

**Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra**

**Estudos em macroalgas carragenófitas
(Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa
- aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos**

Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira

2004

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Biologia, especialidade de Biologia Celular, de acordo com o disposto no n.º 1 do Art. 8º do Dec.-Lei n.º 388/70, de 18 de Agosto.

*À Ana e Mariana,
A Luz da Minha Vida*

DECLARAÇÃO

Para efeitos do disposto no n.º 2 do Art. 8º do Dec.-Lei n.º 388/70, declaro que participei na elaboração de todos os trabalhos que constam desta tese e nos artigos publicados ou enviados para publicação e cujos resultados são parte integrante da presente dissertação.

Coimbra, 30 de Novembro de 2004

Leonel Carlos dos Reis Tomás Pereira

“Observei que todos aqueles produtos do reino vegetal estavam aderentes ao solo apenas por uma base superficial. Sem raízes, indiferentes ao corpo sólido, areia, concha ou seixo, que as suporta, pedem-lhe tão-somente um pouco de apoio e não vitalidade. Estas plantas provêm de si mesmas, e o princípio da sua existência está na água, que as sustenta e as alimenta. A maior parte delas, em vez de folhas, eram providas de lâminas de formas extravagantes, circunscritas numa gama restrita de cores, que não compreendia mais do que o cor-de-rosa, o carmim, o verde, o azeitonado, e o castanho. Tornei a ver ali, mas não secas, como os exemplares do *Nautilus*, as sifonáceas, abertas em leques, que pareciam como que solicitar a brisa, cerâmios escarlates, laminárias estendendo seus pequenos gomos comestíveis, neriocrístias filiformes e flexuosas, que desabrochavam à altura de quinze metros, ramalhetes de acetabulárias, cujos pés crescem pela parte superior, e grande número de outras plantas pelagianas, todas porém sem flores.”

in “Vinte Mil Léguas Submarinas”

Júlio Verne

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor José F. Mesquita, por todo o apoio, disponibilidade, incentivos, ensinamentos e sugestões feitas na elaboração desta dissertação e pela sua revisão final. Agradeço sobretudo a sua amizade e toda a confiança que depositou em mim durante todos estes anos em que tive a honra de ser seu assistente e colaborador.

À Doutora Ana Margarida Amado (Departamento de Química da FCTUC) e Professor Doutor Paulo Ribeiro Claro (CICECO, Laboratório Associado, Universidade de Aveiro) pela preciosa colaboração dada na análise das amostras por FTIR-ATR e FT-Raman.

À Professora Doutora Madalena Caldeira (Departamento de Química, Universidade de Coimbra) e, em particular, ao Doutor Fred van de Velde (Nizo Food Research e Wageningen Centre for Food Sciences, Holanda) pela ajuda na análise das amostras por RMN e por SEC-MALLS, na interpretação dos espectros e pelos comentários pertinentes feitos em relação aos trabalhos publicados e/ou em publicação.

Ao Doutor Alan T. Critchley (Degussa Texturant Systems, França) pela amabilidade na cedência de amostras de carragenófitas, usadas a nível industrial, e pela leitura crítica dos manuscritos entretanto já publicados.

Ao Dr. José S. Dias pelo seu inestimável apoio na preparação e observação do material algal em M.E., e na preparação do material para a análise em EDX.

À Engenheira Marta A. Carmona Ferro e ao Engenheiro Augusto Luís Lopes (Departamento de Engenharia Cerâmica, Universidade de Aveiro) pela ajuda dada nas análises por EDX.

A todos os colegas do Departamento de Botânica, em especial à Professora Doutora Lília Santos, pela amizade demonstrada e interesse pelo meu trabalho, e ao Professor Doutor Manuel Tomé pelo excelente ambiente criado no gabinete, por nós

partilhado, pela permanente disponibilidade no esclarecimento de dúvidas relacionadas com aspectos informáticos (utilização do “Endnote”, etc.) e pela ajuda na utilização do microscópio de fluorescência.

Não posso deixar de agradecer, de uma forma geral, a todos os funcionários do Departamento de Botânica, pela cooperação prestada, em particular ao Sr. José Brasão pelo auxílio técnico no tratamento das amostras, na preparação do material algal para as observações em M.O. e no auxílio dado na preparação e manutenção do equipamento de cultura laboratorial, e ao Sr. Mário Morais pelo apoio técnico dado, a nível informático, fotográfico e na execução de algumas apresentações sob a forma de poster.

Aos meus alunos, de estágio científico, Rui Gaspar, Nuno Gonçalo Dias, Ana Sousa e Helena Coelho pela ajuda dada no ensaio e aplicação dos diferentes métodos de amostragem das carragenófitas.

À Dra. Fátima Costa e D. Emília, da Biblioteca do Departamento de Botânica, pelo apoio dado na pesquisa bibliográfica.

Aos meus colegas do ACM, em particular à Dra. Ludovina Lopes, pelos magníficos momentos de confraternização, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas permanentes manifestações de amizade.

À Reitoria da Universidade de Coimbra, ao Centro de Biologia Vegetal e ao Instituto do Ambiente e Vida, pelo apoio financeiro necessário à execução de parte deste trabalho e algumas deslocações a congressos.

À minha esposa, pela paciência, apoio e carinho demonstrados neste período da minha vida.

À minha família, que sempre me apoiou e encorajou, tanto ao nível profissional como pessoal, aqui fica o meu profundo reconhecimento.

A todos manifesto a minha mais sincera gratidão.

Índice Geral

<i>Agradecimentos</i>	vi
<i>Índice Geral</i>	viii
<i>Índice de Tabelas</i>	xiii
<i>Índice de Figuras</i>	xiv
<i>Abreviaturas</i>	xxi
<i>Resumo</i>	xxiii
<i>Abstract</i>	xxvi
Preâmbulo	xxix
1 – Introdução	1
Enquadramento do trabalho	2
Objectivos	2
1.1 – Caracterização da costa portuguesa	3
1.1.1 – Principais factores ambientais da costa portuguesa	3
1.2 – Flora algal da costa portuguesa (breve resumo)	4
1.3 – Breve revisão das principais características das carragenófitas estudadas	7
1.3.1 – Divisão Rhodophyta (Algas Vermelhas)	7
1.3.2 – Gigartinales	8
1.3.3 – Gigartinaceae	9
1.3.3.a – <i>Gigartina pistillata</i> (S.G. Gmelin) Stackhouse	9
1.3.3.b – <i>Chondrus crispus</i> Stackhouse	10
1.3.3.c – <i>Chondracanthus teedei</i> (Roth) Lamouroux	11
1.3.3.d – <i>Chondracanthus acicularis</i> (Wulfen) Lamouroux	12
1.3.4 – Petrocelidaceae	13
1.3.4.a – <i>Mastocarpus stellatus</i> (Stackhouse) Guiry	13
1.3.5 – Phylloporaceae	14
1.3.5.a – <i>Gymnogongrus crenulatus</i> (Turner) J. Agardh	14
1.3.5.b – <i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i> (Gréville) P.C. Silva & DeCew	15
1.3.6 – Cystocloniaceae	16
1.3.6.a – <i>Calliblepharis jubata</i> (Goodenough & Woodward) Kutzing	16
1.4 - As carragenanas	18
1.4.1 - Estrutura Química	18
1.4.1.a – Descrição geral	18
1.4.1.b – Estrutura molecular	19
1.4.1.c – Modificação alcalina (ou enzimática) das carragenanas	23
1.4.1.d – Carragenanas híbridas	25
1.5 - Análises químicas e estruturais das carragenanas	25
1.5.1 – Isolamento de carragenanas	26
1.5.2 – Fraccionamento de carragenanas	26
1.5.3 – Separação de fracções com baixo peso molecular	27
1.5.4 – Espectroscopia de Infravermelho	27
1.5.5 – Espectroscopia de Raman	29
1.5.6 – Ressonância Magnética Nuclear	30
1.5.7 – Análise cromatográfica	32
1.5.7.a – Determinação do peso molecular	32
1.5.7.b – Conteúdo em sulfato	33
1.5.7.c – Composição monossacáridica	33
1.6 - Propriedades físicas das carragenanas	33
1.6.1 – Solubilidade	33
1.6.2 – Transições cadeia-hélice	34
1.6.3 – Viscosidade	36
1.6.4 – Geleificação	37
1.6.5 – Sinergia com outras gomas	37
1.6.6 – Interação com proteínas	38
1.6.7 – Estabilidade química das carragenanas	38
1.7 – Biologia da parede celular	38

1.7.1 – Variabilidade dos polímeros presentes na parede celular	39
1.7.2 – Localização dos polissacarídeos	39
1.7.3 – Biossíntese das carragenanas	41
1.7.4 – Biodegradação extracelular	43
1.7.5 – Funções Fisiológicas das carragenanas	43
1.8 – Significado taxonómico dos polissacarídeos presentes nas Gigartinales	44
1.9 – Biotecnologia das carragenanas	45
1.9.1 – Técnicas de imobilização em carragenana	46
1.9.2 – Enzimologia da degradação	46
1.9.3 – Enzimas modificadoras de carragenana	46
1.9.4 – Funcionalidades das carragenanas modificadas	47
1.9.5 – Desenvolvimento futuros	48
1.10 - Indústria das carragenanas	48
1.10.1 – Algas usadas na indústria	48
1.10.2 – Apanha de algas	52
1.10.3 – Cultura de carragenófitas	52
1.10.4 – Extracção industrial das carragenanas	54
1.10.5 – Mercado mundial das carragenanas	54
1.10.6 – A indústria de ficocolóides em Portugal	55
1.11 - Utilizações das carragenanas	56
1.11.1 – Segurança alimentar das carragenanas	56
2 – Material e Métodos	58
2.1 – Material algal estudado	59
2.1.1 – Carragenófitas portuguesas estudadas	59
2.1.2 – Carragenófitas usadas a nível industrial	59
2.2 – Estações de colheita	60
2.2.1 – Localização geográfica	61
2.2.2 – Perfil topográfico (Baía de Buarcos)	61
2.2.3 – Dados físico-químicos dos locais de colheita	61
2.3 – Metodologias de amostragem	61
2.3.1 – Estudo ecológico na Baía de Buarcos	61
2.3.1.a – Método dos quadrados: <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	61
2.3.1.b – Método dos quadrados: outras carragenófitas	64
2.3.1.c – Cálculo da cobertura (%)	64
2.3.2 – Variação sazonal do comprimento, percentagem de cada geração (estrutura da população) e do conteúdo em ficocolóides	64
2.3.3 – Análise estatística	66
2.4 – Material algal para herborização e cultura laboratorial	66
2.5 – Cultura laboratorial	66
2.5.1 – Cultura laboratorial de adaptação/manutenção	67
2.5.2 – Cultura em cilindros de “plexiglass”	67
2.6 – Herborização	70
2.7 – Preparação de amostras para FTIR-ATR e FT-Raman	70
2.8 – Extracção dos ficocolóides	70
2.8.1 – Extracção industrial das carragenanas	70
2.8.2 – Extracção laboratorial das carragenanas nativas	71
2.8.3 – Extracção laboratorial alcalina	71
2.9 – Análise das carragenanas por espectroscopia vibracional	73
2.9.1 – FTIR-ATR	73
2.9.2 – FT-Raman	73
2.10 – Análise das carragenanas por espectroscopia de RMN	73
2.10.1 – Revisão dos valores relativos aos deslocamentos químicos em RMN	73
2.10.2 – Tratamento das carragenanas para RMN	74
2.10.3 – ¹ H-RMN	74
2.10.4 – ¹³ C-RMN	75
2.11 – Determinação do peso molecular por SEC-MALLS	75
2.12 – Análise da composição catiónica por ICP-AES	75
2.13 – Estudos citológicos	76
2.13.1 – Microscopia óptica (MO)	76

2.13.2 – Microscopia Electrónica (ME)	76
2.13.3 – Citoquímica	77
2.13.3.a – Microscopia óptica	77
2.13.3.b – Microscopia electrónica	77
3 – Resultados	79
3.1 – Caracterização das estações de colheita e da flora algal associada	80
3.1.1 – Baleal (Peniche)	80
3.1.2 – S. Martinho do Porto	80
3.1.3 – S. Pedro de Moel	80
3.1.4 – Baía de Buarcos	81
3.1.5 – Aguda	81
3.1.6 – Miramar	82
3.1.7 – Lavadores (Salgueiros)	82
3.1.8 – Valadares	82
3.1.9 – A-Ver-o-Mar	83
3.1.10 – Aguçadoura	83
3.1.11 – Apúlia	84
3.1.12 – Praia do Norte (V. do Castelo)	84
3.1.13 – Afife	84
3.1.14 – Vila Praia de Âncora	85
3.1.15 – Moledo	85
3.2 – Estudo ecológico das carragenófitas da Baía de Buarcos	87
3.2.1 – Perfil topográfico do local de estudo	87
3.2.2 – Dados físico-químicos	87
3.2.3 – Estudo de uma população de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	89
3.2.3.a – Variação sazonal do comprimento e da biomassa	89
3.2.3.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	89
3.2.3.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	90
3.2.4 – Estudo de uma população de <i>Chondrus crispus</i>	90
3.2.4.a – Variação sazonal do comprimento	90
3.2.4.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	90
3.2.4.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	93
3.2.5 – Estudo de uma população de <i>Gigartina pistillata</i>	93
3.2.5.a – Variação sazonal do comprimento	93
3.2.5.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	93
3.2.5.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	96
3.2.6 – Estudo de uma população de <i>Chondracanthus acicularis</i>	96
3.2.6.a – Variação sazonal do comprimento	96
3.2.6.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	96
3.2.6.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	96
3.2.7 – Estudo de uma população de <i>Mastocarpus stellatus</i>	98
3.2.7.a – Variação sazonal do comprimento	98
3.2.7.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	98
3.2.7.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	98
3.2.8 – Estudo de uma população de <i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i>	102
3.2.8.a – Variação sazonal do comprimento	102
3.2.8.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	102
3.2.8.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	103
3.2.9 – Estudo de uma população de <i>Gymnogongrus crenulatus</i>	104
3.2.9.a – Variação sazonal do comprimento	104
3.2.9.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	104
3.2.9.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	105
3.2.10 – Estudo de uma população de <i>Calliblepharis jubata</i>	105
3.2.10.a – Variação sazonal do comprimento	106
3.2.10.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração	106
3.2.10.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana	106
3.2.11 – Estudo comparativo das carragenófitas presentes em Buarcos	109
3.2.11.a – Comprimento	109
3.2.11.b – Peso seco e conteúdo em carragenana	109

3.2.11.c – Cobertura no Outono/Inverno e Primavera/Verão	110
3.2.11.d – Dominância quantitativa	110
3.3 – Estudo das variações geográficas das carragenófitas	112
3.3.1 – Dados físico-químicos	112
3.3.2 – Distribuição das carragenófitas pelas estações de colheita	113
3.3.3 – <i>C. crispus</i>	114
3.3.3.a – Variação geográfica do comprimento	114
3.3.3.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	114
3.3.3.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	114
3.3.4 – <i>G. pistillata</i>	117
3.3.4.a – Variação geográfica do comprimento	117
3.3.4.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	117
3.3.4.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	117
3.3.5 – <i>C. teedei</i>	120
3.3.5.a – Variação geográfica do comprimento	120
3.3.5.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	120
3.3.5.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	120
3.3.6 – <i>C. acicularis</i>	123
3.3.6.a – Variação geográfica do comprimento	123
3.3.6.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	123
3.3.6.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	123
3.3.7 – <i>M. stellatus</i>	124
3.3.7.a – Variação geográfica do comprimento	124
3.3.7.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	124
3.3.7.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	124
3.3.8 – <i>A. devoniensis</i>	127
3.3.8.a – Variação geográfica do comprimento	127
3.3.8.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	127
3.3.8.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	127
3.3.9 – <i>G. crenulatus</i>	127
3.3.9.a – Variação geográfica do comprimento	127
3.3.9.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	127
3.3.9.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	129
3.3.10 – <i>C. jubata</i>	130
3.3.10.a – Variação geográfica do comprimento	130
3.3.10.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração	130
3.3.10.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana	130
3.3.11 – Estudo comparativo das carragenófitas com distintas origens geográficas	133
3.3.11.a – Comprimento	133
3.3.11.b – Peso seco e conteúdo em carragenana	133
3.3.12 – Estudo comparativo global das carragenófitas	134
3.3.12.a – Peso seco	134
3.3.12.b – Conteúdo em carragenana	134
3.4 – Cultura laboratorial	136
3.4.1 – Evolução da biomassa	136
3.4.1.a – <i>M. stellatus</i>	136
3.4.1.b – <i>G. pistillata</i>	136
3.4.2 – Estudo comparativo da relação peso seco/peso fresco e conteúdo em carragenanas entre o material cultivado e o material selvagem	137
3.4.2.a – <i>M. stellatus</i>	137
3.4.2.b – <i>G. pistillata</i>	138
3.5 – Análise das carragenanas por espectroscopia vibracional	139
3.5.1 – Análise por FTIR-ATR de amostras padrão de carragenana	139
3.5.2 – Análise por FT-Raman de amostras padrão de carragenana	140
3.5.3 – Análise por FTIR-ATR e FT-Raman directamente em pó de alga	147
3.5.4 – Análise dos ficocolóides produzidos pelas carragenófitas	148
3.5.4.a – Carragenófitas portuguesas	148
3.5.4.b – Carragenófitas usadas a nível industrial e outras carragenófitas	159
3.6 – Análise dos ficocolóides por RMN	169
3.6.1 – Análise por ¹ H-RMN de amostras padrão de carragenana	169

3.6.2 – Análise por ¹³ C-RMN de amostras padrão de carragenana	170
3.6.3 – Análise dos ficocolóides produzidos pelas carragenófitas	171
3.6.3.a – Carragenófitas portuguesas	171
3.6.3.b – Carragenófitas usadas a nível industrial	183
3.7 – Peso molecular, composição catiónica das carragenanas estudadas e “diagrama de Stancioff”	183
3.7.1 – Peso molecular de carragenanas extraídas de carragenófitas portuguesas	183
3.7.2 – Peso molecular, composição catiónica e “diagrama de Stancioff”	184
3.7.2.a – Composição catiónica das carragenanas em estado bruto	184
3.7.2.b – Composição das amostras purificadas	185
3.8 – Aspectos morfológicos, anatómicos, citológicos e citoquímicos de carragenófitas seleccionadas	187
3.8.1 – <i>C. teedei</i> e <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (Gigartinales)	187
3.8.2 – <i>G. pistillata</i> (Gigartinales)	194
3.8.3 – <i>G. crenulatus</i> e <i>A. devoniensis</i> (Phylloporaceae)	201
3.8.4 – Aspectos citoquímicos	202
3.8.4.a – Técnicas de coloração citoquímica	202
3.8.4.b – Micro-análise EDX	203
4 – Discussão	204
4.1 – Organização e natureza bioquímica dos polissacarídeos presentes nas carragenófitas	205
4.1.1 – Aspectos ultrastruturais de algumas Gigartinales estudadas	205
4.1.2 – Localização celular dos polímeros de celulose e de carragenana	206
4.1.3 – Extracção das carragenanas	207
4.1.4 – Uso da espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman) na caracterização dos ficocolóides	209
4.1.5 – Uso de RMN (¹ H e ¹³ C) na caracterização dos ficocolóides	213
4.1.5.a – Revisão dos valores dos deslocamentos químicos das carragenanas de acordo com as recomendações da IUPAC	214
4.1.6 – Revisão do significado quimiotaxonomico de alguns ficocolóides presentes em algas economicamente importantes (Gigartinales, Rhodophyceae)	215
4.1.6.a – Desenvolvimentos recentes	220
4.2 – Biogeografia das carragenófitas	227
4.2.1 – Flora algal da área geográfica estudada	227
4.2.2 – Amostragem das carragenófitas	228
4.2.3 – Estudo da cobertura, biomassa e dominância quantitativa das principais espécies algais da baía de Buarcos	230
4.2.4 – Distribuição das carragenófitas pelas diferentes estações costeiras	230
4.3 – Aspectos ecológicos e ecofisiológicos das espécies estudadas	231
4.4 – Potencialidades industriais das carragenófitas portuguesas	236
5 – Conclusões e Perspectivas Futuras	238
6 – Referências Bibliográficas	245
Anexo I – Lista das algas colhidas	282
Anexo II – Utilização das carragenanas	289
Aplicações na área alimentar	289
Indústria dos produtos lácteos e confeitaria	289
Alimentos de base aquosa	290
Produtos à base de carne	290
Alimentos para animais	291
Aplicações em áreas não alimentares	291
Aplicações técnicas	291
Aplicações médicas	291
Aplicações farmacêuticas	292
Agricultura	292
Ambientadores em gel	292
Pastas de dentes	292

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Diferentes tipos de carragenana (Adaptado de Stortz <i>et al.</i> 1997 e Amimi <i>et al.</i> 2001)	21
Tabela 1.2 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da espectroscopia de infravermelho (Segundo Chopin e Whalen, 1993)	29
Tabela 1.3 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da ressonância magnética nuclear do ¹³ C	31
Tabela 1.4 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da ressonância magnética nuclear do ¹ H (Segundo Ciancia <i>et al.</i> , 1993; Stortz <i>et al.</i> , 1994)	32
Tabela 1.5 – Reagentes usados na localização <i>in situ</i> de polímeros (Segundo Gretz <i>et al.</i> 1997)	40
Tabela 1.6 – Colheita anual de carragenófitas, em toneladas de peso seco (dados de 2001).....	52
Tabela 1.7 – Aplicações das carragenanas na área alimentar (Segundo van de Velde e de Ruiter, 2002)	57
Tabela 2.1 – Carragenófitas portuguesas estudadas	59
Tabela 2.2 – Carragenófitas usadas a nível industrial	60
Tabela 2.3 – Deslocamentos químicos, para cada um dos compostos standard internos, em espectroscopia de RNM (em sistemas aquosos)	74
Tabela 3.1 – Dominância quantitativa das 12 espécies mais representativas no período Outono/Inverno	112
Tabela 3.2 – Dominância quantitativa das 13 espécies mais representativas no período Primavera/Verão	112
Tabela 3.3 – Dados físico-químicos das estações de colheita	113
Tabela 3.4 – Distribuição das carragenófitas pelas diferentes estações de colheita	113
Tabela 3.5-A – Identificação dos diferentes tipos de carragenana por FTIR-ATR	140
Tabela 3.5-B – Identificação dos diferentes tipos de carragenana por FT-Raman	141
Tabela 3.6 – Composição das carragenanas produzidas pelas carragenófitas portuguesas estudadas, determinada por espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman)	153
Tabela 3.7 – Composição das carragenanas produzidas pelas carragenófitas usadas a nível industrial, determinada por espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman)	167
Tabela 3.8 – Deslocamentos químicos (ppm) dos prótons α -anoméricos das carragenanas, com referência ao standard interno DSS a 0 ppm	169
Tabela 3.9 – Deslocamentos químicos ¹³ C-RMN (ppm) das principais carragenanas, com referência ao standard interno DSS a 0 ppm	170
Tabela 3.10 – Composição das carragenanas produzidas por cada carragenófitas estudada, determinada por espectroscopia de ¹ H-RMN	180
Tabela 3.11 – Quadro síntese da análise da composição (por espectroscopia de ¹ H-RMN) das carragenanas obtidas a partir das diferentes carragenófitas portuguesas estudadas	182
Tabela 3.12 – Composição molecular das carragenanas produzidas comercialmente baseada em espectroscopia de ¹ H-NMR	183
Tabela 3.13 – Peso molecular médio das carragenanas extraídas	184
Tabela 3.14 – Peso molecular médio da solução de carragenanas	184
Tabela 3.15 – Composição catiónica determinada por ICP-AES (%mole)	185
Tabela 3.16 – Composição das amostras purificadas	186
Tabela 4.1 – Ficolóides presentes nas espécies pertencentes às famílias, economicamente importantes, da ordem Gigartinales.....	225

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Subdivisões biogeográficas do Atlântico oriental (Segundo Afonso <i>et al.</i> , 2000)	5
Figura 1.2 – Temperatura à superfície do mar, na costa portuguesa, no Inverno (A) e na Primavera (B). As principais correntes marinhas que afectam a costa portuguesa encontram-se representadas por setas largas (Adaptado de Martins, 1993)	5
Figura 1.3 – Cladograma terminal das espécies carragenófitas (Segundo Freshwater <i>et al.</i> , 1994)	8
Figura 1.4 – Espécies estudadas (Gigartinales, Rhodophyta): <i>Gigartina pistillata</i> (A); <i>Chondrus crispus</i> (B); <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (C); <i>Chondracanthus acicularis</i> (D); <i>Mastocarpus stellatus</i> (E); <i>Gymnogongrus crenulatus</i> (F); <i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i> (G); <i>Calliblepharis jubata</i> (H)	17
Figura 1.5 – A carragenana é constituída pela alternância de unidades de β -D-galactose e de α -D-galactose, ou de 3,6-anidrogallactose (Segundo Chaplin, 2003)	20
Figura 1.6 – Representação esquemática das unidades repetitivas idealizadas presentes nas carragenanas estudadas nesta dissertação (Segundo van de Velde <i>et al.</i> , 2004)	22
Figura 1.7 – Interação entre o sulfato em C-2 da unidade G e o hidroxil em C-3 da unidade D (Segundo Ciancia <i>et al.</i> , 2002)	23
Figura 1.8 – Conversão das carragenanas μ e ν (precursores biológicos das carragenanas gelificantes) em carragenanas κ (A) e ι (B), e da carragenana λ em θ (Segundo Chaplin, 2003)	24
Figura 1.9 – Mecanismo de gelificação das carragenanas: A – Logo que a temperatura desce, as cadeias moleculares reagrupam-se aos pares, associando-se duas a duas, pela acção dos iões de cálcio. Logo que a temperatura se eleva, inicia-se o processo inverso, a fusão (Segundo Rees, 1963); B – No processo de gelificação, as cadeias de carragenana colocam-se de maneira que as zonas ricas em radicais hidrófobos fiquem face a face (Segundo Paoletti <i>et al.</i> , 1984)	35
Figura 1.10 – Ponte intra-molecular de potássio na carragenana κ , segundo Tako e Nakamura (1986a)	35
Figura 1.11 – Representação esquemática das pontes inter-moleculares de cálcio na carragenana ι , segundo Tako <i>et al.</i> (1987)	36
Figura 1.12 – Algumas das carragenófitas usadas na indústria	51
Figura 2.1 – Localização das diferentes estações de colheita	62
Figura 2.2 – Determinação do número mínimo de quadrados a usar na amostragem de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> ...	63
Figura 2.3 – Baía de Buarcos: localização (A); zona de amostragem (B); método das escalas móveis (C); determinação do tamanho dos quadrados a usar (D); amostragem não destrutiva com um quadrado de 1 m ² (E)	65
Figura 2.4 – Colheita e cultura laboratorial de carragenófitas: colheita das algas inteiras com auxílio de uma faca (A); cultura em baldes de vidro (B); equipamento de esterilização por UV (C); cultura de manutenção em aquário (D); cilindro de “plexiglass” para produção de biomassa (E)	69
Figura 2.5 – Preparação das amostras para análise espectroscópica e extracção das carragenanas: lavagem das amostras (A); secagem numa estufa a 60 °C (B); remoção da componente organosolúvel (C); despigmentação das amostras para FT-Raman (D); extracção dos ficocolóides em banho-maria (E); evaporação da solução de carragenana (F); carragenana sob a forma de coágulo esbranquiçado (G)	72
Figura 3.1 – Estações de colheita localizadas entre a foz do rio Minho e a foz do rio Ave: A – imagem satélite da zona entre Viana do Castelo a Caminha; B – imagem satélite da zona de Esposende; C – imagem satélite da zona de Póvoa de Varzim; D – Moledo; E – apanha de “musgo” em Vila Praia de Âncora; F – Affife; G – Praia do Norte; H – “medas” em A-Ver-o-Mar	86

Figura 3.2 – Perfil topográfico do local de estudo: o substrato rochoso, onde foram efectuadas as amostragens, situa-se no horizonte inferior do patamar médiolitoral	87
Figura 3.3 – Temperatura do ar e da água (A), salinidade e pH da água (B) na Baía de Buarcos. Variação do comprimento e biomassa de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (C)	88
Figura 3.4 – Estrutura de uma população de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> da Baía de Buarcos	89
Figura 3.5 – Variação mensal do conteúdo em carragenana (B) e variação mensal do peso seco (A) nas diferentes gerações de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (C)	91
Figura 3.6 – Variação do comprimento de <i>C. crispus</i>	92
Figura 3.7 – Estrutura de uma população de <i>C. crispus</i> da Baía de Buarcos	92
Figura 3.8 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. crispus</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>C. crispus</i> (C)	94
Figura 3.9 – Variação do comprimento (média ± erro padrão, n = 100) de <i>G. pistillata</i>	95
Figura 3.10 – Estrutura de uma população de <i>G. pistillata</i> da Baía de Buarcos	95
Figura 3.11 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>G. pistillata</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>G. pistillata</i> (C)	97
Figura 3.12 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. acicularis</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>C. acicularis</i> (C)	99
Figura 3.13 – Variação do comprimento de <i>M. stellatus</i>	100
Figura 3.14 – Estrutura de uma população de <i>M. stellatus</i> da Baía de Buarcos	100
Figura 3.15 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>M. stellatus</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>M. stellatus</i> (C)	101
Figura 3.16 – Variação do comprimento de <i>A. devoniensis</i>	102
Figura 3.17 – Variação do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>A. devoniensis</i>	103
Figura 3.18 – Variação do comprimento de <i>G. crenulatus</i>	104
Figura 3.19 – Variação do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>G. crenulatus</i>	105
Figura 3.20 – Variação do comprimento de <i>C. jubata</i>	107
Figura 3.21 – Estrutura de uma população de <i>C. jubata</i>	107
Figura 3.22 – Variação mensal do peso seco (A) e do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. jubata</i> . Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>C. jubata</i> (C)	108
Figura 3.23 – Comprimento médio das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos	109
Figura 3.24 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) médios das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos	110
Figura 3.25 – Cobertura das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos, nos períodos de Outono/Inverno e de Primavera/Verão	111
Figura 3.26 – Representação iconográfica da cobertura e distribuição das espécies mais representativas, nos períodos de Outono/Inverno (A) e de Primavera/Verão (B)	111
Figura 3.27 – Variação do comprimento de <i>C. crispus</i> nas diferentes estações de colheita	115
Figura 3.28 – Estrutura da população de <i>C. crispus</i> nas diferentes estações de colheita	115
Figura 3.29 – Variação geográfica do peso seco (A) e do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. crispus</i> . Variação do conteúdo em carragenana e peso seco de <i>C. crispus</i> (C)	116
Figura 3.30 – Variação do comprimento de <i>G. pistillata</i> nas diferentes estações de colheita	118
Figura 3.31 – Estrutura da população de <i>G. pistillata</i> nas diferentes estações de colheita	118
Figura 3.32 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>G. pistillata</i> . Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (C)	119

Figura 3.33 – Variação do comprimento de <i>C. teedei</i> nas diferentes estações de colheita	121
Figura 3.34 – Estrutura da população de <i>C. teedei</i> nas diferentes estações de colheita	121
Figura 3.35 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. teedei</i> . Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (C)	122
Figura 3.36 – Variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana no <i>C. acicularis</i>	123
Figura 3.37 – Variação do comprimento de <i>M. stellatus</i> nas diferentes estações de colheita	125
Figura 3.38 – Estrutura da população de <i>M. stellatus</i> nas diferentes estações de colheita	125
Figura 3.39 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>M. stellatus</i> . Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (C)	126
Figura 3.40 – Variação do comprimento de <i>A. devoniensis</i> nas diferentes estações de colheita	128
Figura 3.41 – Variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana no <i>A. devoniensis</i>	128
Figura 3.42 – Variação do comprimento de <i>G. crenulatus</i> nas diferentes estações de colheita	129
Figura 3.43 – Estrutura da população de <i>G. crenulatus</i> nas diferentes estações de colheita	129
Figura 3.44 – Variação do comprimento de <i>C. jubata</i> nas diferentes estações de colheita	131
Figura 3.45 – Estrutura da população de <i>C. jubata</i> nas diferentes estações de colheita	131
Figura 3.46 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de <i>C. jubata</i> . Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (C)	132
Figura 3.47 – Comprimento médio de cada carragenófito	133
Figura 3.48 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) de cada carragenófito	134
Figura 3.49 – Estudo comparativo das carragenófitas relativamente ao peso seco	135
Figura 3.50 – Estudo comparativo das carragenófitas relativamente ao conteúdo em carragenana	135
Figura 3.51 – Evolução do peso fresco e da velocidade de crescimento do <i>M. stellatus</i> cultivado em cilindro de “plexiglass”	136
Figura 3.52 – Evolução do peso fresco e da velocidade de crescimento da <i>G. pistillata</i> cultivada em cilindro de “plexiglass”	137
Figura 3.53 – Peso seco e conteúdo em carragenana do <i>M. stellatus</i> selvagem, cultivada em aquário e em cilindro de “plexiglass”	138
Figura 3.54 – Peso seco e conteúdo em carragenana do <i>G. pistillata</i> selvagem, cultivada em aquário e em cilindro de “plexiglass”	138
Figura 3.55 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana kappa; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	142
Figura 3.56 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana iota; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de <i>Eucheuma denticulatum</i>	143
Figura 3.57 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana híbrida kappa/iota; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	144
Figura 3.58 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana híbrida beta/kappa; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de <i>Betaphycus gelatinum</i>	145
Figura 3.59 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana lambda; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de <i>Chondrus crispus</i>	146
Figura 3.60 – Espectros FT-Raman de carragenan ksi/tetha (A) e de talos tetraspóricos de <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (B); Espectros FTIR-ATR de carragenana ksi/tetha (C) e de talos tetraspóricos de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (D)	146
Figura 3.61 – Espectro FT-Raman de pó de alga (gametófitos femininos de <i>C. crispus</i>) tratado com uma mistura de acetona e metanol (A). Espectro FT-Raman de alga fresca tratada com hipoclorito de cálcio 4% (30 s), posteriormente	

seca e moída (B). Espectro de alga seca moída (obtida a partir de um exemplar de herbário) tratada com hipoclorito de cálcio 4% (60 s) (C). Espectro da carragenana nativa extraída de <i>C. crispus</i> (D)	147
Figura 3.62 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (A) <i>C. crispus</i> (talos não-frutificados); (B) <i>C. crispus</i> (gametófitos femininos); (C) <i>M. stellatus</i> (gametófitos femininos); (D) <i>G. pistillata</i> (gametófitos femininos)	149
Figura 3.63 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (E) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (gametófitos femininos); (F) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (talos não-frutificados)	149
Figura 3.64 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (G) <i>A. devoniensis</i> (gametófitos femininos); (H) <i>A. devoniensis</i> (talos não-frutificados); (I) <i>G. crenulatus</i> (talos tetrasporoblásticos); (J) <i>A. devoniensis</i> (gametófitos femininos)	150
Figura 3.65 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (L) <i>C. jubata</i> (talos não-frutificados); (M) <i>C. jubata</i> (tetrasporófitos); (N) <i>C. jubata</i> (gametófitos femininos); (O) <i>G. crenulatus</i> (talos tetrasporoblásticos); (P) <i>E. denticulatum</i>	150
Figura 3.66 – Espectros de FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (Q) <i>C. crispus</i> (tetrasporófitos), (R) <i>G. pistillata</i> (talos heterospóricos), (S) <i>G. pistillata</i> (tetrasporófitos), (T) <i>C. acicularis</i> (tetrasporófitos), (U) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (tetrasporófitos)	151
Figura 3.67 – Espectros de FTIR-Raman de carragenanas extraídas alcalinamente: (Q) <i>C. crispus</i> (tetrasporófitos), (R) <i>G. pistillata</i> (talos heterospóricos), (S) <i>G. pistillata</i> (tetrasporófitos)	151
Figura 3.68 – Espectros de FTIR-Raman de carragenanas extraídas alcalinamente: (T) <i>C. acicularis</i> (tetrasporófitos), (U) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (tetrasporófitos).....	152
Figura 3.69 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (A) <i>C. crispus</i> (talos não-frutificados); (B) <i>C. crispus</i> (gametófitos femininos); (C) <i>M. stellatus</i> (gametófitos femininos); (D) <i>G. pistillata</i> (gametófitos femininos); (E) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (talos não-frutificados). Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos percursos biológicos e as setas largas indicam os picos correspondentes às carragenanas principais (iota e kappa, respectivamente)	154
Figura 3.70 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (F) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (gametófitos femininos); (G) <i>A. devoniensis</i> (gametófitos femininos); (H) <i>A. devoniensis</i> (talos não-frutificados); (L) <i>C. jubata</i> (talos não-frutificados); (N) <i>C. jubata</i> (gametófitos femininos). Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos percursos biológicos e as setas largas indicam os picos correspondentes às carragenanas principais (iota e kappa, respectivamente)	155
Figura 3.71 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (V) <i>G. pistillata</i> (Talos Heterospóricos - ramificações portadoras de cistocarpos); (D) <i>G. pistillata</i> (Gametófitos Femininos). (*) Espectro FT-Raman da carragenana nativa kappa/iota/mu/nu. Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes às carragenanas predominantes (kappa e iota) e as setas indicam os picos correspondentes aos precursores biológicos (só indicados no espectro V)	156
Figura 3.72 – Espectros FT-Raman: (Q) <i>C. crispus</i> (Tetrasporófitos); (R) <i>G. pistillata</i> (Talos Heterospóricos - ramificações portadoras de soros de tetrasporocistos); (S) <i>G. pistillata</i> (Tetrasporófitos - carragenana extraída alcalinamente). (*) Espectro FT-Raman de uma amostra comercial de carragenana lambda pura (WCFS)	157
Figura 3.73 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (T) <i>C. acicularis</i> (Tetrasporocistos); (U) <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (Tetrasporocistos)	158
Figura 3.74 – Espectros FTIR-ATR: (E1 – E7) carragenana nativa de <i>K. alvarezii</i> do Panamá (carragenana extraída e analisada após períodos crescentes de cultura da alga); (D3) pó de alga de <i>K. alvarezii</i> da Indonésia; (D1) pó de alga de <i>K. alvarezii</i> da Tanzânia; (D4) pó de alga de <i>K. alvarezii</i> das Filipinas.....	161
Figura 3.75 – Espectros FT-Raman: D1 – pó de alga de <i>K. alvarezii</i> (Tanzânia); D4 – pó de alga de <i>K. alvarezii</i> (Filipinas); D5 – pó de alga de <i>K. striatum</i> (Madagáscar); D15 – pó de alga de <i>K. isiforme</i> (Colômbia); E6 – carragenana nativa de <i>K. alvarezii</i> (Panamá); D3 – pó de alga de <i>K. alvarezii</i> (Indonésia)	162

Figura 3.76 – Espectros de FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de <i>C. crispus</i> (D6), com origem no Canadá. Visto tratar-se de uma mistura de gerações (amostra industrial), os espectros apresentam, simultaneamente, picos característicos da carragenana híbrida kappa/iota e da carragenana lambda	163
Figura 3.77 – Espectros de FTIR-ATR e FT-Raman de <i>C. chamissoi</i> (Chile): D11a – gametófitos femininos; D11b – tetrasporófitos; D11c – talos não-frutificados	164
Figura 3.78 – Espectros de FTIR-ATR e FT-Raman de <i>E. denticulatum</i> : D8 – Tanzânia; D9 – Filipinas. Esta espécie, em ambos os casos, produz predominantemente carragenana iota	165
Figura 3.79 – Espectros de FTIR-ATR e FT-Raman de <i>B. gelatinum</i> (Filipinas): D12a – pó de alga; D12b – carragenana híbrida kappa/beta (extraída alcalinamente)	166
Figura 3.80 – Carragenófitas usadas a nível industrial: D1 – <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Tanzânia); D2 – <i>Sarchothalia crispata</i> (Chile); D3 – <i>K. alvarezii</i> (Indonésia); D4 – <i>K. alvarezii</i> (Filipinas); D5 – <i>K. striatum</i> (Madagáscar); D6 – <i>Chondrus crispus</i> (Canadá); D7 – <i>K. alvarezii</i> (Filipinas); D8 – <i>Eucheuma denticulatum</i> (Tanzânia); D9 – <i>E. denticulatum</i> (Filipinas); D10 – <i>E. denticulatum</i> (Madagáscar); D11a – imagem à lupa de <i>Chondracanthus chamissoi</i> GF (Chile); D11b – imagem à lupa de <i>C. chamissoi</i> T (Chile); D11c – <i>C. chamissoi</i> NF (Chile); D12 – <i>Betaphycus gelatinum</i> (Filipinas); D15 – <i>E. isiforme</i> (Colômbia)	168
Figura 3.81 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i> : A, B, C, D, E (gametófitos, extracção alcalina)	173
Figura 3.82 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Calliblepharis jubata</i> : F (talos não frutificados – extracção alcalina); G (talos não frutificados – extracção alcalina); H (gametófitos femininos – extracção alcalina); I (tetrasporófitos – extracção alcalina)	174
Figura 3.83 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Chondracanthus acicularis</i> : J (gametófito feminino - extracção alcalina); L (gametófito feminino - extracção aquosa); M (mistura de gerações ou talos heterospóricos – extracção alcalina).....	175
Figura 3.84 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : N (talos não frutificados – extracção alcalina); O (talos não frutificados – extracção alcalina); P (gametófitos femininos – extracção alcalina); Q (gametófitos femininos – extracção alcalina); R (talos não frutificados – extracção aquosa); S (gametófitos femininos – extracção aquosa)	176
Figura 3.85 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : T (tetrasporófitos - extracção alcalina); U (tetrasporófitos - extracção aquosa); V (tetrasporófitos – transformação alcalina da amostra U)	177
Figura 3.86 – Espectros ¹³ C-NMR das carragenanas extraídas de <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : P (gametófitos femininos - extracção alcalina); N (talos não frutificados - extracção alcalina); U (tetrasporófitos – extracção aquosa); T (tetrasporófitos – extracção alcalina)	177
Figura 3.87 – Espectros ¹ H-RMN de uma amostra comercial (WCFS) de carragenana lambda e das carragenanas extraídas de gametófitos femininos (GF) de <i>C. crispus</i> e <i>G. pistillata</i> , de tetrasporófitos (T) e de talos heterospóricos – ramos portadores de soros tetraspóricos (H [⊕]) de <i>Gigartina pistillata</i> (extracção alcalina)	178
Figura 3.88 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Gymnogongrus crenulatus</i> : Y (talos tetrasporoblásticos - extracção alcalina); Z (talos tetrasporoblásticos - extracção alcalina); W (talos tetrasporoblásticos – extracção alcalina)	179
Figura 3.89 – Espectros ¹ H-NMR das carragenanas extraídas de <i>Mastocarpus stellatus</i> : K (gametófitos - extracção alcalina); Xb (gametófitos de cultura laboratorial - extracção alcalina)	181
Figura 3.90 – Conteúdo da fracção kappa em carragenanas híbridas kappa/iota purificadas	186
Figura 3.91 – <i>Chondracanthus teedei</i> : talos não-frutificados colhidos em Roscoff, França (A, B e C); talo tetraspórico (D e F), não-frutificado (E e G) e gametófito feminino (H e I), colhidos no Baleal; talo não-frutificado de <i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> colhido em Buarcos (J e L) e visto em pormenor (M)	188

Figura 3.92 – <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : gametófito feminino frutificado, portador da geração carposporófito, colhido em Buarcos (A e B); detalhe de um ramo portador de cistocarpos (C); corte transversal de cistocarpos segundo orientação indicada na figura C (D e E); carpósporos no interior do cistocarpo (F); corte transversal do talo segundo a orientação indicada na figura C (G e H). Coloração pelo lactofenol azul (D a H)	189
Figura 3.93 – <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : ultraestrutura do gametófito feminino frutificado, mostrando parcialmente uma célula plurinucleada (A) e alguns aspectos da diferenciação dos carpósporos (B e C); pormenores ultraestruturais de um carporocisto, nomeadamente no respeitante ao núcleo, cloroplastos, Golgi e vesículas nucleadas (D); notar a abundância de grãos de amido florídeo que dão reacção positiva ao “teste de Thiéry” (E)	190
Figura 3.94 – <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : tetrasporófito frutificado, portador de tetrasporocistos, colhido em Buarcos (A, B e C); detalhe de ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C); corte transversal de um ramo ao nível de um soro de tetrasporocisto, segundo a orientação indicada na figura D (E); detalhes mostrando tetrasporocistos e tetrásporos (F e G); corte transversal do talo segundo orientação indicada na figura C (H); detalhes mostrando o córtex (I), zona de transição (J) e medula (L). Coloração pelo azul de toluidina (E e F) e pelo lactofenol azul (G a L)	191
Figura 3.95 – <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (ultraestrutura do tetrasporocisto): fases sucessivas da formação dos tetrásporos por divisão cruciada do tetrasporocisto (A a D); Vistas parciais de dois estádios de maturação de tetrasporocistos mostrando detalhes ultraestruturais do núcleo e cloroplastos (E), do Golgi e vesículas nucleadas (F)	192
Figura 3.96 – <i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> : aspectos citoquímicos em MO e ME da geração tetrasporófito, mostrando tetrasporocistos após “coloração” pelo PAS (D), negro de Sudão B (E) e técnica de Thiéry (A, B e C). Notar que reagem positivamente a esta técnica não só o amido florídeo, mas também as vesículas nucleadas, os vacúolos fibrilares e algumas porções da parede	193
Figura 3.97 – <i>Gigartina pistillata</i> : gametófito feminino frutificado, portador da geração carposporófito (A a N); ramos portadores de cistocarpos (C e D); corte transversal do talo, segundo orientação indicada na figura C (E e F); aspectos citoquímicos em MO, mostrando um corte transversal do talo (aspecto geral) após “coloração” pelo azul de toluidina (G), branco de calcoflúor (H) e observado num microscópio de polarização (I); aspectos citoquímicos mostrando a zona medular (J) após “coloração” pelo azul de toluidina (L), branco de calcoflúor (M) e observada num microscópio de polarização (N)	195
Figura 3.98 – <i>Gigartina pistillata</i> : tetrasporófito frutificado, portador de soros de tetrasporocistos (A a G); ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C e D); corte transversal de um ramo ao nível de um soro de tetrasporocisto, segundo a orientação indicada na figura D (E); corte transversal do talo segundo orientação indicada na figura D (F e G). Coloração pelo azul de toluidina (G)	196
Figura 3.99 – <i>Gigartina pistillata</i> : talo heterospórico (A) apresentando ramos portadores de cistocarpos (zona esquerda do talo) e de soros de tetrasporocistos (zona direita do talo); ampliações dos ramos portadores de cistocarpos (B) e dos ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C)	196
Figura 3.100 – <i>Gigartina pistillata</i> : carposporogénese (A a H); aspectos citoquímicos em MO e ME após “coloração” pelo azul de toluidina (A e B), PAS (C e D), negro de Sudão B (E e F) e técnica de Thiéry (G)	197
Figura 3.101 – <i>Gigartina pistillata</i> : tetrasporogénese (A a H); aspectos citoquímicos em MO e ME após “coloração” pelo azul de toluidina (A e B), PAS (C e D), negro de Sudão B (E e F) e técnica de Thiéry (G)	198
Figura 3.102 – <i>Gigartina pistillata</i> (talo heterospórico): A – ultraestrutura do carpósporo em desenvolvimento (carposporogénese); B – ultraestrutura da formação dos tetrásporos (tetrasporogénese)	199
Figura 3.103 – <i>Gigartina pistillata</i> : A – cultura laboratorial de gametófitos femininos; B – corte transversal do talo segundo orientação indicada na figura A, corado pelo azul de toluidina; C – corte transversal feito num talo submetido a um processo de extracção das carragenanas, corado pelo azul de toluidina; D – ultraestrutura de uma célula cortical e respectiva parede celular	200

Figura 3.104 – *Gymnogongrus crenulatus*: talo tetrasporoblástico (A a D), portador de tetrasporoblastos (C); corte transversal do tetrasporoblasto segundo orientação indicada na figura C (D); corte transversal do talo segundo a orientação indicada na figura C (E a G), corados pelo azul de toluidina (E), branco de calcoflúor (F) e observado num microscópio de polarização (G)201

Figura 3.105 – *Ahnfeltiopsis devoniensis*: gametófito feminino frutificado, portador da geração carposporófito (A a C); ramos portadores de cistocarpos - setas (C); corte transversal do talo, segundo orientação indicada na figura C (D a F); aspectos citoquímicos em MO, mostrando um corte transversal do talo após “coloração” pelo branco de calcoflúor (D e E) e observado num microscópio de polarização (F)202

Abreviaturas

% – Percentagem
‰ – Permilagem
µg – Micrograma
µm – Micrómetro
µmole – Micromole
A – 3,6-Anidrogactose
ACS – American Chemical Society
AES – Optical Emission Spectroscopy (OES)
AMF – Alkali-Modified Flour
ANOVA – Analysis of Variance
ARC – Alternative Refined Carrageenan
ATR – Attenuated Total Reflectance
CBH – Celobiohidrolase
cm – Centímetro
cP – Centipoise
D – α-D-galactose
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Deoxyribonucleic Acid
DRIFTS – Diffuse Reflectance Fourier Transform Spectroscopy
DSS – Sal de sódio 2,2-dimetil-2-silapentano-3,3,4,4,5,5-*d*₆-5-sulfonato
EDX – Energy-Dispersive X-Ray
ERF – Enzyme Resistant Fraction
EUC – European Union Committee
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drug Administration
FITC – Fluoresceína Isotiocianato
FT – Fourier Transform
G – β-D-Galactose
GF – Gametófito Feminino
GLC – Gas Liquid Chromatography
GPC – Gel Permeation Chromatography
h – Hora
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
ICP – Inductively Coupled Plasma
IR – Infrared
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
JEFCA – Expert Committee on Food Additives and Contaminants
kDa – Kilodalton
Kg – Quilograma
kHz – Kiloherz
l – Litro
m – Metro
M – Molar
MALLS – Multi-Angle Laser-Light Scattering

ME – Microscopia Electrónica
MeOH – Metanol
mg – Miligrama
MHz – Megahertz
min – Minuto
ml – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MO – Microscopia óptica
mPa – Milipascal
MS – Mass Spectroscopy
nd:YAG – Neodymium:Yttrium Aluminium Garnet (laser)
NF – Não Frutificado
nm – Nanómetro
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
°C – Graus Celsius
PAS – Ácido periódico e reagente de *Schiff*
PES – Processed Eucheuma Seaweed
PES – Provasoli Enriched Seawater
PM – Peso Molecular
PNG – Philippine Natural Grade
ppm – Partes por milhão (deslocamentos químicos)
r – Coeficiente de correlação
rbcl – Rubisco (ribulose bifosfato carboxilase)
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA – Ribonucleic Acid
S – Salinidade
s – Segundo
SCF – Scientific Committe on Food
SEC – Size Exclusion Chromatography
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SRC – Semi-Refined Carrageenan
T – Tetrasporófito
TEM – Transmission Electron Microscopy
TSP – Sal de sódio ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-*d*₄
UV – Ultravioleta (radiação)
var – Variedade
W – Watt
WHO – World Health Organization

Resumo

Oito carragenófitas, da costa portuguesa, representando sete géneros e quatro famílias das Gigartinales, foram estudadas na baía de Buarcos durante cerca de um ano (estudo das variações sazonais) e em quinze estações costeiras (estudo das variações geográficas), localizadas entre o Baleal (Peniche), na zona Centro, e Moledo, na zona Norte. A determinação da variação sazonal e geográfica do estado reprodutor, comprimento, peso seco e conteúdo em carragenana, foi feita com base no método de amostragem aleatória. Em geral, o comprimento e a biomassa das carragenófitas estudadas apresentam variações sazonais, com um incremento no início da Primavera (Abril), um aumento acentuado no início do Verão (Junho/Julho) e valores reduzidos no final do Verão, Outono e Inverno. O baixo conteúdo em colóide registado no Inverno (Dezembro) e, em oposição, o elevado teor em carragenana verificado nas amostras colhidas no Verão (Julho), podem estar relacionados, respectivamente, com os elevados e reduzidos níveis de nutrientes (Azoto e Fósforo) presentes na água. O maior conteúdo médio em carragenana foi registado numa amostra de *Chondracanthus acicularis* (40.1 %), seguido dos valores registados nas amostras de *Gigartina pistillata* (38.7 %) e *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (34.9 %). O método de amostragem aleatória (com quadrados) foi usado na determinação da biomassa e o método de “amostragem em contínuo sobre um transepto” no cálculo da percentagem de cobertura de cada carragenófitas, em dois períodos: Outono/Inverno e Primavera/Verão. As carragenófitas com maior cobertura e biomassa foram as seguintes: *Chondrus crispus* (3.75 % - 570 g m⁻²); *C. acicularis* (3.45 % - 99 g m⁻²); *C. teedei* var. *lusitanicus* (2.51 % - 208 g m⁻²); *Mastocarpus stellatus* (2.02 % - 520 g m⁻²).

Para a caracterização dos diferentes tipos de carragenana foram usadas as técnicas espectroscópicas: FTIR-ATR, FT-Raman, ¹H e ¹³C-RMN. Com base nestas técnicas, nomeadamente em FTIR-ATR e FT-Raman, foram desenvolvidas metodologias inovadoras que nos permitiram a correcta identificação das diversas fracções de carragenana, em particular das variantes da família lambda (carragenana lambda, ksi e theta) e dos precursores biológicos (mu e nu) das carragenanas gelificantes (kappa e iota, respectivamente). Visto que as amostras foram sujeitas a uma manipulação mínima (as algas são simplesmente secas e moídas), a composição determinada representa, o mais fielmente possível, a composição natural dos

ficocolóides. Nas análises espectroscópicas foram usados, como referência, os espectros de amostras comerciais de carragenana e de carragenófitas utilizadas com fins industriais. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear do protão e do carbono ^{13}C foi usada na caracterização e quantificação dos diferentes componentes das carragenanas extraídas (extracção aquosa e alcalina). De acordo com as recomendações da IUPAC foi apresentado, relativamente ao DSS como standard interno, um novo conjunto de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C -RMN dos principais tipos de carragenana. Além disso, foram reportados os deslocamentos químicos relativos ao ácido pirúvico e ao amido florídeo, compostos que surgem normalmente associados às carragenanas.

Relativamente aos diferentes tipos de carragenana produzidos pelas espécies estudadas, devem ser realçados os seguintes resultados: os gametófitos femininos e talos não frutificados do *C. crispus*, *M. stellatus*, *C. teedei* var. *lusitanicus*, *G. pistillata* e *C. acicularis* produzem carragenanas híbridas com diferentes rácios kappa/iota (copolímeros de carragenana kappa/iota); O *G. crenulatus* e o *A. devoniensis* produzem uma grande diversidade de híbridos, com diferentes rácios kappa/iota, dependentes de variações sazonais; as carragenanas da família lambda estão presentes nos tetrasporófitos de *C. crispus* (carragenana lambda), *M. stellatus* (carragenana lambda), *C. teedei* var. *lusitanicus* (carragenana híbrida ksi/theta), *C. acicularis* (carragenana híbrida ksi/theta) e *G. pistillata* (carragenana híbrida ksi/lambda); as diferentes gerações do *Calliblepharis jubata* produzem carragenana do tipo iota.

Com base nos nossos resultados, baseados em FTIR-ATR, FT-Raman e ^1H -RMN, muito mais sensíveis do que a ^{13}C -RMN, podemos concluir que a carragenana kappa e iota têm precursores biológicos distintos, respectivamente mu e nu.

O método de extracção laboratorial alcalino, usado neste trabalho, possibilita a extracção de carragenanas com baixo índice de degradação e elevado peso molecular, vindo confirmar a ideia de que a extracção de ficocolóides, mesmo em condições “suaves”, possibilita a ciclização das suas unidades constituintes.

A combinação de uma grande cobertura, de uma elevada biomassa disponível e um elevado teor em carragenana das espécies pertencentes ao género *Chondracanthus* e de *Gigartina pistillata*, permite-nos considerar que estas carragenófitas constituem uma potencial fonte industrial de copolímeros de carragenana kappa/iota, em adição às carragenófitas tradicionalmente colhidas em Portugal (*C. crispus* e *M. stellatus*). No entanto, atendendo a que na actividade de apanha de algas marinhas, em populações

selvagens existentes no patamar médiolitoral, existe o risco de sobre-colheita e subsequente perda económica, para além da redução ou até destruição da biodiversidade algal, é necessário desenvolver estudos com vista à inclusão destas carragenófitas em sistemas integrados de aquacultura.

Em diversas estações costeiras encontrámos talos heterospóricos de *G. pistillata* (contendo, simultaneamente, soros de tetrasporocistos e cistocarpos), os quais foram objecto de estudos morfológicos, citológicos e bioquímicos. Estes estudos foram alargados a outras carragenófitas seleccionadas, o que nos permitiu analisar alguns aspectos da carposporogénese, tetrasporogénese (*C. teedei* var. *lusitanicus*) e distribuição dos polissacarídeos (celulose e carragenana) nos talos e paredes celulares (*G. crenulatus*, *A. devoniensis* e *G. pistillata*).

Abstract

Eight carrageenophytes from the Centre and North cost of Portugal, representing seven genera and four families of Gigartinales, were studied for about one year (seasonal variation studies) in Buarcos bay and in fifteen different coastal stations (geographic variation studies) from Baleal (Peniche), in Centre zone, to Moledo, in the North zone. The reproductive status, dry weight and carrageenan content have been followed by monthly random sampling. In general, plant size and biomass showed a seasonal increase in early spring (April), a marked increase in early summer (June/July) and low values in late summer, autumn and winter. The low colloid content in winter (December) and the high colloid content in summer (July) can be related to high and low nutrient (N and P, mainly) content of the water, respectively. The highest average carrageenan yield was found in *Chondracanthus acicularis* (40.1 %), *Gigartina pistillata* (38.7 %) and *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (34.9 %). The haphazard sampling method (with quadrates) was used to determine the biomass and the continuous sampling method, applied along a perpendicular transept to the shoreline, was used to calculate the carrageenophytes cover in two periods: autumn/winter and spring/summer. The following results must be enhanced: the highest cover and biomass was found in *Chondrus crispus* (3.75 % - 570 g m⁻²), *Chondracanthus acicularis* (3.45 % - 99 g m⁻²), *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (2.51 % - 208 g m⁻²) and *Mastocarpus stellatus* (2.02 % - 520 g m⁻²).

In order to characterize the different carrageenan types, vibrational (Infrared and Raman) and resonance (¹H and ¹³C-NMR) spectroscopy was been used to reveal detailed information concerning the properties and structure of these polysaccharides at molecular level. In this work have been developed techniques of analysis based on the FTIR-ATR and FT-Raman spectroscopy, which allowed an accurate identification of the diverse carrageenan fractions, with particular relief for the variants of lambda-family (lambda, ksi and theta) and for the biological precursors (mu and nu) of the gelling carrageenans (kappa and iota, respectively). Because the samples are minimally treated (dried, ground algal material), the determined composition represents, as accurately as possible, the natural composition of the colloids. The spectra of both commercial carrageenan samples and common carrageenophytes were used as reference. The NMR (¹H and ¹³C) spectroscopy was used in order to characterize and quantify the different

carrageenan fractions in the extracted phycocolloids (water and alkali extractions). A new set of ^{13}C and ^1H -NMR chemical shifts of most common carrageenan types is given relative to DSS as the internal standard according to the IUPAC recommendations. Moreover, the chemical shifts of characteristic signal for pyruvate acetal and floridean starch are reported. Relatively to the carrageenan types, the following results must be enhanced: Female gametophytes and non-fertile thalli samples of *C. crispus*, *M. stellatus*, *C. teedei* var. *lusitanicus*, *G. pistillata*, *C. acicularis* and *Gymnogongrus crenulatus*, present a varying degrees of kappa-iota hybrid carrageenan (copolymers of kappa-iota carrageenan). Relative amounts of the different gelling carrageenan fractions were determined with ^1H -NMR. The carrageenans extracted from *Ahnfeltiopsis devoniensis* are constituted mainly by iota-carrageenan, but seasonal variations in the nature of carrageenans are present. Lambda-family carrageenans were found in tetrasporophytes of *C. crispus* (lambda carrageenan), *M. stellatus* (lambda carrageenan), *C. teedei* var. *lusitanicus* (hybrid ksi-theta carrageenan), *C. aciculais* (hybrid ksi-theta carrageenan) and *G. pistillata* (hybrid ksi-lambda carrageenan). *Calliblepharis jubata* presents carrageenans of iota-type in all reproductive stages.

On the basis of our results, based on FTIR-ATR, FT-Raman and ^1H -NMR, more sensible than ^{13}C -NMR, we can conclude that the carragenana kappa and iota have distinct biological precursors, mu and nu respectively.

The “soft” alkaline extraction method, used in this work, makes possible the carrageenan extraction with low degradation and high molecular weight.

The conjugation of high available biomass and phycocolloid content of the *Chondracanthus* species and *Gigartina pistillata* makes it a potentially important source of copolymers of kappa-iota carrageenan, in addition to the traditionally harvested carrageenophytes (*M. stellatus* and *C. crispus*). However, collection of seaweeds from rocky shore has its limitations, always contains the risk of over-collection and subsequent loss of the population. The next step, in the near future, will be developing studies in order to introduce these carrageenophytes in the aquaculture integrated systems.

In this work, fronds of *G. pistillata* exhibiting both tetrasporangial sori and cystocarps, i.e., tetraspores and carpospores (heterosporic thalli), were found in several costal stations. In order to clarify the nature and function of these reproductive structures, it's morphological, cytological and biochemical study was carried out. Other morphological, citochemical and ultrastructural studies were performed in selected

carrageenophytes in order to study both the carpospore/tetraspore formation (*C. teedei* var. *lusitanicus*) and polysaccharide distribution (cellulose and carrageenan) in the thalli and cell walls (*G. crenulatus*, *A. devoniensis* and *G. pistillata*).

PREÂMBULO

Preâmbulo (Resenha histórica)

Apesar do nosso país apresentar condições excepcionais para o desenvolvimento da flora algológica, tanto marinha como de água doce, os estudos em ficologia, comparativamente a outras áreas da biologia, correspondem ainda a uma pequena percentagem do total da produção científica portuguesa, pese embora o seu incremento nos últimos anos.

Com uma faixa costeira de 830 quilómetros, o litoral português evidencia-se pela riqueza da sua flora, em grande parte resultante da diversidade das influências climáticas decorrentes da sua situação biogeográfica peculiar (Braun-Blanquet *et al.*, 1972).

Os primeiros estudos ficológicos foram publicados no final do século XVIII (Vandelli, 1788; Correa da Serra, 1796), seguidos por alguns outros após um considerável período de tempo. As principais referências a algas marinhas portuguesas correspondem às publicações de Palminha (1951; 1957), Mesquita Rodrigues (1963) e Ardré (1970; 1971), representando estes últimos os estudos mais completos, sobre a flora algal marinha portuguesa, até agora publicados.

No que respeita ao Departamento de Botânica (FCTUC), embora as primeiras referências a algas se encontrem na obra de Brotero (Flora Lusitana, 1804), foi essencialmente Júlio Henriques que, a partir da fundação da Sociedade Broteriana, em 1880, incrementou o interesse pela ficologia nesta Instituição (originalmente denominada Instituto Botânico). Embora muito do material existente no Herbário de Criptogamia do Departamento de Botânica tenha sido recolhido por Welwitsch e Newton, deve-se a Júlio Henriques, em colaboração com Moller, a colheita de grande número dos espécimes presentes neste herbário (Santos e Mesquita, 1981).

Mesquita Rodrigues, de 1943 a 1964, para além de alguns trabalhos sobre algas de água doce, dedicou-se fundamentalmente, como já foi referido, ao estudo das Phaeophyceae (Rodrigues, 1963), tendo feito uma revisão dos espécimes existentes nos herbários de Coimbra (COI), Porto e Lisboa. No que respeita às Rhodophyceae, este investigador descreveu uma variedade nova, o *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (originalmente denominada *Gigartina teedii* var. *lusitanica*) (Rodrigues, 1957, 1958).

Entre os estudos ficológicos realizados no Departamento de Botânica, merecem relevo os trabalhos de Póvoa dos Reis sobre Rhodophyceae de água doce e salobra, nomeadamente dos géneros *Batrachospermum*, *Lemanea*, *Gracilaria*, *Polysiphonia* e *Compsopogon*, que incluem a identificação e descrição de algumas espécies novas (Póvoa dos Reis, 1962, 1965, 1977).

Nos anos 60 do século passado, Almeida Rino, durante o período em que trabalhou no Departamento de Botânica, inventariou vários *taxa* novos para Portugal (Rino, 1969). Incentivada por este investigador, M. Fátima Santos continuou e intensificou o trabalho por ele iniciado (Santos e Mesquita, 1981).

Em 1972, José F. Mesquita, professor deste Departamento (aposentado em 2003) que se tinha especializado em citologia ultraestrutural, achou interessante alargar estes estudos citológicos ao grupo das Algas, pois, entre outros aspectos, tratava-se de uma área praticamente inexplorada em Portugal. Para a concretização dessa nova linha de investigação promoveu e orientou a instalação da primeira câmara climatizada no Instituto Botânico, na qual se iniciou, em colaboração com M. Fátima Santos, o isolamento e a cultura de algumas espécies de microalgas de água doce que, de certo modo, vieram a constituir o “embrião” da actual Algoteca (www.uc.pt/botanica/acoi.htm). M. Fátima Santos, para além de todo o árduo trabalho

de colheita, identificação e manutenção de grande parte da actual colecção de algas da Algoteca, continuou a colaborar com José F. Mesquita em estudos citológicos ultraestruturais de diversas microalgas (por vezes com a colaboração de J. Santos Dias), referenciados como os primeiros realizados, neste domínio, no nosso País.

Posteriormente, Lília Santos, actual responsável pela Algoteca, desenvolveu também diversos trabalhos de investigação em microalgas, com particular relevo nas classes Eustigmatophyceae e Chrysophyceae (aspectos citológicos, taxonómicos e ecológicos). Neste momento coordena e/ou participa em projectos de carácter internacional, entre os quais se destaca o projecto COBRA (criopreservação de microalgas) e a elaboração da Flora Ibérica das algas continentais (Santos e Santos, 2004).

Em 1989 como monitor e depois, em 1992, como assistente estagiário, Leonel Pereira iniciou a sua actividade como docente e investigador do Departamento de Botânica sob supervisão do Prof. José F. Mesquita, que o orientou e incentivou para o estudo das macroalgas marinhas. Pretendia-se assim retomar e desenvolver no Departamento de Botânica este domínio da Ficologia, “abandonado” desde a década de 60 (Rodrigues, 1958, 1963) em favor do estudo das microalgas de água doce. Neste contexto L. Pereira realizou, de 1989 a 1997, diversos estágios, “workshops” e missões que lhe permitiram obter uma formação metodológica sólida em ficologia marinha, indispensável ao trabalho de investigação que pretendia desenvolver. De salientar, neste aspecto, a aprendizagem realizada na Universidade de Caen (França), ao abrigo de um acordo de cooperação franco-portuguesa subscrito pelos Profs. J. Mesquita (Coimbra) e J. Cosson (Caen). Assim se iniciou o trabalho sobre a ecofisiologia de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* da baía de Buarcos, cujos primeiros resultados foram apresentados, em 1994, na XXIV reunião da SPMEC-BC (Pereira e Mesquita, 1994).

Após a realização das provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica (Pereira, 1996a, b), L. Pereira iniciou propriamente a sua actividade de investigação com o projecto “Contribuição para o conhecimento das macroalgas da costa portuguesa”, apresentado no 1º encontro da APAA (Pereira e Mesquita, 1999) e financiado, em parte, pela Reitoria da UC e pelo Centro de Biologia Vegetal. No âmbito deste projecto, para além de diversos levantamentos algológicos, co-orientou, em colaboração com o Prof. J. F. Mesquita, alguns estágios científicos da licenciatura em Biologia (ver *Curriculum*) no domínio da Ficologia (macroalgas), o que lhe veio a proporcionar uma excelente prática no trabalho de campo. Das colheitas feitas, nestes levantamentos, resultou a “nova colecção de macroalgas marinhas do Departamento de Botânica” (MACOI) e todos os dados recolhidos deram origem ao “portal das macroalgas portuguesas – portuguese seaweeds website” (Pereira *et al.*, 2002a; Dias, 2003a), uma base de dados “on-line” que pode ser consultada em www.uc.pt/seaweeds. O primeiro trabalho a fazer referência a exemplares desta nova colecção (MACOI), registados na base de dados, foi Pérez-Ruzafa *et al.* (2003).

Estas actividades de campo e muitas outras de índole laboratorial, cujos resultados dão corpo à presente tese de doutoramento, representam a primeira etapa de uma linha de investigação em macroalgas marinhas desenvolvida no Departamento de Botânica da FCTUC, que se espera continuar e ampliar, com ênfase nas suas potencialidades biotecnológicas.

1 – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

Enquadramento do trabalho

Foi no contexto descrito no “Preâmbulo” que se iniciou e desenvolveu o trabalho de investigação conducente à tese que ora se apresenta: “Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa – aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos”. A selecção de espécies ou estirpes produtoras de carragenanas, de elevada qualidade e o seu estudo sob os pontos de vista ecológico, bioquímico e citológico constitui um trabalho de elevado interesse, tendo em vista, para além dos aspectos estritamente biológicos, a importância crescente destes ficocolóides na confecção de diversos produtos industriais, na área alimentar, não alimentar e farmacêutica.

O facto das algas utilizadas com este objectivo serem sobretudo espécies exóticas com origem em países politicamente instáveis, obriga a indústria de extracção a procurar outras fontes de ficocolóides, sobretudo espécies ainda não exploradas mas susceptíveis de fornecer colóides de qualidade. As espécies presentes em Portugal, da ordem Gigartinales, nomeadamente das famílias Cystocloniaceae, Gigartinaceae, Petrocelidaceae e Phylophoraceae, produtoras de carragenanas (carragenófitas), são por isso algas vermelhas de elevado potencial económico. Apesar destas famílias possuírem várias espécies produtoras de carragenanas, nem todas são passíveis de ser exploradas para uso industrial, devido ao seu baixo teor em ficocolóides ou de biomassa reduzida, ou ainda, de difícil colheita a partir de populações naturais. Considera-se como passível de utilização industrial, algas com um teor mínimo de ficocolóide na ordem dos 40 a 50 % do seu peso seco (Zinoun, 1993).

Objectivos

Os objectivos específicos deste trabalho foram então os seguintes:

- 1 - Pesquisar, na costa portuguesa (entre Peniche e Caminha), populações de Gigartinales, no patamar médiolitoral, com cobertura e biomassa significativas;
- 2 - Caracterizar, sob o ponto de vista ecológico, as populações de carragenófitas, recorrendo a métodos de amostragem adequados (método dos quadrados, método de amostragem em contínuo e método de amostragem aleatória);
- 3 - Determinar as variações sazonais e geográficas da produção dos ficocolóides;
- 4 - Caracterizar as carragenanas sob o ponto de vista bioquímico, com recurso a análises estruturais por espectroscopia vibracional e de RMN;
- 5 - Estudar a morfologia, anatomia e ultraestrutura celular de espécimes seleccionados, em microscopia óptica e electrónica (TEM), dando especial relevo à formação dos esporos (carpósporos e tetrásporos) e à localização dos polissacarídeos nas paredes celulares.

1.1 - Caracterização da costa portuguesa

No contexto da estrutura geral dos ecossistemas, que resulta dos principais factores climáticos, topográficos e evolutivos dos oceanos e das zonas continentais, as áreas biogeográficas e as respectivas sub-áreas, com características bióticas e abióticas comuns, podem ser definidas de acordo com os padrões da composição florística e faunística de cada área. Por exemplo, na margem europeia do oceano Atlântico existe, de norte para sul, um gradiente acentuado de temperatura que restringe a distribuição de muitas espécies e dá origem a uma subdivisão biogeográfica do Atlântico oriental em duas províncias: a província do Atlântico boreal; e a província subtropical denominada “Lusitanica” (Figura 1.1) (Luning, 1990; Afonso *et al.*, 2000).

A província Lusitanica estende-se desde a costa ocidental da Península Ibérica até à costa da Bretanha (França). Devido à existência de diferenças significativas, a nível climático e na composição das comunidades animal e vegetal, a província Lusitanica foi subdividida em: subprovíncia subtropical (área que vai desde o estreito de Gibraltar até o cabo de Finisterra); e subprovíncia de transição subtropical/boreal (área delimitada entre o cabo de Finisterra e a Bretanha) (Afonso *et al.*, 2000).

Na subprovíncia subtropical, a zona costeira entre o cabo de Finisterra e o cabo de São Vicente, sob influência directa do oceano Atlântico, distingue-se da sub-região do Golfo de Cádiz, que representa uma área de transição entre o mar Mediterrâneo e o oceano Atlântico (Afonso *et al.*, 2000).

1.1.1 – Principais factores ambientais da costa portuguesa

Portugal fica situado na zona sudoeste da Europa, ocupando a maior parte do sudoeste da Península Ibérica, entre as latitudes 37 e 42° N.

A temperatura da superfície da água do mar (Figura 1.2) varia, no Inverno, entre os 12 °C no Norte e os 16,5 °C no Sul. Ocasionalmente, no Norte, a temperatura da água do mar, junto à costa, pode atingir 11 °C, devido à influência das águas frias vindas dos rios. No verão, a temperatura das águas varia entre os 18 °C, no Norte, e os 22 °C, no Sul. De Junho a Outubro, devido ao fenómeno denominado “upwelling”, que ocorre no litoral Norte, as temperaturas das águas costeiras podem descer até os 16 °C. Este fenómeno é responsável pelo enriquecimento das águas superficiais com nutrientes, pois as águas vindas das profundezas do oceano são frias e ricas em minerais. O “upwelling” promove assim o aumento da produtividade nesta zona costeira (Martins, 1993).

A salinidade da água do mar pode variar entre 35 e 26 S‰, dependendo da maior ou menor proximidade de fontes de água doce (Sousa-Pinto, 1998).

A costa portuguesa é afectada por duas correntes marinhas principais: a corrente das Canárias, com um fluxo forte para Sul (12 cm.s⁻¹), com origem no Norte; e a corrente dos Açores, que entra pela zona Sul e determina a circulação de Oeste para Este (Figura 1.2). A circulação da água do mar ao longo da costa Atlântica Ibérica é predominantemente de Sul para Norte, com uma velocidade média de 16 cm.s⁻¹ (Martins, 1993).

1.2 - Flora algal da costa portuguesa (breve resumo)

O litoral português, com um total de 830 quilómetros comporta, separados por grandes areias, extensões rochosas, muitas delas ricas em algas. Grande parte das zonas costeiras encontram-se muito expostas à acção do mar (Lewis, 1964) e as algas do patamar médiolitoral encontram-se sobretudo no horizonte inferior, delimitado pelo nível mínimo da maré baixa (Múrias, 1994; Pereira, 1996b).

Ardre (1970; 1971), que estudou exaustivamente a flora algal portuguesa no final da década de 60 (do século passado), identificou e descreveu 246 espécies de Rhodophyceae, 98 Phaeophyceae e 60 Chlorophyceae, números que não se alteraram significativamente desde então (Sousa-Pinto, 1998).

A costa portuguesa apresenta um gradiente acentuado na distribuição da flora algal. A flora do patamar médiolitoral do Norte do país é similar à encontrada na zona central da Europa (Bretanha e Sul das ilhas Britânicas). A flora algal do Sul do país é, no entanto, bastante diferente, havendo aí uma nítida influência do Mediterrâneo e da zona Norte da costa ocidental Africana (Sousa-Pinto, 1998; Afonso *et al.*, 2000).

As algas do litoral ocidental, com uma orientação Norte-Sul, podem ser agrupadas em dois grupos: as algas da zona Norte (entre a foz do rio Minho e a foz do rio Tejo); e as algas da zona Sul (entre a foz do rio Tejo e o Algarve). A costa portuguesa é o limite Sul, na Europa, de mais de 40 espécies, enquanto que 20 espécies típicas do Mediterrâneo e da costa Atlântica de África, têm aqui o seu limite Norte (costa Algarvia). Exemplos das primeiras: algas castanhas (Phaeophyceae) *Laminaria saccharina*, *L. hyperborea*, *Fucus serratus*, *Pelvetia caniculata*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Chorda filum*; algas vermelhas (Rhodophyceae) *Ahnfeltia plicata*, *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata*, *Ceramium shuttleworthianum* e *Delesseria sanguinea* (Ardre, 1971; Afonso *et al.*, 2000; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2003). Exemplos das segundas: *Zonaria tournefortii*, *Amphiroa beavoisii*, *Griffithsia opuntioides*, *Ulva linearis* e *Valonia utricularis* (Afonso *et al.*, 2000). Outras algas, que são tipicamente de águas temperadas, têm o seu limite Norte na costa ocidental de Portugal. Estas incluem as algas castanhas (Phaeophyceae) *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira spp.*, *Padina pavonica*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris polypodioides* (antes denominado *D. membranaceae*) e *Halopteris filicina*.

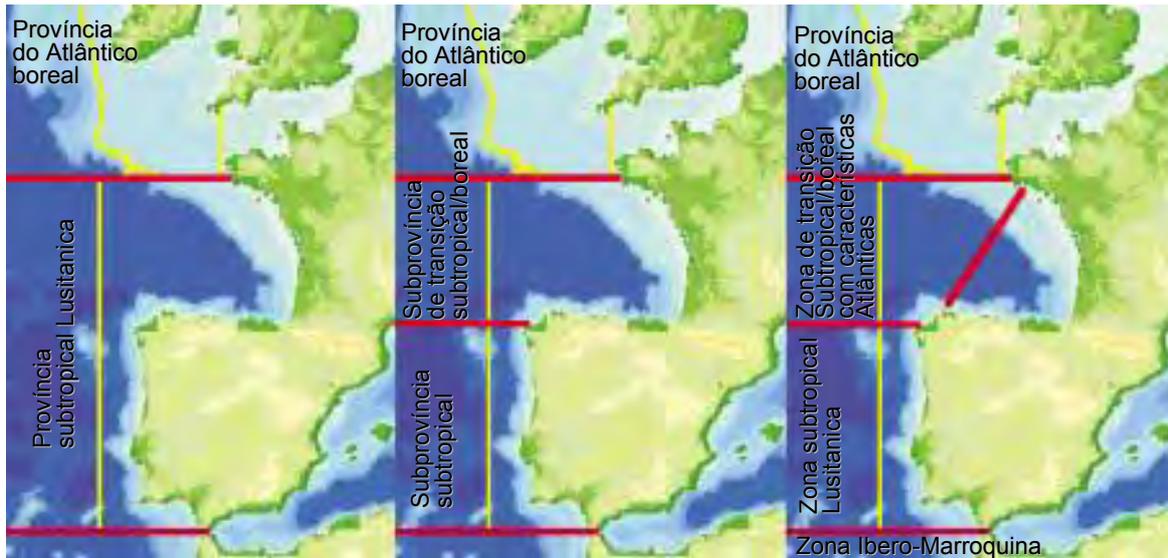


Figura 1.1 – Subdivisões biogeográficas do Atlântico oriental (Segundo Afonso *et al.*, 2000)

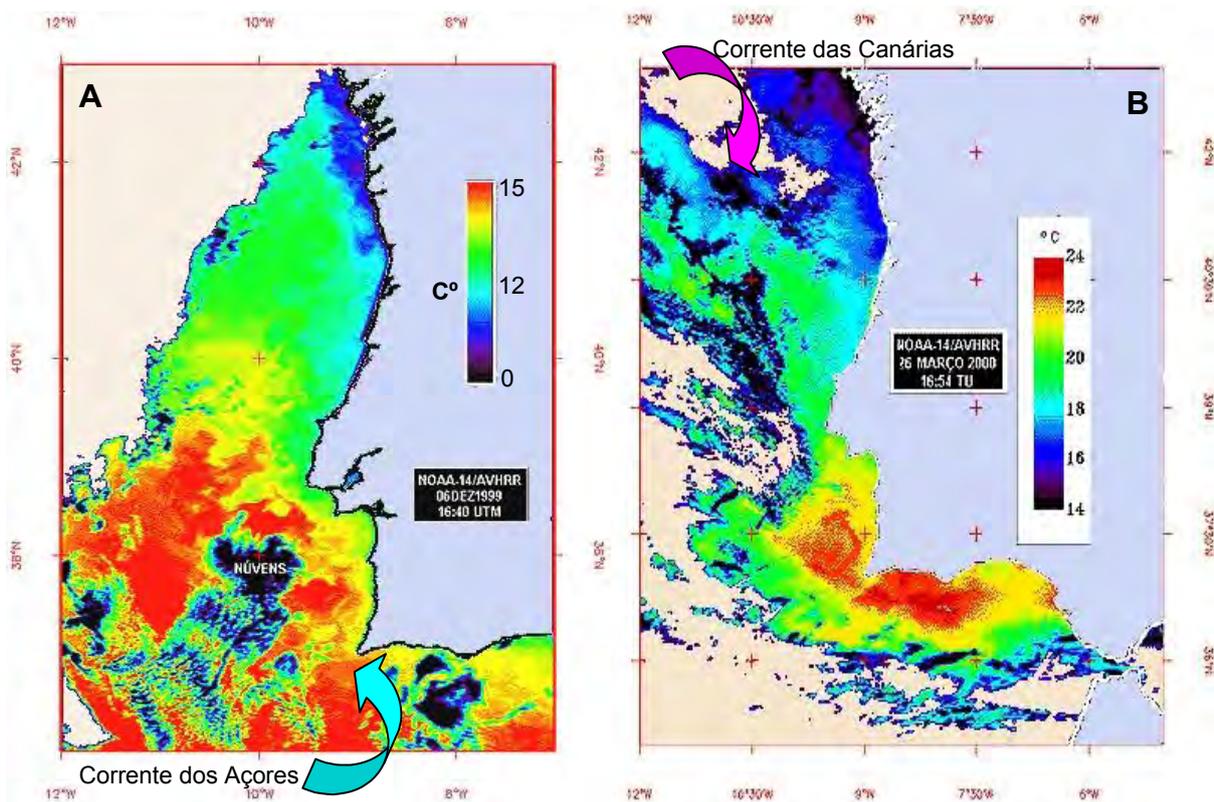


Figura 1.2 – Temperatura à superfície do mar, na costa portuguesa, no Inverno (A) e na Primavera (B) (Informação recolhida pelo satélite meteorológico da NOAA). As principais correntes marinhas que afectam a costa portuguesa encontram-se representadas por setas largas (Adaptado de Martins, 1993).

Uma outra característica da costa portuguesa é a de apresentar um incremento do número de algas vermelhas (número de espécies) e um decréscimo do número de algas castanhas (número de espécies), do Norte para o Sul (Palminha, 1951; Mesquita Rodrigues, 1963; Ardré, 1970). Para a localização actual das espécies anteriormente referidas, no litoral ocidental de Portugal, consultar a base de dados “on-line” www.uc.pt/seaweeds.

A diferença acentuada na distribuição das algas, entre as estações de colheita a Norte e as estações a Sul, é mais evidente no horizonte inferior do patamar médiolitoral, imediatamente acima da orla de Laminariales. No Norte, esta zona é dominada por talos de *H. elongata*, *B. bifurcata*, *C. crispus*, *M. stellatus*, *Calliblepharis jubata*, *G. pistillata*, *Chondracanthus acicularis* (antes chamada *Gigartina acicularis*), *Osmundea pinnatifida* (antes chamada *Laurencia pinnatifida*), *Gelidium pulchellum* e *Pterosiphonia complanata* (Ardré, 1970; Honrado *et al.*, 2002).

O patamar médiolitoral da zona centro, de Aveiro a Lisboa, é dominado pela *Saccorhiza polyschides*, *M. stellatus*, *C. crispus*, *Corallina elongata*, *C. acicularis*, *Gelidium pusillum* e *O. pinnatifida*; por vezes com populações densas de *Lomentaria articulata* e *Litophyllum incrustans*. Alguma *H. elongata* pode ser encontrada na Baía de Buarcos. No horizonte inferior do patamar médiolitoral predominam populações de *B. bifurcata* e *C. tomentosum*. No patamar sublitoral, predominam as populações de *P. complanata* (junto ao limite entre o patamar médiolitoral e o patamar sublitoral), o *Gelidium corneum* (antes denominado *G. sesquipedale*) e a *Pterocladia capillacea* (antes denominada *Peterocladia capillacea*) (Ardré, 1970; Pereira *et al.*, 2001; Gaspar, 2002; Sousa, 2003).

O patamar médiolitoral da zona costeira entre Lisboa e o Algarve é dominado por densos tufos de *Caulacanthus ustulatus*, *Corallina elongata*, *C. acicularis*, *G. pusillum*, *O. pinnatifida* e *Chondria coerulescens*. O *Codium adherens* pode cobrir também áreas significativas da costa rochosa. O horizonte inferior do patamar médiolitoral possui uma orla constituída por *G. corneum*. Em praias pouco expostas é possível encontrar populações densas de *Valonia utricularis* (Ardré, 1970; Sousa-Pinto, 1998; Coelho, 2003).

1.3 – Breve revisão das principais características das carragenófitas estudadas

1.3.1 – Divisão Rhodophyta (Algas Vermelhas)

As algas vermelhas são tradicionalmente classificadas no Filo (Divisão) Rhodophyta, que inclui uma única classe, a Rhodophyceae que, por sua vez, se divide em duas subclasses, a Bangiophycidae e a Florideophycidae (Cole e Sheath, 1990).

As Rhodophyceae apresentam, na sua grande maioria, tonalidades que variam do rosa-claro ao vermelho-escuro, em consequência da composição pigmentar dos seus plastídeos, em que o vermelho da ficoeritrina mascara o verde da clorofila a. A ficoeritrina é muito eficiente na captura da luz azul e da luz verde, comprimentos de onda que conseguem penetrar as águas até ao nível dos habitats do patamar infralitoral (Pereira, 1996b). Existem, pelo menos, cinco tipos diferentes de ficoeritrina nas algas vermelhas, diferindo na absorção espectral, mas com um pico de absorção situado na zona dos verdes. Localizadas nos ficobilissomas (em tilacóides não associados, similares aos das cianófitas), as ficoeritrinas conseguem capturar e transferir eficazmente a energia luminosa para a ficocianina e aloficocianina e, finalmente, para a clorofila a, permitindo a captura e utilização da energia luminosa, que de outra forma seria inacessível à clorofila (Cole e Sheath, 1990; Lobban e Harrison, 1994; Graham e Wilcox, 2000).

Os carotenóides das algas vermelhas incluem o α e β -caroteno, luteína, zeaxantina, anterixantina e violaxantina. Quando os carotenóides são abundantes, as Rhodophyceae são difíceis de distinguir de outros grupos de macroalgas, sobretudo das algas castanhas (Phaeophyceae) (Gayral e Cosson, 1986; Pereira, 1996a, b).

Os plastídeos das algas vermelhas são distintos dos encontrados noutros grupos de macroalgas e parece que tiveram origem a partir de cianófitas (cianobactérias), por intermédio de um processo de endossimbiose primária. Estes plastídeos não apresentam retículo endoplasmático periplastideal (Graham e Wilcox, 2000).

Ao contrário do que acontece com os plastídeos das algas verdes (Chlorophyceae), os das Rhodophyceae nunca contêm amido. A substância de reserva típica das algas vermelhas é o amido florídeo e encontra-se no citoplasma sob a forma de grânulos (Cole e Sheath, 1990).

Outro aspecto da biologia celular das algas vermelhas é o da presença habitual de sinapses (pontuações de conexão) de natureza proteica (Cole e Sheath, 1990).

Julga-se que a ausência de flagelos tenha tido profundos efeitos na evolução nos ciclos reprodutivos das algas vermelhas, tendo dado origem a ciclos biológicos trigenéticos, típicos destas algas. A origem destes ciclos tem sido relacionada com a ausência de flagelos, como uma forma de potenciar a fecundidade reprodutora (Graham e Wilcox, 2000). No entanto, nalgumas espécies, o ciclo trigenético típico apresenta modificações significativas, ficando reduzido a duas gerações.

Uma revisão mais completa das características das Rhodophyceae pode ser consultada em Pereira (1996a).

1.3.2 – Gigartinales

Esta ordem é uma das mais extensas e inclui muitas famílias que, pela análise do *rbcL*, se revelaram polifiléticas (Freshwater *et al.*, 1994; Ragan *et al.*, 1994). Um grande número de géneros com elevado interesse económico (carragenófitas) são membros desta ordem e a maioria está filogeneticamente relacionada (ver secção 1.8, Significado taxonómico dos polissacarídeos presentes nas Gigartinales) (Freshwater *et al.*, 1994; Fredericq *et al.*, 1996).

As carragenófitas podem ser subdivididas em duas ramificações monofiléticas: uma possuindo tetrasporocistos cruciados e a outra com tetrasporocistos zonados (Figura 1.3). O primeiro grupo inclui as famílias Gigartinaceae, Petrocelidaceae e Phyllophoraceae (Freshwater *et al.*, 1994; Fredericq e Ramirez, 1996), enquanto o segundo engloba um grande número de famílias Caulacanthaceae, Cubiculosporaceae, Furcellariaceae, Tichocarpaceae, Rissoellaceae, Dicranemataceae, Acrotylaceae, Mychodeophyllaceae, Cystocloniaceae e Solieriaceae (Fredericq *et al.*, 1999).

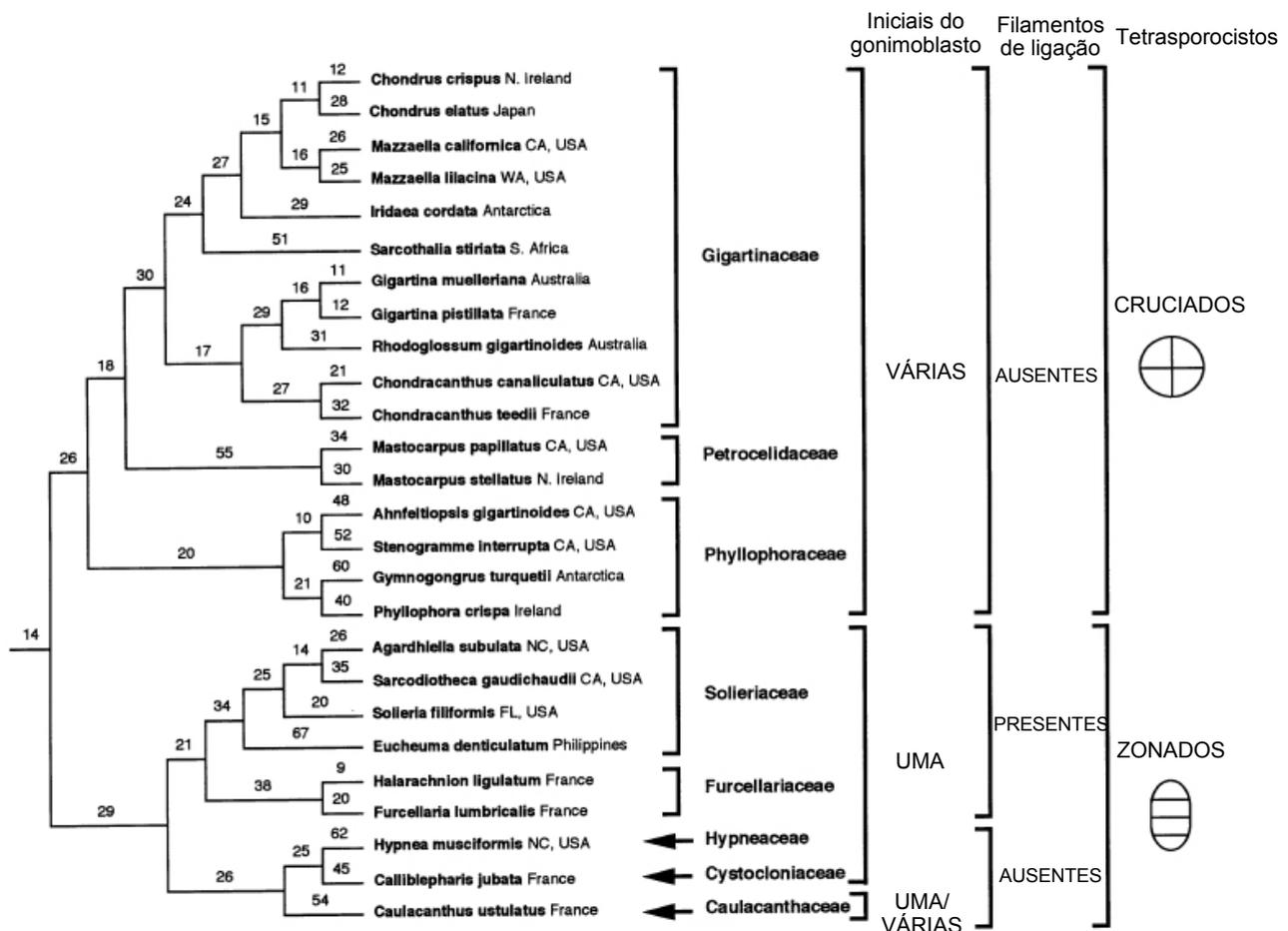


Figura 1.3 – Cladograma terminal das espécies carragenófitas (Segundo Freshwater *et al.*, 1994).

1.3.3 – Gigartinaceae

Em 1993, Hommersand e colaboradores propuseram uma classificação revista das algas vermelhas marinhas da família Gigartinaceae, na qual 69 espécies foram reclassificadas em quatro géneros, anteriormente estabelecidos (*Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea* e *Rhodoglossum*) e em 3 géneros reintegrados (*Chondracanthus*, *Sarcothalia* e *Mazzaella*), tendo por base características morfológicas e de desenvolvimento. Este artigo de revisão inclui descrições, chaves e fotografias dos caracteres diagnósticos (uma síntese desta informação pode encontrar-se em Pereira, 1996a). As relações filogenéticas destes sete géneros foram estabelecidas com base na análise do *rbcL* plastídeoal (Hommersand *et al.*, 1994). Estes autores reexaminaram as bases morfológicas, para a separação dos diferentes géneros desta família, com o auxílio da análise computadorizada de fotografias dos vários estádios de desenvolvimento dos cistocarpos (Hommersand *et al.*, 1999).

As Gigartinaceae encontram-se representadas na costa Portuguesa pelos géneros *Gigartina*, *Chondrus*, *Chondracanthus* e pelas espécies *G. pistillata*, *C. crispus*, *Chondracanthus teedei* (e a respectiva variedade *lusitanicus*) e *Chondracanthus acicularis* (Barbara e Cremades, 1996; Gaspar, 2002). Neste trabalho foram estudadas todas as espécies atrás enumeradas.

1.3.3.a – *Gigartina pistillata* (S.G. Gmelin) Stackhouse

A *G. pistillata* (Figura 1.4 - A) é a espécie tipo do género *Gigartina* (Kim, 1976; Hommersand *et al.*, 1993).

Os talos são erectos, até 20 cm de altura, vermelho-escuros ou vermelho-acastanhados, cartilaginoso-elásticos, dicotómicamente ramificados, fixados ao substrato por intermédio de um pequeno disco. Os gametófitos femininos apresentam uma ramificação dicotómica mais profusa do que os tetrasporófitos. Apesar desta alga ser a espécie tipo, a *G. pistillata* não apresenta a maioria das características típicas das frondes de muitas das outras espécies do género *Gigartina* (Kim, 1976; Gayral, 1982; Hommersand *et al.*, 1992).

A *G. pistillata* apresenta um ciclo trigenético isomórfico (Hommersand *et al.*, 1992), no entanto, talos heterospóricos (com cistocarpos e tetrasporocistos no mesmo talo) foram identificados em populações da África do Sul (Isaac e Simons, 1954).

Esta alga vive sobre as rochas no horizonte inferior do patamar médiolitoral e no patamar infralitoral, tendo preferência pelas estações abrigadas ou moderadamente expostas (Gayral, 1982; Gayral e Cosson, 1986). Em Portugal, a *G. pistillata* surge no limite superior do patamar infralitoral e no horizonte inferior do patamar médiolitoral, sobre as rochas, em grandes depressões e bacias arenosas, nas estações tanto batidas como abrigadas (Rodrigues, 1957; Ardré, 1970; Pereira *et al.*, 2001; Gaspar, 2002).

Esta espécie distribui-se por todo o Atlântico Nordeste, desde o Sul da Irlanda até ao Sul da Mauritânia. No Mediterrâneo foi localizado na zona de Málaga (Sul de Espanha) (Ardré, 1970). Existem alguns registos desta alga na África do Sul (Isaac e Simons, 1954; Hommersand *et al.*, 1992). Em Portugal, a *G. pistillata* tem a sua localização mais a Sul em Sines (Rodrigues, 1957; Ardré, 1970). Segundo a base de dados “on-line” www.uc.pt/seaweeds, a *G. pistillata* distribui-se, de Norte para Sul, em Apúlia, Aguçadoura, A-Ver-o-Mar, Lavadores, Aguda, Buarcos, S. Pedro de Moel, Água de Medeiros, Polvoeira, Légua, Nazaré e S. Martinho do Porto.

A análise dos polissacarídeos produzidos pela *G. pistillata* foi feita por Peat (1981), por McCandless (1983) e, mais recentemente, por Amimi e colaboradores (2001), em exemplares colhidos em Marrocos.

1.3.3.b – *Chondrus crispus* Stackhouse

O *C. crispus* (Figura 1.4 - B) é a espécie tipo do género *Chondrus* (Fredericq *et al.*, 1992). O talo desta alga encontra-se aderente ao substrato por um pequeno disco de fixação, espesso no centro e delgado nas margens. A base, fixada ao suporte, tem sido considerada como um simples aparelho de fixação; mas esta continua a crescer até atingir um diâmetro que pode chegar aos 2 cm (Kopp e Perez, 1979); por outro lado, a sua parte superior dá sucessivamente origem a novas lâminas. Kopp (1975) mostrou que um disco amputado é capaz de se reconstituir e o fragmento seccionado é capaz de regenerar um novo disco (Kim, 1976; Fredericq *et al.*, 1992; Perez *et al.*, 1992). O disco de fixação perene dá origem, periodicamente, a um talo erecto, cilíndrico, com 0,5 a 1,0 mm, a partir da qual se desenvolvem lâminas ramificadas dicotomicamente; foi possível contar até dezasseis dicotomias (Pringle e Mathieson, 1987); as lâminas conservam, mesmo quando se encontram submersas, o aspecto frisado (daí o restritivo específico “*crispus*”).

O *C. crispus* é uma espécie sexuada, dióica, com um ciclo de reprodução semelhante ao da maior parte das Florideophycidae, ou seja, com um ciclo trigenético isomórfico. Chen & MacLachlan (1971) e Guiry (1981) reconstituíram, em laboratório, o seu ciclo na totalidade. É possível reconhecer três gerações distintas: os gametófitos feminino e masculino; o carposporófito, parasita do gametófito feminino; e o tetrasporófito.

Os campos de *C. crispus* mais densos situam-se dentro dum estrato compreendido entre o nível +1 m e -1 m, em relação ao limite das marés baixas de água-morta (MacFarlane, 1968), dentro das cinturas de *Fucus serratus* e de *Laminaria digitata* (ou da espécie equivalente em Portugal, a *L. ochroleuca*). É possível encontrar esta espécie também em níveis mais elevados, ao nível do *Ascophyllum nodosum*, nomeadamente nas zonas batidas onde os nevoeiros (brumas) mantêm uma humidade elevada. O *C. crispus* surge também nos charcos do patamar supralitoral, ou muito mais abaixo, na cintura de *Laminaria hyperborea*, tendo-se encontrado, inclusivamente, populações a 10 metros de profundidade na Nova Escócia (Pringle e Semple, 1984). O *C. crispus* desenvolve-se igualmente sobre as superfícies recobertas por *Lithotamnium*, por vezes sobre conquilhas e moluscos, mas raramente epífita sobre outras algas.

O *C. crispus* é também uma espécie eurihalina, pois tolera as águas estuarinas, com salinidades que podem baixar até os 12 S‰, e águas com 38 S‰, como as da ilha da Madeira. Em Portugal surge nas estações mediantemente ou muito batidas, no patamar infralitoral e na base do horizonte inferior do patamar médiolitoral, sobre as rochas mal iluminadas, debaixo de rochas pendentes e nas bacias arenosas, por vezes arenosas, das estações pouco batidas (Rodrigues, 1957; Ardré, 1970, 1971).

O *C. crispus* é uma espécie com distribuição anfi-atlântica. Atlântico oriental: comum na Grã-Bretanha, Irlanda, Islândia e entre a Noruega e o sul de Espanha; possibilidade de existência em Marrocos e nas Ilhas de Cabo Verde (observação pessoal). Atlântico ocidental: de Newfoundland (Canadá) a Delaware (USA) (Fredericq *et al.*, 1992; Dixon e Irvine, 1995).

As populações mais luxuriantes que, por essa razão, são objecto duma exploração comercial intensiva, estendem-se pelas costas da Nova Escócia, pela ilha do Príncipe Eduardo, pelo Marine e Massachusetts, no que respeita ao Atlântico oeste; ao

longo das costas Francesas (de Cherbourg à ilha de Noirmoutier), da Espanha (costas da Galiza) e de Portugal, para o Atlântico Este (Laxe-Muros, 1990).

Em Portugal esta espécie é abundante em Âncora, Montedor e Viana do Castelo (Rodrigues, 1957; Ardré, 1970). O seu limite a Sul encontra-se na zona de Vila Nova de Milfontes (Ardré, 1970). Segundo a base de dados “on-line”, anteriormente referida, o *C. crispus* encontra-se nas seguintes zonas costeiras: Praia do Norte (V. Do Castelo), Aguçadoura, Apúlia, A-Ver-o-Mar, Lavadores, Aguda, Buarcos, Nazaré, S. Martinho do Porto e Peniche.

Os trabalhos de investigação, feitos com esta alga, envolvem diversas áreas: estudos ecológicos em populações naturais (Fernandez e Menendez, 1991; Chopin e Floch, 1992; Scrosati *et al.*, 1994); estudos em microscopia electrónica de varrimento (Chen e Taylor, 1976; Fletcher e Callow, 1992) e de transmissão, associada a técnicas de micro-análise de raios-X (Mccandless *et al.*, 1977; Craigie *et al.*, 1992; Chopin *et al.*, 1997); e análise da composição química (Bellion *et al.*, 1983; Craigie *et al.*, 1992; Matsuhira e Urzua, 1992; Sekkal *et al.*, 1993; Tasende, 2000; Ruperez e Saura-Calixto, 2001).

1.3.3.c – *Chondracanthus teedei* (Roth) Lamouroux

Esta espécie é muito facilmente identificável, desenvolvendo-se as frondes, que podem atingir 15 cm de altura, em tufos a partir de um pequeno disco basilar que os liga ao substrato; os eixos principais, atenuados para ambas as extremidades, terminam em ponta e deles partem ramos uma, duas ou três vezes pinulados; os râmulos terminais são pequenos, espiciformes e horizontalmente patentes. Os cistocarpos, pouco numerosos, em geral solitários, sésseis e globosos, são produzidos nas pínulas ou na parte dilatada das margens dos ramos, e os soros de tetrasporocistos têm também uma localização marginal.

As frondes, cartilaginéo-membranáceas, apresentam uma coloração púrpura-violácea que escurece pela dessecação, tornando-se amarelo-esverdeada pelo apodrecimento (Rodrigues, 1957; Gayral, 1982).

Os exemplares colhidos na Baía de Buarcos (Portugal) apresentam diferenças muito evidentes em relação aos espécimes colhidos no Canal da Mancha (França), na Biscaia (Espanha) ou no Mediterrâneo. Assim, os eixos principais das frondes, tal como as suas ramificações, são mais largos (atingindo 1 cm nas porções mais velhas) sendo, por isso, as plantas de aspecto mais robusto, alcançando frequentemente 20 cm de altura; a ramificação é mais densa e luxuriante e as pínulas desenvolvem-se não só nas margens dos ramos, mas também superficialmente; as pínulas são patentes, simples – raramente bífidas – e muito agudas, dando às frondes um aspecto espinocente; os cistocarpos, globosos e sésseis, são aqui numerosíssimos e formam-se tanto nas pínulas que se desenvolvem na margem dos ramos, como nas que se formam na sua superfície (Rodrigues, 1957, 1958).

Pela existência deste conjunto de características, os exemplares colhidos na Baía de Buarcos foram incluídos num *taxon* distinto (Figura 1.4 - C), denominado *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Rodrigues, 1957, 1958; Barbara e Cremades, 1996).

Esta alga apresenta um ciclo biológico trigenético isomórfico (Guiry, 1984; Braga, 1985, 1990) e vive sobre os rochedos e nas bacias do patamar litoral médio e inferior, nas estações calmas (Gayral, 1982). Em Portugal esta espécie encontra-se no horizonte inferior do patamar litoral, sobre os rochedos das estações abrigadas ou pouco batidas, sobretudo nas bacias arenosas das estações batidas. A var. *lusitanicus* encontra-

se bem representada, na maré baixa, nas estações tanto batidas como abrigadas (Ardré, 1970). Na Baía de Buarcos, esta variedade surge abundantemente nos rochedos e nas bacias arenosas, próximo do limite inferior das marés (Rodrigues, 1957).

O *C. teedei* é uma alga anfi-Atlântica (Orfanidis, 1993); no Atlântico oriental, distribui-se de Inglaterra até ao Senegal; populações significativas desta espécie encontram-se localizadas no Brasil (Braga, 1985, 1990). Foi também referenciada no Mediterrâneo e no Mar Negro (Orfanidis, 1993).

Em Portugal, o *C. teedei* tem o seu limite mais a Sul situado em Faro (Ardré, 1970). Pela consulta da base de dados do “Portal das Macroalgas Portuguesas), pode referir-se que esta espécie foi colhida e/ou observada, de Norte para Sul, nas seguintes zonas: Polvoeira, S. Martinho do Porto, Peniche e Zambujeira do Mar; a var. *lusitanicus* encontra-se nas seguintes estações: Aguçadoura, A-Ver-o-Mar, Lavadores, Aguda e Buarcos.

Esta espécie foi alvo de diversos estudos, nomeadamente: ecologia (Braga, 1985, 1990; Orfanidis, 1993; Pereira, 1996b); ciclo de vida e sistemática (Rodrigues, 1958; Guiry, 1984; Braga, 1985; Guiry *et al.*, 1987; Braga, 1990; Barbara e Cremades, 1996); ultraestrutura (Tsekos, 1981, 1982, 1983; Tsekos *et al.*, 1985; Tsekos e Diannelidis, 1990; Tsekos e Schnepf, 1991; Tsekos e Reiss, 1993; Tsekos *et al.*, 1993; Pereira e Mesquita, 1994; Tsekos e Reiss, 1994; Tsekos, 1996; Delivopoulos, 2003; Ouriques e Bouzon, 2003); e análise dos polissacarídeos produzidos (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993a, b).

1.3.3.d – *Chondracanthus acicularis* (Wulfen) Lamouroux

Fronde de cor vermelho-escuro (Figura 1.4 - D), cartilaginosa-elástica, fixada ao substrato por um sistema de rizóides (Gayral, 1982). Eixos principais rastejantes, cilíndricos, mais ou menos comprimidos, irregularmente ramificados; ramulos laterais curtos e espinhosos e/ou longos e curvos, sempre delgados nas extremidades (Fig. 3.49). Esta alga constitui, sobre as rochas, uma espécie de “relvado” (Gayral, 1982; Gayral & Cosson, 1986). Os cistocarpos formam intumescências sésseis na superfície dos ramos (Gayral, 1982).

Ardré (1970) assinala a presença em Portugal (S. Martinho, Arrábida, Sesimbra, Outão, Sines, Carrapateira, Sagres e Carvoeiro) numa espécie vizinha ou, provavelmente, uma forma ecológica do *C. acicularis*: a *Gigartina falcata* (Hering) J. Agardh. Segundo Ardré (1970) esta espécie apresentava os eixos e os ramos nitidamente achatados e todos os talos recolhidos eram estéreis.

Esta alga apresenta um ciclo trigenético isomórfico.

Esta espécie forma tapetes densos e vastos nas estações tanto abrigadas como muito batidas, sobre as rochas cobertas de areia, horizontais a verticais, mais raramente nas bacias, depois da baixa-mar até à meia-maré e, por vezes, sob a protecção doutras algas de maior porte (Ardré, 1970; Gayral & Cosson, 1986). O *C. acicularis* encontra-se, por vezes, epífita sobre outras algas: *Corallina elongata*, *Gelidium*, *Osmundea pinnatifida*, *Plocamium cartilagineum* e, mais raramente, sobre *Cystoseira tamariscifolia* e *Lithophyllum incrustans* (Ardré, 1970).

Esta alga distribui-se no Atlântico desde a Inglaterra até à Mauritânia, nas Antilhas e na América do Norte; surge também no Pacífico (Japão), no Mediterrâneo e no Mar Negro (Ardré, 1970; Gayral, 1982; Cabioch *et al.*, 1995).

Em Portugal é possível encontrar o *C. acicularis* em todas as estações, no Norte e Centro, até S. Martinho e Peniche. Os talos podem apresentar grandes dimensões (até 10 cm de comprimento). No Sul, em particular no Algarve, os talos apresentam-se

curtos (0,5 a 2 cm de comprimento) (Rodrigues, 1957; Ardré, 1970; Gaspar, 2002). Na base de dados www.uc.pt/seaweeds, encontram-se registadas colheitas nas seguintes estações: Aguçadoura, A-Ver-o-Mar, Lavadores, Aguda Buarcos, S. Pedro de Moel, Polvoeira, Nazaré e Consolação.

Aspectos relacionados com a reprodução e com o tipo de ficocolóide produzido foram estudados, respectivamente, por Gury e Cunningham (1984) e por McCandless *et al.* (1983).

1.3.4 – Petrocelidaceae

As Petrocelidaceae estão muito próximas filogeneticamente das Gigartinaceae e das Phylloporaceae, formando um “aglomerado” na árvore filogenética das carragenófitas (ver Figura 1.3) (Freshwater *et al.*, 1994).

Guiry e colaboradores (1984) elevam o subgénero *Mastocarpus* à categoria de género, excluindo-o da família Gigartinaceae, como havia sido sugerido por Kim (1976) e incluindo-o na família Petrocelidaceae. As espécies pertencentes ao género *Mastocarpus* diferenciam-se das do género *Gigartina* por características morfológicas, bioquímicas e pelo ciclo biológico (trigenético isomórfico nas Gigartinaceae e trigenético heteromórfico nas Petrocelidaceae) (Braga, 1985). Os tetrasporófitos do género *Mastocarpus*, conhecidos com *Petrocelis*, possuem talos incrustantes e de tonalidade escura.

Esta família está representada em Portugal pela espécie *M. stellatus* (Ardré, 1970; Gallardo e Casado, 2000).

1.3.4.a – *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry

Gametófitos erectos (Figura 1.4 - E), com 10 a 15 cm de altura, consistência cartilaginosa, de cor vermelho-escuro ou acastanhada. O talo consiste num disco de fixação com dimensões até 5 cm, do qual deriva uma ou mais frondes, cilíndricas na base, em forma de goteira na zona mediana e progressivamente achatado para as extremidades, com ramificações dicotómicas, fazendo lembrar uma cauda de peixe. Gametófito feminino com excrescências carnudas, cónicas, localizadas na superfície do talo e onde se situam os cistocarpos. Tetrasporófitos incrustantes, anteriormente chamados *Petrocelis cruenta*, com forma discóide, coriáceos e de cor púrpura quase negra (Gayral e Cosson, 1986; Cabioch *et al.*, 1995; Dixon e Irvine, 1995).

O *M. stellatus* apresenta um ciclo de vida trigenético heteromórfico (Bird *et al.*, 1994). Neste trabalho só foram estudados os gametófitos.

Esta alga encontra-se sobre as rochas em estações expostas, no horizonte inferior do patamar médiolitoral, misturado com o *C. crispus* (Gayral e Cosson, 1986; Dixon e Irvine, 1995).

Esta espécie está distribuída por todo o Atlântico Nordeste, desde o Ártico até Marrocos; possibilidade de existência nas Ilhas de Cabo Verde (observação pessoal). A sua distribuição na Península Ibérica está restrita às costas Atlânticas. Os exemplares mais setentrionais foram localizados em Magoito (Estremadura, Portugal) (Gallardo e Casado, 2000). Ardré (1970) refere a sua presença abundante junto ao Cabo Raso e pouco abundante em Sines.

De acordo com os registos da base de dados do “Portal das Macroalgas Portuguesas” (www.uc.pt/seaweeds), foram colhidos e/ou referenciados exemplares desta espécie nas seguintes estações de colheita (do Norte para o Sul): Apúlia,

Aguçadoura, A-Ver-o-Mar, Lavadores, Aguda, Buarcos, Praia do Salgado, Peniche, S. Martinho do Porto e Consolação.

Estudos sobre a ecologia desta alga foram feitos por (Pybus, 1977). A determinação da natureza dos polissacarídeos produzidos pelo *M. stellatus* foi feita por Bellion e colaboradores (1983) e por Craigie e Rivero-Carro (1992).

1.3.5 – Phylloporaceae

As Phylloporaceae, juntamente com a relacionada família Gigartinaceae, formam o “complexo-Gigartinaceae” das Gigartinales, uma das ordens chave de Kylin (1956). As Phylloporaceae são particularmente interessantes quando comparadas com as Gigartinaceae, pois ambas famílias apresentam adaptações ecológicas, produzem ficocolóides de elevado valor económico e apresentam um grande número de espécies com um padrão de distribuição mundial similar. Em contraste com a grande diversidade de tipos de cistocarpos presentes nas Gigartinaceae (Hommersand *et al.*, 1993), a morfologia dos cistocarpos das Phylloporaceae é vista normalmente como sendo menos complexa e de grande uniformidade (Fredericq *et al.*, 2002).

Estas famílias, no entanto, diferem drasticamente no que respeita aos seus ciclos biológicos, característica à muito considerada de grande importância na taxonomia das Rhodophyceae (Guiry, 1987; Maggs, 1990). As Phylloporaceae são o único grupo de algas, nas Rhodophyceae, que exibem quatro tipos diferentes de ciclos de vida (Fredericq *et al.*, 2002): 1 – trigenético isomórfico; 2 – trigenético heteromórfico, com alternância de gametófitos macroscópicos e tetrasporófitos de reduzidas dimensões; 3 – digenético do tipo tetrasporoblástico, onde estão ausentes os carposporófitos (Newroth, 1971; Ardré, 1977; Masuda, 1996); 4 – ciclo de vida do tipo directo, no qual só existem gametófitos femininos que produzem carposporófitos por apomixia (Maggs, 1988; Masuda e Norris, 1994).

As Phylloporaceae estão representadas em Portugal pelos géneros *Gymnogongrus*, *Ahnfeltiopsis* e *Phyllophora* e pelas espécies *G. crenulatus*, *G. griffithsiae*, *A. devoniensis* e *P. pseudoceranooides* (Gaspar, 2002). Neste trabalho foram estudados o *G. crenulatus* e o *A. devoniensis*.

1.3.5.a – *Gymnogongrus crenulatus* (Turner) J. Agardh

Talo coriáceo (Figura 1.4 - F), de cor vermelho-escuro mas, por vezes, com as extremidades de tonalidade mais pálida (Gayral e Cosson, 1986; Cabioch *et al.*, 1995). Talo com 5 a 15 cm de altura, aderido ao substrato por intermédio de um disco de fixação. Fronde cilíndrica na parte inferior e aplanada na parte superior, ramificada dicotómicamente.

Esta alga possui um ciclo digenético, sem carposporófito; a geração resultante do zigoto é um tetrasporoblasto parasita (Ardré, 1977; Mathieson *et al.*, 1984; Gayral e Cosson, 1986); estas estruturas parecem excrescências verrugosas e encontram-se presentes só de um dos lados da fronde (Cabioch *et al.*, 1995).

O *G. crenulatus* vive sobre as rochas em bacias, no horizonte médio do patamar médiolitoral ou no patamar infralitoral, até 13 m de profundidade; esta espécie é tolerante à cobertura pela areia (Gayral e Cosson, 1986; Dixon e Irvine, 1995).

A sua distribuição no Atlântico Nordeste vai desde a Noruega até à Mauritània; também se encontra presente no Mediterrâneo (Cabioch *et al.*, 1995; Dixon e Irvine, 1995). Em Portugal, segundo a base de dados “on-line” anteriormente referida, o *G. crenulatus* distribui-se, de Norte para o Sul, pelas seguintes estações: Apúlia, A-Ver-o-

Mar, Lavadores, Aguda, Buarcos, S. Pedro de Moel, Água de Medeiros, Polvoeira, Légua e Consolação.

O ciclo de vida desta alga foi estudado por Ardré (1977), a análise do tipo de ficocolóide produzido foi feita por McCandless (1982) e o estudo da sua potencialidade como fonte de carragenana foi feito por Mathieson *et al.* (1984).

1.3.5.b – *Ahnfeltiopsis devoniensis* (Gréville) P.C. Silva & DeCew

Esta espécie (Figura 1.4 - G) é difícil de distinguir do *G. crenulatus*, no entanto, o *A. devoniensis* apresenta, geralmente, dimensões inferiores, com uma altura máxima de 10 cm (Cabioch *et al.*, 1995). Apresenta uma cor vermelho-acastanhado, as extremidades ramificadas dicotomicamente, de cor mais pálida, quase esbranquiçada (Maggs *et al.*, 1992; Cabioch *et al.*, 1995).

As frondes, em forma de pequenos tufo, emergem de pequenos discos de fixação com cerca de 3 mm de diâmetro. As frondes apresentam-se muito ramificadas; ramificações com largura constante (3 a 4 mm) (Cabioch *et al.*, 1995).

O *A. devoniensis*, anteriormente chamado *Gymnogongrus devoniensis*, foi separado do género *Gymnogongrus* por apresentar um ciclo biológico trigenético heteromórfico (relativamente aos exemplares presentes em Portugal), no qual os carpósporos dão origem a tetrasporófitos incrustantes (Maggs, 1990; Maggs *et al.*, 1992). Os gametófitos femininos apresentam cistocarpos esféricos, que sobressaem ligeiramente, em ambos os lados das ramificações (Maggs *et al.*, 1992; Cabioch *et al.*, 1995).

Esta alga cresce abundantemente em rochas sombrias e húmidas, e em bacias arenosas, em estações moderadamente expostas (Maggs *et al.*, 1992).

O *A. devoniensis* encontra-se distribuído, no Atlântico Nordeste, da Irlanda até Portugal. Os exemplares mais setentrionais foram colhidos em Albufeira (Algarve) (Maggs *et al.*, 1992). Em Portugal, e segundo a consulta feita ao “Portal das Macroalgas Portuguesas”, esta espécie encontra-se nas seguintes localidades: Lavadares, Aguda, Buarcos e Ribamar.

Para além dos estudos feitos por Maggs (1990; 1992), sobre a morfologia, taxonomia e biologia molecular, a análise da composição polissacarídica do *A. devoniensis* foi feita por McCandless *et al.* (1982).

1.3.6 – Cystocloniaceae

De entre as carragenófitas, as cystocloniaceae constituem a família mais afastada, filogeneticamente falando, das Gigartinaceae, formando um “aglomerado” distinto juntamente com a família Solieriaceae, Furcellariaceae, Hypneaceae e Caulacanthaceae (ver Figura 1.3) (Freshwater *et al.*, 1994).

Ao contrário dos membros das Gigartinaceae, Petrocelidaceae e Phyllophoraceae, que apresentam várias células iniciais do gonimoblasto, ausência de filamentos de conexão e tetrasporocistos cruciados, as Cystocloniaceae apresentam uma só célula inicial do gonimoblasto, filamentos de conexão e tetrasporocistos zonados (Freshwater *et al.*, 1994; Dixon e Irvine, 1995).

Esta família está representada em Portugal pelo género *Calliblepharis* e por duas espécies, *C. ciliata* e *C. jubata* (Conde e Gallardo, 2002; Gaspar, 2002). Neste trabalho a única espécie estudada foi a *C. jubata*.

1.3.6.a – *Calliblepharis jubata* (Goodenough & Woodward) Kutzing

Esta alga (Figura 1.4 - H) apresenta um talo foliáceo lanceolado, de consistência cartilaginosa mas flexível, de cor vermelho-escuro, aplanado, com a superfície por vezes recoberta de pequenas proliferações espinhosas, muito polimórfico e com 10 a 30 cm de altura. Os talos encontram-se fixados às rochas por intermédio de hápteros ramificados (Cabiocch *et al.*, 1995; Dixon e Irvine, 1995; Conde e Gallardo, 2002).

As duas espécies presentes em Portugal são difíceis de diferenciar, no entanto, a *C. jubata* pode apresentar as extremidades enroladas em forma de gancho e os tetrasporocistos (nos tetrasporófitos), do tipo zonado, encontram-se nas proliferações espinhosas da superfície do talo (Gayral e Cosson, 1986; Conde e Gallardo, 2002).

Esta espécie apresenta um ciclo biológico trigenético, com gametófitos e tetrasporófitos morfologicamente idênticos (Dixon e Irvine, 1995).

A *C. jubata* vive sobre as rochas, entre o horizonte inferior do patamar médiolitoral e profundidades na ordem dos 25 m, em estações batidas (Gayral e Cosson, 1986).

Esta alga encontra-se distribuída desde as ilhas Britânicas até à Mauritânia; também está presente no Mediterrâneo (Dixon e Irvine, 1995; Conde e Gallardo, 2002). Em Portugal, segundo Ardré, O *C. jubata* tem a sua distribuição, mais a Sul, limitada ao Cabo de São Vicente (Sagres). De acordo com os registos da base de dados do “Portal das Macroalgas Portuguesas” (www.uc.pt/seaweeds), foram colhidos e/ou referenciados exemplares desta espécie nas seguintes estações de colheita (do Norte para o Sul): Lavadores, Aguda, Buarcos e Peniche.

Foram realizados, com esta alga, estudos sobre as variações sazonais da morfologia e tamanho (Zinoun e Cosson, 1996), a natureza dos polissacarídeos produzidos (Deslandes *et al.*, 1985; Zinoun, 1993) e a actividade celular da sulfhidrolase (Zinoun *et al.*, 1997).

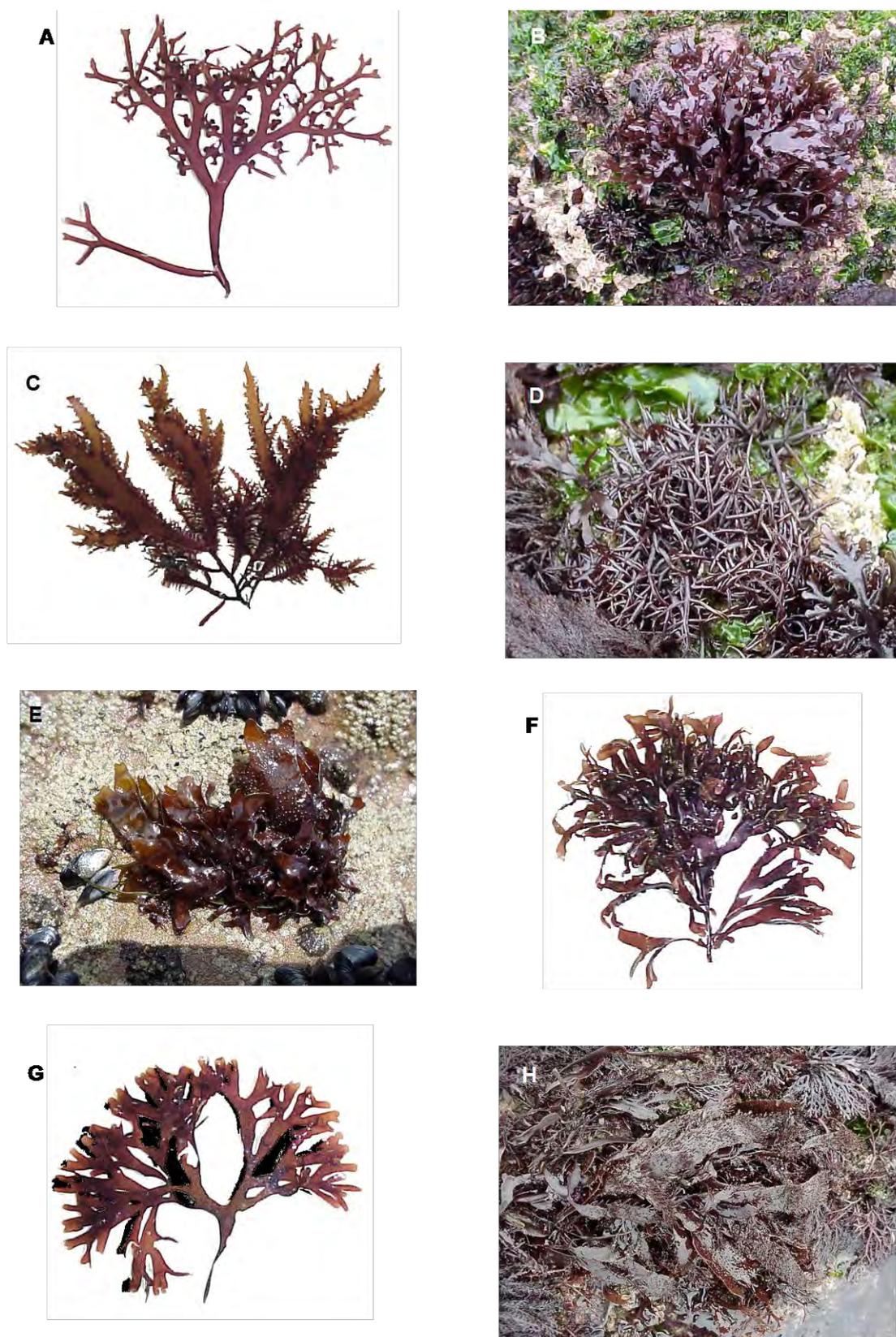


Figura 1.4 – Espécies estudadas (Gigartinales, Rhodophyta): *Gigartina pistillata* (A); *Chondrus crispus* (B); *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (C); *Chondracanthus acicularis* (D); *Mastocarpus stellatus* (E); *Gymnogongrus crenulatus* (F); *Ahnfeltiopsis devoniensis* (G); *Calliblepharis jubata* (H).

1.4 - As carragenanas

Há séculos atrás a carragenana já era usada na Europa e na Ásia como agente espessante e estabilizante em alimentos. Na Europa, o uso de carragenana iniciou-se na Irlanda há mais de 600 anos quando, na pequena povoação da costa sul da Irlanda, chamada “Carraghen”, os pudins (“flans”) eram feitos pela cozedura de “Irish Moss” (Musgo Irlandês = *Chondrus crispus*) no leite. O nome carragenina, designação antiga da carragenana, foi usado pela primeira vez em 1862 para designar o extracto obtido a partir do *C. Crispus*, em referência ao nome da pequena localidade Irlandesa (Tseng, 1945). O procedimento para a extracção das carragenanas foi descrito, pela primeira vez, por Schmidt em 1844 (van de Velde e de Ruiten, 2002).

O Musgo Irlandês é usado desde o século XIX, a nível industrial, na clarificação da cerveja. A sua produção comercial teve início, na década de 30, nos Estados Unidos (Therkelsen, 1993). A interrupção das importações de agar durante a II Guerra Mundial, levou à sua substituição pela carragenana; esta situação constituiu o ponto de partida duma indústria florescente (Ribier e Godineau, 1984).

O fraccionamento dos extractos brutos de carragenana iniciou-se na década de 50 (Smith *et al.*, 1955), da qual resultou a caracterização dos diferentes tipos de carragenana. No mesmo período foi determinada a estrutura molecular das carragenanas (Oneill, 1955b, a), descobrindo-se assim a estrutura da 3,6-anidro-D-galactose presente na carragenana kappa, assim como os tipos de ligação entre os anéis de galactose e anidrogalactose.

Hoje, a indústria das carragenanas já não se encontra limitada à extracção a partir do *C. crispus*, sendo usadas inúmeras espécies de algas vermelhas marinhas (Gigartinales, Rhodophyta). Estas algas foram, durante muitos anos, exclusivamente colhidas a partir de populações naturais. A cultura de macroalgas iniciou-se, no Japão, há cerca de 200 anos. No entanto, o incremento do conhecimento científico sobre as algas, em particular sobre os seus ciclos de vida, permitiu o início da “plantação” artificial em larga escala na década de 50. Actualmente são cultivados cerca de uma dúzia de taxa de algas marinhas, o que se traduz numa diminuição considerável da pressão exercida sobre as populações naturais (Critchley e Ohno, 1998b).

Durante os últimos anos o mercado mundial de carragenanas tem aumentado cerca de 3 % ano, com um volume total de aproximadamente 310 milhões de euros em 2000 (McHugh, 2003).

1.4.1 - Estrutura Química

1.4.1.a – Descrição geral

O produto extraído no seu estado puro é denominado carragenina, mas é extremamente instável e difícil de obter; conseqüentemente, a carragenina liga-se a um ou mais catiões, para constituir diversos sais de carragenina: a carragenana. Por recomendação da “Division of Organic Chemistry - ACS”, deve ser usada a terminação “ana” em vez da terminação “ato”, pois esta última diz respeito a sais cristalizáveis; ora, os sais de carragenina nunca cristalizam (Perez *et al.*, 1992).

As carragenanas são polissacarídeos extraídos de diversas famílias da ordem Gigartinales (McCandless, 1978; Chopin *et al.*, 1999a). Estas poligalactanas são sulfatadas e possuem uma estrutura linear formada por resíduos de galactose com alternância de ligações $\alpha(1-3)$ e $\beta(1-4)$ (Anderson *et al.*, 1965; Rinaudo, 2002).

A carragenana, em estado puro seco, apresenta-se sob a forma de um pó, inodoro e sem sabor. A solução e o gel de carragenana apresentam-se, normalmente, translúcidos e a sua incorporação noutras soluções não modifica nem o gosto nem a coloração original destas. Em solução, os polímeros de carragenana comportam-se como colóides hidrófilos aniónicos (Ribier e Godineau, 1984; Perez *et al.*, 1992).

A carragenana é um composto de elevada massa molecular, com um alto grau de polidispersividade. A distribuição da massa molecular varia de amostra para amostra, dependendo da sua origem, idade das algas, época da colheita, modo de extracção e duração do tratamento. As carragenanas comerciais (utilizadas a nível alimentar) possuem um elevado peso molecular, variando normalmente entre os 400 e os 600 kDa, com um mínimo de 100 kDa. Este valor mínimo foi estabelecido pelas entidades reguladoras (FDA, EUC, etc.) em resposta aos relatos de ocorrência de ulceração do cego e do cólon, induzida por carragenana altamente degradada. Em 1976 a carragenana alimentar foi definida pela FDA como possuindo uma viscosidade aquosa de pelo menos 5 mPa.s (5 cP) numa concentração de 1.5 % a 75 °C, o que corresponde aos anteriormente referidos 100 kDa.

Para além da carragenana tradicionalmente extraída, denominada carragenana refinada, um novo tipo de carragenana, promovido por um grupo de produtores filipinos (Seaweed Industry Association of the Philipines – www.philexport.org/members/siap/seaweed.htm), surgiu no mercado. Este novo produto é comercializado sob o nome de “Philippine Natural Grade” (PNG); outros sinónimos para este tipo de carragenana são “Processed Eucheuma Seaweed” (PES), carragenana semi-refinada (“Semi-refined Carrageenan”, SRC), carragenana alternativamente refinada (“Alternative Refined Carrageenan”, ARC) e farinha modificada alcalinamente (“Alkali-modified Flour”, AMF). Este produto tem por base algas do género *Eucheuma* e *Kappaphycus* com origem na Indonésia e nas Filipinas. As algas sofrem um tratamento mais económico que evita a extracção da carragenana. O PES difere da carragenana tradicional pois contém 8 a 15 % de material ácido insolúvel, quantidade substancialmente superior aos 2 % presentes na carragenana refinada. Esta fracção ácida insolúvel consiste, em grande parte, em celulose que se encontra presente nas paredes celulares. O conteúdo em metais pesados é também superior na PES do que na carragenana refinada (Imeson, 2000). O componente solúvel em água, presente na PES, é predominantemente carragenana kappa, sendo quase indistinguível da obtida pelos métodos de extracção alcalina convencionais. No entanto, o peso molecular da carragenana kappa presente na PES pode ser ligeiramente superior ao da carragenana refinada (Hoffmann *et al.*, 1996).

1.4.1.b – Estrutura molecular

As cadeias moleculares destes polissacarídeos apresentam duas características fundamentais: são constituídas a partir dum monómero – a galactose – e contêm uma forte proporção de ésteres sulfato ($O-SO_3^-$), aos quais se deve a carga negativa apresentada pelo composto. A galactose, em solução aquosa, fixa uma molécula de água ao carbono 1 (C_1), o que conduz a uma estrutura instável, que se auto-cicliza em forma de piranose, para formar uma ponte de oxigénio entre o C_1 e o C_5 . A ciclização pode ocorrer de três maneiras distintas: sob a forma de β -D-galactose, ou sob a forma de α -D-galactose, ou então, sob a forma de 3,6 anidro- α -D-galactose, por intermédio da criação duma ponte de oxigénio entre C_3 e C_6 da α -D-galactose (Perez *et al.*, 1992).

A carragenana não é um biopolímero puro mas sim uma mistura de galactanas sulfatadas, lineares e solúveis em água. Trata-se de um composto constituído por uma

alternância de unidades do tipo β -D-galactose (unidades G) e α -D-galactose (unidades D) ou 3,6-anidrogalactose (unidades A), formando um dissacarídeo “ideal” que constitui o “bloco” básico que se repete na estrutura de cada carragenana (Figura 1.5).

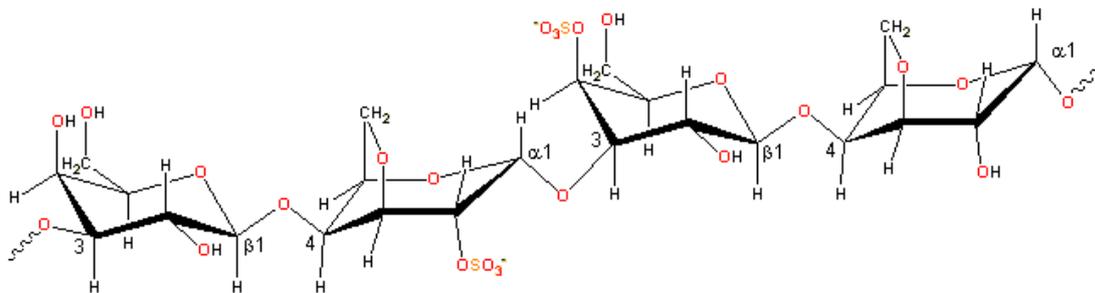


Figura 1.5 – A carragenana é constituída pela alternância de unidades de β -D-galactose e de α -D-galactose, ou de 3,6-anidrogalactose (Segundo Chaplin, 2003).

As galactanas sulfatadas são classificadas de acordo com a presença 3,6-anidrogalactose no resíduo ligado em posição 4 e o número de grupos sulfato presentes. Para a carragenana do tipo comercial, o conteúdo em sulfato varia entre os 22 e os 38 %. Para além da galactose e do sulfato, outros hidratos de carbono (por exemplo xilose, glucose e ácidos urónicos) e substituintes (por exemplo, ésteres metil e grupos piruvato) poderão estar presentes na carragenana (van de Velde e de Ruiter, 2002). Visto que a carragenana nativa é uma mistura de polissacarídeos não-homólogos, o termo unidade dissacarídica repetitiva refere-se a uma estrutura idealizada (Craigie, 1990) (Figura 1.6 e Tabela 1.1). Para descrever estruturas mais complexas foi desenvolvido um código nomenclatural baseado em letras (Knutsen *et al.*, 1994).

Os tipos mais comuns de carragenana são tradicionalmente identificados por uma letra do alfabeto grego (Craigie, 1990; Chopin *et al.*, 1999a) (Tabela 1.1). As três carragenanas mais importantes a nível comercial são a iota (ι), a kappa (κ) e a lambda (λ), cujos nomes segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e segundo o código de letras são, respectivamente, carragenose 2,4'-dissulfato (G4S-DA2S), carragenose 4'-sulfato (G4S-DA) e carragenana 2,6,2'-trissulfato (G2S-D2S,6S). As carragenanas iota e kappa são carragenanas gelificantes, enquanto que a lambda é uma carragenana espessante/viscosificante (van de Velde *et al.*, 2002a).

A diferença no comportamento reológico entre a carragenana iota e a kappa, por um lado, e a carragenana lambda, por outro, resulta do facto das unidades DA das formas gelificantes possuírem uma conformação 1C_4 , que resulta da presença de pontes 3,6-anidro, enquanto a lambda não as possui. Os precursores naturais da carragenana iota e kappa são denominados por nu (ν) e mu (μ), com os códigos G4S-D2S,6S e G4S-D6S, respectivamente. Estes precursores biológicos são carragenanas não gelificantes e possuem unidades D na conformação 4C_1 , como consequência da ausência de pontes 3,6-anidro (van de Velde *et al.*, 2002a).

Tabela 1.1 – Diferentes tipos de carragenana (Adaptado de Stortz *et al.* 1997 e Amimi *et al.* 2001).

Carragenana	Unidades G β -D-galactose	Unidades D α -D-galactose	Código de Letras	
Família kappa				
Kappa (κ)	4-sulfato	3,6-anidro	G4S	DA
Iota (ι)	4-sulfato	3,6-anidro 2-sulfato	G4S	DA2S
Mu (μ)	4-sulfato	6-sulfato	G4S	D6S
Nu (ν)	4-sulfato	2,6-dissulfato	G4S	D2S6S
Omicron (\omicron)	4-sulfato	2-sulfato	G4S	D2S
Família lambda				
Lambda (λ)	2-sulfato	2,6-dissulfato	G2S	D2S6S
Ksi (ξ)	2-sulfato	2-sulfato	G2S	D2S
Theta (θ)	2-sulfato	3,6-anidro 2-sulfato	G2S	DA2S
Pi (π)	Piruvato 2-sulfato	2-sulfato	GP, 2S	D2S
Família beta				
Beta (β)	-	3,6-anidro	G	DA
Alpha (α)	-	3,6-anidro 2-sulfato	G	DA2S
Gamma (γ)	-	6-sulfato	G	D6S
Delta (δ)	-	2,6-dissulfato	G	D2S6S
Família omega				
Omega (ω)	6-sulfato	3,6-anidro	G6S	DA
Psi (ψ)	6-sulfato	6-sulfato	G6S	D6S

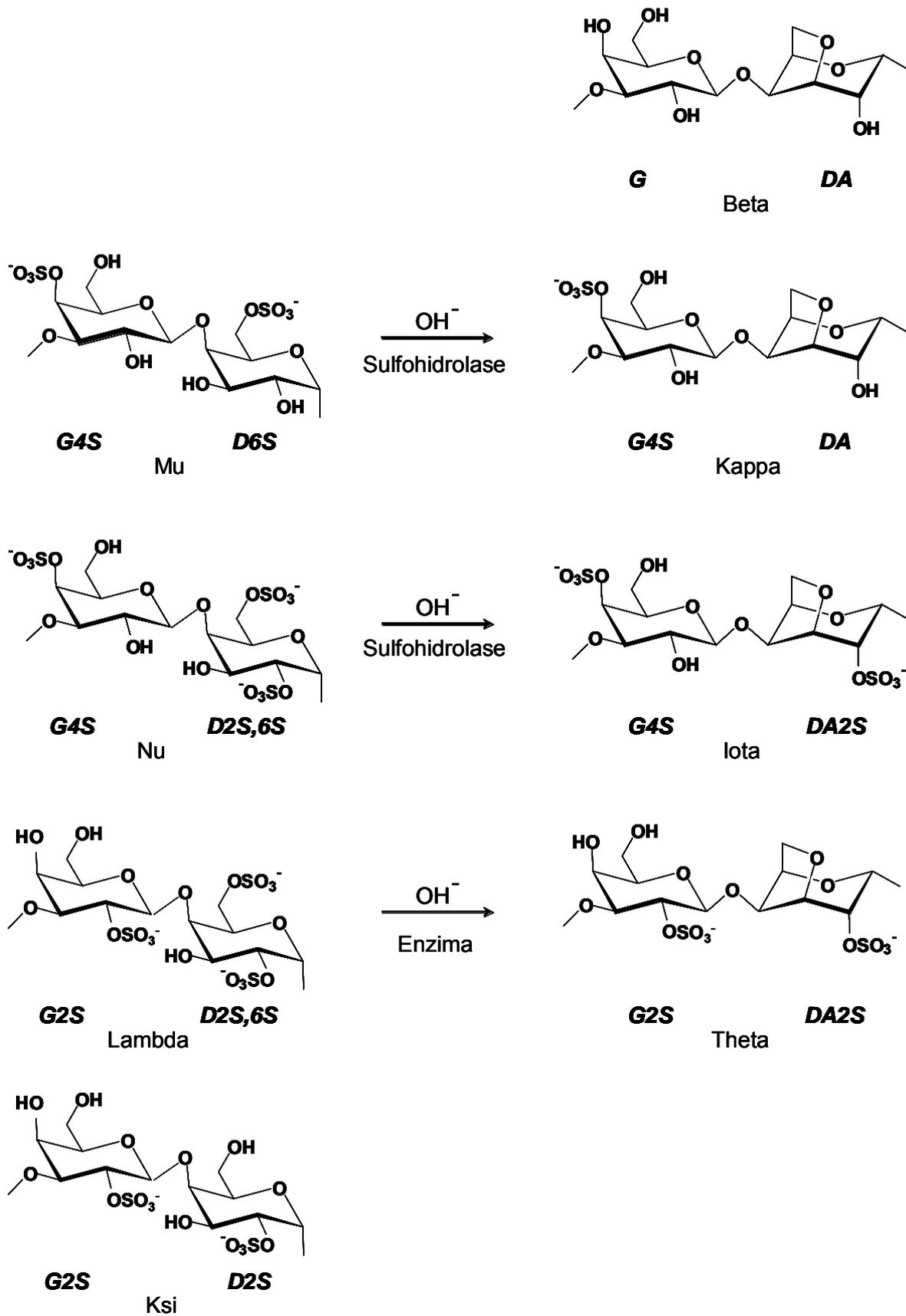


Figura 1.6 – Representação esquemática das diferentes estruturas diméricas das carragenanas estudadas (Segundo van de Velde *et al.* 2004).

1.4.1.c – Modificação alcalina (ou enzimática) das carragenanas

As pontes 3,6-anidro são formadas pela eliminação do sulfato dos ésteres sulfato, em C-6, presentes nos precursores. *In vivo*, a carragenana iota e kappa são formadas enzimaticamente a partir dos seus precursores, pela actuação de uma sulfohidrolase. No processamento laboratorial e/ou industrial, a reacção de ciclização é levada a cabo pelo ião hidróxido (OH⁻) como catalisador. A conformação ¹C₄ das unidades 3,6-anidro-D-galactose na carragenana iota e kappa permite a formação de uma estrutura terciária helicoidal, essencial na formação de géis. A ocorrência de unidades dissacarídicas sem o anel de 3,6-anidro e, conseqüentemente, sem a conformação ⁴C₁, promove a formação de pregas na cadeia o que impede a origem da estrutura helicoidal e a conseqüente não gelificação da carragenana.

A formação de unidades 3,6-anidro- α -D-galactose (DA) a partir de resíduos de α -D-galactose 6-sulfato (D6S) por intermédio de tratamento alcalino é uma importante e bem conhecida reacção (Figura 1.8) (Percival, 1949; Turvey, 1965; Ciancia *et al.*, 1993b). Esta reacção é usada a nível industrial, para potenciar as propriedades gelificantes das carragenanas (Glicksman, 1983) e no laboratório, para a determinação quantitativa dos resíduos de α -D-galactose 6-sulfato (D6S) (Rees, 1961).

A carragenana beta (β), extraída do *Betaphycus gelatinum* (outrora denominado *Eucheuma gelatinae*), difere da κ carragenana devido à ausência do radical éster sulfato (O-SO₃⁻) no C₄ da β -D-galactose. Esta ausência acentua o carácter hidrófobo da molécula, que se traduz na produção de um gel mais duro do que o induzido pela carragenana kappa e de uma sinérese mais pronunciada. A estrutura espacial desta carragenana é idêntica à da carragenana kappa (cadeias em hélice). No processo de gelificação, as cadeias estão mais próximas na carragenana beta do que na carragenana kappa e mais alongadas na carragenana iota. A carragenana beta tem origem na conversão enzimática ou alcalina da carragenana gamma (γ) (Perez *et al.*, 1992; Ragasa, 2003)

A carragenana lambda é ciclizada em meio alcalino, produzindo derivados com 3,6-anidrogalactose (carragenana theta - θ), de forma mais lenta do que nas carragenanas da família kappa (Figura 1.7). A ciclização de compostos contendo unidades de β -D-galactose não sulfatadas é 3.6 a 7.6 vezes mais rápida do que na carragenana lambda, sugerindo que a presença do grupo 2-sulfato, no resíduo β -D-galactose (G2S), protege a molécula da polarização ou ionização (Figura 1.7), fenómenos que antecedem o da ciclização (Ciancia *et al.*, 1993b; Nosedo e Cerezo, 1995).

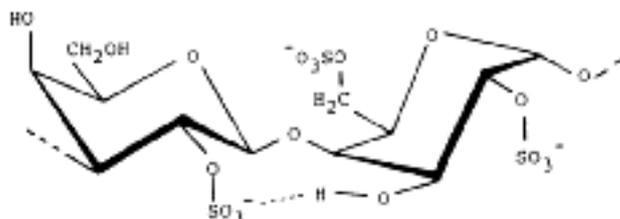


Figura 1.7 – Interação entre o sulfato em C-2 da unidade G e o hidroxil em C-3 da unidade D (Ciancia *et al.*, 1993b).

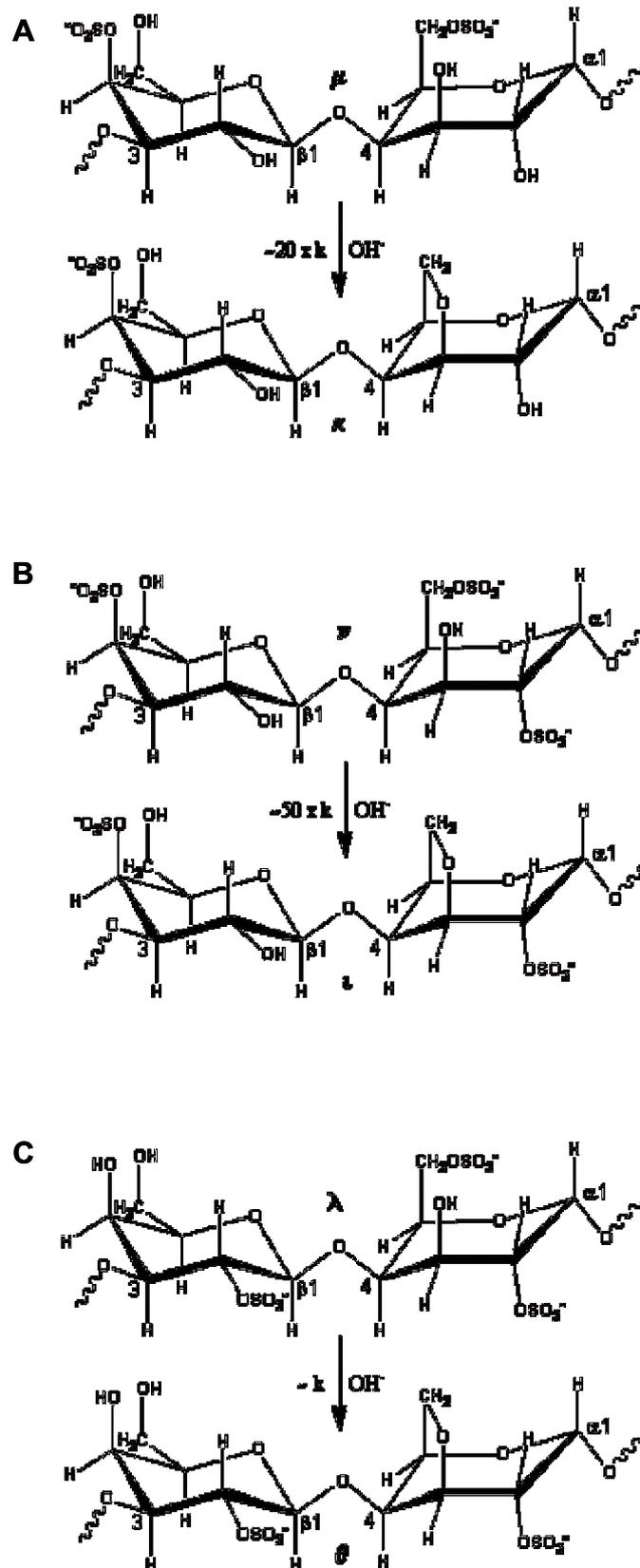


Figura 1.8 – Conversão das carragenanas mu e nu (precursores biológicos das carragenanas gelificantes) em carragenanas kappa (A) e iota (B), e da carragenana lambda em theta (C), por intermédio de tratamento alcalino (Segundo Chaplin, 2003).

Foi possível identificar um outro tipo de carragenana: o tipo ksi (carragenana ξ). Esta carragenana resulta, sem dúvida, da evolução metabólica da carragenana λ e encontra-se tanto na célula como nas soluções resultantes da extracção alcalina. Tanto a carragenana theta como a ksi foram encontradas em extractos nativos de tetrasporófitos de espécies da família Gigartinaceae (Chopin *et al.*, 1999a; Falshaw *et al.*, 2003).

Nalgumas espécies da família Petrocelidaceae, o ficocolóide extraído difere da carragenana lambda típica devido à presença dum radical piruvato, em vez do sulfato, no primeiro monómero da sequência; alguns autores designam esta carragenana por pi (π) (Chopin *et al.*, 1999a).

1.4.1.d – Carragenanas híbridas

As carragenanas exibem, por vezes, uma grande regularidade estrutural, mas na maior parte dos casos apresentam-se heterogéneas, formando um híbrido, constituído por duas ou mais fracções de carragenana.

Carragenanas híbridas do tipo kappa/iota e os respectivos precursores biológicos (μ e ν) foram encontradas nos gametófitos de várias espécies da família Gigartinaceae, Phylloporaceae, Cystocloniaceae, Solieriaceae e Hypneaceae (Correa-Diaz *et al.*, 1990; Pereira e Mesquita, 2003). Estas carragenanas híbridas kappa/iota consistem numa cadeia híbrida, em que alternam unidades de carragenana kappa e iota (van de Velde *et al.*, 2001), podendo variar desde a carragenana iota quase pura, até a carragenana kappa quase pura (Bixler, 1996). Os copolímeros de carragenana kappa e iota são conhecidos a nível industrial como carragenana “kappa-2”, “híbridos-kappa/iota” ou carragenana “weak-gelling” (Bixler *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2003).

A variação estrutural, associada à sulfatação do polímero, promove alterações ao nível das propriedades reológicas das carragenanas (Rees *et al.*, 1982). Com efeito, a formação de um gel de carragenana híbrida kappa-iota apresenta-se altamente dependente da estrutura do polissacarídeo. Assim, as propriedades reológicas variam consideravelmente na sequência de pequenas variações na estrutura do polímero (Rees, 1969). As implicações reológicas desta hibridização correspondem a um enfraquecimento do gel forte e quebradiço da carragenana kappa, pelo carácter suave e elástico do gel de carragenana iota. Este tipo de carragenana híbrida tem grande potencial em aplicações alimentares na área da indústria dos derivados lácteos (Bixler *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2003).

Outros tipos de híbridos são encontrados por exemplo no género *Betaphycus* (Solieriaceae), que produzem carragenana híbrida kappa/beta (Chopin *et al.*, 1999a; Ragasa, 2003) e nos tetrasporófitos das espécies pertencentes às famílias Petrocelidaceae e Gigartinaceae, que produzem carragenanas híbridas do tipo lambda/theta, lambda/ksi ou ksi/theta (Correa-Diaz *et al.*, 1990; Chopin *et al.*, 1999a)

1.5 - Análises químicas e estruturais das carragenanas

A análise química das carragenanas tem sido feita sobretudo a partir de amostras puras, com vista à determinação da estrutura molecular detalhada. Inicialmente usavam-se técnicas analíticas baseadas em métodos de degradação e modificação química, métodos esses muito demorados e tediosos. Na década de 60 (do século passado) vários investigadores começaram a identificar a natureza química dos ficocolóides com o auxílio da espectroscopia de infravermelho (Neely, 1957; Lloyd *et al.*, 1961; Anderson *et al.*, 1968b; Stancioff e Stanley, 1969). Em meados dos anos 70, com a introdução da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e da hidrólise redutiva (com

preservação da ponte 3,6-anidro), houve um grande impulso no estudo da estrutura química das carragenanas (Bhattacharjee *et al.*, 1978).

No presente, ainda se encontram em desenvolvimento os métodos e as técnicas analíticas para determinar as quantidades, a polidispersidade e a pureza das carragenanas presentes nas algas, nas misturas industriais e, até mesmo, nos produtos alimentares (Roberts e Quemener, 1999; van de Velde e de Ruiter, 2002; Pereira *et al.*, 2003). As diferentes técnicas usadas neste tipo de análise são, por exemplo, o FT-Raman, a electroforese, a colorimetria e os ensaios combinados com HPLC (cromatografia líquida de alta performance).

1.5.1 - Isolamento de carragenanas

A extracção comercial das carragenanas é executada sob condições de extrema alcalinidade e a elevadas temperaturas (Bixler, 1996; van de Velde e de Ruiter, 2002). No entanto, para se obterem fracções específicas ou carragenanas com elevado conteúdo em percursos, foram desenvolvidos diversos métodos de extracção, em condições menos agressivas. A extracção em água quente é, provavelmente, o método mais antigo aplicado à extracção de carragenanas a partir de algas.

Para remover compostos indesejáveis, sobretudo os solúveis em solventes orgânicos (alguns pigmentos, por exemplo), é usual recorrer a misturas de acetona, álcool (metanol) ou éter di-etílico (Zinoun e Cosson, 1996). Com a conjugação de diferentes tempos e temperaturas de extracção é possível obter diferentes fracções de carragenana. Para extracções mais delicadas, é usual a adição de sais: cloreto de sódio (NaCl) ou bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Para digerir o amido florídeo, polissacarídeo presente nalgumas soluções resultantes de extracções a quente (temperaturas superiores a 80 °C), é adicionada amiloglucosidase. A diálise pode ser aplicada na remoção de impurezas de baixo peso molecular, tais como sais e açúcares. Para remover os componentes insolúveis das paredes celulares (como por exemplo as microfibrilhas de celulose) recorre-se, normalmente, a uma centrifugação e/ou a filtragens sucessivas. Tal como no processamento industrial, as carragenanas isoladas por precipitação em etanol ou isopropanol, ao qual se segue a etapa de secagem. A liofilização é um método elegante para obter carragenanas mas, por razões de custo, só pode ser aplicado em extracções de pequena escala. As resinas de diálise ou de troca iónica são aplicadas na obtenção de carragenanas com contra-íões (Bixler *et al.*, 2001; van de Velde e de Ruiter, 2002; van de Velde *et al.*, 2002a; Falshaw *et al.*, 2003).

1.5.2 - Fraccionamento de carragenanas

A técnica mais usada no fraccionamento de carragenanas consiste na adição de KCl, o que permite a separação da carragenana kappa das outras fracções (Smith e Cook, 1953). Esta técnica baseia-se no facto das hélices de carragenana kappa formarem agregados na presença de íões de potássio, promovendo a sua gelificação. Nenhuma das outras carragenanas (iota e lambda) possui este mecanismo de gelificação.

O fraccionamento por KCl foi desenvolvido para separar a carragenana kappa da lambda, a partir do extracto de *C. crispus*. A adição de íões de potássio a uma solução aquosa quente permite a separação completa da carragenana kappa da lambda, pois a primeira gelifica e a segunda mantém-se dissolvida na solução (Matsuihiro e Urzua, 1992).

Esta técnica é também aplicada na distinção entre uma mistura de carragenanas (mistura de kappa e iota) e uma carragenana híbrida kappa/iota (van de Velde *et al.*, 2001).

1.5.3 - Separação de fracções com baixo peso molecular

As fracções de baixo peso molecular podem ser obtidos por intermédio de uma hidrólise ácida não específica ou por hidrólise enzimática específica. A hidrólise enzimática é importante para a determinação da estrutura fina da carragenana (Knutsen e Grasdalen, 1992a). O primeiro passo consiste na precipitação em etanol das fracções com elevado peso molecular ou resistentes à enzima (ERF). Numa segunda etapa as diferentes fracções são separadas por intermédio de uma filtração em gel e HPLC de fase reversa. Melhorias na performance dos materiais cromatográficos permitiram o desenvolvimento de um método de análise rápido (Knutsen *et al.*, 2001).

1.5.4 - Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (“Infrared” - IR) tem sido, até agora, a tecnologia mais usada na identificação de ficocolóides. Esta técnica, usada desde meados do século passado na identificação de polissacarídeos, permite determinar rapidamente a natureza dos diferentes tipos de carragenana (Matsuhira, 1996).

Na década de 50, um elevado número de hidratos de carbono foram analisados com recurso à espectroscopia de infravermelho, na tentativa de se correlacionarem as diferentes estruturas dos mono-, oligo- e polissacarídeos com as respectivas bandas de absorção. Descobriu-se então que as formas anoméricas dos glicósidos eram facilmente distinguíveis pelo seu espectro de infravermelho, enquanto as frequências 1240 cm^{-1} e 820 cm^{-1} podiam ser associadas à presença dos grupos sulfato existentes no ácido hialurónico e em mucopolissacarídeos (Neely, 1957). Mais tarde, esta técnica foi aplicada na análise das estruturas dos polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marinhas (Lloyd *et al.*, 1961). Black *et al.* (1965) usaram a informação obtida com os espectros de IR para estimar o conteúdo de 3,6-anidrogactose, enquanto outros autores conseguiam identificar a posição dos grupos sulfato (Anderson *et al.*, 1968b; Stancioff e Stanley, 1969) e caracterizar os ficocolóides do tipo agar e carragenana (Doty e Santos, 1978; Christiaen e Bodard, 1983; Whyte *et al.*, 1985). Rochas *et al.* (1986) determinaram o conteúdo em sulfato das carragenanas e do agar, a partir de bandas de absorção características. A absorção na zona do infravermelho é devida a vibrações de tensão e curvatura das pontes moleculares, reflectindo estas a estrutura molecular do material estudado.

A espectroscopia vibracional (de infravermelho e de Raman) permite revelar informações detalhadas sobre as propriedades e a estrutura dos polissacarídeos, a nível molecular. Estes métodos espectroscópicos apresentam três grandes vantagens: são métodos não destrutivos, rápidos e requerem pequenas quantidades de amostra (Chopin e Whalen, 1993; Pereira *et al.*, 2003).

A banda alargada, centrada em 1240 cm^{-1} , é comum a todos os polissacarídeos sulfatados e resulta da vibração do S=O presente nos grupos sulfato. Esta banda está correlacionada com o conteúdo em sulfato da amostra. Outra banda importante, a 903 cm^{-1} , corresponde à presença das pontes de 3,6-anidrogactose (DA) na amostra. O pico a 805 cm^{-1} encontra-se restrito à presença de carragenana iota e é normalmente usado na determinação da razão entre as fracções iota e kappa presentes numa amostra híbrida (Correa-Diaz *et al.*, 1990). Na Tabela 1.2 encontram-se resumidos os diferentes

picos usados na identificação das principais carragenanas (Chopin *et al.*, 1999a), de acordo com o sistema de letras gregas (usado sobretudo a nível comercial/industrial) e o código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

A espectroscopia de infravermelho tem sido usada no estudo da composição de amostras com diferentes origens e também das fracções obtidas por precipitação e fraccionamento (Stancioff e Stanley, 1969; Correa-Diaz *et al.*, 1990). Esta técnica, nos seus primórdios de utilização, estava limitada à análise de amostras solúveis de carragenana. No entanto, com o desenvolvimento da espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (“Fourier transform infrared” - FTIR) e das suas variantes de reflectância difusa (“diffuse reflectance” - DRIFTS) (Chopin *et al.*, 1999a) e de reflectância total atenuada (“attenuated total reflectance” - ATR) (Pereira e Mesquita, 2003; Pereira *et al.*, 2003), tornou-se possível não só analisar as carragenanas (e outros ficocolóides, tais como o agar e os alginatos) no seu estado sólido, mas inclusivamente analisar directamente alga seca moída.

Como já referimos anteriormente, a identificação da estrutura dos polissacarídeos em espectroscopia de infravermelho baseia-se na análise dos respectivos picos, em determinados comprimentos de onda. Visto que este tipo de informação está bastante dispersa na literatura, agrupámos numa tabela (Tabela 1.2) os principais picos encontrados nos espectros dos ficocolóides juntamente com as correspondentes ligações químicas.

Este método de “screening” proporciona várias vantagens, como por exemplo a redução do tempo despendido na análise, pois:

- 1- É um método rápido (bastam alguns minutos em vez dos vários dias necessários à extracção dos ficocolóides e preparação das películas ou pastilhas de KBr), expedito (os espectrómetros de FTIR são cada vez mais comuns) e simples de usar;
- 2- Requer pequenas quantidades de material (algumas gramas de peso fresco ou miligramas de peso seco), possibilitando o uso de amostras retiradas, por exemplo, de colecções de herbário;
- 3- As amostras são pouco manipuladas (são secas e depois moídas), o que permite uma determinação mais exacta da composição nativa dos diferentes tipos de carragenana, enquanto que as técnicas que envolvem extracção (pois implicam selectividade e fraccionamento das diferentes fracções) originam amostras com composições que não reflectem obrigatoriamente a composição nativa;
- 4- A resolução melhorada dos espectros FTIR proporciona mais informação do que a conseguida com a espectroscopia tradicional de infravermelho. A análise de alga seca moída permite não só detectar as fracções dominantes mas também os respectivos percursos. Além disso, o “software” dos espectrómetros de FTIR possibilita o processamento dos dados espectrais, em especial a conversão para espectros de segunda-derivada, que proporciona mais informação, sobretudo devido à melhor resolução apresentada nalguns comprimentos de onda (Matsuhira, 1996; Cáceres *et al.*, 1997; Chopin *et al.*, 1999a).

Apesar dos grandes avanços conseguidos no estudo dos ficocolóides com esta técnica, a espectroscopia de infravermelho é usada para identificar os diferentes tipos de carragenana presentes nas amostras sem, no entanto, os quantificar.

Tabela 1.2 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da espectroscopia de infravermelho (Segundo Chopin e Whalen, 1993). As carragenanas estão representadas por letras gregas e pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	ponte(s)/ grupo(s)	Código de letras	Tipo de carragenana				
			Kappa (κ)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Lambda (λ)
1240	S=O dos ésteres sulfato		+	+	+	+	+
930	C-O da 3,6-anidrogactose	DA	+	-	+	-	-
845	C-O-SO ₄ em C ₄ da gactose	G4S	+	+	+	+	-
830	C-O-SO ₄ em C ₂ da gactose	G/D2S	-	-	-	+	+
820	C-O-SO ₄ em C ₆ da gactose	G/D6S	-	+	-	+	+
805	C-O-SO ₄ em C ₂ da 3,6-anidrogactose	DA2S	-	-	+	-	-

-, ausência; +, presença.

1.5.5 - Espectroscopia de Raman

Comparativamente à espectroscopia de infravermelho, a aplicação da espectroscopia de Raman tradicional tem tido um uso muito restrito devido, sobretudo, à fluorescência induzida pelo laser. A análise de amostras com compostos de origem biológica origina ruído de fundo, muito acentuado, devido à excitação provocada pelos laser de luz visível, ocorrendo muitas vezes a destruição da própria amostra (Matsuiro, 1996; Pereira *et al.*, 2003). Além disso, a obtenção de espectros com uma boa relação sinal/ruído consumia muito tempo. Essas limitações foram ultrapassadas com o desenvolvimento da espectroscopia de Raman transformada de Fourier e laser a emitir na região próxima do infravermelho (FT-Raman - “Fourier Transform Raman spectroscopy”). O uso do laser nd:YAG na excitação do efeito Raman, na região próxima do infravermelho (comprimento de onda 1064 nm), permitiu a redução substancial da fluorescência e, conseqüentemente, do risco de destruição das amostras e do tempo necessário à obtenção do espectro, ao mesmo tempo que a relação sinal/ruído foi substancialmente melhorada (Matsuiro, 1996; Pereira *et al.*, 2003). No entanto, o uso corrente de espectrómetros de FT-Raman só passou a ser possível a partir de finais da década de 80 do século passado (Cutler, 1990).

Em relação aos espectros de Raman, é importante realçar que os de infravermelho são complexos e a fraca resolução de alguns picos não permite tirar conclusões precisas sobre a presença de algumas fracções menores. Actualmente, os investigadores associam a espectroscopia de infravermelho à de Raman, de forma a complementar a informação obtida por cada uma delas (Matsuiro, 1996; Pereira e Mesquita, 2003, 2004). Os espectros de Raman são análogos aos de infravermelho, mas certas bandas de fraca intensidade em FTIR surgem nítidas nos espectros de Raman, facto que facilita a identificação das diferentes fracções presentes nas amostras (Givernaud-Mouradi, 1992). Segundo Pereira *et al.* (2003) os espectros de FT-Raman

apresentam, em geral, melhor resolução do que os espectros de FTIR, o que permite a identificação de um grande número de bandas características, úteis na identificação dos diferentes tipos de carragenana. Nalguns casos, os ficocolóides podem ser identificados só com o recurso à espectroscopia de Raman; por exemplo, algumas variantes da família das carragenanas lambda (κ e θ) podem ser mais facilmente identificadas por FT-Raman.

1.5.6 - Ressonância Magnética Nuclear

Na década de 80, do século passado, a ressonância magnética nuclear (“nuclear magnetic resonance” - NMR) do ^{13}C passou a ser usada, com regularidade, na identificação da estrutura fina dos polissacarídeos, em particular a das carragenanas e a dos agares. Esta técnica espectroscópica apresenta uma grande fiabilidade na detecção das diferentes fracções, assim como a natureza e a posição dos substituintes (Zinoun, 1993).

Os primeiros trabalhos de Yarotsky *et al.* (1977) e de Bhattacharjee *et al.* (1978) permitiram atribuir os 12 picos observados nos espectros aos respectivos 12 carbonos do di-holósido. A classificação dos principais tipos de ficocolóides foi estabelecida por estes mesmos autores, com base, sobretudo, na identificação dos picos anoméricos. Posteriormente, outros autores basearam-se nestes trabalhos afim de dar uma atribuição definitiva a estes deslocamentos químicos. Desde então a identificação das carragenanas faz-se por simples comparação dos picos obtidos com os da literatura (Bhattacharjee *et al.*, 1978; Usov *et al.*, 1980; Bellion, 1982; Greer e Yaphe, 1984a, b; Usov, 1984; Rochas e Lahaye, 1989).

Na actualidade, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, nas suas duas variantes ^1H e ^{13}C , é uma das ferramentas padrão usadas na determinação da estrutura química dos ficocolóides (Usov, 1998; van de Velde *et al.*, 2002a).

Durante a preparação das amostras, as carragenanas são ‘sonicadas’ de forma a reduzir a viscosidade da solução. A alta viscosidade é responsável pela fraca resolução que alguns espectros apresentam (Deslandes *et al.*, 1990). Devido à abundância, naturalmente baixa, do isótopo de ^{13}C , as amostras para RMN (ressonância magnética nuclear) são preparadas em concentrações relativamente elevadas (5 a 10 %), quando comparado com as usadas em ^1H -RMN (0.5 a 1 %).

A espectroscopia de ^{13}C -RMN é usada, na maior parte das vezes, na determinação da composição molecular das amostras e das proporções relativas de cada um dos diferentes componentes: unidades repetitivas de kappa, iota, lambda, mu e nu. A quantificação por intermédio do espectro de ^{13}C -RMN, baseada nas intensidades das ressonâncias dos carbonos anoméricos, é possível desde que se usem longos intervalos em cada interpulso (cerca de 1.5 s) (van de Velde *et al.*, 2002a). A maior limitação desta técnica resulta do facto de ser pouco sensível à presença de componentes menores, com concentrações inferiores a 5 %.

Os espectros ^{13}C -RMN da carragenana kappa, iota, mu e nu foram sendo interpretados durante muitos anos e estão, na actualidade, perfeitamente elucidados (Usov *et al.*, 1980; Ciancia *et al.*, 1993a). O espectro ^{13}C -RMN da carragenana lambda tem sido matéria de debate. Os valores químicos calculados para a carragenana lambda, juntamente com todas as outras possíveis estruturas, foram publicadas em 1992 (Stortz e Cerezo, 1992). Dois anos mais tarde os valores químicos da carragenana lambda eram finalmente publicados mas, no entanto, algumas das ressonâncias observadas permaneciam ainda por atribuir (Stortz *et al.*, 1994). Os valores químicos dos espectros de ^{13}C -RMN, dos principais tipos de carragenana, encontram-se resumidos na Tabela

1.3. A substituição acetal piruvato, no esqueleto da carragenana, resulta no aparecimento de ressonâncias em 25.5 ppm (metil), 101.6 ppm (acetal) e 175.7 ppm (carboxil) (Chiovitti *et al.*, 1999). O amido florídeo é a principal substância de reserva das algas vermelhas (Florideophycidae) e é identificada nas amostras pela presença de ressonâncias com os valores químicos de 72.9 e 102.5 ppm (Turquois *et al.*, 1996).

Tabela 1.3 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da ressonância magnética nuclear do ^{13}C . As carragenanas estão representadas por letras gregas e pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Carragenana	Código de letras	Deslocamentos químicos (ppm)						Ref ^a
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
Kappa (κ)	G4S	102.5	69.6	78.9	74.1	74.8	61.3	Usov e Shashkov, 1985
	DA	95.3	69.9	79.2	78.3	76.8	69.5	
Iota (ι)	G4S	102.2	69.3	76.8	72.2	74.8	61.3	Usov e Shashkov, 1985
	DA2S	92.1	75.0	77.8	78.3	77.0	69.8	
Lambda (λ)	G2S	103.4	77.4	75.8	64.2	74.2	61.3	Falshaw e Furneaux, 1994
	D2S,6S	91.6	74.8	69.5	80.3	68.7	68.1	
Mu (μ)	G4S	105.3	70.7	78.8	73.8	75.4	61.9	Stortz <i>et al.</i> , 1994 Ciancia <i>et al.</i> , 1993
	D6S	98.2	68.9	70.7	79.5	68.9	68.4	
Nu (ν)	G4S	105.3	70.7	80.4	73.8	75.4	61.9	Ciancia <i>et al.</i> , 1993 Stortz <i>et al.</i> , 1994
	D2S,6S	98.8	76.8	68.9	79.5	68.9	68.4	
Alfa (α)	G	102.7	69.6	81.9	66.9	75.3	61.6	Falshaw <i>et al.</i> , 1996
	D2S	94.7	75.4	78.1	78.3	77.1	70.0	
Beta (β)	G	102.7	69.7	80.5	66.5	75.5	61.4	Liao <i>et al.</i> , 1993
	DA	94.7	70.3	79.5	78.3	77.0	69.7	
Theta (θ)	G2S	100.3	77.6	77.2	67.8	74.7	61.1	Falshaw e Furneaux, 1994
	DA2S	95.6	74.7	77.4	79.5	77.0	69.8	
Omega (ω)	G6S	102.7	69.4	80.3	66.0	72.9	67.2	Usov e Shashkov, 1985
	DA	94.7	70.1	79.5	78.5	76.9	69.4	

A espectroscopia de ^1H -RMN é muito mais sensível do que a de ^{13}C -RMN, mas apresenta uma dispersão de valores químicos significativamente menor. Por essa razão, a espectroscopia de ^1H -RMN é sobretudo usada em duas situações: em primeiro lugar, é usada em análises rápidas de soluções com baixa concentração de carragenana; em segundo lugar é usada na quantificação das diferentes fracções presentes numa amostra (van de Velde *et al.*, 2002a). A quantificação de fracções numa mistura é feita com base na ressonância dos prótons α -anoméricos, que originam sinais bem definidos na região

entre 5.1 e 5.7 ppm (ver Tabela 1.4). Os sinais dos prótons β -anoméricos não podem ser usados na identificação e quantificação de diadas (van de Velde *et al.*, 2002a).

A espectroscopia de ^1H -RMN pode assim ser usada em análises de rotina de carragenanas em amostras comerciais e não comerciais. Numa segunda vertente de utilização, os oligossacarídeos são obtidos por intermédio de uma hidrólise enzimática (kappa ou iota-carragenases específicas) das carragenanas. Nesta situação a espectroscopia de ^1H -RMN é preferida em relação à de ^{13}C -RMN, devido à sua elevada sensibilidade e capacidade para resolver a estrutura molecular detalhada dos oligossacarídeos. As fracções de elevado baixo peso molecular são separados por precipitação diferencial e, depois, fraccionadas por intermédio de cromatografia de permeação em gel. As fracções assim obtidas são depois analisadas por espectroscopia de ^1H -RMN. A informação detalhada sobre a estrutura molecular dos diferentes di-, tetra- e oligossacarídeos, presentes nas diferentes fracções, é usada para deduzir a estrutura da carragenana original (Knutsen e Grasdalen, 1992a, b).

Tabela 1.4 – Identificação dos diferentes tipos de carragenana através da ressonância magnética nuclear do ^1H (Segundo Ciancia *et al.*, 1993; Stortz *et al.*, 1994). As carragenanas estão representadas por letras gregas e pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Carragenana	Código de letras	Deslocamentos químicos (ppm)
Kappa (κ)	DA2S	5.32
Iota (ι)	DA	5.11
Lambda (λ)	D2S,6S	5.59
Mu (μ)	D6S	5.26
Nu (ν)	D2S,6S	5.52

1.5.7 - Análise cromatográfica

As técnicas de análise cromatográfica são aplicadas no estudo de diferentes aspectos estruturais das carragenanas, tais como a distribuição da massa molecular, conteúdo em ésteres sulfato, composição dos monossacarídeos e análise da ligação glicosídica (Roberts e Quemener, 1999).

1.5.7.a – Determinação do peso molecular

A massa molecular das carragenanas é um parâmetro importante do seu comportamento reológico (viscosidade, stress de concentração e força do gel) e, consequentemente, nas suas aplicações. A distribuição da massa molecular é normalmente determinada por cromatografia de exclusão pelo tamanho (SEC – “Size Exclusion Chromatography”) e cromatografia de permeação por gel (GPC – “Gel Permeation Chromatography”), juntamente com a detecção por dispersão de laser multi-ângulo (MALLS – “Multi-Angle Laser-Light Scattering”) (Hoffmann *et al.*, 1996). Os sistemas de cromatografia separam as carragenanas de acordo com o seu volume hidrodinâmico, revelando a distribuição de massa molecular, enquanto o MALLS revela a massa molecular absoluta de cada pico individual. No entanto, vários problemas estão associados com o SEC e GPC, tais como a absorção da amostra no empacotamento dentro da coluna, degradação dos polímeros devido às elevadas forças a que estão

submetidas, dificuldades na separação da amostra com elevada massa molecular ou material agregado; devido a estas limitações, só o material dissolvido pode ser analisado. Os problemas atrás referidos são menos severos no fraccionamento por fluxo assimétrico. Recentemente foi usado, com sucesso, o fraccionamento por fluxo assimétrico associado à detecção por MALLS, na determinação do peso molecular da carragenana kappa (Ciancia *et al.*, 1997b).

1.5.7.b – Conteúdo em sulfato

Os grupos sulfato constituem um substituinte estrutural importante do esqueleto de galactose nas carragenanas. Nessa perspectiva, um método rápido e reprodutível para a determinação do conteúdo em ésteres sulfato é particularmente importante. O método oficialmente usado, ao nível das entidades reguladoras (FAO, 1992), na determinação do conteúdo em sulfato, é baseado na hidrólise selectiva do éster sulfato, por intermédio de um ácido e subsequente precipitação selectiva dos iões de sulfato sob a forma de sulfato de bário. O sulfato de bário é então medido por pesagem ou por turbidometria, tal como se encontra descrito nos relatórios elaborados pelo comité de especialistas da FAO/WHO, na área dos aditivos alimentares (JECFA) (FAO, 1992). Este método possui algumas desvantagens, pois é laborioso e necessita quantidades de amostra na ordem dos gramas. Um avanço prometedor nesta área consiste no uso da cromatografia de alta performance (HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”) na quantificação do sulfato livre, libertado pela hidrólise ácida. Esta análise é feita, normalmente, num sistema de HPLC provido de uma coluna de troca-iónica com detecção de condutividade (Jol *et al.*, 1999).

1.5.7.c – Composição monossacarídica

A composição monossacarídica das carragenanas é determinada pela razão entre a galactose e a anidrogactose. No processo de obtenção de monossacarídeos, através da hidrólise ácida dos polissacarídeos, dá-se a conversão de anidrogactose em galactose e outros produtos de degradação, tal como o 5-hidroximetilfurfural. Com a introdução da hidrólise redutiva resolveu-se, em parte, este problema. Este método revela também a presença de pequenas quantidades (inferiores a 5 %mole) de glucose e xilose em amostras comerciais de carragenana. A hidrólise redutiva pode ser aplicada, também, em amostras de algas, facilitando assim os estudos quimiotaxonómicos (Jol *et al.*, 1999).

1.6 - Propriedades físicas das carragenanas

1.6.1 - Solubilidade

As carragenanas são solúveis na água, mas a sua solubilidade depende de: tipo de carragenana, temperatura, pH, tipo e concentração de iões e de outros solutos presentes. A carragenana mais solúvel é a lambda, pois a sua estrutura química não possui o componente mais hidrófobo, a 3,6-anidrogactose. Além disso, a carragenana lambda possui 3 grupos sulfato de natureza hidrófila. Assim, a carragenana lambda é solúvel em água, em quase todas as condições de temperatura e pH (Perez *et al.*, 1992; van de Velde e de Ruiter, 2002).

A carragenana kappa é a fracção mais difícil de dissolver. Esta carragenana, quando associada a sais de sódio, é solúvel em água fria; quando associada a sais de

potássio, é solúvel em água quente. A carragenana iota possui uma solubilidade intermédia (Perez *et al.*, 1992; van de Velde e de Ruiter, 2002).

1.6.2 - Transições cadeia-hélice

As carragenanas da família kappa (carragenana kappa e iota) são ricas em 3,6-anidrogactose e, quando em solução, são possuidoras de uma estrutura helicoidal, originando um gel termo-reversível. À medida que a temperatura da solução diminui, as cadeias de macromoléculas organizam-se no espaço sob a forma de hélices mais ou menos largas. Estas hélices associam-se entre elas por intermédio dos catiões de cálcio e de potássio, e estabelecem pontes entre as cadeias (Rees *et al.*, 1982). A água fica aprisionada no interior das hélices pelos agrupamentos hidrófobos, enquanto os ésteres sulfato, situados no exterior, retêm-na à superfície das hélices. Estas macromoléculas apresentam zonas com espirais frouxas, ricas em ésteres sulfato e zonas com espirais apertadas, ricas em 3,6-anidrogactose. Segundo Rees (1963; 1969) as zonas ricas em 3,6-anidrogactose colocam-se face a face para que os catiões de cálcio e de potássio fiquem dentro das cavidades originadas por duas hélices. Estes catiões servem de ligação sólida entre as cadeias de macromoléculas. Assim, estabelece-se uma rede tridimensional que origina um gel cuja rigidez depende do teor em 3,6-anidrogactose e em grupos sulfato. É necessário referir que a dureza do gel é inversamente proporcional ao teor em ésteres sulfato (Figura 1.9).

As carragenanas kappa e iota ocorrem sob duas formas estruturais distintas: em cadeia não estruturada, a altas temperaturas; e sob a forma de dupla hélice estruturada, a baixas temperaturas. A dupla hélice forma-se por arrefecimento das cadeias irregulares; a este fenómeno dá-se o nome de transição cadeia-hélice. A temperatura a que se dá a transição cadeia-hélice é um parâmetro muito importante, pois está directamente relacionado com as propriedades funcionais da carragenana. A temperatura de transição depende dos factores intrínsecos de cada carragenana, tais como a polidispersidade, distribuição dos grupos sulfato, quantidade de precursores, e depende dos factores extrínsecos, tais como o tipo e concentração dos sais, do pH e da velocidade do arrefecimento (van de Velde *et al.*, 2002c).

A temperaturas superiores a 60 °C a carragenana kappa está sempre na forma de cadeia irregular. A temperatura típica, à qual se dá a transição cadeia-hélice, depende da estrutura química da carragenana (e do sistema em que esta se dá), sendo de 38 °C na água e no leite. Na presença de iões de potássio, as duplas hélices da carragenana kappa aglomeram-se, formando unidades maiores denominadas “fibras” (Snoeren e Payens, 1976), “agregado de hélices” (Morris *et al.*, 1980), “superstrands” (Hermansson *et al.*, 1991) ou “bastões super-helicoidais” (Piculell, 1995). A microscopia electrónica revelou que o tamanho máximo destes agregados é de cerca de 20 nm (Hermansson *et al.*, 1991). O potássio actua como uma ponte intra-molecular, formando interacções electrostáticas entre o éster sulfato e o átomo de oxigénio anidro (Figura 1.10), na carragenana kappa (Tako e Nakamura, 1986a). O nível de agregação determina as propriedades físicas, tais como a força do gel, a viscosidade, a sinérese, etc.

A carragenana iota possui, tal como a kappa, uma conformação de cadeia irregular a temperaturas acima dos 60 °C. As hélices formam-se pelo arrefecimento, mas estas são completamente diferentes das de carragenana kappa e completamente

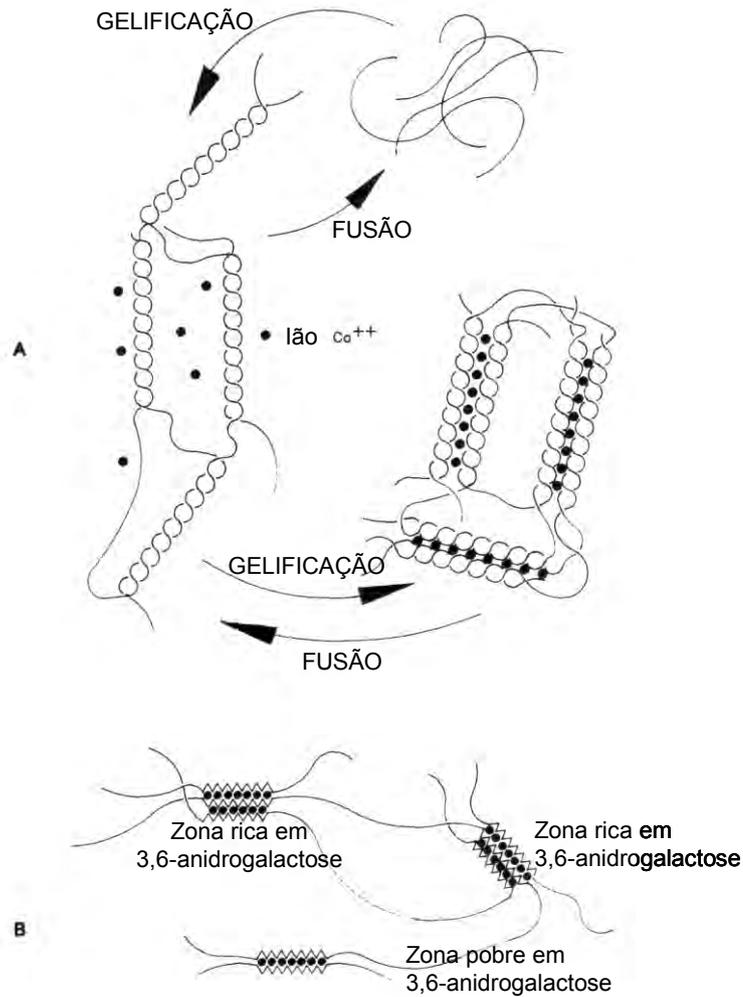


Figura 1.9 – Mecanismo de gelificação das carragenanas: A – Logo que a temperatura desce, as cadeias moleculares reagrupam-se aos pares, associando-se duas a duas, pela acção dos íões de cálcio. Logo que a temperatura se eleva, inicia-se o processo inverso, a fusão (Segundo Rees, 1963); B – No processo de gelificação, as cadeias de carragenana colocam-se de maneira que as zonas ricas em radicais hidrófobos fiquem face a face (Segundo Paoletti *et al.*, 1984).

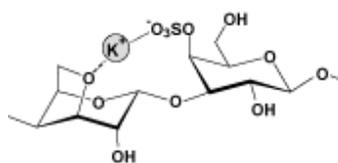


Figura 1.10 – Ponte intra-molecular de potássio na carragenana kappa, segundo Tako e Nakamura (1986a).

independentes do tipo de catião presente. A carragenana iota não forma agregados tão grandes como os da fracção kappa mas, em certas condições, é possível observar alguma agregação de hélices (Morris *et al.*, 1980). A temperatura de transição cadeia-hélice desta carragenana depende, tal como acontecia na carragenana kappa, de factores intrínsecos e extrínsecos. Em sistemas aquosos e lácteos a temperatura de transição é de 45 °C. As hélices simples de carragenana iota interligam-se (Figura 1.11) por intermédio de pontes inter-moleculares de cálcio (Tako *et al.*, 1987).

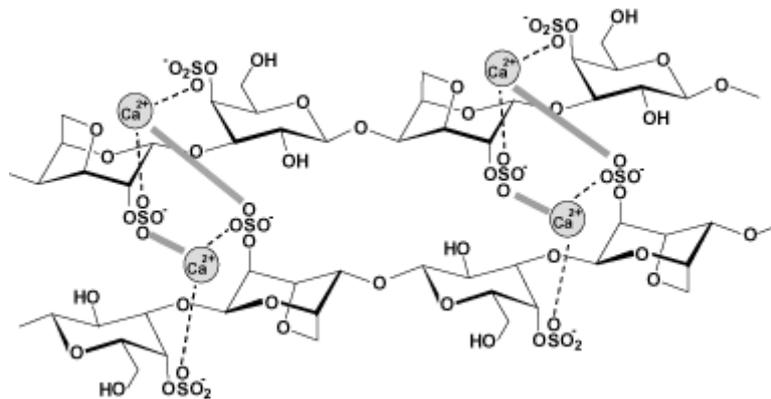


Figura 1.11 – Representação esquemática das pontes inter-moleculares de cálcio na carragenana iota, segundo Tako *et al.* (1987).

As carragenanas da família lambda são pobres em 3,6 anidrogactose e ricas em ésteres sulfato. A sua natureza espessante resulta da presença de muitos grupos sulfato, que conferem à molécula uma carga negativa. Em solução aquosa, as moléculas tendem a ocupar o máximo de volume devido às forças de repulsão. A presença de três grupos sulfato, por dímero, reduz fortemente o carácter hidrófobo da carragenana. As moléculas de água sofrem um abrandamento no seu movimento devido à presença de grupos hidrófilos, situados ao longo das macromoléculas, o que confere à solução um carácter viscoso. A carragenana lambda nunca forma hélices, apresentando-se sempre sob a forma de cadeia irregular. Consequentemente, esta carragenana nunca forma géis, ou seja, nunca gelifica (Langendorff *et al.*, 2000; Rinaudo, 2002).

1.6.3 - Viscosidade

As carragenanas formam soluções muito viscosas quando se encontram em soluções a temperaturas acima da temperatura de transição cadeia-hélice. Nesta situação, as moléculas de carragenana estão na forma de cadeias irregulares, muitas vezes na forma “esticada”, devido à repulsão electrostática causada pelas cargas negativas dos grupos éster sulfato presentes ao longo da cadeia linear de galactana. A viscosidade aumenta de forma quase exponencial em relação à concentração. A adição de sais à solução de carragenana reduz a viscosidade, devido à neutralização das cargas do polímero. A viscosidade aumenta com a massa molecular de carragenana, de acordo com a denominada equação “Mark-Houwink” (Hjerde *et al.*, 1994)

$$[\eta]=K(M_w)^a$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca e M_w a massa molecular média. Os valores para a constante K e a são dependentes do tipo de carragenana. O expoente a é próximo da unidade e está relacionado com a presença de moléculas rígidas do tipo “bastão”.

1.6.4 - Geleificação

A possibilidade de formar géis é a principal característica das carragenanas. Só a carragenana kappa e iota têm essa capacidade, pois as outras carragenanas não possuem a conformação 1C_4 , que resulta das pontes 3,6-anidro. Os géis formam-se após o arrefecimento da solução quente de carragenana (Figura 1.11). O mecanismo de geleificação encontra-se descrito em vários livros de texto (Guiseley *et al.*, 1980; Therkelsen, 1993; Piculell, 1995; Imeson, 2000).

Em termos gerais, os géis de carragenana kappa são duros, fortes, quebradiços e instáveis nos processos de congelamento/descongelamento; ambos os tipos de gel são termo-reversíveis. A “força” dos diferentes tipos de gel é controlada pela concentração dos catiões gelificantes (Nemoto, 2002). A carragenana kappa forma géis na presença de iões de potássio. As soluções aquosas de carragenana devem ser aquecidas acima dos 60 °C para que esta se dissolva. A adição de 0.5 % de carragenana kappa em água e 0.2 % em leite é o suficiente para formar um gel. A carragenana kappa forma um gel mais forte com os sais de potássio do que com os sais de cálcio. O potássio favorece a formação de um gel rígido mas elástico, enquanto que o cálcio origina um gel duro mas quebradiço (McHugh, 2003).

A carragenana iota forma géis na presença de cálcio e a “força do gel” está relacionada com a quantidade de cálcio presente na solução. A geleificação da carragenana kappa é promovida especificamente por catiões monovalentes (K^+ , Rb^+ , Cs^+ e NH_4^+). Estes catiões promovem a agregação das hélices duplas de carragenana kappa, formando agregados chamados “domínios” (do inglês “domains”) ou “bastões super-helicoidais”. Esta associação de estruturas helicoidais em tensão explica a histerese observada na rotação óptica e medições reológicas na carragenana kappa (Rodd *et al.*, 2000; van de Velde *et al.*, 2002c). A transição conformacional cadeia-hélice da carragenana iota parece não ter especificidade em relação a um dado catião. A transição térmica da carragenana iota não apresenta histerese, o que sugere a não existência de agregação inter-hélice. Assim sendo, o mecanismo da geleificação nesta carragenana terá lugar ao nível da hélice. Os géis de carragenana iota são tixotrópicos, isto é, quando a estrutura do gel é destruída, esta restabelece-se após algum tempo (Yuguchi *et al.*, 2002; Yuguchi *et al.*, 2003). Um comportamento tixotrópico similar é encontrado em concentrações muito baixas de carragenana kappa no leite; forma-se assim um gel delicado, útil em produtos lácteos líquidos, que podem ser agitados. Este gel delicado é o suficientemente forte para suspender, por exemplo, as finas partículas no leite achocolatado.

1.6.5 - Sinergia com outras gomas

A carragenana kappa apresenta sinergia com gomas de galactomana, em particular com a farinha de alfarroba e, em menor grau, com a goma “Konjac” e “Guar” (E412 - goma derivada das sementes da planta *Cyamopsis tetragonolobus*, que cresce em abundância na Índia e no Paquistão). A farinha de alfarroba (E410) obtém-se a partir das sementes da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*), árvore que cresce em Portugal, Espanha, Itália, Chipre e noutros países da bacia mediterrânica (McHugh, 2003). O efeito de sinergia consiste na redução da quantidade de polímero gelificante numa

solução; a adição de farinha de alfarroba pode levar a uma redução de cerca de 1/3 da concentração em carragenana kappa (Tako e Nakamura, 1986b). O mecanismo de interação está relacionado com o alinhamento das regiões não ramificadas da cadeia de manana com os agregados de duplas hélices de carragenana kappa (Dea e Morrison, 1975). A adição de galactomanas à carragenana kappa modifica a morfologia do gel, tornando-o elástico e com baixa sinérese.

Alguns amidos são conhecidos como possuidores de sinergia com a carragenana iota, no entanto, o seu mecanismo detalhado ainda não foi revelado até agora (van de Velde e de Ruiter, 2002).

1.6.6 - Interação com proteínas

Na indústria de derivados lácteos, as carragenanas são utilizadas tomando em conta a interação de sinergia com as proteínas do leite. Em sistemas lácteos são necessárias concentrações cinco vezes menores de carragenana, para se obter um gel, quando comparado com sistemas aquosos. O efeito de sinergia está relacionado com as interações entre as carragenanas carregadas negativamente com os aminoácidos positivamente carregados, na superfície das micelas de caseína, especialmente entre a carragenana kappa e a caseína-kappa. Níveis muito baixos de carragenana (entre 0.015 e 0.025 %) são suficientes na prevenção da separação e na estabilização das partículas de cacau no leite achocolatado (Puvanenthiran *et al.*, 2000; Sedlmeyer *et al.*, 2003).

1.6.7 - Estabilidade química das carragenanas

As carragenanas são extremamente sensíveis a ácidos e a rupturas oxidativas. A ruptura da ligação glicosídica aumenta com a temperatura e com o tempo. A hidrólise ácida ocorre sobretudo nas ligações glicosídicas (1→3). O sistema de anéis de 3,6-anidrogactose favorece a hidrólise, enquanto que a presença do grupo éster sulfato, na posição 2, reduz a possibilidade de hidrólise (Therkelsen, 1993). A hidrólise ácida na carragenana kappa é mais rápida do que na fração iota. A despolimerização de carragenanas pode ocorrer também pela acidificação dos grupos sulfato (com liberação de ácido sulfúrico), como resultado da diálise exaustiva em água desionizada. A auto-hidrólise pode ocorrer também durante o processo de liofilização ou quando as carragenanas são armazenadas por um período de tempo alargado e em condições de secura. As carragenanas, no estado gelificado, retêm os catiões associados, prevenindo assim a ocorrência de hidrólise (Hoffmann *et al.*, 1996).

1.7 - Biologia da parede celular

O estudo da formação da parede celular nas algas vermelhas é um assunto fascinante e, ao mesmo tempo, muito complexo (Vreeland e Kloareg, 2000). Este tipo de estudo envolve áreas e técnicas tão diversas como a biologia molecular, biologia do desenvolvimento, análise química dos polissacarídeos (espectroscopia, cromatografia, enzimologia, etc.) e a citoquímica, com vista à elucidação da biossíntese dos precursores biológicos dos diferentes componentes da parede celular, com especial relevo dado ao seu transporte, deposição e modificação extracelular (Tsekos, 1996).

1.7.1 - Variabilidade dos polímeros presentes na parede celular

A família de polissacarídeos do tipo carragenana (kappa, iota, lambda, furcelana, beta e respectivos precursores) e agar (agar, porfirana, agarose) são altamente variáveis (Craigie, 1990; Vreeland e Kloareg, 2000) e encontram-se normalmente misturados em extractos obtidos de algas inteiras. Diversos métodos analíticos, que minimizam a destruição da estrutura natural dos polissacarídeos, em particular da anidrogactose, foram desenvolvidos por Usov (Usov *et al.*, 1980; Usov, 1984, 1992) e por Chopin e colaboradores (Chopin e Whalen, 1993; Chopin *et al.*, 1999a). Recentemente, foram publicados vários artigos que contribuíram para elucidar a variabilidade dos polímeros presentes na parede celular de várias algas vermelhas com interesse económico: Chiovitti, Bacic e colaboradores, na Austrália (Chiovitti *et al.*, 1995b, 1996; Chiovitti *et al.*, 1997; Chiovitti *et al.*, 1998b); Furneaux, Miller e colaboradores, na Nova Zelândia (Furneaux e Miller, 1985, 1986; Miller *et al.*, 1997; Miller, 2003b); Cerezo, Estevez e colaboradores, na Argentina (Estevez *et al.*, 2000, 2001, 2002); Lahaye e colaboradores, na França (Lahaye *et al.*, 1985; Lahaye, 2001a, b).

A parede celular das algas vermelhas é constituída por uma parte fibrilar (cristalina) embebida numa matriz amorfa (Kloareg e Quatrano, 1988; Tsekos e Reiss, 1992; Tsekos, 1999; Lechat *et al.*, 2000). A fase microfibrilar é composta principalmente por celulose, manana e xilana (Gretz *et al.*, 1980; Mukai e Craigie, 1981; Gretz e Vollmer, 1989; Craigie, 1990), enquanto que a matriz amorfa mucilaginosa é constituída usualmente por um polímero de galactana sulfatada (Craigie, 1990; Gretz *et al.*, 1991a). Outros componentes adicionais da matriz são as glicoproteínas (Chamberlain e Evans, 1973; Tsekos *et al.*, 1985).

1.7.2 - Localização dos polissacarídeos

A localização citológica *in situ* dos polímeros da matriz extracelular constitui um complemento valioso à caracterização química e física dos ficocolóides extraídos. A presença de celulose, carragenanas (e outros polissacarídeos) e proteínas na parede celular pode ser detectada através de reagentes citoquímicos adequados (Tabela 1.5), ou com recurso a moléculas mais específicas tais como as lectinas, enzimas, anticorpos ou sondas de hibridização (Gretz *et al.*, 1997). Tomando em conta os limites demonstrados na especificidade de muitos reagentes citoquímicos, a correlação entre a composição química dos polímeros extraídos e os padrões de localização constitui uma ferramenta de grande utilidade no estudo dos polissacarídeos da parede celular.

Gretz e colaboradores (1997), ao aplicarem técnicas de coloração citoquímica, concluíram que a parte externa do talo de *K. alvarezii* era constituído sobretudo por polissacarídeos aniónicos, enquanto que a parte interna apresentava hidratos de carbono menos sulfatados. A cloro-zinco-iodina, tinopal (branco de calcoflúor) e o reagente I₂KI/H₂SO₄, permitiram localizar celulose nas regiões internas. Essas áreas apresentavam, em microscopia de polarização, birrefringência, sugerindo a presença de uma estrutura cristalina nas paredes celulares da zona medular e do eixo central do talo (Gretz *et al.*, 1997).

Colorações citoquímicas, tais como o branco de calcoflúor e o azul de toluidina, também foram utilizados na localização de celulose e galactanas sulfatadas durante a regeneração da parede celular de protoplastos isolados de algas agarófitas e carragenófitas (Legall *et al.*, 1990).

Tabela 1.5 – Reagentes usados na localização *in situ* de polímeros (Segundo Gretz *et al.* 1997).

Polímero	Reagente	Cor
Polissacarídeos sulfatados e carboxilados	Azul de alciano 0.1 % em 3 % ácido acético, pH 2.5	Azul-esverdeado
	Azul de toluidina 0.05 % em 0.1 M tampão acetato, pH 4.4	Vermelho-verde turquesa
Polissacarídeos sulfatados	Azul de alciano 0.1 %, 0.9 M MgCl ₂ em 0.1 M HCl, pH 1	Azul-esverdeado
	Azul de toluidina 0.05 % em 0.1 M HCl, pH 1	Vermelho-verde turquesa
Polissacarídeos aniônicos	Vermelho de ruténio 0.2 % em água destilada	Vermelho
β-Glicano	Branco de calcoflúor 0.04 % em água destilada	Azul fluorescente
Celulose	Cloro-zinco-iodina I ₂ KI e 65 % H ₂ SO ₄	De azul a violeta
		Azul pálido
Proteínas	Azul de coomassie G-250 0.25 % em 7 % ácido acético	Azul

A distribuição das galactanas sulfatadas nos talos de várias carragenófitas, como por exemplo no *Chondrus crispus* (Gordon-Mills *et al.*, 1978) e em agarófitas, tal como a *Pterocladia capillacea* (outrora *Pterocladia capillacea*) (Rascio *et al.*, 1991), parece apresentar um gradiente, com maior acumulação nas regiões externas e uma menor acumulação nas partes internas dos talos (Kloareg e Quatrano, 1988). No entanto, parece que estes resultados não são aplicáveis a todas as espécies, pois, por exemplo, os polissacarídeos encontrados na *Eucheuma* estão uniformemente distribuídos por todo o talo (Laclaire e Dawes, 1975). Análises químicas feitas em *Kappaphycus alvarezii* (comercialmente conhecido como “cottonii”) permitiram confirmar a presença de celulose e carragenana na parede celular, componentes comuns à maioria das carragenófitas com interesse económico (Gretz *et al.*, 1997).

A distribuição das carragenanas nas diferentes partes do talo, nas Gigartinales, pode ser averiguada com o auxílio de “sondas” específicas; esta técnica foi usada para localizar, por exemplo, carragenana kappa e iota no *K. alvarezii* (Zablackis *et al.*, 1991). Estes autores conseguiram demonstrar que a carragenana kappa se encontrava predominantemente na parede celular e na matriz extracelular da zona cortical, na zona medular e no eixo central dos talos, com recurso a sondas específicas de oligossacarídeos de carragenana conjugados com FITC (Fluoresceína Isotiocianato). Entretanto, a carragenana iota encontra-se, predominantemente, na parede celular das células que constituem a zona epidérmica ou cuticular; ou seja, a carragenana iota está concentrada essencialmente na superfície do talo da alga.

A localização das diferentes carragenanas presentes no *K. alvarezii* foi também investigada por Vreeland e colaboradores (1992), com auxílio de anticorpos monoclonais (marcação por imunofluorescência). Esta técnica permitiu concluir que a carragenana kappa se encontrava distribuída na parede celular e na matriz, enquanto que a carragenana iota se encontrava na lamela média; a carragenana lambda encontrava-se

localizada na cutícula do talo, enquanto que as carragenanas kappa e iota estavam ausentes.

O uso de anticorpos desempenhou um papel muito importante na descoberta da alternância bioquímica das carragenanas, dependente da ploidia dos talos, nas Gigartinales e Phylloporales (Gordon-Mills *et al.*, 1978; McCandless *et al.*, 1982, 1983; McCandless e Gretz, 1984). Os marcadores moleculares, tais como os anticorpos policlonais (Vreeland, 1970, 1972), anticorpos monoclonais (Vreeland *et al.*, 1984; Larsen *et al.*, 1985; Vreeland *et al.*, 1987; Boyen *et al.*, 1988; Vreeland e Laetsch, 1989) e sondas de hibridização (Vreeland *et al.*, 1987; Vreeland e Laetsch, 1989; Zablackis *et al.*, 1991) foram usados na localização de polissacarídeos da parede celular de algas marinhas. Anticorpos monoclonais conjugados com FITC foram usados na localização de carragenana kappa, iota e lambda, nos talos de *K. alvarezii* (Vreeland *et al.*, 1992). Estas sondas específicas foram também usadas em estudos de regeneração da parede celular de protoplastos, na mesma alga (Gross, 1990; Zablackis *et al.*, 1993).

A microscopia electrónica requer conjugados electronodensos, sendo os de ouro coloidal os mais populares (Chanzy *et al.*, 1984; Greer *et al.*, 1984; Gretz *et al.*, 1991a). Os conjugados de enzimas, anticorpos e lectina com ouro possuem um grande potencial no estudo da distribuição dos polímeros nas células. A celobiohidrolase-ouro (CBH-ouro) foi usada para localizar β -glucano na matriz extracelular em algas vermelhas: *Agardhiella subulata*, alga produtora de carragenana iota (Wu, 1996); *Lemanea annulata* (Gretz *et al.*, 1991a); *K. alvarezii* (Gretz *et al.*, 1997), alga produtora de carragenana kappa; e gametófitos de *C. crispus* (Gretz e Vollmer, 1989). Em qualquer dos casos, não foi encontrado celulose a nível intercelular, o que suporta o modelo de polimerização deste polímero mediado pela membrana plasmática (Tsekos *et al.*, 1996a; Tsekos, 1999; Tsekos *et al.*, 1999).

A localização em microscopia electrónica de galactanas sulfatadas foi realizada com base em conjugados de enzimas e anticorpos associados a ouro coloidal (Bellion *et al.*, 1983; Greer *et al.*, 1984; Wu, 1996). A utilização de anti-carragenana-ouro monoclonal mostrou uma grande afinidade para a parede celular e matriz intercelular de *A. subulata*, ficando assim demonstrado que a celulose e a carragenana iota se encontram associadas na parede das células da zona cortical desta alga (Gretz *et al.*, 1990; Wu, 1996).

1.7.3 - Biossíntese das carragenanas

Ainda pouco se sabe a propósito da biossíntese das carragenanas. Acredita-se, no entanto, que a síntese do esqueleto de galactana tem lugar no complexo de Golgi (Bellion *et al.*, 1981). A esterificação do sulfato do esqueleto de galactana é catalizada por sulfatotransferases (sulfotransferases) e ocorre nos dictiosomas e não na parede celular (Craigie e Wong, 1977; Craigie, 1990). Os mecanismos e as enzimas responsáveis pela introdução dos outros substituintes, tais como o piruvato e os grupos metoxi, aguardam elucidação.

Uma pequena proporção de proteína de ligação (“bound protein”) está muitas vezes presente em fracções de extractos de ficocolóides de algas vermelhas (Vreeland e Kloareg, 2000). As proteínas da parede celular, incluindo sulfohidrolases, sulfatases, carbohidrolases, proteases e proteínas estruturais, são alvos essenciais, mas de difícil estudo, para a compreensão da biologia da parede celular das algas vermelhas.

Uma enzima responsável pela conversão de carragenana mu em carragenana kappa foi identificada por Wong e Craigie (1978) em talos de *C. crispus*. Esta enzima promove a produção de 3,6-anidrogactose e a libertação estequiométrica de sulfato. O

nome de “sulfohidrolase”, usado na identificação da enzima, é baseado no facto desta promover a libertação do éster sulfato presente na carragenana mu.

Zinoun e colaboradores (1997) conseguiram detectar a actividade de uma sulfohidrolase em extractos de *Calliblepharis jubata* (alga produtora de carragenana iota) com o auxílio de fragmentos de carragenana iota marcados radioactivamente.

Os precursores biológicos das carragenanas kappa e iota (carragenanas gelificantes) denominam-se mu (μ) e nu (ν), respectivamente; estas carragenanas não possuem pontes do tipo 3,6-anidro. A formação das pontes 3,6-anidro é catalizada, como já foi referido anteriormente, por sulfohidrolases, enzimas presentes na parede celular (Wong e Craigie, 1978). Para a carragenana iota, esta relação entre o precursor e o produto final é clara, mas para a carragenana kappa esta relação permanece um pouco ambígua, pois várias amostras de carragenana híbrida kappa-iota contêm, aparentemente, só o precursor nu (Zinoun, 1993; Amimi *et al.*, 2001; van de Velde *et al.*, 2001). A presença de precursor nu nas amostras de carragenana resultantes da carragenófita *K. alvarezii*, espécie conhecida por produzir carragenana kappa, foi reportada por Bellion e colaboradores (1983). Estas ocorrências sugerem, segundo alguns autores (Zinoun, 1993; Amimi *et al.*, 2001), que a carragenana nu é um precursor comum às carragenanas kappa e iota. No entanto, é necessário ter alguma cautela a respeito desta hipótese (ver “Discussão”), havendo necessidade de desenvolver mais trabalho de investigação, sobretudo na detecção eficaz e precisa dos precursores em extractos nativos, de forma a ajudar a elucidar os mecanismos de biossíntese das carragenanas.

Recentemente foram purificadas e clonadas duas sulfohidrolases, por intermédio de electroforese, a partir do *C. crispus* (De Ruyter *et al.*, 2000; Genicot *et al.*, 2000). Estas duas sulfohidrolases (sulfohidrolase I e sulfohidrolase II) exibem a mesma especificidade pelo substrato, sendo por isso denominadas 6-O-sulfohidrolases da carragenana-nu. A sulfohidrolase I liberta o sulfato sem modificar a viscosidade do polímero, sugerindo que esta actua de forma randómica. Em contraste, a sulfohidrolase II remove o sulfato da carragenana nu de forma progressiva e sequencial, originando uma longa e ininterrupta cadeia de dímeros de carragenana-iota. Em termos práticos, a sulfohidrolase II promove a formação de uma estrutura helicoidal, típica de um polissacarídeo gelificante.

Como foi referido anteriormente, a parede celular das algas vermelhas é constituída por uma fase microfibrilar cristalina embebida numa fase mais amorfa, a matriz. Tal como acontece nas células das plantas, os vacúolos têm origem na progressiva fusão de vesículas derivadas do retículo endoplasmático e/ou do aparelho de Golgi. Nas algas vermelhas, os sacos de mucilagem, na forma de vacúolos, encontram-se tanto em células reprodutoras maduras e em desenvolvimento, como em células vegetativas (Pueschel, 1979; Tsekos, 1981, 1983; Tsekos *et al.*, 1985; Delivopoulos e Diannelidis, 1990a). Os polissacarídeos são geralmente sintetizados no aparelho de Golgi ou na superfície da plasmalema. O aparelho de Golgi e os sacos de mucilagem (vacúolos) participam na síntese e secreção de parte dos materiais constituintes da parede celular (Tsekos, 1996). O complexo de Golgi está implicado na secreção de dois produtos distintos, durante a esporogénese: o primeiro, de natureza fibrosa, encontra-se nos vacúolos e nas vesículas intumescidas derivadas do Golgi, e participa directamente na formação da parede celular; o segundo, presente em carpósporos e tetrásporos, está associado com a actividade do Golgi e encontra-se no interior de vesículas nucleadas (“cored vesicles”) (Tsekos, 1981; Delivopoulos, 2003; Ouriques e Bouzon, 2003). As vesículas nucleadas são relativamente grandes e possuem um “núcleo” central electronodense constituído por glicoproteínas com fibrilhas polissacarídicas periféricas

(Tsekos *et al.*, 1985). Tsekos (1981; 1983) sugere que as vesículas nucleadas libertam o seu conteúdo na parede celular por exocitose, conteúdo esse constituído por enzimas que intervêm na síntese dos polissacarídeos. Vários trabalhos demonstraram que os sacos de mucilagem (vacúolos) contêm polissacarídeos sulfatados (Pueschel, 1979; Tsekos, 1981, 1983; Tsekos *et al.*, 1985). Segundo Tsekos e Shcnepf (1991) os polissacarídeos são produzidos dentro de estruturas vesiculares; esta presunção foi confirmada por estudos bioquímicos e ultraestruturais, nos quais ficou demonstrado que o sistema endomembranar constitui o local da síntese dos polissacarídeos da matriz extracelular (Ramus, 1972; Evans *et al.*, 1974; Tsekos, 1981; Tsekos *et al.*, 1985; Gretz *et al.*, 1991b).

Em jeito de conclusão, pela análise dos trabalhos de diversos autores, é consensual que: os precursores das carragenanas são sintetizados (complexo de Golgi) e sulfatados (sulfatação associada com o retículo endoplasmático e os dictiosomas) intracelularmente; a conversão dos precursores nas carragenanas gelificantes ocorre na membrana plasmática ou na parede celular, pela acção de sulfohidrolases (Ramus, 1972; Ramus e Groves, 1972; Wong e Craigie, 1978; Mccandless e Craigie, 1979; Mathieson *et al.*, 1984; Gretz e Vollmer, 1989).

1.7.4 - Biodegradação extracelular

As carragenanas são degradadas por enzimas denominadas carragenases. Várias bactérias marinhas produzem carragenase-iota e carragenase-kappa, enzimas que degradam a carragenana iota e kappa, respectivamente. A biologia estrutural e a evolução molecular das carragenases foram recentemente revistas por Barbeyron e colaboradores (2001), assim como o seu papel na biotecnologia das carragenanas (De Ruitter e Rudolph, 1997). Ver secção 1.9, sobre a biotecnologia das carragenanas.

1.7.5 - Funções Fisiológicas das Carragenanas

A maioria das algas vermelhas possui uma parede celular análoga à das células das plantas superiores: microfibrilas de celulose embebidas numa matriz de polissacarídeos. Devido ao facto das algas vermelhas habitarem em meios aquáticos, a composição e a organização da matriz intercelular difere da encontrada nas plantas de habitat terrestre. As plantas superiores precisam de uma estrutura rígida para suportarem o efeito da gravidade e, por isso, a celulose é um componente muito importante das suas paredes celulares. A natureza cristalina da celulose proporciona uma estrutura rígida e resistente. Nas paredes celulares das algas vermelhas, a celulose constitui o componente menor, variando de 1 a 8 % do total do peso seco da alga (Toffanin *et al.*, 1994). As algas marinhas requerem uma maior flexibilidade estrutural, de forma a poderem resistir e adaptar ao stress variável da zona das marés e, sobretudo, ao movimento das ondas. Uma matriz extracelular composta principalmente por carragenana (ou agar, no caso das agarófitas), proporciona à alga uma grande flexibilidade. Tal como acontece nas plantas, outros polissacarídeos e glicoproteínas interligam as fibrilas cristalinas e/ou os polissacarídeos da matriz amorfa, contribuindo assim para a resistência ao stress mecânico, expansão celular e coesão celular (Flores *et al.*, 1997; Lechat *et al.*, 2000). No entanto, o significado fisiológico da composição da matriz intercelular das algas vermelhas, no que diz respeito à regulação mecânica, hidratação e regulação osmótica em meio marinho, continua a ser matéria de debate (Kloareg e Quatrano, 1988).

1.8 - Significado taxonómico dos polissacarídeos presentes nas Gigartinales

O significado taxonómico da estrutura dos polissacarídeos da parede celular foi referenciado várias vezes nas últimas décadas (McCandless, 1978; Craigie, 1990; Liao *et al.*, 1993; Chiovitti *et al.*, 1998b). Ocorreram nos últimos anos muitas mudanças na sistemática das algas vermelhas (Mikami, 1965; Hommersand *et al.*, 1993; Saunders e Kraft, 1997) e vários tipos de análise bioquímica dos ficocolóides têm sido desenvolvidos (Chopin e Whalen, 1993; Usov, 1993; Stortz *et al.*, 1997a; van de Velde *et al.*, 2002a; Pereira *et al.*, 2003); a composição da parede celular de representantes das algas vermelhas encontra-se bem documentada (McCandless, 1978; Chopin, 1986; Gretz e Vollmer, 1989; Craigie, 1990). O método desenvolvido por Chopin e Whalen (1993) para a identificação de ficocolóides através de FTIR permitiu alargar o estudo a um grande número de algas. A utilização da espectroscopia de RMN, em particular a de ^1H -RMN, veio permitir a determinação precisa (qualitativa e quantitativa) da composição dos principais ficocolóides, em particular das carragenanas (van de Velde *et al.*, 2002a). À luz das recentes abordagens filogenéticas, com base molecular, foi possível estabelecer uma distribuição das algas ao nível da família, com base no tipo de ficocolóide produzido (Chopin *et al.*, 1999a).

A alternância bioquímica das gerações bem documentada nas Phyllophoraceae, Petrocelidaceae e Gigartinaceae, mantém-se válida até hoje, mas a existência de um padrão idêntico não foi identificado nas outras famílias das Gigartinales (Craigie, 1990).

Vários autores estão de acordo que a primeira tentativa para determinar o possível significado taxonómico dos polissacarídeos da parede celular das algas vermelhas foi feita por Stoloff e Silva (1957). No entanto, não é possível ignorar que o pioneiro no estudo dos colóides marinhos foi Tseng (1945). Este autor foi responsável por uma síntese notável sobre os diferentes ficocolóides e pela terminologia que iria perdurar até aos nossos dias. No seu trabalho, Tseng agrupou as algas consoante o tipo de colóide que estas produziam, num esquema que ainda hoje é usado: as agarófitas produzem agar, as carragenófitas produzem carragenana, etc.

Em 1957, baseando-se na análise de 66 espécies pertencentes a 22 géneros, Stoloff e Silva demonstraram o potencial das propriedades dos polissacarídeos solúveis em água, como ferramentas quimiotaxonómicas. Além disso, estes autores fizeram três declarações chave: 1 – O uso de componentes químicos na classificação não é novidade, pois Harvey, ao estabelecer os principais grupos de algas, usou um carácter bioquímico, a composição pigmentar; 2 – Os dados derivados da análise dos componentes bioquímicos com valor comercial são, também eles, importantes e com interesse económico; 3 – Quanto maior for o número de critérios usados e quanto maior número de correlações entre factores forem elucidados, maior será a relação entre os arranjos taxonómicos e a filogenia das algas. Este conjunto de argumentos é aceite pela generalidade dos autores, pois a compreensão da filogenia das algas vermelhas resulta da integração de características morfológicas, ultraestruturais, químicas e moleculares (Chopin *et al.*, 1999a). Hoje o número de espécies analisado é substancialmente superior, pelo que o significado taxonómico dos polissacarídeos presentes nas algas carragenófitas se reveste de particular importância (ver Discussão).

1.9 - Biotecnologia das carragenanas

Os maiores avanços na moderna biotecnologia não teriam sido possíveis sem a utilização dos polissacarídeos extraídos das macroalgas marinhas (alginatos, agar, agarose e carragenanas).

Para a separação e fragmentação dos genes é indispensável a electroforese, não só à base de agarose mas também com recurso aos seus derivados hidroxietílicos com baixas temperaturas de gelificação/fusão. A agarose também é indispensável na cultura de protoplastos e na regeneração celular. A insulina recombinante, o activador plasminogénico tecidual, o Factor VIII, os interferons, etc., todos eles foram desenvolvidos usando, pelo menos numa etapa do seu desenvolvimento, os géis de agarose. É questionável se as recentes descobertas nas áreas de investigação médica, em particular na investigação do cancro (na descoberta e na compreensão dos oncogenes) e da SIDA, teriam sido possíveis sem a agarose e/ou os seus derivados (Renn, 1990).

O agar continua a ser o meio ideal para a cultura e selecção de hospedeiros microbiológicos na engenharia genética, assim como na cultura de tecidos *in vitro*. A bioconversão mais eficaz é resultado da tecnologia de encapsulação com base em sais insolúveis de ácido alginico e de carragenana (Iborra *et al.*, 1997; van de Velde *et al.*, 2002b).

O termo 'biotecnologia' tem significados diferentes consoante o autor, desde o "modificar e cultivar sistemas vivos de forma a fornecerem produtos úteis", até à clonagem terapêutica, tudo pode ser considerado 'biotecnologia'. Como definição geral, a biotecnologia é "a manipulação e/ou utilização de parte ou de todo um sistema biológico específico com o fim de fornecer um determinado produto".

A biotecnologia não é uma ciência em si mesma, mas tão-somente o conjunto de instrumentos e técnicas que podem ser usados na resolução de problemas, criar produtos e/ou processos. Esses instrumentos incluem a engenharia genética, a tecnologia de recombinação de ADN, a cultura de tecidos, as enzimas, as fermentações, os bio-reactores de organismos ou células imobilizados, a bioquímica e a imunologia. A biotecnologia não é nada de novo, podendo até considerar-se tão velha como a Humanidade pois, em termos gerais, inclui os processos de fermentação (nas fábricas da cerveja, do pão e do vinho) e de biocatálise. Em boa verdade, a biotecnologia nasceu quando o homem primitivo tentou, pela primeira vez, entender os processos da vida. As recentes descobertas catapultaram a biotecnologia para uma posição proeminente no panorama científico actual (Renn, 1990, 1997).

A fermentação é baseada, tradicionalmente, no uso de células em crescimento ou de microorganismos, na conversão de substratos, por intermédio de reacções multi-etapa, em produtos novos. A biocatálise é usualmente definida como "o uso de enzimas ou sistemas de enzimas para catalizar uma transformação altamente selectiva de um substrato num determinado produto final. Consequentemente, o termo biotecnologia dos polissacarídeos significa, usualmente, transformação biocatalítica e pode ser descrita, em geral, como "a aplicação de enzimas ou sistemas de enzimas na conversão de polímeros de hidratos de carbono em novos polissacarídeos com mais-valia" (De Ruyter e Rudolph, 1997). A biotecnologia dos ficocolóides das algas vermelhas, em particular das carragenanas, está ainda numa fase precoce, quando comparada com a biotecnologia dos alginatos e dos polímeros de origem vegetal, tais como o amido (Guzman-Maldonado e Paredes-Lopez, 1995) ou a pectina (Beldman e al., 1996).

1.9.1 - Técnicas de imobilização em carragenana

A área da imobilização de células e organitos tem tido uma rápida expansão. Muitas das novas técnicas usadas na preparação de células imobilizadas foram desenvolvidas durante a década de 80 (do século passado), tendo então sido investigado um leque alargado de aplicações (Tosa *et al.*, 1979).

O desenvolvimento de procedimentos de imobilização cada vez mais delicados permite agora a manipulação de qualquer tipo de célula, mantendo-a viva e viável. A carragenana é particularmente útil na imobilização de sementes, células e microorganismos com ou sem nutrientes ou outras substâncias activas. Uma das principais vantagens da carragenana está relacionada com a temperatura de gelificação, o que permite uma maior margem de tolerância em relação ao tipo de organismos a imobilizar. Além disso, a actividade enzimática das células, encerradas em carragenana, é geralmente muito elevada (van de Velde *et al.*, 2002b).

As aplicações para as técnicas de imobilização são variadas, podendo ir desde a produção de etanol, como potencial fonte de combustível líquido, até à sobrevivência prolongada de “ilhas de Langerhans” encapsuladas em membranas biocompatíveis (SIAP, 1996). Uma revisão das diferentes aplicações da carragenana na imobilização de células e/ou organismos, pode ser consultada em van de Velde *et al.* (2002b). As principais aplicações da carragenana, como meio de imobilização, são: tratamento de águas residuais (remoção de azoto, degradação da morfina, degradação de poluentes à base de clorofenol); síntese assimétrica (produção de ácido aspártico, ácido málico, alanina e triptofano); aplicações alimentares (produção de vinagre, pré-fermentação do leite para a produção de queijo fresco, produção de cerveja e de etanol); aplicações farmacêuticas (produção de tetraciclina e clorotetraciclina, ácido aspártico e antibióticos semi-sintéticos).

1.9.2 - Enzimologia da degradação

A primeira referência sobre a modificação enzimática de polissacarídeos sulfatados de algas data de 1902, quando Gran (De Ruiter e Rudolph, 1997) descreve a degradação do agar por acção de uma enzima isolada a partir de uma bactéria chamada *Bacillus gelaticus*; em consequência, a enzima foi denominada “gelase”. Grande parte deste trabalho foi desenvolvido no laboratório de Martinus W. Beijerinck (Holanda). Desde então muitas agarases, em particular alfa e agarase- β , foram isoladas, purificadas e clonadas, sendo neste momento comercializadas em pequena escala. Especialmente no Japão, sempre houve um grande interesse nas agarases e oligossacarídeos resultantes do agar, depois usados como ingredientes na área alimentar. Dois tipos de oligossacarídeos podem ter origem no agar: os oligossacarídeos resultantes da hidrólise da ligação α , catalisada por um ácido diluído, ou por agarases- α ; e os novos oligossacarídeos, resultantes da hidrólise das ligações β , catalisadas por agarase- β (De Ruiter e Rudolph, 1997).

1.9.3 - Enzimas modificadoras de carragenana

A primeira enzima capaz de modificar as carragenanas foi descrita em 1943 pelo investigador japonês Mori (1943), ao qual se seguiu uma equipa de canadianos (Yaphe e Baxter, 1955), doze anos mais tarde. Entretanto, diversas enzimas modificadoras de carragenana foram descobertas e descritas. Um considerável número destas enzimas foi purificado a partir de bactérias marinhas, como por exemplo a *Alteromonas*

carrageenovora (anteriormente denominada *Pseudomonas carrageenovora*) (Barbeyron *et al.*, 1994; Barbeyron *et al.*, 1995) e a partir de diferentes algas marinhas (algumas espécies do género *Gigartina*).

A enzima melhor caracterizada é a carragenase-ê, isolada a partir da *A. carrageenovora* (Bellion *et al.*, 1982; Knutsen e Grasdalen, 1992a; Potin *et al.*, 1995). Esta enzima actua como uma endo-hidrolase, hidrolisando especificamente a ligação â-glicosídica entre a 3,6-anidro-D-galactose e a D-galactose. Desta hidrólise formam-se oligossacarídeos de neocarrabiose DA-G4S com â-D-galactopiranosose, 4-sulfato, 3-ligando, como etapa redutiva final. O mecanismo lítico e a especificidade foram revelados por análise detalhada em ¹H-RMN dos produtos de reacção (Knutsen e Grasdalen, 1992a). As carragenases-iota com origem em *Alteromonas fortis* e *Zobellia galactanovorans* hidrolisam as ligações β -1,4 da carragenana iota (Barbeyron *et al.*, 2000; Barbeyron *et al.*, 2001). O seu mecanismo de hidrólise consiste numa reacção de substituição nucleofílica de passo único, do qual resulta uma inversão da configuração da cadeia anomérica. Em contraste com as carragenases-kappa (Potin *et al.*, 1995), as carragenases-iota não apresentam actividade de transglicosilação (Barbeyron *et al.*, 2001). Segundo van de Velde e de Ruitter (2002) ainda não foram identificadas enzimas capazes de quebrar a ligação glicosídica entre os dímeros de neocarrabiose.

A cristalização e análise preliminar por raios-X da carragenase-kappa (de *A. carrageenovora*) e carragenase-iota (de *A. fortis*) foi feita por Michel e colaboradores (2001). Esta foi a primeira análise tridimensional da estrutura de uma carragenase. O local activo desta enzima tem o formato de um túnel, indicando que é capaz de degradar substratos sólidos.

Grande parte das enzimas referidas não foram ainda purificadas até ao estado homogéneo e também não foram ainda completamente caracterizadas. Além disso, nenhuma destas enzimas se encontra comercialmente disponível.

1.9.4 - Funcionalidades das carragenanas modificadas

Uma área em grande expansão é a da biotecnologia das carragenanas, na qual se recorre, normalmente, a enzimas modificadoras de polissacarídeos. Em colaboração com a CP Kelco, o grupo do Dr. Bernard Kloareg (CNRS, Roscoff, França) clonou duas sulfohidrolases do *C. crispus* (De Ruitter *et al.*, 2000). Essas enzimas constituem uma nova ferramenta na produção de carragenanas híbridas do tipo nu/iota, com características especiais de grande utilidade na indústria alimentar.

As oligogalactanas são reconhecidas como bio-compostos activos e extremamente valiosos em aplicações não alimentares, tais como na agricultura, cosmética e indústria farmacêutica. Por essa razão, novas variedades de enzimas modificadoras de carragenana têm sido purificadas e clonadas. Os laboratórios do Dr. Kloareg desenvolveram várias carragenases capazes de hidrolisar selectivamente as carragenanas kappa e iota (Barbeyron *et al.*, 2001). Estas enzimas podem ser usadas para produzir oligossacarídeos de carragenana, com estrutura e propriedades específicas. Além disso, a carragenase-kappa, obtida a partir de *P. carrageenovora*, apresenta actividade de endo-transglicosilação (Potin *et al.*, 1995). Esta actividade poderá ser usada na transferência de substituintes vários nos oligossacarídeos de carragenana kappa. A patente deste grupo de enzimas pertence aos laboratórios Goëmar (Barbeyron *et al.*, 1998).

1.9.5 - Desenvolvimento futuros

A biotecnologia, como ferramenta para a obtenção de polissacarídeos e oligossacarídeos com funcionalidades específicas, tem-se desenvolvido muito rapidamente. A biotecnologia já foi usada ao nível comercial para desenvolver polímeros de hidratos de carbono de origem vegetal, como por exemplo o amido, a goma guar e a pectina. Quantidades limitadas de polissacarídeos de algas, sobretudo alginatos, são correntemente modificados com recurso a enzimas e estão disponíveis comercialmente (ver www.goemar.com). A biotecnologia dos ficocolóides tem, no mercado dos polímeros com características específicas, uma oportunidade de grande expansão e evolução. Além disso, a atenção crescente dada à aplicação de hidratos de carbono isolados a partir de algas marinhas, na área biomédica, é perfeitamente visível no aumento exponencial do número de artigos e patentes desenvolvidos, sugerindo que, no futuro, estes compostos têm um grande potencial na área das aplicações farmacêuticas (De Ruiter e Rudolph, 1997). É também de esperar que estas enzimas terão um uso crescente como ferramentas sofisticadas para a análise estrutural detalhada dos polissacarídeos algais, essencial na compreensão das suas propriedades físico-químicas.

Em conclusão, os benefícios, a curto prazo, do uso da biotecnologia na produção de colóides marinhos são: desenvolvimento de novos polímeros com propriedades funcionais específicas; melhor aproveitamento dos desperdícios resultantes do processo de extracção das carragenanas; incremento da eficácia dos processos de extracção. A longo prazo, é de esperar que a biotecnologia venha a permitir: a transferência de genes algais, responsáveis pela codificação de enzimas úteis, para outros microorganismos; a produção de complexos específicos biologicamente activos. A biotecnologia será uma ferramenta muito importante na produção de novos polissacarídeos, de origem marinha, que irão ser usados como ingredientes funcionais, de alta qualidade, na área alimentar, cosmética e farmacêutica (De Ruiter e Rudolph, 1997; Tseng, 2001).

1.10 - Indústria das Carragenanas

1.10.1 - Algas usadas na indústria

Grande parte das carragenanas é extraída hoje do *Kappaphycus alvarezii* e da *Eucheuma denticulatum*. A fonte original de carragenanas era o *Chondrus crispus*, alga que continua a ser usada mas em quantidades limitadas. O *Betaphycus gelatinum* é usado para a extracção de um tipo particular de carragenana, a beta (β). Algumas espécies sul americanas, usadas anteriormente em quantidades reduzidas, ganharam recentemente a preferência dos produtores de carragenanas, pois estes procuram aumentar a diversificação das espécies usadas, de forma a possibilitar a extracção de novos tipos de carragenana (McHugh, 2003). A *Gigartina skottsbergii*, a *Sarcothalia crispata* e a *Mazzaella laminaroides* são actualmente as espécies mais valiosas, todas elas colhidas a partir de populações naturais do Chile. Pequenas quantidades de *Gigartina canaliculata* são colhidas no México e a *Hypnea musciformis* tem sido usada no Brasil (Furtado, 1999).

Nos últimos anos grande parte destas macroalgas foram reclassificadas por biólogos marinhos e ficologistas em consequência do incremento do conhecimento sobre a sua morfologia, fisiologia, bioquímica, etc. Segue-se uma lista dos nomes actuais e dos respectivos sinónimos (Perez *et al.*, 1992; McHugh, 2003):

O *Betaphycus gelatinum* (Figura 1.12 - C) antes chamava-se *Eucheuma gelatinae*;

O *Chondrus crispus* mantém o seu nome, sendo conhecido também por “Irish Moss” (musgo irlandês);

A *Eucheuma cottonii* chamase agora *Kappaphycus alvarezii* (Figura 1.12 - A e B); comercialmente era e continua a ser conhecida por “cottonii”;

A *Eucheuma denticulatum* (Figura 1.12 - D) chamava-se *Eucheuma spinosum*; comercialmente conhecida por “spinosum”;

A *Eucheuma gelatinae* é agora *Betaphycus gelatinum* (Figura 1.12 - C);

A *Gigartina canaliculata* mantém o seu nome inalterado;

A *Gigartina skottsbergii* (Figura 1.12 - E) mantém também o seu nome inalterado

A *Gigartina stellata*, mencionada nos primeiros artigos sobre carragenófitas, agora com pouca importância a nível industrial, passou-se a chamar *Mastocarpus stellatus*.

O nome da *Hypnea musciformis* (Figura 1.12 - F) permanece inalterado;

A *Iridaea ciliata* (*I. crispata*) é agora *Sarcothalia crispata* (Figura 1.12 - H);

A *Iridaea laminaroides* é agora *Mazzaella laminaroides*.

Outras macroalgas usadas em pequenas quantidades na indústria das carragenanas são:

Gigartina pistillata;

Gigartina acicularis, agora *Chondracanthus acicularis*.

Gigartina chamissoi, agora *Chondracanthus chamissoi* (Figura 1.12 - G).

O *Kappaphycus alvarezii* encontra-se distribuído nas zonas costeiras das Filipinas, da Indonésia e da zona este de África. Esta alga cresce nas zonas de recife, no limite superior do patamar infralitoral, sobre a areia de coral e substratos rochosos, onde a ondulação é fraca ou moderada. Possui um talo denso, constituído por numerosas ramificações cilíndricas. A superfície do talo pode ser rugosa ou lisa, com uma cor que pode ir do verde ao castanho. O seu tamanho natural é de cerca de 20 a 30 cm de diâmetro, podendo os exemplares maiores atingir 1 m.

A *Eucheuma denticulatum* tem a mesma distribuição do *K. alvarezii*, sendo também a sua morfologia muito idêntica, com a excepção das ramificações que estão cobertas por pequenos espinhos (3 a 4 mm). Esta alga tem um tamanho médio que ronda os 75 cm de diâmetro e desenvolve-se na areia de coral ou sobre substratos rochosos, em áreas expostas a correntes moderadas ou fortes.

O *Betaphycus gelatinum* cresce sobre rochas ou substratos coralinos, a alguns metros da orla dos recifes, exposto a uma forte ondulação e turbulência. A colheita de talos selvagens é feita, em grande parte, na ilha de Hainan (China), na ilha Formosa e nas Filipinas; o seu cultivo é feito na Ilha de Hainan, tendo a sua produção já ultrapassado a quantidade colhida em populações naturais (McHugh, 2003).

O *Chondrus crispus* encontra-se distribuído desde a Noruega até Marrocos e desde Newfoundland, no Canadá, até o Cabo Cod, no estado de Massachusetts nos EUA. Cresce a partir de um pequeno disco basal que se encontra aderido às rochas ou a pedras. Esta alga desenvolve-se numa vasta faixa da zona costeira, entre o limite superior do patamar médiolitoral e profundidades de 5 a 6 metros. Possui uma tonalidade de violeta escuro ou acastanhada com iridiscência oleosa, com numerosas ramificações dicotómicas e um comprimento médio de cerca de 25 cm (Rudolph, 2000). Juntamente com o *C. crispus* é colhido o *Mastocarpus stellatus*, pois ocupa basicamente o mesmo habitat. O “Irish Moss” é colhido, para extracção de carragenana, no Canadá (Nova Escócia e nas ilhas Príncipe Eduardo), nos Estados Unidos (no estado do Maine e

de Massachusetts), na França e na Península Ibérica (Santos e Duarte, 1991; Sousa-Pinto, 1998) (ver www.surialink.com).

O *C. crispus* tem sido colhido no Canadá desde a década de 20, mas só se tornou numa actividade económica importante durante o período da II Guerra Mundial, quando o fornecimento de Agar japonês foi interrompido e os talos de “Irish Moss” da costa francesa ficaram menos acessíveis. A quantidade colhida na ilha Príncipe Eduardo subiu das 5 toneladas (peso seco) em 1940 para as 90 toneladas em 1942. O processo de apanha inicial consistia na recolha das algas destacadas e arrastadas pelas ondas e pelo vento.

A escala da operação destes barcos provocou severos danos no processo natural de recuperação das populações de *C. crispus*. No entanto, a procura desta alga teve um declínio acentuado aquando do início da cultura intensiva de *Kappaphycus* e da *Eucheuma* nas Filipinas, durante a década de 80. Devido à pouca procura por parte da indústria, a colheita de *C. crispus* voltou a ser uma actividade de “part-time” dos pescadores, possibilitando a recuperação gradual das populações naturais.

Na França o *C. crispus* cresce sobretudo na Bretanha. No entanto, devido à morfologia algal distinta da encontrada no Canadá, não é possível usar dragas na apanha das algas francesas. A colheita totalmente manual ocupa, de forma temporária, cerca de 3000 pessoas (Perez *et al.*, 1992; McHugh, 2003).

A *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* e *Mazzaella laminaroides* são todas colhidas a partir de populações naturais presentes nas zonas costeiras do Chile, principalmente na zona central, de Valparaíso até à ilha Chiloe. Alguma *G. Skottsbergii* é também colhida na Argentina. A *M. laminaroides* é colhida à mão, na zona médiolitoral, por pessoas que andam sobre as rochas, aquando da baixa-mar. A *S. crispata* é colhida por pescadores, na zona infralitoral. Estes pescadores mergulham, arrancam as algas com o auxílio de um gancho e depois guardam-nas em sacos denominados “chinguillos”. A *G. skottsbergii* é colhida durante a maré baixa, na zona infralitoral, usando a mesma técnica da colheita da *S. crispata*. Dependendo da área onde os pescadores mergulham, cada pessoa é capaz de colher cerca de 70 kg/hora (Critchley e Ohno, 1998b).

A *Gigartina canaliculata* cresce no México, na zona médiolitoral, sendo colhida à mão por pescadores, durante a maré baixa, de Maio a Setembro (Critchley e Ohno, 1998b).

A *Hypnea musciformis* encontra-se distribuída no mar das Caraíbas, no oceano Índico e no Pacífico tropical (van de Velde e de Ruiters, 2002); a sua apanha para fins comerciais é feita no Brasil (Berchez *et al.*, 1993; Furtado, 1999) e no Senegal (Mollion, 1977); a sua cultura é feita na Índia (Critchley e Ohno, 1998b).

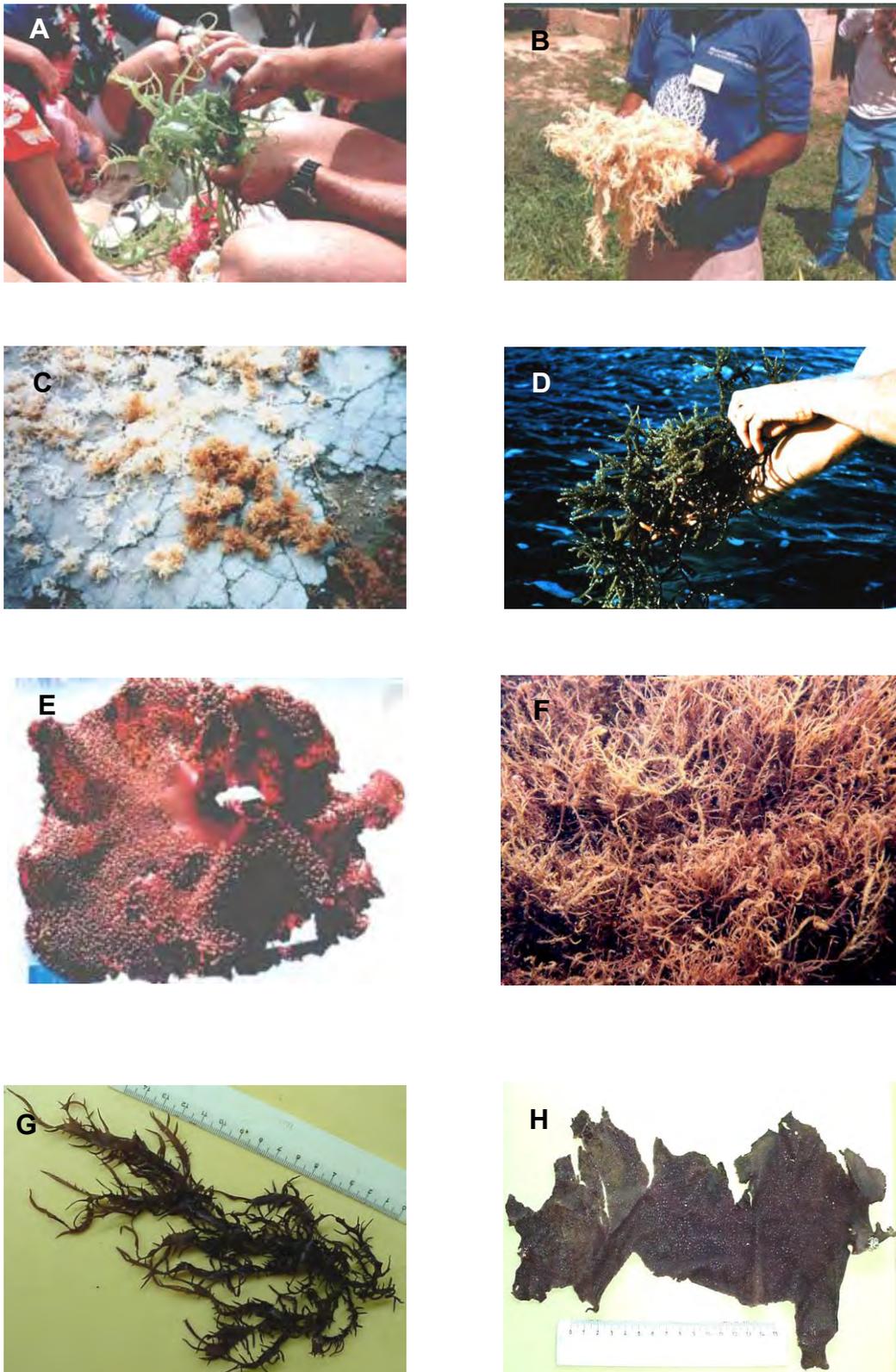


Figura 1.12 – Algumas das carragenófitas usadas na indústria: A – *Kappaphycus alvarezii*; B – *K. alvarezii* (seco); C – *Betaphycus gelatinum* (seco); D – *Eucheuma denticulatum*; E – *Gigartina skottsbergii*; F – *Hypnea musciformis*; G – *Chondracanthus chamissoi*; H - *Sarcothalia crispata*. A, B, C e E de McHugh, 2003; D e F de www.surialink.com; G e H, originais.

1.10.2 - Apanha de algas

A apanha de algas carragenófitas (Tabela 1.7) é uma tarefa laboriosa feita, em grande parte, manualmente (Therkelsen, 1993; Rudolph, 2000). Esta actividade é realizada sazonalmente e em locais com populações algais de grande densidade, recolhendo-se algas destacadas pelas ondas, na época das tempestades, ou arrancando-as das rochas durante a maré baixa (*Iridaea*, *Gigartina* e *Chondracanthus*). A apanha de *C. crispus* é feita à mão ou com o auxílio de dragas. A apanha feita a partir de barcos foi desenvolvida no Canadá e permite a colheita de algas frescas e de boa qualidade (Perez *et al.*, 1992). As algas flutuantes, como por exemplo a *Furcellaria*, são facilmente colhidas por arrasto. A colheita de algas arrojadas na zona das marés tem as suas limitações, pois a quantidade disponível é limitada e a sua decomposição inicia-se rapidamente devido à exposição à chuva e aos raios solares.

Tabela 1.6 – Colheita anual de carragenófitas, em toneladas de peso seco [dados de 2001, segundo (McHugh, 2003)].

País	Carragenófitas	Toneladas
<i>Chondrus e Mastocarpus</i>		
Canadá		2.000
França, Espanha e Portugal		1.400
Coreia do Norte e do Sul		500
Sub-total		3.900 (2.3 %)
<i>Euclima e Kappaphycus</i>		
Indonésia		25.000
Filipinas		115.000
Tanzânia		8.000
Outros		1.000
Sub-total		149.000 (88.5 %)
<i>Gigartina e Chondracanthus</i>		
Chile		14.000
Marrocos, México e Perú		1.500
Sub-total		15.500 (9.2 %)
Total		168.400 (100 %)

1.10.3 - Cultura de Carragenófitas

A colheita de algas a partir de populações naturais tem sempre o risco de sobreprodução e a possibilidade da perda total da mesma. Em sequência disso tem havido, nas últimas décadas, um grande desenvolvimento nas técnicas de cultura de algas.

A cultura de algas teve início no Japão há quase 200 anos. Pescadores japoneses empilhavam lâminas de *Porphyra* nas zonas costeiras (no patamar médiolitoral) de forma a aumentar a sua produção (Perez *et al.*, 1992).

A domesticação de cultivares de algas é importante para reduzir ou pôr fim à pressão da colheita de espécies alvo em ecossistemas sensíveis. A investigação dos ciclos biológicos das algas possibilitou o desenvolvimento de processos de sementeira

artificial a partir da década de 50 do século passado. Hoje, cerca de uma dúzia de taxa são comercialmente cultivados, promovendo uma diminuição na pressão exercida sobre as populações naturais. Um exemplo de sucesso neste campo está patente nas Filipinas, onde Maxwell Doty foi pioneiro na maricultura de espécies pertencentes ao género *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Santelices, 1999). Pequenos talos, de uma variedade que cresce rapidamente e com boa resistência às doenças, são atados a longas cordas. Estas cordas são depois colocadas na zona interior dos recifes, onde as algas podem crescer sem serem arrastadas. As algas são depois colhidas quando atingem um peso (peso fresco) individual de cerca de 1 Kg (peso fresco) (Rudolph, 2000). A actual produção de cultivares de *Eucheuma* e *Kappaphycus* representa a quase totalidade da produção de carragenanas nas Filipinas, sem haver necessidade de recorrer à colheita de recursos naturais (Kapraun, 1999).

Uma outra variante da cultura de algas denominada “cultura integrada” ou “co-cultura” tem vindo a desenvolver-se na última década. A aquacultura de peixes e mariscos promove a libertação de grandes quantidades de nutrientes (fosfatos e nitratos), contribuindo para a eutrofização de algumas zonas costeiras. As algas têm sido usadas, com sucesso, como biofiltros na remoção do excesso de nutrientes. A co-cultura de algas em tanques ou em cordas, junto às zonas de aquacultura de peixe, permite um crescimento rápido de algumas espécies com interesse económico e a redução da quantidade dos nutrientes libertados para o mar (ver www.seapura.com). Os estudos sobre a co-cultura de algas tiveram início em meados da década de 70 e ganharam novo interesse no final do século XX (Troell *et al.*, 1999). No Vietname iniciou-se recentemente o cultivo de *Kappaphycus* em zonas costeiras. A cultura desta alga é feita em lagoas e lagos, alternando, cada 6 meses, com a aquacultura de camarões (Nang e Dinh, 1998).

O *Betaphycus gelatinum*, alga produtora de carragenana beta, é cultivado na ilha de Hainan (China). Porções de alga, colhida em populações naturais, são colocadas em ramificações de corais e seguros com o auxílio de pequenos anéis de borracha e, posteriormente, lançados ao mar, na zona infralitoral, junto aos recifes de coral (Wu, 1998).

Em França cultivou-se, com sucesso, *Chondrus crispus* em “raceways”, de 1978 a 1996 (Kaas, 1998). A utilização de uma variedade criteriosamente seleccionada (T₄) e de um sistema de cultura completamente automatizado, permitiu a cultura de *C. crispus* com uma taxa de crescimento 10 vezes superior à taxa normal (Perez *et al.*, 1992). No entanto, devido à queda acentuada do seu preço, a cultura desta alga deixou de ser viável economicamente (Kaas, 1998).

Os métodos de cultura e repovoamento da *Gigartina skottsbergii* tiveram origem numa colaboração entre a divisão de agricultura do “Instituto e Fomento Pesqueiro e Departamento de Oceanografia da Universidade de Concépcion” (Chile) (Buschmann *et al.*, 2001; Romo *et al.*, 2001).

Outras experiências ao nível da cultura de carragenófitas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas. Para uma revisão dos principais estudos sobre a cultura de carragenófitas em laboratório, em tanques e em zonas litorais, ver Perez *et al.* (1992), Critchley e Ohno (1998b), Chopin *et al.* (1999b), Buschmann *et al.* (2001) e Romo *et al.* (2001).

O factor mais importante no sucesso ou insucesso da produção de algas carragenófitas tem haver com a escolha do local para a sua cultura. Se, por exemplo, num dado ponto da zona costeira se desenvolvem populações selvagens de *Kappaphycus* ou a *Eucheuma*, quer dizer que esse local é provavelmente adequado à

implantação de uma cultura de carragenófitas. Se não existirem populações naturais, o local deverá respeitar os seguintes critérios (McHugh, 2003):

As zonas de recife afastadas de fontes de água doce (pequenos rios) constituem normalmente bons locais. Se a salinidade (usualmente 35 S‰) descer para valores inferiores a 30 S‰ as algas não se desenvolverão adequadamente.

A temperatura da água deverá oscilar entre os 25 e os 30 °C. Um bom local deverá ficar entre o limite da maré baixa e o limite exterior do recife.

Visto que as algas obtêm os nutrientes a partir da água é importante que o local possua alguma corrente. Águas com movimentos moderados, constituem o local ideal, pois possibilitam a estabilização da temperatura e da salinidade. Deverá ser evitada a acção intensa da ondulação, pois esta poderia promover a fragmentação das algas, resultando numa perda de biomassa.

O fundo do local é também importante; um fundo branco, firme, com uma quantidade reduzida de algas nativas, constitui o local ideal. A presença de muitas algas e plantas marinhas constitui uma fonte de competição pelos nutrientes. A presença de lama ou de lodo no fundo é indicador de águas pouco movimentadas, pelo que são de evitar.

Muita luz solar é uma condição necessária ao bom crescimento das algas. As carragenófitas cultivadas em águas superficiais (30 a 50 cm de profundidade) crescem melhor do que aquelas cultivadas em águas mais profundas (abaixo de 1 metro de profundidade).

Os métodos e ilustrações detalhadas da cultura de macroalgas marinhas podem ser consultados em www.surialink.com e nos trabalhos de Trono (Trono, 1999) e de Critchley e Ohno (1998a). Guias práticos e trabalhos de revisão, com ilustrações úteis, para a cultura de *Eucheuma* e *Kappaphycus* podem ser encontrados em Foscarini e Prakash (1990) ou em Ask e Azanza (Ask e Azanza, 2002).

1.10.4 - Extracção industrial das carragenanas

As carragenófitas, depois de colhidas são lavadas, de forma a remover a areia e pequenas pedras e depois são secas para a preservar a qualidade das carragenanas e a reduzir o peso das algas. Em regiões tropicais, a secagem é feita, normalmente, ao sol mas, em climas mais frios são usados secadores de ar rotativos, aquecidos à base de fuel. Após a secagem as algas são transportadas para as fábricas ou armazéns. As fábricas localizadas junto às zonas de colheita usam algas frescas, o que permite uma redução substancial dos custos.

No processo industrial de obtenção das carragenanas é usado o método de extracção alcalina, descrito na secção “Materiais e Métodos”, alínea 2.8.1.

Para produzir um tipo particular de carragenana, com composição uniforme, são utilizados diferentes lotes de algas. A qualidade do produto final é assegurada pela análise pormenorizada das carragenanas (Bixler, 1996).

1.10.5 - Mercado mundial das carragenanas

As carragenanas constituem o terceiro hidrocolóide mais importante na área alimentar, logo a seguir à gelatina (de origem animal) e ao amido. A produção mundial total de carragenófitas é de cerca de 168 mil toneladas de peso seco (Tabela 1.7), da qual se extraem aproximadamente 26 mil toneladas de carragenanas, com um valor estimado de 310 milhões de euros (dados referentes a 2001). O mercado das

carragenanas tem apresentado, durante os últimos anos, um crescimento anual de 3 % (van de Velde e de Ruiter, 2002; McHugh, 2003).

Na actualidade, seis companhias manufacturam cerca de 80 % de toda a produção de carragenanas. É usual separar estas empresas em: companhias tradicionais produtoras de biopolímeros e companhias fornecedoras de ingredientes (aditivos alimentares) que produzem as suas próprias carragenanas. As principais companhias produtoras de biopolímeros são (van de Velde e de Ruiter, 2002; McHugh, 2003):

- Corporação FMC (www.fmcbiopolymer.com), EUA;
- CP Kelco, formada em 2000 pela fusão da “Copenhagen Pectin/Food”, da divisão de gomas da “Hercules In Corporeted” e do grupo “Kelco Biopolymers” da corporação Monsanto-Pharmacia (www.cpkelco.com), EUA;
- Ceamsa (www.ceamsa.com), Espanha.

As principais companhias com actividade a nível mundial que, para além das carragenanas, também produzem uma gama completa de ingredientes (emulsionantes, aromatizantes, etc.), são:

- Degussa (www.degussa.com ou www.texturantsystems.com), Alemanha;
- Danisco (www.danisco.com), Dinamarca;
- Quest International (www.questintl.com), Holanda.

Devido à erosão dos preços das carragenanas durante os últimos 10 anos, a utilização de misturas de carragenana teve um incremento graças, sobretudo, às companhias tradicionais produtoras de biopolímeros.

1.10.6 - A indústria de ficocolóides em Portugal

Apesar da abundância de algas na costa portuguesa, o uso destas na alimentação não tem grande tradição em Portugal, excepto para algumas comunidades costeiras nos Açores. Nestas comunidades a *Porphyra leucostica* é usada em omeletas e a *Osmundea pinnatifida* é usada como especiaria (Palminha, 1971).

As algas marinhas utilizam-se como fertilizantes desde o Século XIV, particularmente nos campos agrícolas próximos do mar. A colheita comercial de macroalgas para fertilizantes foi regulamentada, pela primeira vez, pelo rei D. Dinis, em 1309 (Veiga de Oliveira *et al.*, 1975; Vieira e Santos, 1995). Hoje, o uso de algas como fertilizantes está praticamente restrito à zona Norte, em particular nos campos hortícolas da Zona de Póvoa de Varzim e Viana do Castelo (Pereira *et al.*, 1998; Sousa-Pinto, 1998). As duas principais misturas de algas usadas tradicionalmente como fertilizante são o “moliço” e o “sargaço”. O moliço é uma mistura de algas e plantas marinhas colhidas na Ria de Aveiro. Esta mistura contém sobretudo *Ulva*, *Enteromorpha* (algas agora pertencentes ao género *Ulva*), *Gracilaria* e *Lola*, e as plantas marinhas pertencentes aos géneros *Zostera*, *Ruppia* e *Potamogeton*. O sargaço é a mistura de *Saccorhiza*, *Laminaria*, *Fucus*, *Codium*, *Palmaria*, *Gelidium* e *Chondrus* (Sousa-Pinto, 1998).

As algas com maior procura, devido ao seu conteúdo em agar, são o *Gelidium corneum*, colhido na zona Centro e Sul da costa portuguesa, e a *Pterocladia capillacea*, que é colhida nos Açores (Palminha, 1971; Sousa-Pinto, 1998). Quando o agar oriundo da Ásia, em particular do Japão, se tornou escasso, devido à II Guerra Mundial, teve início a indústria de ficocolóides portuguesa. Esta indústria chegou a ter expressão ao nível da produção mundial de agar, devido à abundância e qualidade das algas portuguesas (Vieira e Santos, 1995; Sousa-Pinto, 1998). A primeira fábrica de agar em Portugal foi construída em 1947, tendo o seu número aumentado até 6 fábricas, em 1971. Por essa altura, Portugal tornou-se num dos maiores produtores mundiais de

agar (Santelices, 1988), produzindo cerca de 1.620 toneladas por ano (Palminha, 1971). No entanto, o declínio ou desaparecimento de algumas populações de agarófitas, a incapacidade de diversificar, de apostar na qualidade e a conjuntura internacional desfavorável, levaram ao desaparecimento desta indústria, restando hoje apenas uma empresa, a Iberagar (Vieira e Santos, 1995).

Estabelecida em 1964 em Portugal, originalmente denominada Unialgas, a Iberagar estava inicialmente vocacionada para a produção de agar para a indústria alimentar e farmacêutica, exportando grande parte da sua produção para o Japão, EUA e Grã-Bretanha (<http://inicon.net/iberagar.htm>). A partir de 1980 a Iberagar tornou-se na única empresa portuguesa a produzir carragenana, fornecendo uma significativa parcela do mercado, principalmente para a indústria alimentar (sobremesas e produtos à base de carne) e também para áreas em expansão como a biologia molecular e a microbiologia (Iberagar).

Embora alguns produtos de cosmética, feitos em Portugal, contenham algas na sua composição, parece que a indústria portuguesa de cosmética não usa nenhuma macroalga portuguesa (Sousa-Pinto, 1998). Os institutos de talassoterapia que usam algas marinhas nos seus tratamentos, importam-nas sobretudo de França. Em Portugal e apesar do reconhecimento do potencial e da importância do sector das algas marinhas, as actividades, em domínios ligados à ficologia, são ainda de reduzida dimensão e inferiores ao desejável e necessário. No entanto, vários estudos feitos por ficologistas e por organizações governamentais ligadas à indústria, têm identificado inúmeras espécies que podem constituir um importante recurso natural em Portugal (Pateira, 1993; Pereira, 1996a).

1.11 - Utilizações das carragenanas

Revisões sobre as diferentes utilizações da carragenanas podem ser encontradas em vários textos sobre carragenanas (Guiseley *et al.*, 1980; Therkelsen, 1993; Imeson, 2000; Rudolph, 2000). Os principais campos de aplicação de carragenanas são em seguida resumidamente enumerados (ver “Anexo II”):

1 – Área alimentar (indústria dos produtos lácteos e cafetaria, alimentos de base aquosa, produtos à base de carne e comida para animais) (ver Tabela 1.8);

2 – Aplicações em áreas não alimentares (aplicações técnicas, aplicações médicas, aplicações farmacêuticas, aplicações na indústria de ambientadores domésticos e na indústria de higiene pessoal).

1.11.1 - Segurança alimentar das carragenanas

Os produtos à base de algas marinhas, e as carragenanas em particular, têm sido usadas, desde há vários séculos, como ingredientes alimentares. As carragenanas para uso alimentar, com um peso molecular médio acima dos 100 kDa (FAO, 1992; FAO/WHO, 2001; SCF, 2003), foram consideradas como aditivos completamente seguros e não tóxicos e, por conseguinte, podem ser usados em produtos alimentares em quantidades ilimitadas. As carragenanas para uso alimentar não são absorvidas a nível intestinal, não havendo evidências concretas que estas promovam processos ulcerogénicos nos seres humanos (Guiseley *et al.*, 1980; Weiner, 1991).

Tabela 1.7 – Aplicações das carragenanas na área alimentar [segundo van de Velde e de Ruiter (2002)].

Uso	Carragenana	Função
Sobremesas gelificadas de base aquosa	Kappa + iota Kappa + iota + FA	Gelificar
Gelatinas pouco calóricas	Kappa + iota	Gelificar
Flans de preparação a quente	Kappa, kappa + iota	Gelificar e melhorar a sensação na boca
Pudins de preparação a frio	Kappa, iota, lambda	Engrossar, gelificar
Leites achocolatados	Kappa, Lambda	Manter em suspensão o cacau
Leite condensado	Iota, lambda	Emulsionar
Crems lácteos	Kappa, iota	Estabilizar a emulsão
Gelados lácteos	Kappa + GG, FA, X	Estabilizar a emulsão e evitar a formação de cristais de gelo
Batidos lácteos	Lambda	Estabilizar a emulsão
Leite de Soja	Kappa + iota	Manter em suspensão os componentes e melhorar a sensação na boca
Queijos	Kappa	Dar textura
Carnes enlatadas e processadas	Kappa	Reter os líquidos no interior da carne e dar textura
Molhos para saladas	Iota	Estabilizar a suspensão
Molhos e condimentos	Kappa	Dar corpo
Recheios de tortas e bolos	Kappa	Dar corpo e textura
Geleias das tartes	Kappa	Gelificar
Cerveja e vinho	Kappa	Promove a floculação e a sedimentação das partículas sólidas em suspensão
Gomas	Iota	Dar textura

FA, Farinha de Alfarroba; GG, Goma de Guar; X, Xantana

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2 – Material e Métodos

2.1 – Material algal estudado

Todas as algas estudadas pertencem à ordem Gigartinales, grupo taxonómico amplamente representado no litoral português. Para além das espécies carragenófitas com interesse industrial, foram estudadas todas as outras espécies nativas mais representativas. Para uma correcta avaliação das potencialidades das carragenófitas portuguesas, como fonte industrial de carragenanas, foram analisadas também algumas algas carragenófitas provenientes de diferentes regiões do mundo, dos mesmos géneros ou de géneros diferentes (ver Tabela 2.2). Estas carragenófitas foram amavelmente cedidas pelo Dr. Alan T. Critchley, da “Degussa, Texturant Systems” (www.degussa-foodingredients.com), responsável pelo laboratório de avaliação de novos recursos algais, da unidade industrial de extracção de ficocolóides sediada em Baupthe (França) e pelo Dr. Brian Rudolph, da “CP Kelco Aps” (www.cpkelco.com), sediada em Lille Skensved (Dinamarca).

2.1.1 – Carragenófitas portuguesas estudadas

Neste trabalho foram estudadas oito espécies distintas, pertencentes a sete géneros e a quatro famílias (Tabela 2.1). A lista completa de todas as colheitas efectuadas encontra-se no Anexo I.

Tabela 2.1 – Carragenófitas portuguesas estudadas

Carragenófitas
Gigartinaceae
<i>Chondrus crispus</i>
<i>Gigartina pistillata</i>
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>
<i>Chondracanthus acicularis</i>
Petrocelidaceae
<i>Mastocarpus stellatus</i>
Phylloporaceae
<i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i>
<i>Gymnogongrus crenulatus</i>
Cystocloniaceae
<i>Calliblepharis jubata</i>

2.1.2 – Carragenófitas usadas a nível industrial

Para comparação com as carragenófitas portuguesas foram escolhidas 11 espécies usadas a nível industrial, pertencentes a 8 géneros e a 3 famílias. A lista das espécies e respectivas origens geográficas consta da Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Carragenófitas usadas a nível industrial

Carragenófita	País de origem
Gigartinaceae	
<i>Chondrus crispus</i>	Canadá
<i>Chondracanthus chamissoi</i>	Chile
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Argentina e Chile
<i>Sarcothalia crispata</i>	Chile
Petrocelidaceae	
<i>Mastocarpus papillatus</i>	Chile
Solieriaceae	
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Filipinas
<i>K. alvarezii</i>	Indonésia
<i>K. alvarezii</i>	Tanzânia
<i>K. alvarezii</i>	Panamá
<i>K. striatum</i>	Madagáscar
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Filipinas
<i>E. denticulatum</i>	Tanzânia
<i>E. denticulatum</i>	Madagáscar
<i>E. isiforme</i>	Colômbia
<i>Betaphycus gelatinum</i>	Filipinas

Para além das algas atrás referidas, alvo de um estudo comparativo com as carragenófitas portuguesas, foram feitas ainda algumas análises nas seguintes espécies: *Hypnea musciformis* (Cabo Verde); *Eucheuma platycladum*; *Gigartina skottsbergii*; *Mazaella laminarioides*; *Catenella impudica*; *Aghardiella* sp.; *C. teedei* (França); *Sarconema scinaoides* (Índia, Paquistão).

2.2 – Estações de colheita

Para a realização dos estudos ecológicos (populações de carragenófitas) e da variação sazonal do conteúdo em carragenanas, foi seleccionada a Baía de Buarcos. As razões que levaram à escolha desta estação estão relacionadas, por um lado, com a sua proximidade geográfica a Coimbra e, por outro lado, com a presença de uma grande diversidade e quantidade de macroalgas (biomassa), que a torna, com efeito, um excelente local para este tipo de estudos (Rodrigues, 1957; Pereira, 1996b; Pereira *et al.*, 2000, 2001; Gaspar, 2002). A confirmar esta característica, de bom modelo para estudos ficológicos, está o grande número de trabalhos já publicados sobre a flora algal da Baía de Buarcos (Rodrigues, 1957, 1958; Ardré, 1970; Pereira e Mesquita, 2003; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2003), o elevado número de espécies aí existentes (das 150 espécies registadas na base de dados do “Portal das Macroalgas Portuguesas”, 87 estão presentes em Buarcos) e a presença constante, durante todo o ano, de exemplares de todas as espécies carragenófitas seleccionadas (Pereira e Mesquita, 2003).

2.2.1 – Localização geográfica

Para o estudo da distribuição geográfica das principais carragenófitas portuguesas (zona Centro e Norte de Portugal) e da variação geográfica do conteúdo em carragenanas, foram feitas colheitas, durante o Verão de 2002, nas seguintes estações de colheita (de Sul para Norte) (Figura 2.1): Baleal (Peniche), S. Martinho do Porto, S. Pedro de Moel, Baía de Buarcos, Aguda, Miramar, Valadares, Lavadores (Salgueiros, Gaia), A-Ver-o-Mar (P. do Varzim), Aguçadoura, Apúlia, Praia do Norte (V. do Castelo), Afife, Vila Praia de Âncora e Moledo.

2.2.2 – Perfil topográfico (Baía de Buarcos)

Para estabelecer o perfil topográfico do local de estudo, em Buarcos, foi usado o método das “escalas móveis” (Pereira *et al.*, 2000; Gaspar, 2002). Para determinar as variações do declive foram usadas duas escalas verticais de 1.5 m, graduadas em centímetros, colocadas em posição vertical (sobre um transepto, perpendicular à linha de costa, previamente estabelecido com o auxílio de uma corda), a uma distância sucessiva de um metro, e um tubo de plástico transparente, cheio de água, para medir o desnível entre as duas escalas (Figura 2.2 - C). Com base no perfil estabelecido e dos valores dos níveis de maré de “viva-água” e de “morte-água”, fornecidos pelo Instituto Hidrográfico (www.hidrografico.pt), foi determinado o posicionamento dos diferentes patamares, e respectivos horizontes, no local de estudo.

2.2.3 - Dados físico-químicos dos locais de colheita

Aquando das colheitas, foram feitas medições da temperatura do ar e da água, do pH (pH Meter HD8705 da Delta Ohm) e da salinidade (SCI Meter model 33 da YSI) da água *in situ*.

2.3 – Metodologias de amostragem

As metodologias usadas na amostragem das carragenófitas têm por base os seguintes protocolos: “Protocol for Monitoring of Seaweeds” (Chopin, 1997); “Selected Methods for Study of Marine Plants” (Dawes, 1998); e “Description and Analysis of Vegetation” (Goldsmith e Harrison, 1976).

2.3.1 – Estudo ecológico das populações de carragenófitas na Baía de Buarcos

2.3.1.a – Método dos quadrados: amostragem de biomassa da *C. teedei* var. *lusitanicus*

O estudo ecológico de uma população de *C. teedei* var. *lusitanicus* foi feito numa área limitada de 100x100 m, situada no horizonte inferior do patamar médiolitoral (Figura 3.2), na Baía de Buarcos (Figura 2.3 - A), concelho da Figueira da Foz. A área limitada é constituída por um substrato rochoso, com pequenas bacias arenosas, de inclinação pouco acentuada, exposto à rebentação das ondas, na zona das marés (Figura 2.3 - B).



Figura 2.1 – Localização das diferentes estações de colheita.

Foram realizadas amostragens de Junho de 2000 a Outubro de 2001, utilizando o método dos quadrados (Goldsmith e Harrison, 1976; Braga, 1990; Chopin, 1997; Pereira *et al.*, 2000). Para a determinação do tamanho mais adequado dos quadrados, testaram-se três tamanhos diferentes (30x30 cm, 20x20 cm, 10x10 cm), lançados três vezes cada, aleatoriamente, sobre os locais onde a *C. teedei* se encontrava mais densamente distribuída (Figura 2.3 - D). Em seguida foram contados todos os indivíduos presentes em cada quadrado e calculado o correspondente número por unidade de área (m^2). Não tendo havido variação quanto ao número de indivíduos, por unidade de área, em cada um dos três diferentes tamanhos, foi escolhido o quadrado de 10x10 cm ($0,01 m^2$).

A determinação do número de quadrados a usar na amostragem baseou-se em Goldsmith e Harrison (1976) e Dawes (1998), segundo os quais o número mínimo de quadrados corresponde ao ponto em que a média acumulada da biomassa, em função do número de quadrados, passa a ter oscilações menores. Segundo os mesmos autores, as colheitas feitas de forma semi-aleatória possibilitam um melhor tratamento estatístico das amostras. A amostragem semi-aleatória adequa-se bem à população estudada pois a grande maioria dos talos de *C. teedei* ocorre no horizonte inferior, do patamar médiolitoral, sobre substrato rochoso, predominantemente no interior das pequenas bacias arenosas, com distribuição uniforme onde os quadrados foram lançados.

Para a determinação do número adequado de quadrados a usar, colheram-se todos os indivíduos presentes em dez quadrados de 10x10 cm, colocando-os, em seguida, em diferentes sacos de plástico. No laboratório, as amostras de *C. teedei* foram lavadas em água do mar filtrada e limpas da fauna e flora associada. Procedeu-se depois à secagem dos exemplares de cada amostra numa estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$, até estas atingirem peso constante (48 h), após o que se passou à determinação da biomassa (peso seco, expresso em $g m^{-2}$) (Pereira, 1996b). Obtido o peso seco de cada uma das dez amostras, efectuou-se um sorteio a fim de se encontrarem três combinações diferentes da média acumulada de biomassa. A partir da análise do gráfico da Figura 2.2, chegou-se à conclusão de que o número mínimo de quadrados a usar na amostragem desta população deveria ser oito.

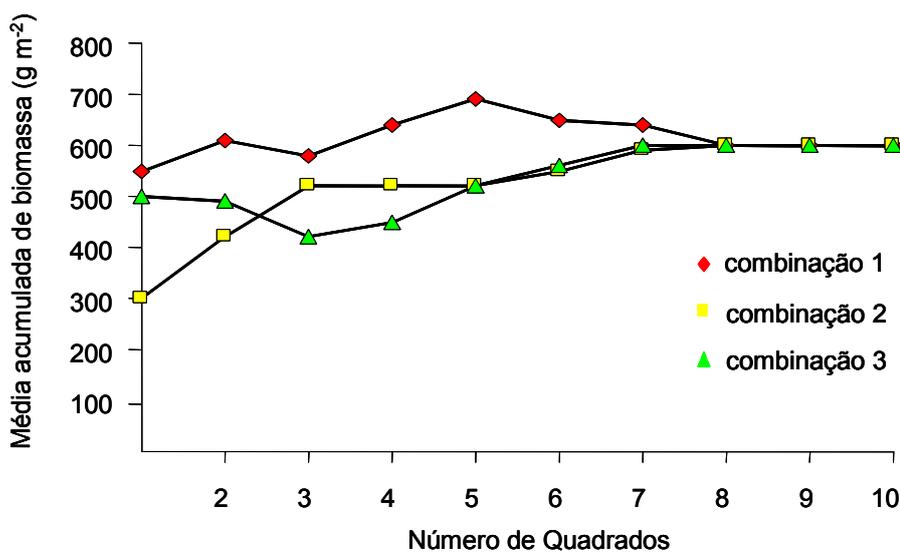


Figura 2.2 – Determinação do número mínimo de quadrados a usar na amostragem de *C. teedei* var. *lusitanicus*

2.3.1.b – Método dos quadrados: amostragem de biomassa das carragenófitas mais significativas.

Para a amostragem de biomassa das carragenófitas com maior expressão (maior cobertura) usou-se a mesma metodologia descrita na alínea 2.3.1.a. O quadrado seleccionado foi o de 10x10 cm (0,01 m²) e o número mínimo de quadrados a usar em cada amostragem foi de quatro. Esta amostragem foi feita em dois períodos distintos: no Outono (Outubro de 2000) e no Verão (Agosto de 2001).

2.3.1.c – Cálculo da cobertura (%) das carragenófitas no Outono/Inverno e na Primavera/Verão

Para o cálculo da percentagem de cobertura de cada carragenófitas foi usado o método de “amostragem em contínuo sobre um transecto” (Cosson e Thouin, 1981; Lobban e Harrison, 1994; Chopin, 1997; Pereira *et al.*, 2001).

Ao longo do perfil estabelecido (ver alínea 2.2.2) foram realizados, de forma contínua, um elevado número de amostragens não destrutivas (levantamentos elementares) recorrendo para tal a um quadrado de 100x100 cm (1 m²) (Figura 2.3 - E). O quadrado foi colocado sucessivamente, ao longo do perfil, em intervalos regulares de cerca de 2 m, em três faixas paralelas (sobre a linha do transecto, do seu lado esquerdo e do seu lado direito), de forma a abranger as zonas mais abrigadas (viradas a Norte), as zonas mais expostas (viradas a Sul) e as zonas de exposição intermédia, incluindo as bacias arenosas. Em cada quadrado foi avaliada a cobertura percentual de cada carragenófitas, com recurso à escala de Braun-Blanquet (Goldsmith e Harrison, 1976). A cobertura média global (%) de cada carragenófitas foi calculada a partir da média da cobertura de cada levantamento elementar. Este método permite determinar a cobertura relativa de cada uma das carragenófitas estudadas, de uma forma mais precisa do que o método da “área mínima” (Cosson e Thouin, 1981; Pereira *et al.*, 2000). Estas amostragens foram feitas nos mesmos períodos referidos na alínea 2.3.1.b.

2.3.2 – Variação sazonal do comprimento, percentagem de cada geração (estrutura da população) e do conteúdo em ficocolóides

Para a determinação da variação sazonal do comprimento, da percentagem de cada geração e do conteúdo em ficocolóides, foram colhidos aleatoriamente, mensalmente, 100 frondes de cada carragenófitas, com dimensões superiores a 3 cm (Zinoun e Cosson, 1996). No laboratório as algas foram separadas, quando possível, em três lotes, com auxílio de uma lupa binocular: gametófitos femininos (talos possuidores de cistocarpos), tetrasporófitos (talos possuidores de tetrasporocistos) e talos não frutificados (sem estruturas reprodutoras visíveis, mas incluindo gametófitos masculinos – a verificação da geração foi feita com auxílio da análise espectroscópica). No caso das espécies com ciclo biológico trigenéticos heteromórficos (*Mastocarpus stellatus* e *Ahnfeltiopsis devoniensis*), com a geração tetrasporófitas incrustante, só foram colhidos os talos correspondentes à geração gametófitas. No caso do *Gymnogongrus crenulatus*, os talos colhidos correspondem à geração gametófitas com tetrasporoblastos parasitas (ver descrição desta espécie na secção 1.3.5.a). As algas foram em seguida medidas com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, lavadas em água destilada, pesadas (peso fresco) e posteriormente secas numa estufa a 60 °C para a determinação do peso seco (ver alínea 2.3.1.a). Após extracção e secagem dos ficocolóides (ver secção 2.7) calculou-se o conteúdo em carragenanas (percentagem do peso seco).

2.3.3 – Análise estatística

Os dados referentes ao estudo ecológico (comprimento, biomassa, percentagem de cada geração, peso seco e conteúdo em carragenana), das diferentes algas carragenófitas, foram submetidos a tratamento estatístico (Zar, 1996). Os resultados do estudo ecológico foram apresentados sob a forma de **média ± erro padrão** (com **n** = número de amostras usadas no estudo). Os dados referentes às variações sazonais e geográficas do peso seco, conteúdo em carragenana, comprimento e biomassa foram comparados com recurso à análise de correlação pelo **coeficiente de Pearson (r)**. Para a análise das significâncias das médias das variáveis, usou-se a análise de variância **ANOVA** unifactorial; para a análise das significâncias dos coeficientes de correlação calculados, usou-se o **Teste t de Student**. Só as significâncias com **p <0.05** foram apresentadas. Relativamente aos níveis de significância, foram considerados três valores de p: significativo, **p <0.05**; muito significativo, **p <0.01**; altamente significativo, **p <0.001**.

2.4 – Transporte e preparação do material algal para herborização e cultura laboratorial.

Exemplares de carragenófitas seleccionadas foram cuidadosamente colhidos inteiros (com o auxílio de uma faca) e transportados húmidos, dentro de sacos, no interior de uma mala térmica.

As carragenófitas provenientes do meio natural encontram-se muito epifitadas; para além de uma grande quantidade de algas (macro e microalgas) epífitas, estas algas são o refúgio de inúmeros pequenos animais.

Para que as algas possam ser herborizadas ou cultivadas no laboratório é necessário libertar toda a fauna e flora a elas aderidas. Este trabalho deve, quando possível, ser iniciado no próprio local de colheita. Para tal deve usar-se uma escova ou então um pincel rijo, de forma a libertar as macroalgas das epífitas de maiores dimensões.

No laboratório realiza-se uma segunda lavagem, com o auxílio de pincéis, em água do mar filtrada. Este trabalho exige muito tempo até que as algas fiquem, o mais possível, livres de contaminantes (Figura 2.5 - A).

Antes de se colocarem as algas em cultura de adaptação e/ou manutenção, é necessário realizar uma terceira sessão de limpeza, sendo então tratadas, durante cinco minutos, por ultra-sons, na presença de diatomito. O diatomito (pó resultante das frústulas siliciosas de diatomáceas fósseis) é um material abrasivo que, ao ser colocado em movimento pela vibração, remove os microorganismos presentes na superfície do talo (Givernaud-Mouradi, 1992).

Finalmente as algas são lavadas diversas vezes em água do mar filtrada e colocadas nos recipientes para cultura de manutenção.

2.5 – Cultura laboratorial

Todas as culturas foram realizadas em sistemas termostatzados (câmara de cultura), nas seguintes condições:

- a) Temperatura do ar com variações que nunca ultrapassam os dois graus (16 ± 2 °C).

b) Luz fornecida através de lâmpadas fluorescentes “day light”, com intensidade luminosa média de $300 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a intensidade luminosa foi medida com o auxílio de um fotómetro “EEL Lightmaster Photometer”).

c) Arejamento obtido através de um compressor de 200 l, nas culturas de manutenção e de um compressor Takatsuki 20GJL, nas culturas feitas em cilindros de “plexiglass”).

2.5.1 – Cultura laboratorial de adaptação/manutenção

As algas provenientes de Buarcos foram mantidas em laboratório, durante um período mínimo de 21 dias, para posterior estudo (ultraestrutura e análise dos ficocolóides) ou para cultura em cilindros de “plexiglass”, em condições controladas de temperatura ($16 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), fotoperíodo (16: 8 h), intensidade luminosa ($300 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fluxo de ar (160 l h^{-1}), em água do mar filtrada e enriquecida com solução de Provasoli - *PES* (Provasoli, 1968) à razão de 10 ml l^{-1} (Braga, 1990). Este período de adaptação permite obter material algal com características físico-químicas idênticas.

Os recipientes usados na cultura de manutenção foram de dois tipos:

a) Balões de vidro (“florencia flasks”) de 2 e 3 litros (Figura 2.4 - B).

b) Aquário rectangular de 200 l (Figura 2.4 - C) provido de um sistema de filtragem de água “Fluvial 303” (permite tratar até 840 l h^{-1} de água, através de filtros de areia de coral e carvão activado) e de esterilização através de radiação ultravioleta (Figura 2.4 - D).

O meio de cultura foi renovado (água do mar enriquecida com solução *PES*) cada 3 dias, excepto nos recipientes possuidores de sistema de filtragem de água. No aquário adicionou-se quinzenalmente nova solução *PES* (10 ml l^{-1}), para enriquecimento do meio.

Para uma boa manutenção das algas, os sistemas foram providos de bombas de ar comprimido, necessárias à agitação do meio e fornecimento de dióxido de carbono (CO_2), essencial à fotossíntese.

2.5.2 – Cultura em cilindros de “plexiglass”

A cultura para obtenção optimizada de biomassa foi feita em cilindros de “plexiglass” de 30 l de capacidade (Figura 2.4 - E). Este sistema de cultura está provido de uma bomba de filtragem “Fluvial 303” (com filtro de areia de coral e carbono activo), sistema de esterilização por UV e fornecimento de ar comprimido (1000 l h^{-1}). O fornecimento de ar comprimido e a filtragem eram controlados por um temporizador, em que alternavam a filtragem e a agitação do meio de cultura. O fornecimento de ar comprimido era efectuado no período luminoso, enquanto a filtragem e esterilização do meio de cultura era feita durante o período escuro.

Visto tratar-se de um sistema sem renovação periódica do meio de cultura, a água do mar filtrada foi enriquecida, de 5 em 5 dias, com solução de nutrientes de *PES* (10 ml l^{-1}). A eliminação das diatomáceas presentes no meio de cultura foi feita pela adição de 1.5 mg l^{-1} de dióxido de germânio (Lewin, 1966); para o combate às cianófitas (cianobactérias) usou-se kanamycina ($1 \mu\text{g l}^{-1}$).

A cultura unialgal, quer para avaliação da produção de biomassa e carragenanas, quer para estudos ultraestruturais, em *Mastocarpus stellatus* e *Gigartina pistillata*, iniciou-se com material previamente cultivado em aquário de adaptação (ver alínea 2.1).

A densidade inicial da cultura não deve ultrapassar as 2 g de alga por cada litro de meio de cultura. Para a determinação do peso fresco, as algas foram periodicamente retiradas do cilindro de cultura, enxugadas em papel de filtro e pesadas numa balança analítica Kern 510. A velocidade de crescimento (incremento de biomassa) foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$V: 100/(t_1-t_0) \times \text{Log} (P_{t_1}/P_{t_0})$$

V: velocidade de crescimento em % por dia

(t_1-t_0): intervalo de tempo entre duas pesagens (em dias)

P_{t_1} e P_{t_0} : peso das algas no instante t_1 e t_0



Figura 2.4 – Colheita e cultura laboratorial de carragenófitas: colheita das algas inteiras com auxílio de uma faca (A); cultura em balões de vidro (B); equipamento de esterilização por UV (C); cultura de manutenção em aquário (D); cilindro de “plexiglass” para produção de biomassa (E).

2.6 - Herborização de exemplares para inclusão na “Nova Coleção de Macroalgas do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra”

As carragenófitas estudadas foram colhidas em diversos locais da costa portuguesa (ver alínea 2.2.1) e posteriormente organizadas em colecção de herbário e em água do mar formolizada (formalina a 4 %). O procedimento utilizado para a herborização dos exemplares seguiu, em termos gerais, a metodologia descrita por Barros Neves e Mesquita Rodrigues (Neves e Rodrigues, 1957). As algas foram então colocadas sobre papel de “Bristol” e secas numa estufa a 60 °C, sobre compressão numa prensa e protegidas com pano-cru e papel de jornal. As diferentes espécies foram identificadas sempre a partir de exemplares frescos e colhidos inteiros.

2.7 – Preparação de amostras de alga seca moída para FTIR-ATR e FT-Raman

As amostras de cada carragenófitas foram lavadas em água destilada de forma a eliminar o sal e os outros contaminantes da superfície dos talos (Figura 2.5 – A). Estas algas, depois de separadas em 3 grupos (gametófitos femininos, talos não frutificados e tetrasporófitos), com o auxílio de uma lupa binocular, são secas numa estufa a 60 °C até atingirem peso constante. As algas secas são depois moídas num moinho de café, de forma a tornar a amostra uniforme. Para a análise, por FTIR-ATR, as amostras de alga moída não necessitam de nenhum tratamento adicional, podendo ser analisadas directamente (Pereira *et al.*, 2003; Pereira e Mesquita, 2004).

A análise por FT-Raman implica que as amostras se encontrem despigmentadas. A despigmentação pode ser feita por secagem ao sol (processo usado pelos colectores/produtores de carragenófitas comerciais) ou por tratamento laboratorial (Figura 2.5 – B), durante 30 a 60 s, com uma solução de hipoclorito de cálcio a 4 %.

2.8 – Extracção dos ficocolóides

2.8.1 – Extracção industrial das carragenanas

No processamento da carragenana refinada (extracção industrial), o ficocolóide é extraído em condições alcalinas. Nestas condições formam-se pontes de 3,6-anidro, condição necessária à obtenção de carragenana kappa e iota de boa qualidade (carragenanas gelificantes). A extracção é feita durante várias horas a uma temperatura próxima do ponto de ebulição da solução alcalina (≥ 110 °C). Neste processo são usadas diferentes soluções alcalinas de forma a obter o tipo de sal de carragenana pretendido.

O extracto das algas é depois filtrado várias vezes: assim um filtro cruzado remove a celulose e um filtro de malha fina é usado para obter uma solução transparente. A solução diluída é depois concentrada, no vácuo, em evaporadores até se obter uma concentração final na ordem dos 3 %. A carragenana é precipitada pela adição de isopropanol. O material fibroso gelificado resultante é comprimido de forma a remover-se o excesso de solvente. A mistura de álcool e água é, em seguida, destilada e o álcool reaproveitado, de forma a reduzir os custos do processo. Na extracção da carragenana kappa é possível usar um protocolo de precipitação alternativo chamado “tecnologia de compressão de gel”. Este protocolo de extracção baseia-se no facto desta carragenana gelificar na presença de iões de potássio. A solução de carragenana é

extrudida numa solução concentrada de KCl, na qual o ficocolóide precipita. O material gelificado, após compressão, é submetido a um ciclo de congelamento/descongelamento para remoção da água (Bixler, 1996).

A massa fibrosa daqui resultante é então seca e finalmente moída. Para se obter um produto com uma qualidade constante são misturadas diversas carragenanas, às quais se juntam sais e açúcares (McHugh, 2003).

No fabrico da carragenana semi-refinada, as algas são tratadas com uma solução de hidróxido de potássio e submetidas a elevadas temperaturas (70 a 80 °C). Esta temperatura é suficiente para catalizar a formação de pontes de 3,6-anidro em ambas carragenanas (kappa e iota), não sendo, no entanto, suficiente para promover a sua extracção. O material de baixo peso molecular é removido, quase na sua totalidade, pelo tratamento alcalino. Estas algas modificadas são depois cortadas e branqueadas, de forma a eliminar a pigmentação. Após a lavagem, o material é seco e moído. Antes da mistura dos diversos lotes e da sua standardização, o material algal é por vezes esterilizado para melhorar a qualidade microbiológica do produto final (Bixler, 1996; McHugh, 2003).

2.8.2 – Extracção laboratorial das carragenanas nativas

Antes da extracção dos ficocolóides (tanto na extracção total como alcalina), o material algal seco é re-hidratado e, em seguida, tratado com uma mistura de metanol 100 % e acetona 100 % (Figura 2.5 – C), para eliminar a fracção organo-solúvel (Zinoun e Cosson, 1996).

Para a extracção dos ficocolóides nativos (sem transformação alcalina dos precursores das carragenanas), as amostras moídas re-hidratadas foram colocadas num copo de vidro juntamente com água destilada (50 ml g⁻¹), pH 7, em banho-maria a 80 °C (Figura 2.5 – E), durante 3 a 4 h (Pereira e Mesquita, 2004).

A solução foi depois filtrada a quente, sob sucção, através de pano e de fibra de vidro. O extracto obtido em solução foi, em seguida, evaporado no vácuo até um terço do volume inicial (Figura 2.5 – F). Após a adição do dobro do volume em etanol (96 %) a carragenana precipita, formando um coágulo esbranquiçado (Figura 2.5 – G). Finalmente este coágulo foi seco numa estufa a 60 °C, por um período de 48 h (Pereira *et al.*, 2003). A pesagem, para cálculo da percentagem de carragenana, foi feita numa balança analítica Kern 510.

2.8.3 – Extracção laboratorial alcalina (método semelhante ao usado na extracção industrial)

Para a extracção alcalina, as amostras moídas de alga foram colocadas numa solução (150 ml g⁻¹) de NaOH (1 M), em banho-maria a 85 °C, durante 3 horas (Pereira *et al.*, 2003). A solução de carragenanas foi depois neutralizada (pH 6-8) com HCl (0.3 M).

A precipitação e secagem das carragenanas foram feitas seguindo o procedimento descrito na alínea 2.8.2.

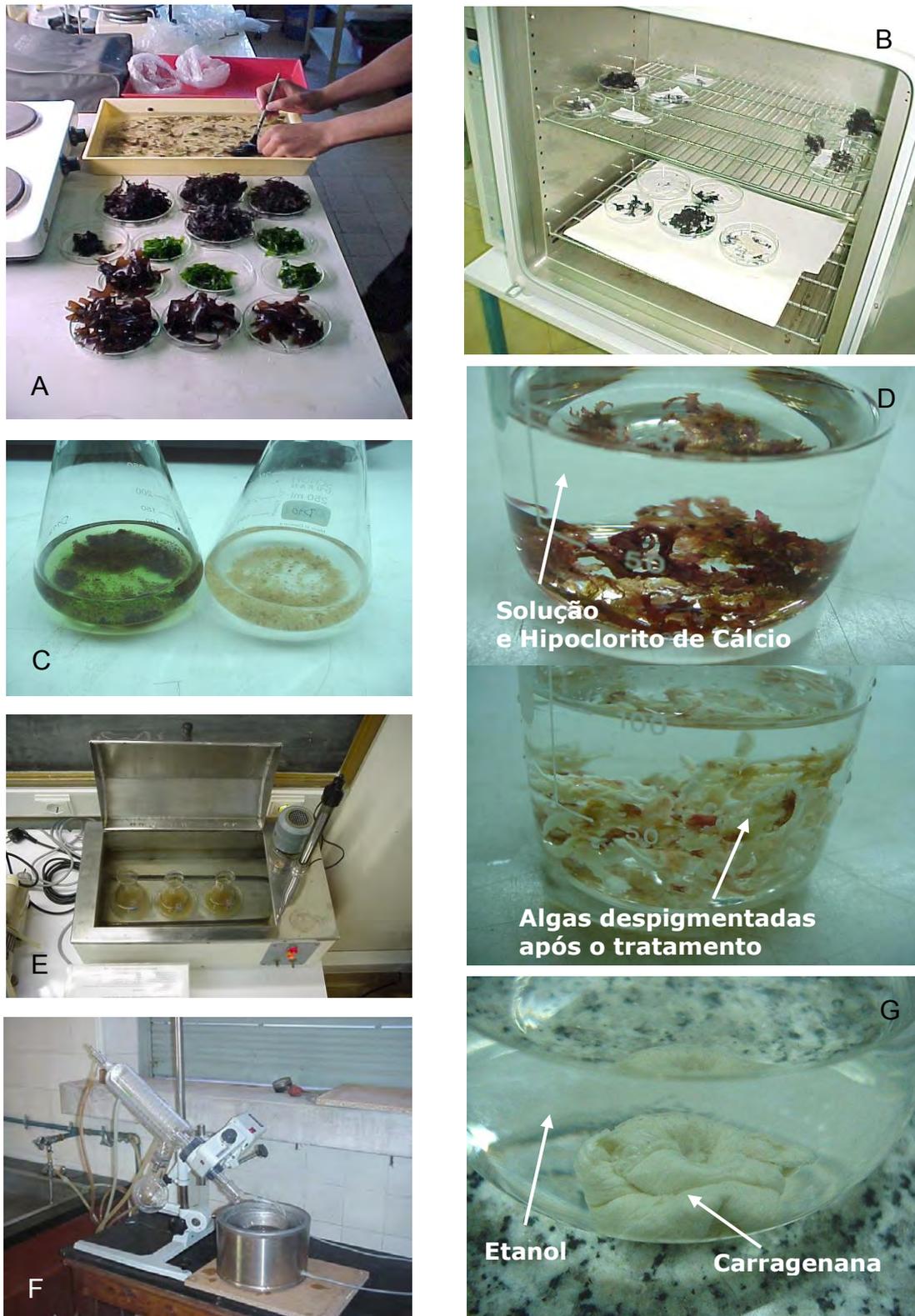


Figura 2.5 – Preparação das amostras para análise espectroscópica e extracção das carragenanas: lavagem das amostras (A); secagem numa estufa a 60 °C (B); remoção da componente organosolúvel (C); despigmentação das amostras para FT-Raman (D); extracção dos ficocolóides em banho-maria (E); evaporação da solução de carragenana (F); carragenana sob a forma de coágulo esbranquiçado (G).

2.9 – Análise das carragenanas por espectroscopia vibracional

Para estabelecer os picos chave, em espectroscopia de infravermelho e de laser Raman, usados na identificação das 9 frações principais de carragenana, foram analisadas as carragenanas comerciais e carragenanas extraídas de carragenófitas usadas na indústria: carragenana kappa (Sigma, type III, C-1263); carragenana lambda (Sigma, type IV, C-3889); carragenana lambda pura (WCFS, CH091); carragenana iota (Sigma, Type V, C-4014); carragenana mu e nu (extraídas do género *Chondracanthus*); carragenana beta e gamma (extraídas de *Betaphycus gelatinum*); carragenana theta e ksi (extraídas do género *Chondrachantus*).

2.9.1 – FTIR-ATR

Os espectros FTIR foram obtidos num espectrómetro IFS 55, usando um sistema “Golden Gate single reflection diamond ATR”, sem necessidade de preparação prévia da amostra. Os espectros são o resultado da média de duas contagens, com 128 “scans” cada e uma resolução de 2 cm^{-1} (Pereira *et al.*, 2003; Pereira e Mesquita, 2004).

2.9.2 – FT-Raman

Os espectros de Raman foram obtidos num espectrómetro Bruker RFS-1000, usando um laser nd-YAG com excitação ao comprimento de onda de 1064 nm. Cada espectro resultou de duas medições repetidas de 150 “scans” cada e uma resolução de 2 cm^{-1} (Pereira *et al.*, 2003).

2.10 – Análise das carragenanas por espectroscopia de RMN

Visto que as carragenanas naturais são misturas de diferentes polissacarídeos, a sua composição difere de amostra para amostra. Sendo assim, a análise qualitativa e quantitativa das diferentes amostras de carragenanas reveste-se de grande importância para a completa caracterização dos ficolóides extraídos mas também para assegurar, na indústria alimentar, a qualidade dos ingredientes. Desde o trabalho pioneiro de Usov e colaboradores (Yarotsky *et al.*, 1977; Usov, 1984), a espectroscopia de RMN tem vindo a ser progressivamente usada como técnica preferencial na determinação e quantificação da composição de amostras laboratoriais e industriais de carragenana.

2.10.1 - Revisão dos valores relativos aos deslocamentos químicos em RMN de acordo com as recomendações da IUPAC

Na análise das carragenanas foram usados como standard internos diversos compostos – DSS, DMSO, MeOH, acetona e o sal de sódio ácido (TSP) – como alternativa ao DSS (Harris *et al.*, 2001). Os espectros foram obtidos a três temperaturas diferentes (24, 45 e 65 °C) em D₂O contendo 20 mM de fosfato, posteriormente ajustado a diferentes valores de pH (5.5, 7.2, 9.7 e 11.8). Os deslocamentos químicos dos diferentes standards internos encontram-se listados na Tabela 2.3. De acordo com as recomendações da IUPAC, o DSS deve ser marcado na escala dos espectros de RMN como o valor de deslocamento 0 ppm, a qualquer temperatura e valor de pH (Harris *et al.*, 2001).

2.10.2 – Tratamento das carragenanas para RMN

Para reduzir a viscosidade das amostras para RMN, as carragenanas foram previamente sonicadas de acordo com o seguinte procedimento (van de Velde *et al.*, 2004):

- Dissolução (5 mg ml⁻¹) em tampão fosfato (20 mM Na₂HPO₄) a 80 °C, durante 30 minutos, seguida de arrefecimento à temperatura ambiente.
- Sonicação de 30 min. (3x) em gelo (sonicador XL 2020, 12 mm tip, potência 475 W, frequência 20 kHz).
- Centrifugação, a temperatura elevada, para remover o material insolúvel.
- Diálise, das soluções sonicadas, em tampão fosfato (20 mM Na₂HPO₄; 2 l; 3x), em água (2 l; 1x).
- Liofilização das amostras.

2.10.3 – ¹H-RMN

Os espectros de ¹H-RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker AMX600, operando a 500.13 MHz e a uma temperatura de 65 °C. As carragenanas a analisar foram preparadas do seguinte modo (van de Velde *et al.*, 2002a; van de Velde *et al.*, 2004):

- Dissolução (5 mg ml⁻¹) em D₂O contendo um sal standard (ver tabela 2.3), 20 mM de Na₂HPO₄, 80 °C.
- Sonicação de 1 hora (3x) num banho sonicador (Branson 2510).
- Análise por ¹H-RMN, 64 “scans”, atraso de interpulso de 5 s.

Para determinar os deslocamentos químicos (δ) das principais carragenanas (e alguns substituintes e contaminantes) foram adicionados sais standard internos (ver tabela 2.3). A atribuição dos deslocamentos químicos aos respectivos protões anoméricos foi feita com base nos dados sumariados por van de Velde *et al.* (2004).

Tabela 2.3 – Deslocamentos químicos, para cada um dos compostos standard internos, em espectroscopia de RNM (em sistemas aquosos).

Abreviatura do composto	Deslocamentos químicos (ppm) ^a		Nome químico do composto
	¹³ C	¹ H	
DSS	0.000	0.000	Sal de sódio 2,2-dimetil-2-silapentano-3,3,4,4,5,5- <i>d</i> ₆ -5-sulfonato
TSP	-0.18	-0.017	Sal de sódio ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3- <i>d</i> ₄
MeOH	51.43	3.337	metanol
DMSO	41.53 ^b	2.696	dimetilsulfóxido
Acetona ^c	32.69	2.208	acetona

- Determinado em D₂O contendo NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ (20 mM fosfato; pH 7.2) a 65 °C. Os deslocamentos químicos constantes foram medidos entre os 24 e os 65 °C e entre pH 5.5 e pH 11.8, com exceção do DMSO que possui uma ligeira dependência em relação à temperatura e a acetona que não pode ser aplicada a pH elevados.
- Detectou-se uma ligeira dependência à temperatura, havendo alterações do deslocamento químico de 41.29 ppm a 24 °C para 41.53 ppm a 65 °C.
- Só válido para pH 5.5 e 7.2

2.10.4 – ^{13}C -RMN

Os espectros de ^{13}C -RMN das carragenanas kappa e iota (e respectivos híbridos) foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 500 (operando a 125.69 MHz), ou num espectrómetro Bruker AMX600 (operando a 125.76 MHz). As carragenanas a analisar foram preparadas do seguinte modo (Pereira *et al.*, 2003; van de Velde *et al.*, 2004):

- a) Dissolução (15/20 mg ml⁻¹) em D₂O contendo um sal standard (ver tabela 2.3), 20 mM de Na₂HPO₄, 65 – 80 °C.
- b) Sonicação de 1 h (3x) num banho sonicador (Branson 2510).
- c) Análise por ^{13}C -RMN, 10.000 acumulações, pulso de 15 µs, tempo de aquisição de 3 s e relaxamento de 5 s.

Os deslocamentos químicos (ppm) foram medidos em relação a diversos sais internos de referência (ver tabela 2.3). A atribuição dos deslocamentos químicos aos respectivos carbonos foi feita com base nos dados sumariados por van de Velde *et al.* (2002a, 2004) e Pereira *et al.* (2003).

2.11 – Determinação do peso molecular por SEC-MALLS

A cromatografia de exclusão pelo tamanho (SEC, “Size Exclusion Chromatography”) foi executada em colunas Phenomenex em série com a coluna TSK guard Phenomenex, usando o gel TSK 6000PW e o TSK 3000PW, com um fluxo constante de 1 ml min⁻¹ (van de Velde *et al.*, *in press*). A detecção foi feita, simultaneamente, com um detector de índice refractivo (RI, “Refractive Index”, ERC-7510 RI), com um detector de rotação óptica (OR-1590 detector chiral da Jasco) e um detector laser multi-ângulo (MALLS, Dawn DSP-F da Wyatt). As colunas foram aquecidas num sistema “waters chromatography”. A operar juntamente com as colunas foi usada uma bomba HPLC programável (LC-10AT da Shimadzu) com uma unidade “degassing” (X-Act da Jour Research). Para a injeção das amostras foi usado um auto-injector (Dilutor 401 da Gilson) acoplado a um banho-maria (F3 da Haake).

2.12 – Análise da composição catiónica por ICP-AES

A composição catiónica das carragenanas em estado bruto (resultantes da extracção alcalina industrial e/ou laboratorial) e das amostras purificadas foi determinada por intermédio da análise ICP-AES. Para purificar as amostras, estas foram dialisadas numa solução de NaCl, de forma a obter carragenanas na forma de sódio. Devido à metodologia usada na extracção das carragenanas das algas portuguesas (micro-extracção - ver alínea 2.8.2 e 2.8.3), a quantidade final das carragenanas obtidas não permitiu a sua purificação final por diálise em NaCl.

As carragenanas (25 mg) foram incineradas e subsequentemente dissolvidas em ácido sulfúrico (1 ml). Após a diluição em água bi-destilada (9 ml), as amostras foram analisadas com um aparelho “ICP-AES simultane axial CCD” da Varian. A calibração foi feita com uma solução multi-elemento contendo Ca, K, Ma, Na e S (van de Velde *et al.*, *in press*).

2.13 – Estudos citológicos

Para estudos histológicos e citológicos de carragenófitas seleccionadas, utilizaram-se exemplares colhidos na baía de Buarcos, previamente sujeitos ao tratamento de limpeza e processo de transporte descrito em 2.4.

2.13.1 – Microscopia óptica (MO)

As observações do material em MO foram efectuadas em lâminas preparadas das duas maneiras seguintes:

- a) Obtenção de cortes (50 μm), de material fresco (selvagem) e/ou cultivado, num micrótomo de avanço mecânico (Richert).
 - Fixação/coloração e montagem em lactofenol azul ou lactofenol incolor (Braga, 1985)
- b) Obtenção de cortes semi-finos (1 μm) a partir dos blocos de resina (Spurr ou LRW), num ultra-micrótomo Ultratome III (LKB) equipado com facas de vidro.
 - Colheita e colagem dos cortes em lâminas de vidro albuminizadas (estufa 60 °C, 24 h).
 - Coloração com azul de toluidina (0.05 % em tampão acetato 0.1 M, pH 4.4).
 - As preparações foram, em seguida, tornadas definitivas (montagem em euparal ou bálsamo do Canadá).

Todas as observações e registos fotográficos em microscopia óptica foram realizados num aparelho Nikon Optiphot, equipado com máquina fotográfica Nikon FX-35WA.

2.13.2 – Microscopia Electrónica (ME)

Para estudos morfológicos, a nível ultraestrutural, as amostras dos talos (porções vegetativas e/reprodutoras) foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo:

- a) Fixação numa mistura de glutaraldeído (2.5 %) e paraformaldeído (2 %) (“Karnovsky”), em tampão fosfato (“Sorensen’s”) 0.1 M, pH 6.8, durante uma noite no frigorífico (0 – 4 °C).
- b) Pós-fixação em tetróxido de ósmio (1 %), no mesmo tampão e nas mesmas condições, durante 2 horas.
- c) Desidratação em álcool etílico (concentrações crescentes) à temperatura ambiente.
- d) Impregnação e inclusão em resina, de acordo com Spurr (1969). Como alternativa, nomeadamente em estudos citoquímicos, foi também executada a inclusão na resina LRW, tendo-se então o cuidado de evitar o contacto com o ar durante a polimerização (cápsulas cheias providas de tampa, numa estufa a 60 °C, durante 24 h).
- e) Obtenção de cortes ultrafinos num ultramicrótomo Ultratome Nova (LKB), executados com faca de diamante.
- f) Colheita e montagem em grelhas de cobre (200, 300 ou 400 “mesh”).
- g) Contrastação com acetato de uranilo e/ou citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Nota: o material para análise em EDX (ver alínea 2.13.3.b) não foi submetido a esta contrastação.

h) As observações ultraestruturais foram feitas no microscópio electrónico de transmissão Jeol-Jem 100SX.

2.13.3 – Citoquímica

Para o esclarecimento da natureza química e organização estrutural de componentes celulares, nomeadamente, mas não exclusivamente, da parede, foram utilizados métodos diversificados (com base química e física), tanto para microscopia óptica como electrónica.

2.13.3.a – Microscopia óptica

a) Coloração com azul de toluidina (0.05 % em tampão acetato 0.1 M, pH 4.4), para a identificação e localização de polissacarídeos sulfatados (segundo Gretz *et al.* 1997).

b) Coloração com branco de calcoflúor (Fluorescent Brightener 28 da Sigma). O material algal (cortes com 50 μm) foi emerso numa solução a 0.04 % de branco de calcoflúor em água destilada, durante 3 minutos e em seguida montados, em lâmina de vidro, em água destilada; o branco de calcoflúor é um biocorante não letal (Edwards, 1999), selectivo do β -Glicano (Gretz *et al.*, 1997) e emite fluorescência (400-40 nm) quando excitado por luz UV, com pico de excitação a 345-365 nm (Microscópio de fluorescência Nikon Diaphot, provido de filtro UV 2A).

c) Observação ao microscópio óptico de polarização. Visto que a celulose, presente nas paredes celulares, se encontra organizada numa estrutura cristalina (Gretz *et al.*, 1997) apresentando, conseqüentemente, birrefringência, os cortes foram observados num microscópio de polarização (Nikon Optiphot, provido de filtros de polarização cruzados).

d) Reacção PAS (ácido periódico e reagente de Schiff) (MacManus, 1948), para a detecção dos polissacarídeos (amido florídeo).

e) Coloração com Negro de Sudão B, para a detecção de lípidos (Bronner, 1975).

2.13.3.b – Microscopia electrónica

a) Teste de Thiéry (Thiéry, 1967), para a identificação e localização do amido florídeo.

b) Microanálise EDX. Espécimes de *G. pistillata* foram preparados, para micro-análise por energia dispersiva de raios-X (EDX), a partir dos mesmos blocos usados nos estudos ultraestruturais (ver alínea 2.13.2). Uma das principais vantagens da análise EDX reside na possibilidade de correlacionar a composição elementar (neste caso, a presença de enxofre) com a respectiva estrutura citológica observada ao microscópio electrónico (Russ, 1974; Mccandless *et al.*, 1977). A espessura recomendada para a análise EDX varia de 150 a 250 nm (Russ e Panessa, 1972). As secções feitas nos blocos (ver alínea 2.13.2) foram colocadas sobre grelhas de cobre, de 400 buracos, providas de membrana “Formvar” e, posteriormente, cobertas por uma fina camada de carbono (Vacuum Coating Unit, modelo E12E2 da Edwards), com vista a aumentar a resistência do material a analisar (Mccandless *et al.*, 1977). A análise EDX (“Energy-Dispersive X-Ray Analysis”) foi executada num microscópio electrónico Hitachi H900 associado a um espectrómetro de raios-X e respectivo detector. As amostras (zona cortical do talo de *G. pistillata* GF) foram analisadas pelo espectrómetro

com tempos de aquisição que variaram de 60 a 90 s; os resultados foram apresentados sob a forma % (percentagem atómica, relativamente ao total de elementos detectados pelo espectrómetro de raios-X).

3 – RESULTADOS

3 – Resultados

3.1 – Caracterização das estações de colheita e da flora algal associada

3.1.1 – Baleal (Peniche)

A norte de Peniche, na rica região do Oeste de Portugal, situa-se uma pequena ilha separada do Continente por uma praia de fina areia branca: o Baleal. O Baleal herdou esta denominação da função que estes rochedos desempenharam no passado com efeito, esta pequena ilha era o local de corte e talhe das baleias que, na sua rota migratória dos mares do Norte, eram alvo da cobiça dos pescadores da vila da Atouguia da Baleia.

As colheitas e observações foram feitas no patamar médiolitoral, nos horizontes inferior, médio e superior. O substrato desta estação é do tipo misto, com extensos areais e zonas rochosas (rocha calcária). A inclinação dos locais de colheita varia do muito inclinado ao pouco inclinado, quase plano. Por sua vez, a exposição às marés varia do muito exposto ao exposto. A flora algal presente na data e local da amostragem era constituída pelas seguintes espécies (excepto carragenófitas estudadas): Rhodophyceae – *Asparagopsis armata* (e respectivo tetrasporófito, *Falkenbergia rofulanosa*); *Bornetia secundiflora*; *Caulacanthus ustulatus*; *Ceramium diaphanum*; *Corallina officinalis*; *Dumontia contorta*; *Gelidium corneum*; *Griffithsia corallinoides*; *Halurus equisetifolius*; *Jania rubens*; *Nitophyllum punctatum*; *Osmundea pinnatifida*; *Plocamium cartilagineum*; *Sphaerococcus coronopifolius*; Phaeophyceae – *Colpomenia peregrina*; *Dictyota dichotoma*; *Fucus spiralis*; *Padina pavonica*; *Punctaria* sp.; *Saccorhiza polyschides*; *Stypocaulon scoparium*; *Taonia atomaria*; Chlorophyceae – *Codium setchellii*; *Codium tomentosum*; *Ulva rigida*.

3.1.2 – S. Martinho do Porto

S. Martinho do Porto é uma vila do concelho de Alcobaça, situada em frente a uma baía que comunica com o mar por uma “boca” relativamente estreita. Do porto desta vila saem todos os anos, pela altura do Verão, inúmeros barcos na faina do *Gelidium* (faina dos “limos”). O local de colheita seleccionado encontra-se a Norte da baía, numa zona muito escarpada. O substrato rochoso, muito exposto à ondulação, situa-se no patamar médiolitoral. A Flora presente nesta zona, na data e local de amostragem, era constituída pelas seguintes espécies: Rhodophyceae – *Asparagopsis armata*; *Chondria dasyphylla*; *Corallina elongata*; *Gelidium corneum*; *Gelidium pusillum*; *Lithophyllum* sp.; *Lomentaria articulata*; *Osmundea pinnatifida*; *Plocamium cartilagineum*; *Porphyra umbilicalis*; Phaeophyceae – *Bifurcaria bifurcata*; *Cladostephus spongiosus*; *Cystoseira tamariscifolia*; *Fucus spiralis*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum vulgare*; *Stypocaulon scoparium*; Chlorophyceae – *Codium tomentosum*; *Ulva lactuca*; *Ulva rigida*.

3.1.3 – S. Pedro de Moel

S. Pedro de Moel é lugar e praia da freguesia de N. Sra. do Rosário, concelho de Marinha Grande. É uma das praias pitorescas da costa portuguesa, com excelente situação, numa aberta do Pinhal de Leiria, um pouco ao sul da foz da ribeira de Moel. A

praia pequena, limitada a norte por rochas abruptas e a sul por uma pequena ribeira facilmente vadeável, não tem boas condições para a prática de desportos náuticos, pois o mar é geralmente agitado e aparenta as mais alterosas ondas da costa portuguesa. O local de amostragem situa-se no patamar médiolitoral, horizonte inferior. O substrato é de natureza mista, com rochas de grande porte e algumas bacias arenosas. A inclinação varia do quase plano ao escarpado, apresentando-se este local extremamente exposto à força das ondas.

A flora observada, aquando da amostragem, era composta pelas seguintes espécies: Rhodophyceae – *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Porphyra* sp.; Chlorophyceae – *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*.

3.1.4 – Baía de Buarcos

O local de colheita na Baía de Buarcos, em frente ao restaurante “Costa”, fica situado a 40° 16’ Norte, 8° 90’ Oeste, a Norte da foz do rio Mondego (Figueira da Foz) e a Sul do Cabo Mondego. As colheitas e observações foram feitas no patamar médiolitoral, horizonte inferior, de substrato predominantemente rochoso mas com algumas bacias arenosas, pouco inclinado e exposto à ondulação. Para mais pormenores sobre a topografia do local ver alínea 3.2.1. A flora algal presente na data e local da amostragem era constituída pelas seguintes espécies (excepto carragenófitas estudadas): Rhodophyceae – *Apoglossum ruscifolium*; *Bornetia secundiflora*; *Calliblepharis ciliata*; *Callithamnion granulatum*; *Callithamnion tetragonum*; *Callithamnion tetricum*; *Ceramium diaphanum*; *Ceramium rubrum*; *Chondria coerulescens*; *Chondria dasyphylla*; *Compsothamnion thuyoides*; *Corallina officinalis*; *Cryptopleura ramosa*; *Gastroclonium ovatum*; *Gelidium pusillum*; *Gelidium spinosum*; *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Grateloupia doryphora*; *Grateloupia filicina*; *Gymnogongrus griffithsiae*; *Halurus equisetifolius*; *Hypoglossum hypoglossoides*; *Jania rubens*; *Osmundea obtusa*; *Lithophyllum incrustans*; *Lomentaria articulata*; *Lomentaria clavellosa*; *Osmundea hybrida*; *Osmundea pinnatifida*; *Pleonosporium borneri*; *Plocamium cartilagineum*; *Polysiphonia elongata*; *Polysiphonia nigra*; *Polysiphonia nigrescens*; *Porphyra linearis*; *Porphyra umbilicalis*; *Pterocladia capillacea*; *Pterosiphonia complanata*; *Pterosiphonia pennata*; *Pterothamnion plumula*; Phaeophyceae – *Scinaia furcellata*; *Bifurcaria bifurcata*; *Cladostephus spongiosus*; *Cystoseira baccata*; *Cystoseira tamariscifolia*; *Desmarestia ligulata*; *Dictyopteris polypodioides*; *Dictyota dichotoma*; *Laminaria ochroleuca*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; *Stypocaulon scoparium*; *Taonia atomaria*; Chlorophyceae – *Bryopsis plumosa*; *Cladostephus spongiosus*; *Codium decorticatum*; *Codium tomentosum*; *Ulva clathrata*; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*.

3.1.5 – Aguda

A praia da Aguda é conhecida pela sua pesca artesanal, baseada em métodos transmitidos de geração em geração. Nesta praia, na Freguesia de Arcozelo, a Câmara Municipal de Vila Nova de Gaia realizou um projecto para o Norte do país, a Estação Litoral da Aguda “ELA” (www.fundacao-ela.pt/index.shtml). O local de colheita, situado em frete da Estação Litoral possui um substrato rochoso, de inclinação pouco acentuada e muito exposto à ondulação.

A flora algal presente na data de amostragem era constituída pelas seguintes espécies: Rhodophyceae – *Ahnfeltia plicata*; *Chondria coerulescens*; *Corallina elongata*; *Corallina officinalis*; *Cryptopleura ramosa*; *Gastroclonium reflexum*;

Gelidium pusillum; *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Grateloupia doryphora*; *Halurus equisetifolius*; *Lithophyllum incrustans*; *Lomentaria articulata*; *Osmundea obtusa*; *Osmundea pinnatifida*; *Porphyra leucosticta*; *Porphyra linearis*; *Porphyra umbilicalis*; *Pterosiphonia complanata*; *Scinaia furcellata*; *Solieria chordalis*; Phaeophyceae – *Bifurcaria bifurcata*; *Cystoseira baccata*; *Dictyopteris polypodioides*; *Dictyota dichotoma*; *Laminaria ochroleuca*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; *Stypocaulon scoparium*; Chlorophyceae – *Codium tomentosum*; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*; *Ulva rigida*.

3.1.6 - Miramar

Na praia de Miramar fica situado o santuário do Senhor da Pedra, que desafia há séculos a fúria das ondas (ver Figura 2.1). O local de colheita, junto ao referido santuário, encontra-se sobre substrato rochoso, pouco inclinado e muito exposto à ondulação.

Nesta estação foi feita a amostragem de carragenófitas mas não foi feito registo da flora algal associada.

3.1.7 – Lavadores (Salgueiros)

A praia de Salgueiros assim como a de Valadares (ver alínea 3.1.8) são frequentemente usadas para a prática de surf e onde, em diversos anos consecutivos, houve campeonatos Europeus e Mundiais de Surf. A praia é constituída por um areal extenso com um paredão que faz acalmar as águas e permite aos veraneantes tomar tanto banhos de mar como de sol. Em frente ao areal é possível observar uma zona rochosa, constituída por rochas soltas de dimensões variáveis e, também, alguns afloramentos rochosos significativos. Este local apresenta-se protegido da ondulação e é praticamente plano.

A flora algal presente na data e local da amostragem era constituída pelas seguintes espécies: Rhodophyceae – *Ahnfeltia plicata*; *Apoglossum ruscifolium*; *Callithamnion tetragonum*; *Chondria coerulescens*; *Chondria dasyphylla*; *Corallina officinalis*; *Cryptopleura ramosa*; *Dumontia contorta*; *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Grateloupia doryphora*; *Hypoglossum hypoglossoides*; *Jania rubens*; *Lithophyllum incrustans*; *Lomentaria articulata*; *Osmundea pinnatifida*; *Porphyra linearis*; *Porphyra umbilicalis*; *Pterosiphonia complanata*; Phaeophyceae – *Desmarestia ligulata*; *Dictyota dichotoma*; *Fucus spiralis*; *Laminaria hyperborea*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; Chlorophyceae – *Codium* sp.; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*.

3.1.8 – Valadares

Praia extremamente rochosa, Valadares estende-se até próximo da Foz do Rio Douro. O local de colheita, na zona de rochas graníticas de dimensões significativas, encontra-se muito exposto à fúria do mar.

Nesta estação foi feita a amostragem de carragenófitas mas não foi feito registo da flora algal associada.

3.1.9 – A-Ver-o-Mar

A-Ver-o-Mar fica a 2,5 km do centro da Póvoa do Varzim, sendo actualmente um prolongamento da cidade, devido ao alargamento urbanístico desta para a zona norte. As suas principais actividades económicas são a agricultura, pesca e a apanha do sargaço (ver Figura 3.1 - H). As colheitas e observações foram feitas no patamar médiolitoral, com um substrato predominantemente rochoso, pouco inclinado e muito exposto à ondulação. A flora algal presente na data e local da amostragem era constituída pelas seguintes espécies (excepto carragenófitas estudadas): Rhodophyceae – *Ahnfeltia plicata*; *Asparagopsis armata*; *Callophyllis laciniata*; *Ceramium* sp.; *Chondria coerulescens*; *Corallina officinalis*; *Dilsea carnosa*; *Gastroclonium ovatum*; *Gelidium corneum*; *Gelidium pusillum*; *Gelidium spinosum*; *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Grateloupia doryphora*; *Osmundea pinnatifida*; *Plocamium cartilagineum*; *Porphyra umbilicalis*; Phaeophyceae – *Bifurcaria bifurcata*; *Cladostephus spongiosus*; *Cystoseira baccata*; *Cystoseira tamariscifolia*; *Dictyopteris polypodioides*; *Dictyota dichotoma*; *Laminaria ochroleuca*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; *Stypocaulon scoparium*; *Taonia atomaria*; Chlorophyceae – *Cladophora laetevirens*; *Codium decortatum*; *Codium* sp.; *Ulva clathrata*; *Ulva lactuca*; *Ulva rigida*.

3.1.10 – Aguçadoura

Aguçadoura é a mais nova freguesia do concelho e fica situada na faixa litoral, a 6 Km da Póvoa de Varzim. As principais actividades económicas são a agricultura, horticultura, pesca e apanha do sargaço. Próspera e densamente povoada desde a segunda metade do séc. XIX, deve este sucesso à transformação das dunas que nada produziam em campos produtivos e verdejantes, que se conhecem como campos masseira (<http://atelier.hannover2000.mct.pt/~pr281/patrim.htm>). Com o sargaço, que recolhem nas próprias praias, adubam os terrenos, onde se produzem grandes colheitas de diversas espécies hortícolas. A zona de colheita encontra-se no patamar médiolitoral e é constituída por um substrato rochoso, pouco inclinado e exposto.

A flora observada na data da amostragem das carragenófitas era constituída pelas seguintes espécies: Rhodophyceae – *Ahnfeltia plicata*; *Callophyllis laciniata*; *Chondria coerulescens*; *Corallina officinalis*; *Dilsea carnosa*; *Gastroclonium ovatum*; *Gelidium corneum*; *Gelidium pusillum*; *Gelidium spinosum*; *Gracilaria foliifera*; *Gracilaria gracilis*; *Osmundea pinnatifida*; *Plocamium cartilagineum*; Phaeophyceae – *Bifurcaria bifurcata*; *Cladostephus spongiosus*; *Cystoseira baccata*; *Dictyopteris polypodioides*; *Dictyota dichotoma*; *Laminaria ochroleuca*; *Sargassum muticum*; *Stypocaulo scoparium*; Chlorophyceae – *Cladophora laetevirens*; *Ulva clathrata*; *Ulva lactuca*.

3.1.11 – Apúlia

Apúlia pertence ao concelho de Esposende. As colheitas e observações foram feitas no patamar médiolitoral e tipo de substrato desta estação é do tipo rochoso, pouco inclinado e muito exposto.

A flora algal presente na data e local da amostragem era constituída pelas seguintes espécies (excepto carragenófitas estudadas): Rhodophyceae – *Ahnfeltia plicata*; *Ceramium rubrum*; *Corallina officinalis*; *Dilsea carnososa*; *Gelidium corneum*; *Gracilaria gracilis*; *Grateloupia filicina*; *Nitophyllum punctatum*; *Porphyra linearis*; *Porphyra umbilicalis*; Phaeophyceae – *Bifurcaria bifurcata*; *Fucus ceranoides*; *Fucus spiralis*; *Laminaria ochroleuca*; *Sargassum muticum*; Chlorophyceae – *Codium* sp.; *Ulva clathrata*; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*.

3.1.12 – Praia do Norte (V. do Castelo)

A praia do Norte (localizada a norte da foz do rio Lima), juntamente com a do Cabedelo (localizado a sul da foz do mesmo rio) (Figura 3.1 – A), constituem os locais mais procurados pelos habitantes de Viana do Castelo, durante o período do Verão. A existência de uma piscina de água do mar, que enche na maré-alta, é um dos principais atractivos desta praia, que possui um areal pequeno e uma extensa área rochosa rica em flora algal (Figura 3.1 – G).

O local de colheita, situado no patamar médiolitoral, é de natureza rochosa, pouco inclinado, quase plano e exposto à ondulação. A flora observada, aquando da amostragem, foi a seguinte: Rhodophyceae – *Porphyra umbilicalis*; *Porphyra linearis*; *Osmundea pinnatifida*; *Corallina officinalis*; *Lithophyllum incrustans*; *Plocamium cartilagineum*; *Cryptopleura ramosa*; *Jania rubens*; *Scinaia furcellata*; *Grateloupia doryphora*; *Chondria coerulescens*; *Palmaria palmata* Phaeophyceae – *Ascophyllum nodosum*; *Desmarestia ligulata*; *Dictyota dichotoma*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; *Fucus* sp.; *Pelvetia caniculata*; *Taonia atomaria*; Chlorophyceae – *Codium* sp.; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*.

3.1.13 – Afife

Afife é uma freguesia localizada à beira mar, a cerca de dez quilómetros a norte da sede de concelho, Viana do Castelo. Na zona costeira existe a praia de Afife, resguardada e dividida por fortes penedias que formam restingas que as abrigam dos ventos fortes do Norte. Um dos produtos recolhidos na costa e de que se auferiam bons rendimentos eram as algas, "a apanha do sargaço" que era um uso disciplinado colectivamente através de um protocolo rigoroso para defesa de todos. O trabalho era feito pelas mulheres, que transportavam o sargaço para as dunas a fim de o secarem; depois de secas, as algas eram colocadas em grandes montes ("palheiros") para vender aos lavradores (<http://www.freguesiasdeportugal.com/distritoviana/09/afife/historia.htm>).

O local de colheita, situado no patamar médiolitoral, é de natureza rochosa, pouco inclinado e exposto à ondulação (Figura 3.1 – F). A flora observada, aquando da amostragem, foi a seguinte: Rhodophyceae – *Porphyra umbilicalis*; *Porphyra linearis*; *Osmundea pinnatifida*; *Corallina officinalis*; *Lithophyllum incrustans*; *Plocamium cartilagineum*; *Cryptopleura ramosa*; *Jania rubens*; *Scinaia furcellata*; *Grateloupia doryphora*; *Chondria coerulescens*; Phaeophyceae – *Desmarestia ligulata*; *Dictyota dichotoma*; *Saccorhiza polyschides*; *Sargassum muticum*; *Fucus* sp.; *Taonia atomaria*;

Chlorophyceae – *Codium* sp.; *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva lactuca*; *Ulva rigida*.

3.1.14 – Vila Praia de Âncora

Antiga, como o provam os constantes achados pré-históricos e proto-históricos, Âncora deve o seu nome ao rio que nasce no sítio das Bezerreiras na Serra d'Arga. Praia cosmopolita e centro piscatório de algum interesse comercial e industrial, situa-se a 9 Km da fronteira espanhola, por Caminha, 30 de Valença e 13 de Viana do Castelo (<http://arquivo.rtam.pt/concelhos/ancora.html>). O local de colheita situa-se na zona habitualmente frequentada pelos apanhadores de “musgo”, designação corrente dada à mistura de *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus*, colhida para exportação (Figura 3.1 - E). O substrato, predominantemente rochoso e muito acidentado, possui pouca inclinação e encontra-se exposto à ondulação marinha.

A flora observada aquando da amostragem das carragenófitas foi a seguinte: Rhodophyceae – *Corallina officinalis*; *Cryptopleura ramosa*; *Dumontia contorta*; *Osmundea pinnatifida*; *Palmaria palmata*; *Plocamium cartilagineum*; Phaeophyceae – *Saccorhiza polyschides*; *Laminaria saccharina*; *Fucus spiralis*; Chlorophyceae – *Codium* sp.; *Ulva lactuca*; *Ulva rigida*.

3.1.15 – Moledo

De Moledo diz-se que é o local “onde o Inverno vai passar o Verão”: manhãs de nevoeiro, dias ventosos, temperaturas pouco convidativas e forte ondulação. O local de colheita, situado no patamar médiolitoral, é de natureza rochosa, pouco inclinado e exposto à ondulação (Figura 3.1 – D). A flora observada aquando da amostragem das carragenófitas foi a seguinte: Rhodophyceae – *Corallina officinalis*; *Cryptopleura ramosa*; *Dumontia contorta*; *Osmundea pinnatifida*; *Palmaria palmata*; *Plocamium cartilagineum*; Phaeophyceae – *Saccorhiza polyschides*; *Laminaria ochroleuca*; *Laminaria saccharina*; *Fucus spiralis*; *Cystoseira* sp.; *Pelvetia caniculata*; *Ascophyllum nodosum*; *Bifurcaria bifurcata*; *Sargassum muticum*; Chlorophyceae – *Ulva compressa*; *Ulva intestinalis*; *Ulva rigida*.

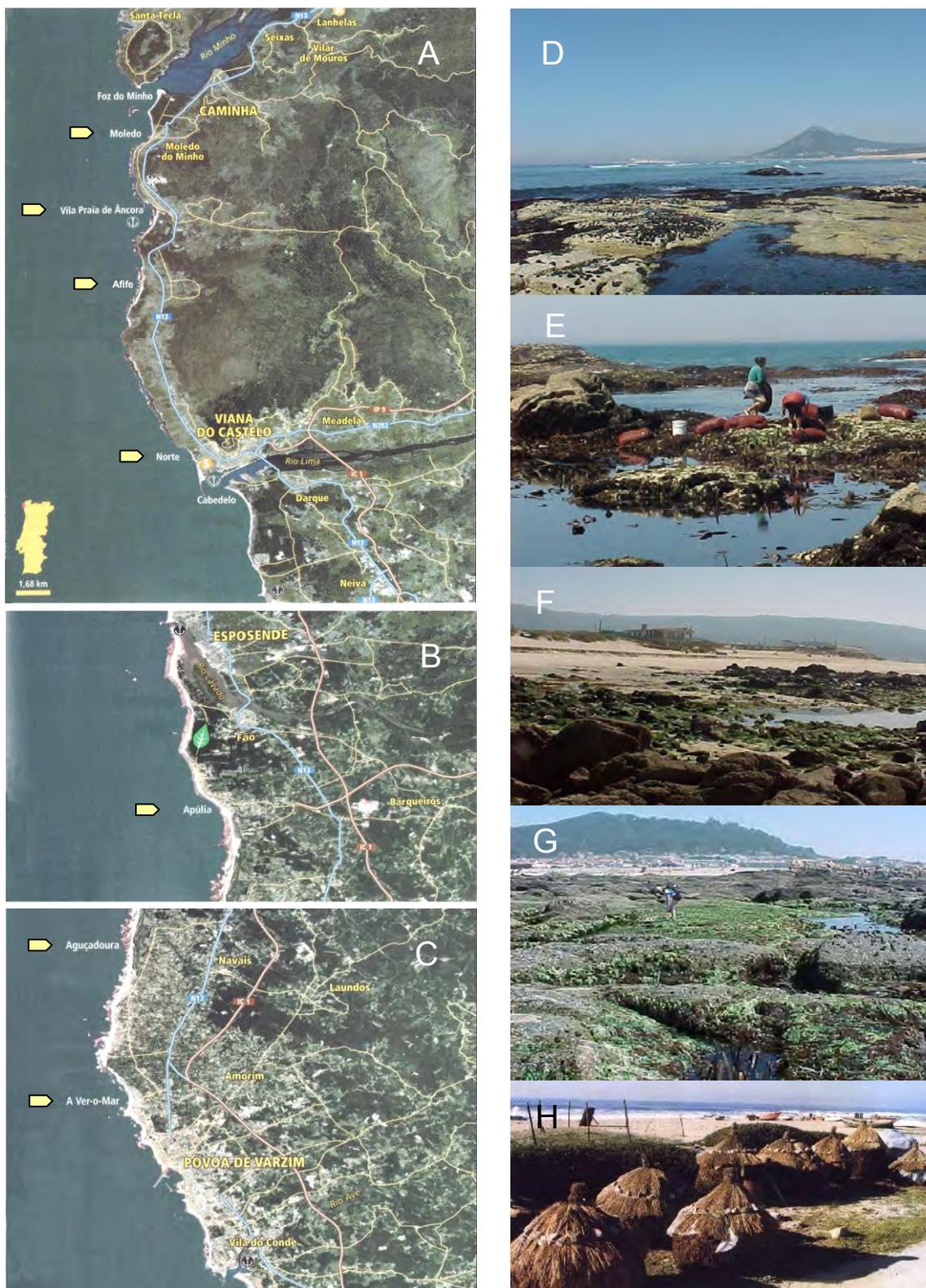


Figura 3.1 – Estações de colheita localizadas entre a foz do rio Minho e a foz do rio Ave:
 A – imagem satélite da zona entre Viana do Castelo a Caminha; B – imagem satélite da zona de Esposende; C – imagem satélite da zona de Póvoa de Varzim; D – Moledo; E – apanha de “musgo” em Vila Praia de Âncora; F – Afife; G – Praia do Norte; H – “medas” em A-Ver-o-Mar.

3.2 – Estudo ecológico das carragenófitas da Baía de Buarcos

3.2.1 – Perfil topográfico do local de estudo

O perfil topográfico do local de estudo encontra-se esquematizado na figura 3.2. Pela análise da referida figura conclui-se que o substrato rochoso, local de implantação das carragenófitas estudadas, apresenta um declive pouco acentuado.

O referido perfil foi decomposto em dois patamares: o patamar supralitoral e o patamar médiolitoral. O patamar médiolitoral foi depois subdividido em 3 horizontes, em função dos níveis das marés.

Devido à pouca inclinação do substrato rochoso, o local de amostragem das carragenófitas encontra-se situado num único horizonte: horizonte inferior do patamar médiolitoral (Figura 3.2).

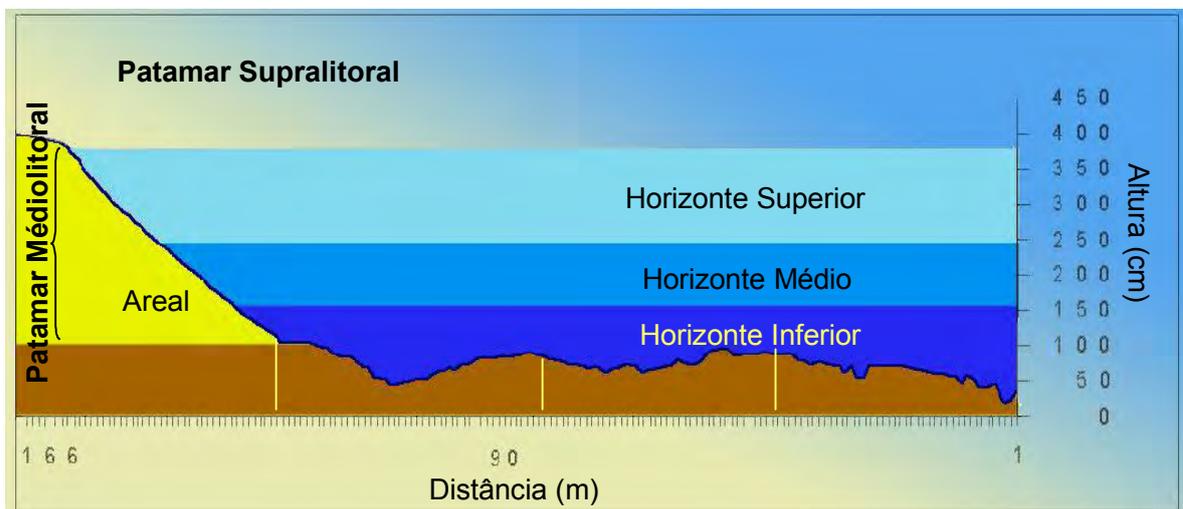


Figura 3.2 – Perfil topográfico do local de estudo: o substrato rochoso, onde foram efectuadas as amostragens, situa-se no horizonte inferior do patamar médiolitoral.

3.2.2 – Dados físico-químicos

A temperatura do ar e da água, salinidade e pH, no local de amostragem, foram medidos de Junho de 2001 a Agosto de 2001 (Figura 3.3 – A, B). A temperatura da água variou de 11.9 °C (Janeiro de 2001) a 22 °C (Junho de 2001). A temperatura do ar oscilou entre os 10.2 ° (Janeiro de 2001) e os 23 °C (Agosto de 2000 e Junho de 2001). A salinidade variou entre 26 S‰ (Janeiro de 2001) e 34 S‰ (Junho, Julho e Setembro de 2000). O pH máximo foi de 8.5 (Junho de 2000) e o mínimo de 7.6 (Agosto 2000).

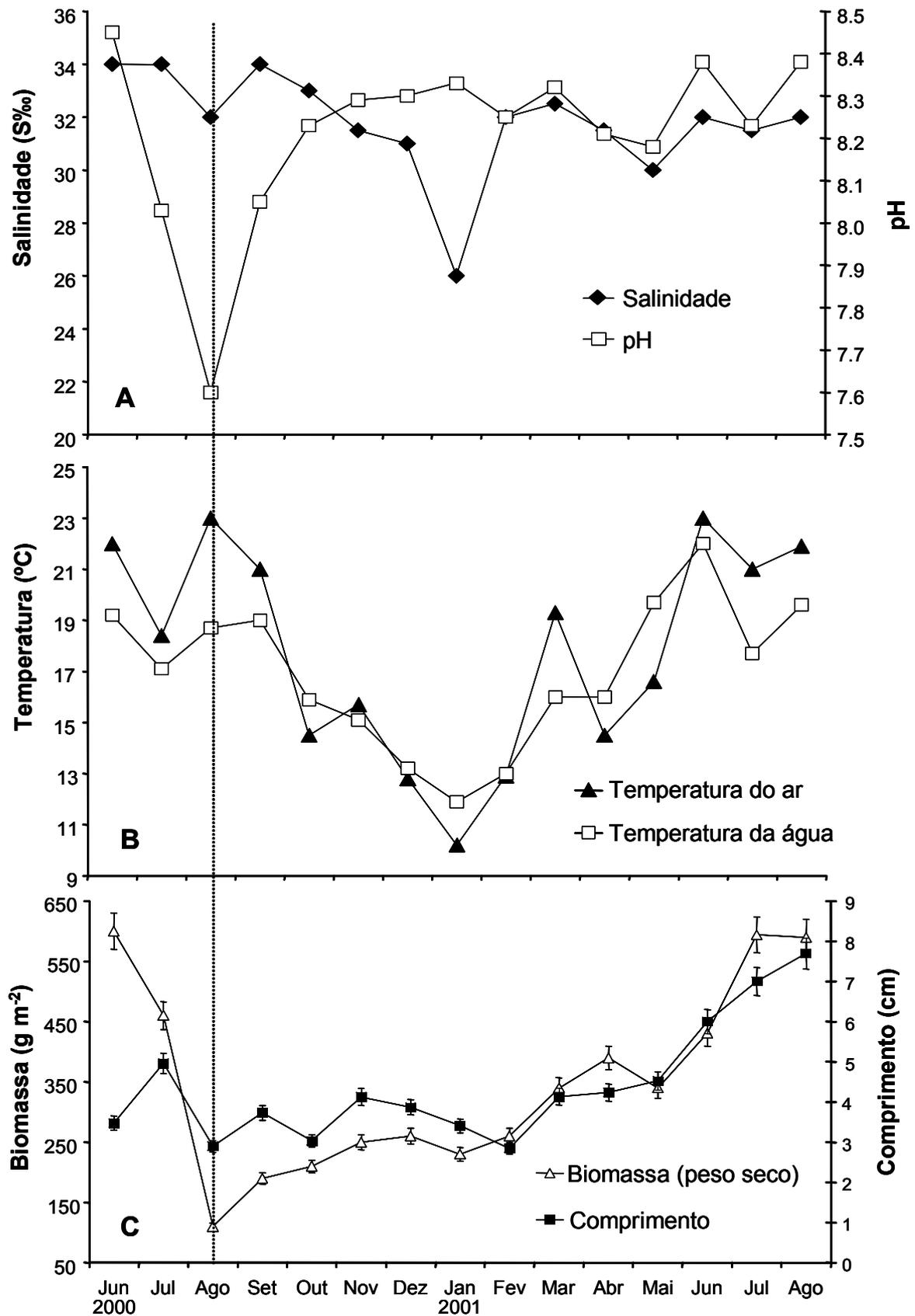


Figura 3.3 – Temperatura do ar e da água (A), salinidade e pH da água (B) na Baía de Buarcos. Variação do comprimento (média \pm erro padrão, $n = 100$) e biomassa (média \pm erro padrão, $n = 8$) de *C. teedei* var. *lusitanicus* (C).

3.2.3 – Estudo de uma população de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*

3.2.3.a – Variação sazonal do comprimento e da biomassa

As medições do comprimento (Figura 3.3 – C) foram feitas de Junho de 2000 a Agosto de 2001. O máximo comprimento médio foi de 7.7 ± 0.4 cm ($n = 100$) em Agosto de 2001 e o mínimo de 2.9 ± 0.2 cm ($n = 100$) em Fevereiro de 2001.

Os dados referentes à biomassa média (expressos em peso seco por unidade área) encontram-se representados na figura 3.3 – C. Estes valores variaram entre os 110 ± 1.9 g m⁻² ($n = 8$) de Agosto de 2000 e os 594 ± 10.5 g m⁻² ($n = 8$) de Junho de 2000.

A biomassa e o comprimento apresentaram baixos valores no Outono e no Inverno; um pequeno incremento ocorreu no início da Primavera (Abril de 2001) e os valores mais elevados destes parâmetros foram registados no início do Verão (Junho/Julho 2001).

A variação anual do comprimento (Figura 3.3 – C) está correlacionada ($r = 0.7421$) com a variação anual da biomassa ($p < 0.01$).

3.2.3.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.4. Os talos não-frutificados foram dominantes em todas as amostras, tendo a sua percentagem variado de 43 % (Setembro de 2001) a 82.5 % (Julho de 2001). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras, variando a sua percentagem de 3 % (Novembro de 2000) a 29 % (Setembro de 2001). Os tetrasporófitos também estiveram presentes em todas as amostras, com uma percentagem máxima de 32.5 % em Outubro de 2001 e mínima de 4 % em Julho 2001.

Comparando os talos frutificados, nomeadamente com os talos possuidores de cistocarpos (gametófitos femininos) (média = 9.6 ± 1.7 %, $n = 17$), os tetrasporófitos (talos com tetrasporocistos) são, geralmente, mais abundantes (média = 21 ± 1.7 %, $n = 17$). A percentagem média de talos não-frutificados foi de 69.4 ± 2.2 % ($n = 17$).

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

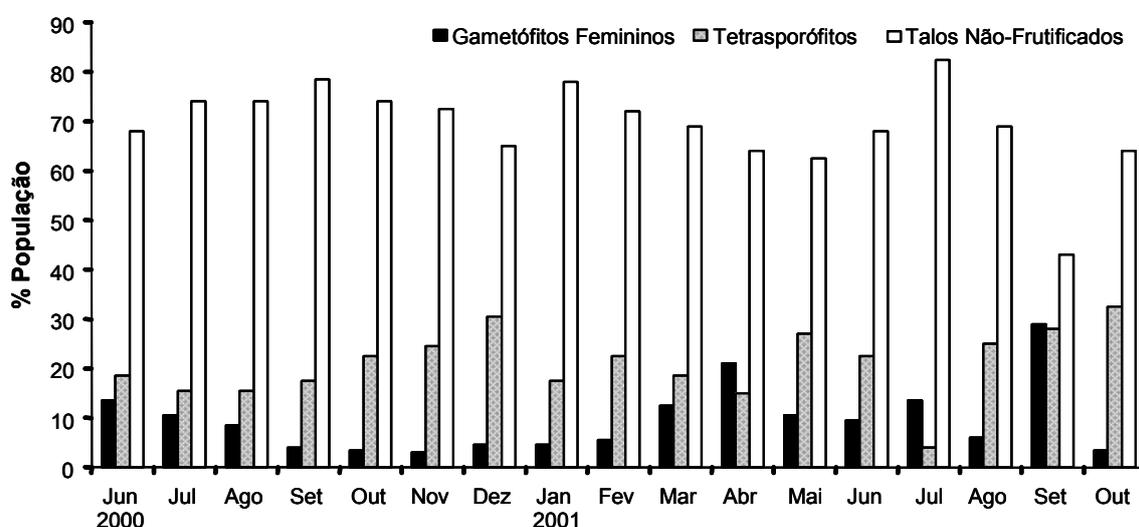


Figura 3.4 – Estrutura de uma população de *C. teedei* var. *lusitanicus* da Baía de Buarcos.

3.2.3.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.5 – A e B, respectivamente. O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos tetraspóricos, com 58 % do peso seco, em Julho de 2001. Uma amostra de talos não-frutificados de Fevereiro de 2000 apresentou o conteúdo mínimo, com 23 % do peso seco.

O peso seco (Figura 3.5 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 12.1 ± 1.5 % ($n = 3$) em Novembro de 2001 e 17.5 ± 0.8 % ($n = 3$) em Dezembro de 2000; a sua média anual foi de 14.2 ± 0.5 % ($n = 15$). Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco, de cada geração, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (26.4 ± 2.5 %, $n = 3$) em Dezembro de 2001 e o valor máximo (43.6 ± 12.5 %, $n = 3$) em Julho de 2001. Os dados respeitantes à variação sazonal do conteúdo em carragenana, de cada geração, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.05$).

A média anual do conteúdo em carragenana foi de 34.9 ± 1.0 % ($n = 15$), com uma média de 37.9 ± 1.5 % ($n = 15$) nos gametófitos femininos, 35.4 ± 2.1 % ($n = 15$) nos tetrasporófitos e 31.4 ± 1.1 % ($n = 15$) nos talos não-frutificados.

A variação anual do conteúdo em carragenana (Figura 3.5 – C) está negativamente correlacionada ($r = -0.5589$) com a variação anual do peso seco ($p < 0.05$). A percentagem de carragenana foi baixa no Outono e Inverno; um pequeno incremento ocorreu no início da Primavera (Abril de 2001); a maior percentagem de carragenana foi registada nas amostras recolhidas no Verão (Julho de 2001).

3.2.4 – Estudo de uma população de *Chondrus crispus*

3.2.4.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.6) foram feitas de Dezembro de 2000 a Dezembro de 2001. O máximo comprimento médio foi de 13.8 ± 1.2 cm ($n = 100$) em Agosto de 2001 e o mínimo de 8.2 ± 0.5 cm ($n = 100$) em Dezembro de 2000. Os dados respeitantes à variação sazonal comprimento, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.4.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.7. Os talos não-frutificados foram dominantes em grande parte das amostras, tendo a sua percentagem variado de 15,4 % (Julho de 2001) a 66.7 % (Dezembro de 2000). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras, variando a sua percentagem de 12.5 % (Março de 2001) a 44.5 % (Abril de 2001). Os tetrasporófitos também estiveram presentes em todas as amostras, com uma percentagem máxima de 50 % em Março de 2001 e mínima de 11.1 % em Junho 2001.

Comparando com os gametófitos femininos (talos possuidores de cistocarpos) (média = 29.4 ± 2.9 %, $n = 14$), os tetrasporófitos (talos com tetrasporocistos) são, geralmente, menos abundantes (média = 24.5 ± 3.4 %, $n = 14$).

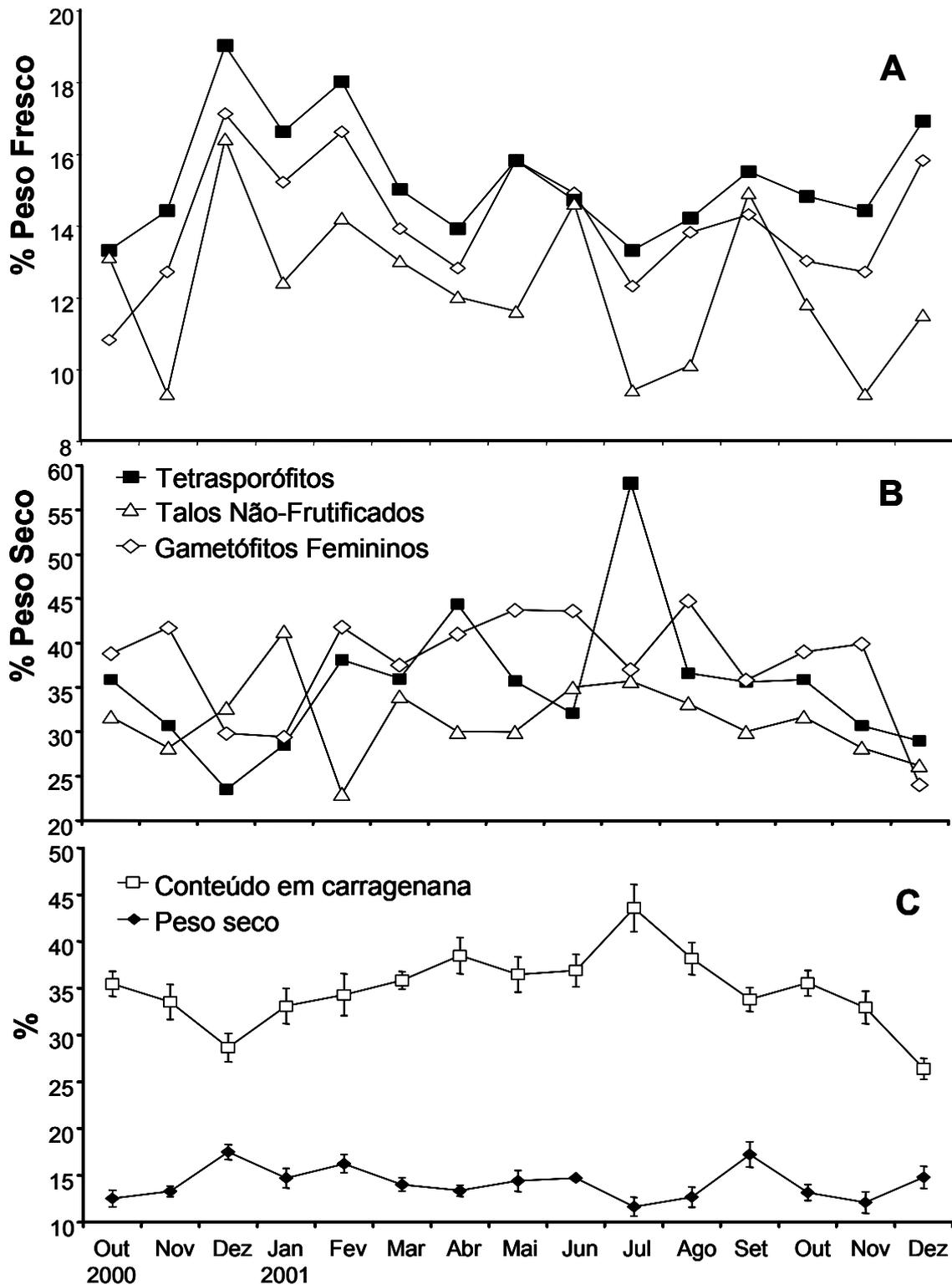


Figura 3.5 – Variação mensal do conteúdo em carragenana (B) e variação mensal do peso seco (A) nas diferentes gerações de *C. teedei* var. *lusitanicus*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, $n = 3$) de *C. teedei* var. *lusitanicus* (C).

A percentagem média de talos não-frutificados foi de $46.1 \pm 3.9 \%$ ($n = 14$). Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

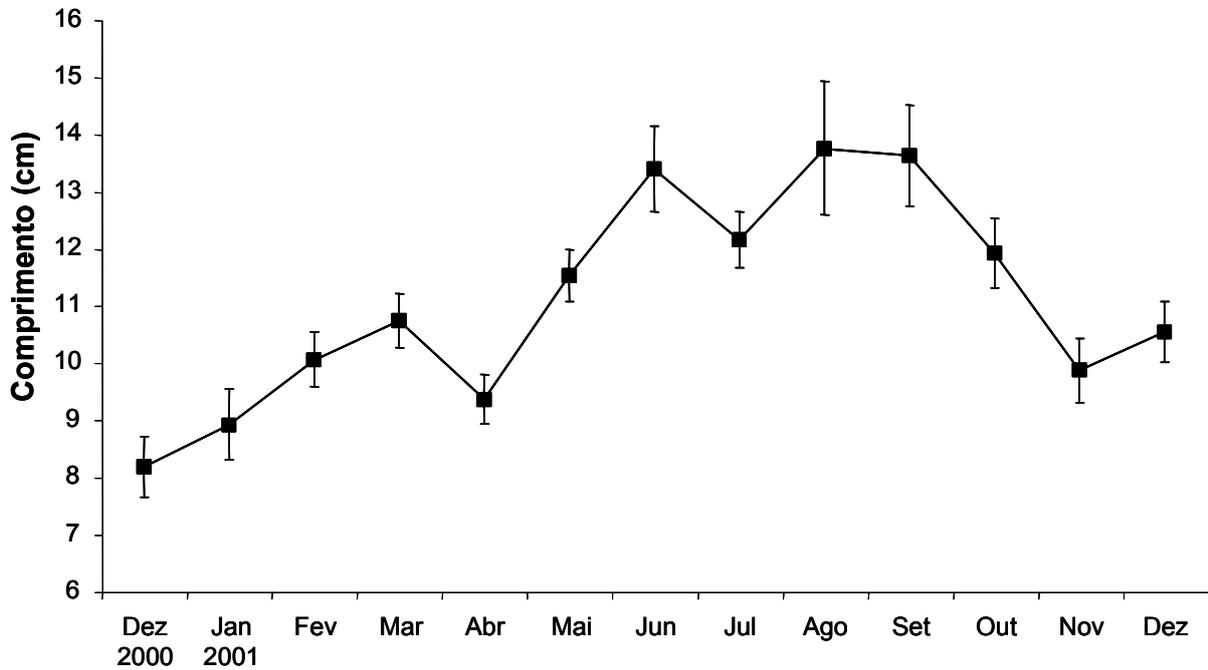


Figura 3.6 - Variação do comprimento (média \pm erro padrão, $n = 100$) de *C. crispus*.

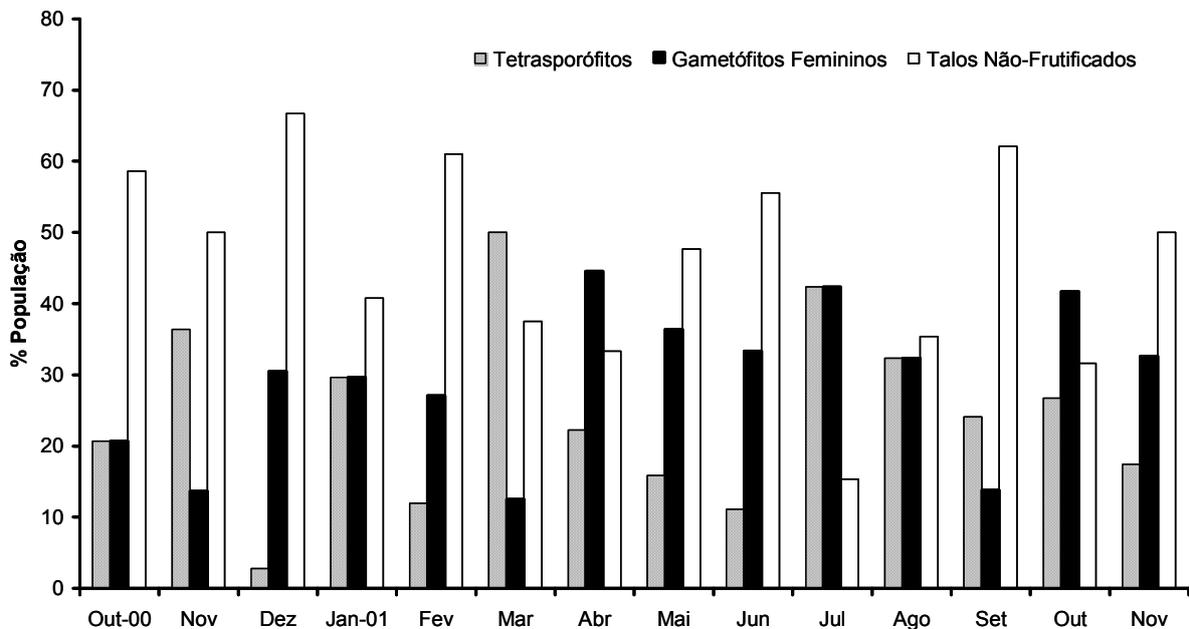


Figura 3.7 – Estrutura de uma população de *C. crispus* da Baía de Buarcos.

3.2.4.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.8 -A e B, respectivamente. O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos tetraspóricos, com 53.2 % do peso seco, em Julho de 2001. Uma amostra de gametófitos femininos de Novembro de 2001 apresentou o conteúdo mínimo, com 10 % do peso seco.

O peso seco médio (Figura 3.8 - C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 20.3 ± 1.1 % (n = 3) em Agosto de 2001 e 24.6 ± 1.0 % (n = 3) em Maio de 2001. Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco, de cada geração, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.05$).

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (19.6 ± 4.4 %, n = 3) em Janeiro de 2001 e o valor máximo (38.0 ± 2.4 %, n = 3) em Setembro de 2001. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 28.7 ± 1.6 % (n = 16), com uma média de 25.0 ± 2.2 % (n = 16) nos gametófitos femininos, 34.6 ± 2.8 % (n = 16) nos tetrasporófitos e 26.4 ± 1.8 % (n = 16) nos talos não-frutificados. Os dados respeitantes à variação sazonal do conteúdo em carragenana, de cada geração, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

A percentagem de carragenana foi baixa no Outono e Inverno; um pequeno incremento ocorreu no início da Primavera (Abril de 2001); o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas no Verão (Julho de 2001).

3.2.5 – Estudo de uma população de *Gigartina pistillata*

3.2.5.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.9) foram feitas de Dezembro de 2000 a Dezembro de 2001. O máximo comprimento médio foi de 9.7 ± 1.0 cm (n = 100) em Outubro de 2001 e o mínimo de 4.5 ± 0.9 cm (n = 100) em Maio de 2001. Os dados respeitantes à variação sazonal comprimento, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.5.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.10. Os talos tetrasporófitos foram dominantes em grande parte das amostras, tendo a sua percentagem variado de 10 % (Maio de 2001) a 81.8 % (Novembro de 2001). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras, variando a sua percentagem de 6.8 % (Novembro de 2001) a 90 % (Maio de 2001). Os talos não-frutificados não estiveram presentes nas amostras recolhidas durante o período de estudo atrás referido. Os talos heterospóricos (talos possuidores, em simultâneo, de cistocarpos e tetrasporocistos) estiveram presentes em 8 das 13 amostras, com uma percentagem máxima de 30,8 % em Dezembro de 2001 e mínima de 1.9 % em Julho 2001.

Comparando com os talos possuidores de cistocarpos (gametófitos femininos) (média = 32.9 ± 5.6 %, n = 13), os tetrasporófitos (talos com tetrasporocistos) são, geralmente, mais abundantes (média = 60.8 ± 5.5 %, n = 13). A percentagem média de

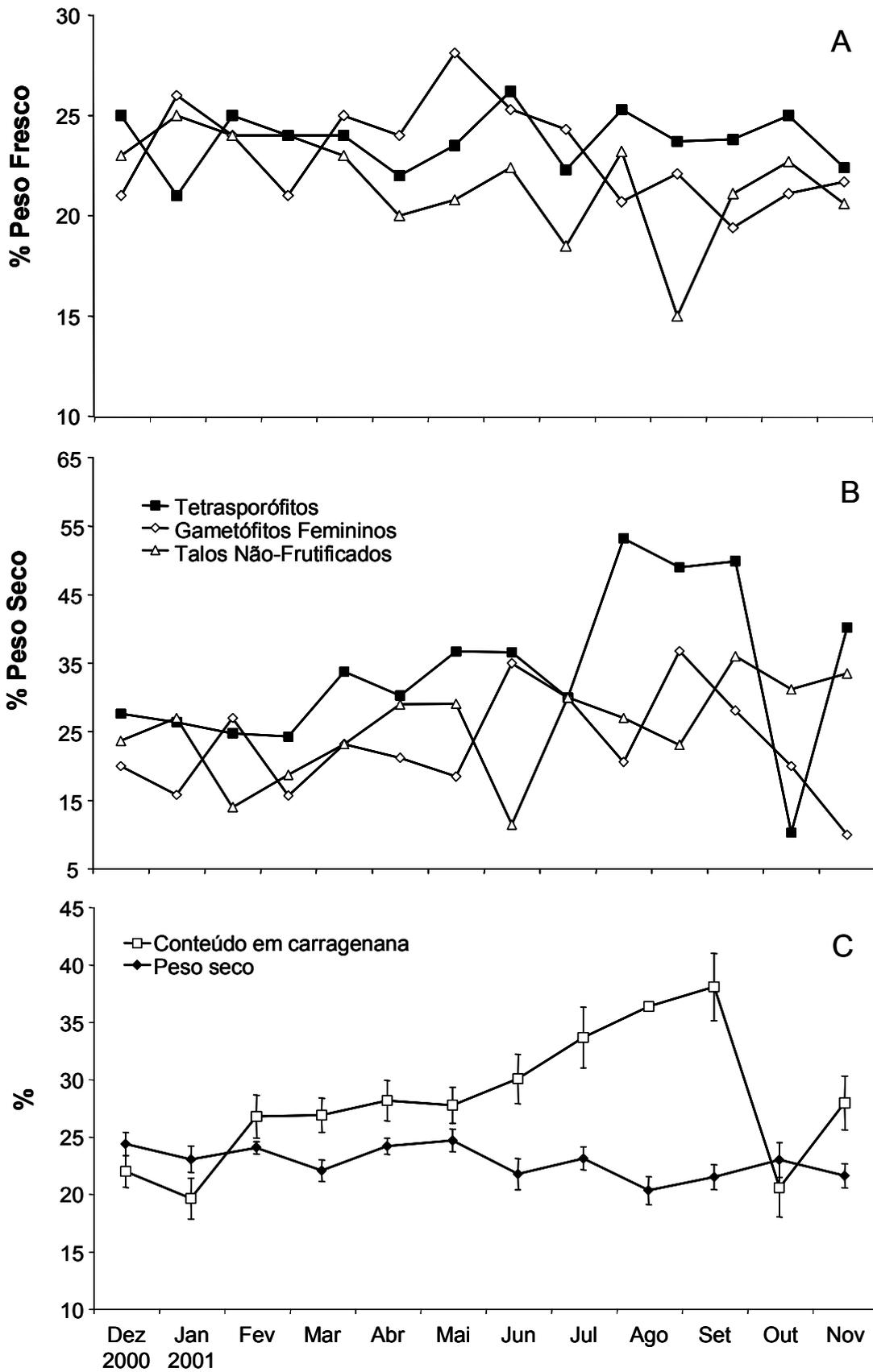


Figura 3.8 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. crispus*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, $n = 3$) de *C. crispus* (C).

talos heterospóricos foi de $46.1 \pm 3.9 \%$ ($n = 14$). Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

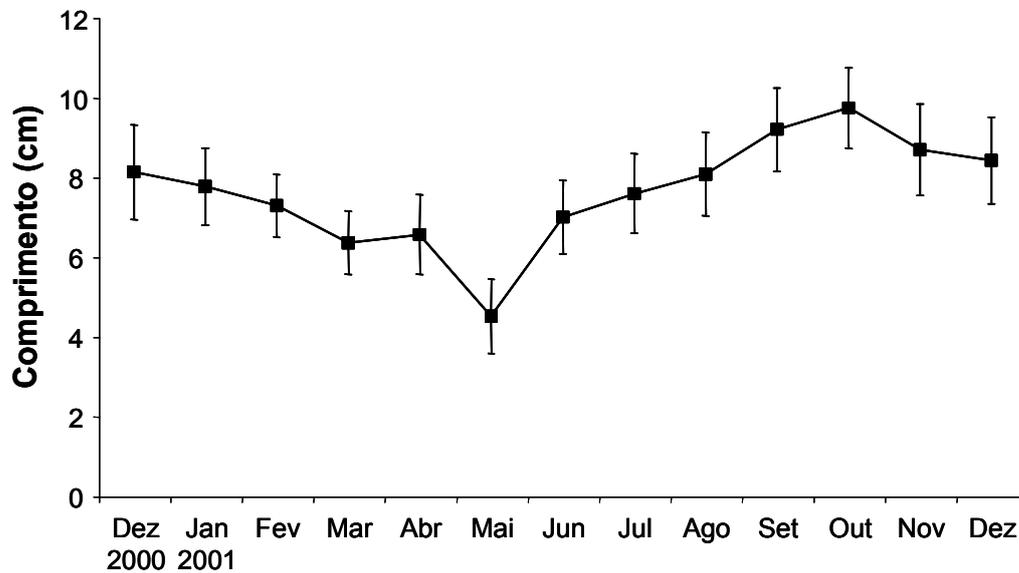


Figura 3.9 - Variação do comprimento (média \pm erro padrão, $n = 100$) de *G. pistillata*.

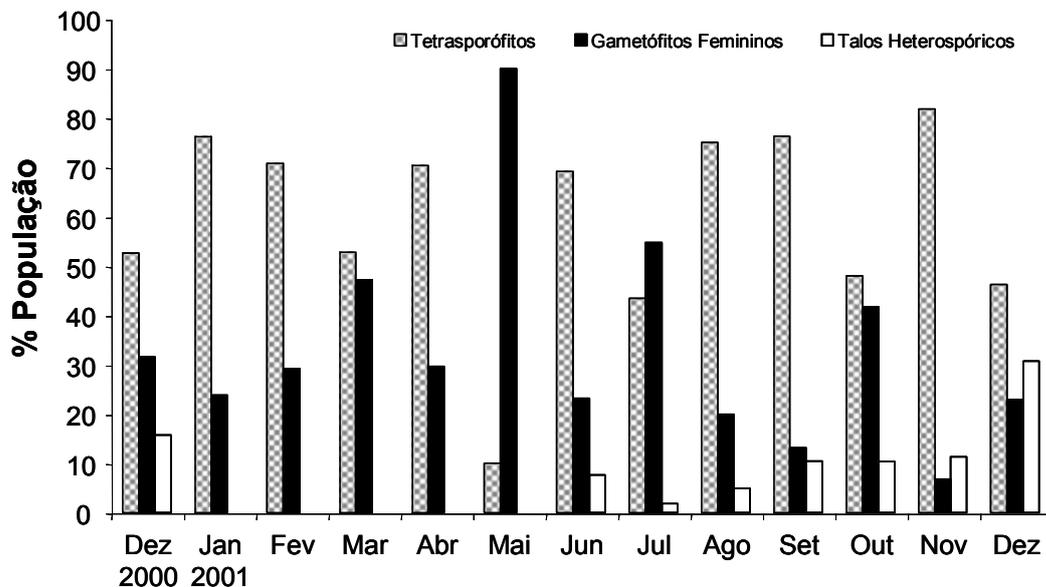


Figura 3.10 – Estrutura de uma população de *G. pistillata* da Baía de Buarcos.

3.2.5.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco e do conteúdo em carragenana dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e heterospóricos encontra-se representada na Figura 3.11 – A e B, respectivamente. O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de gametófitos femininos, com 59.7 % do peso seco, em Junho de 2001. Uma amostra de talos heterospóricos, de Novembro de 2000, apresentou o conteúdo mínimo, com 22.7 % do peso seco.

O peso seco médio (Figura 3.11 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 18.7 ± 0.4 % (n = 3) em Julho de 2001 e 22.4 ± 0.6 % (n = 3) em Maio de 2001.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (26.9 ± 2.6 %, n = 3) em Fevereiro de 2001 e o valor máximo (50.4 ± 0.5 %, n = 3) em Março de 2001. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 38.7 ± 2.6 % (n = 14), com uma média de 36.7 ± 2.7 % (n = 14) nos gametófitos femininos, 39.7 ± 2.8 % (n = 14) nos tetrasporófitos e 39.7 ± 2.4 % (n = 14) nos talos heterospóricos.

A percentagem de carragenana foi baixa no Outono e Inverno; um grande incremento ocorreu no início da Primavera (Março de 2001); o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas na Primavera e no Verão.

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.6 – Estudo de uma população de *Chondracanthus acicularis*

3.2.6.a – Variação sazonal do comprimento

Devido à natureza dos talos desta espécie (delgados e muito emaranhados) não foi possível proceder à medição do seu comprimento.

3.2.6.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

Devido às razões apontadas na alínea anterior também não foi feita a determinação mensal da percentagem de indivíduos de cada geração.

3.2.6.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco e do conteúdo em carragenana dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.12 – A e B, respectivamente. O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos não-frutificados, com 61.1 % do peso seco, em Julho de 2001. Uma amostra de gametófitos femininos, de Novembro de 2000, apresentou o conteúdo mínimo, com 21.7 % do peso seco.

O peso seco médio (Figura 3.12 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 18.3 ± 0.2 % (n = 3) em Junho de 2001 e 33.0 ± 2.7 % (n = 3) em Novembro de 2000. A média anual de peso seco foi de 24.8 ± 2.7 (n = 13).

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (29.4 ± 4.3 %, n = 3) em Novembro de 2000 e o valor máximo (55.5 ± 4.6 %, n = 3) em Julho de 2001. A média anual do conteúdo em carragenana foi de

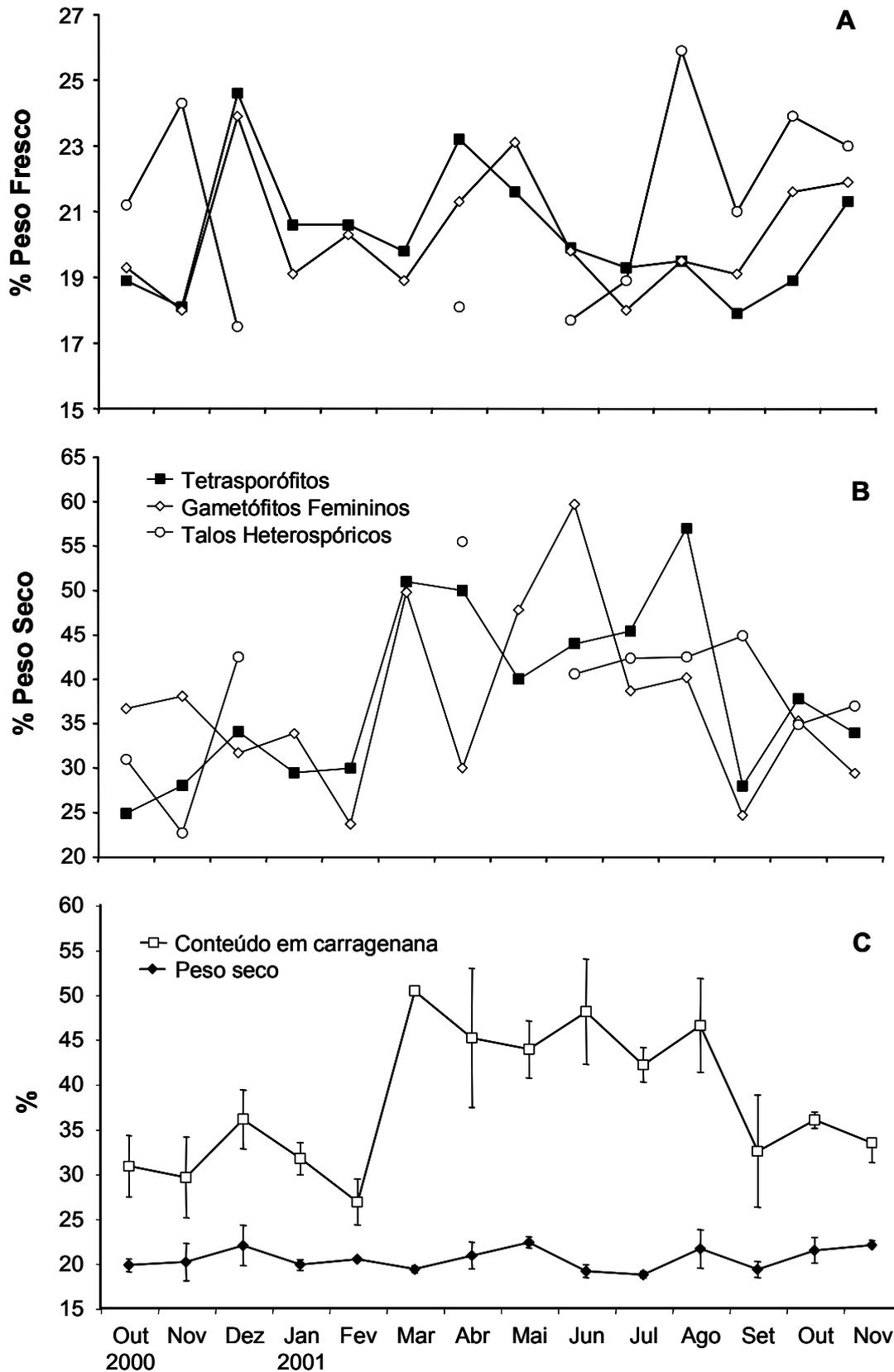


Figura 3.11 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *G. pistillata*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, $n = 3$) de *G. pistillata* (C).

40.1 ± 2.7 % (n = 13), com uma média de 37.9 ± 2.7 % (n = 12) nos gametófitos femininos, 29.0 % (n = 1) nos tetrasporófitos e 42.4 ± 2.9 % (n = 13) nos talos não-frutificados.

A variação anual do conteúdo em carragenana (Figura 3.12 – C) está negativamente correlacionada ($r = -0.4964$) com a variação anual do peso seco ($p < 0.05$).

A percentagem de carragenana foi baixa no Outono e Inverno; um pequeno incremento ocorreu no início da Primavera (Março de 2001); a maior percentagem de carragenana foi registada nas amostras recolhidas no Verão (Julho de 2001).

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.7 – Estudo de uma população de *Mastocarpus stellatus*

3.2.7.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.13) foram feitas de Janeiro de 2001 a Janeiro de 2002. A média anual desta espécie, no respeitante ao comprimento, foi de 6.3 ± 0.5 cm (n = 13); o máximo comprimento médio foi de 9.5 ± 1.2 cm (n = 100) em Setembro de 2001 e o mínimo de 4.1 ± 0.8 cm (n = 100) em Janeiro de 2001. A amostragem respeitante à variação sazonal do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.7.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.14. Os talos não-frutificados estiveram presentes em todas as amostras, tendo a sua percentagem variado de 3.0 % (Setembro de 2001) a 97.3 % (Fevereiro de 2001). Os gametófitos femininos também estiveram presentes em todas as amostras, variando a sua percentagem de 2.7 % (Fevereiro de 2001 e Fevereiro de 2002) a 97.0 % (Setembro de 2001). Não foi feita a amostragem dos talos tetraspóricos devido às suas reduzidas dimensões e natureza incrustante.

A média anual dos talos não-frutificados (50,4 ± 7.9 %, n = 15) foi ligeiramente superior à dos gametófitos femininos (49.6 ± 7.9 %, n = 15)

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.7.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.15 – A e B, respectivamente. O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de gametófitos femininos, com 41.4 % do peso seco, em Setembro de 2001. Uma amostra de talos não-frutificados de Março de 2001 apresentou o conteúdo mínimo, com 10.3 % do peso seco.

O peso seco médio (Figura 3.15 - C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 23.3 ± 0.3 % (n = 2) em Agosto de 2001 e 30.5 ± 0.5 % (n = 2) em Fevereiro de 2001. A média anual de peso seco foi de 28.6 ± 0.6 (n = 14).

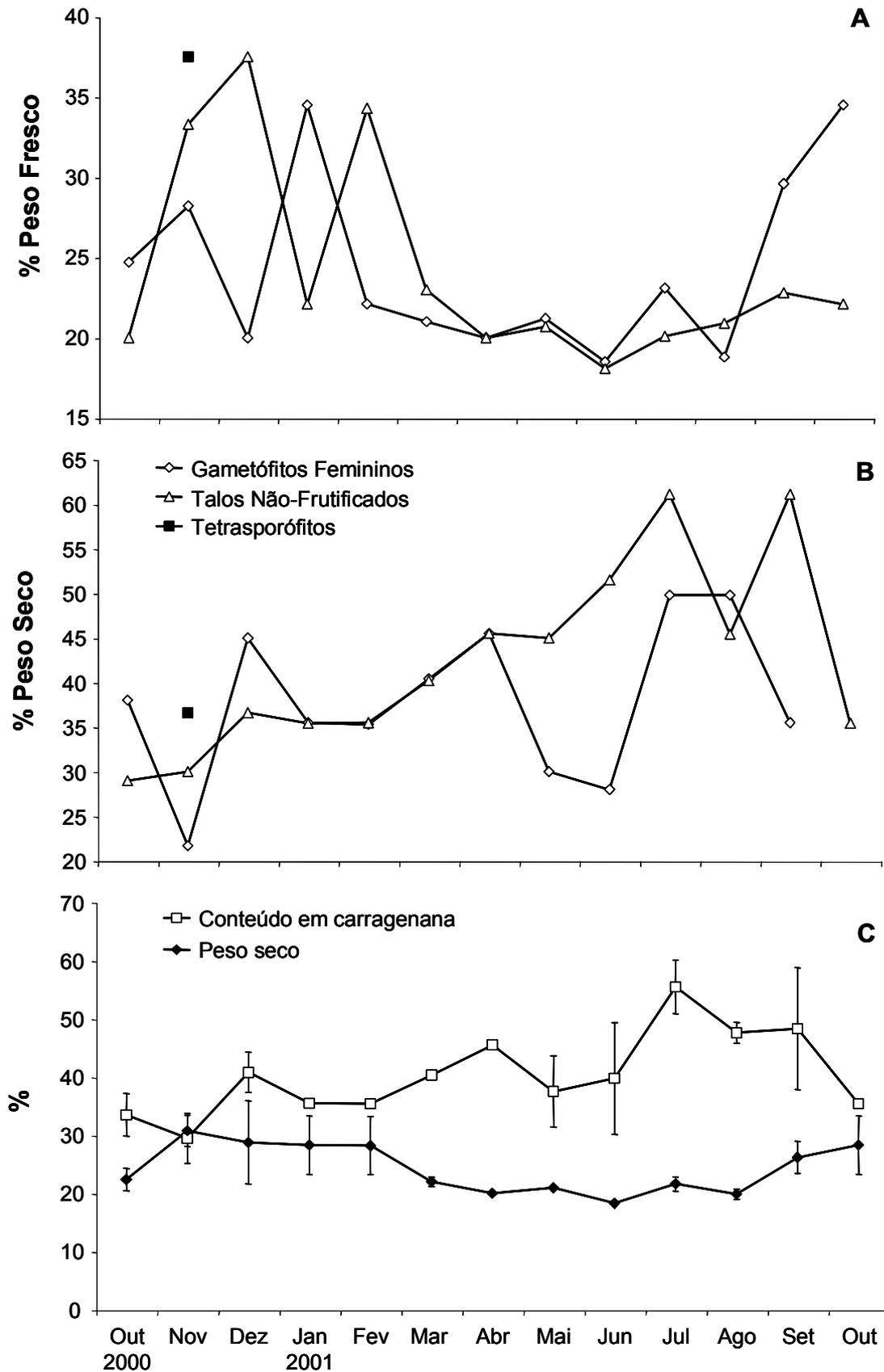


Figura 3.12 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. acicularis*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, n = 3) de *C. acicularis* (C).

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo ($10.4 \pm 4.4 \%$, $n = 2$) em Março de 2001 e o valor máximo ($40.7 \pm 2.4 \%$, $n = 2$) em Setembro de 2001. A média anual do conteúdo em carragenana foi de $20.7 \pm 2.0 \%$ ($n = 14$), com uma média de $20.9 \pm 2.1 \%$ ($n = 14$) nos gametófitos femininos e $20.5 \pm 2.0 \%$ ($n = 14$) nos talos não-frutificados.

A variação anual do conteúdo em carragenana (Figura 3.15 - C) está negativamente correlacionada ($r = -0.5861$) com a variação anual do peso seco ($p < 0.05$).

A percentagem de carragenana foi baixa no Inverno e Primavera; um pequeno incremento ocorreu no início do Verão (Junho de 2001); o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas no Verão (Setembro de 2001).

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

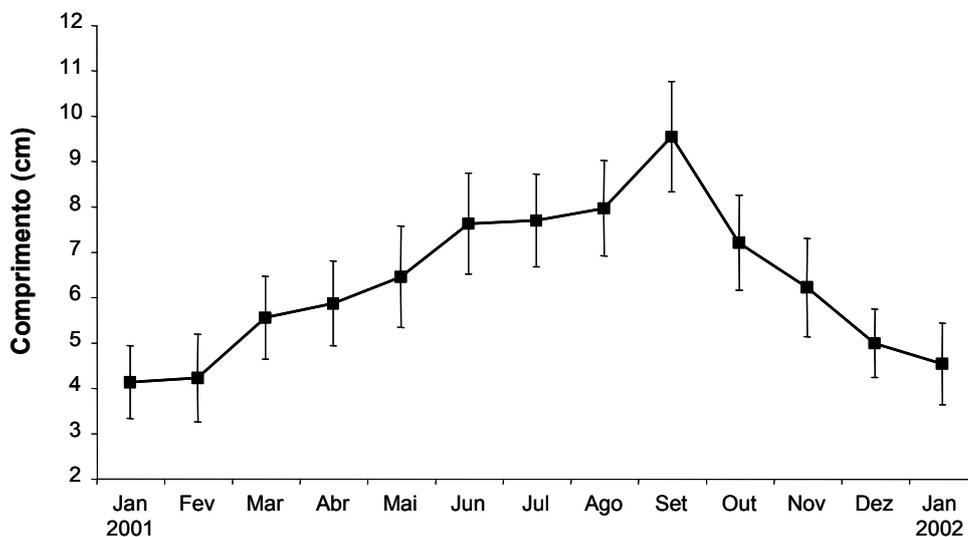


Figura 3.13 - Variação do comprimento (média \pm erro padrão, $n = 100$) de *M. stellatus*.

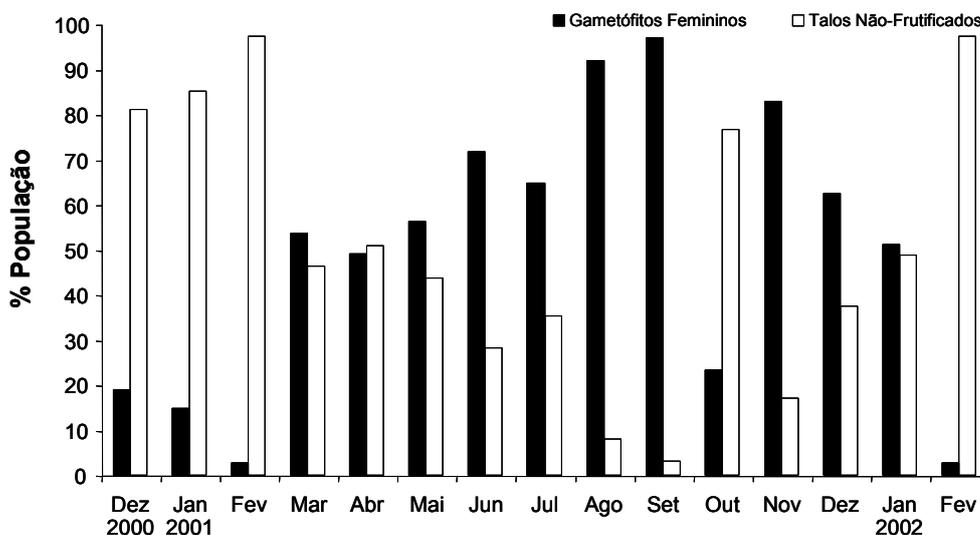


Figura 3.14 – Estrutura de uma população de *M. stellatus* da Baía de Buarcos.

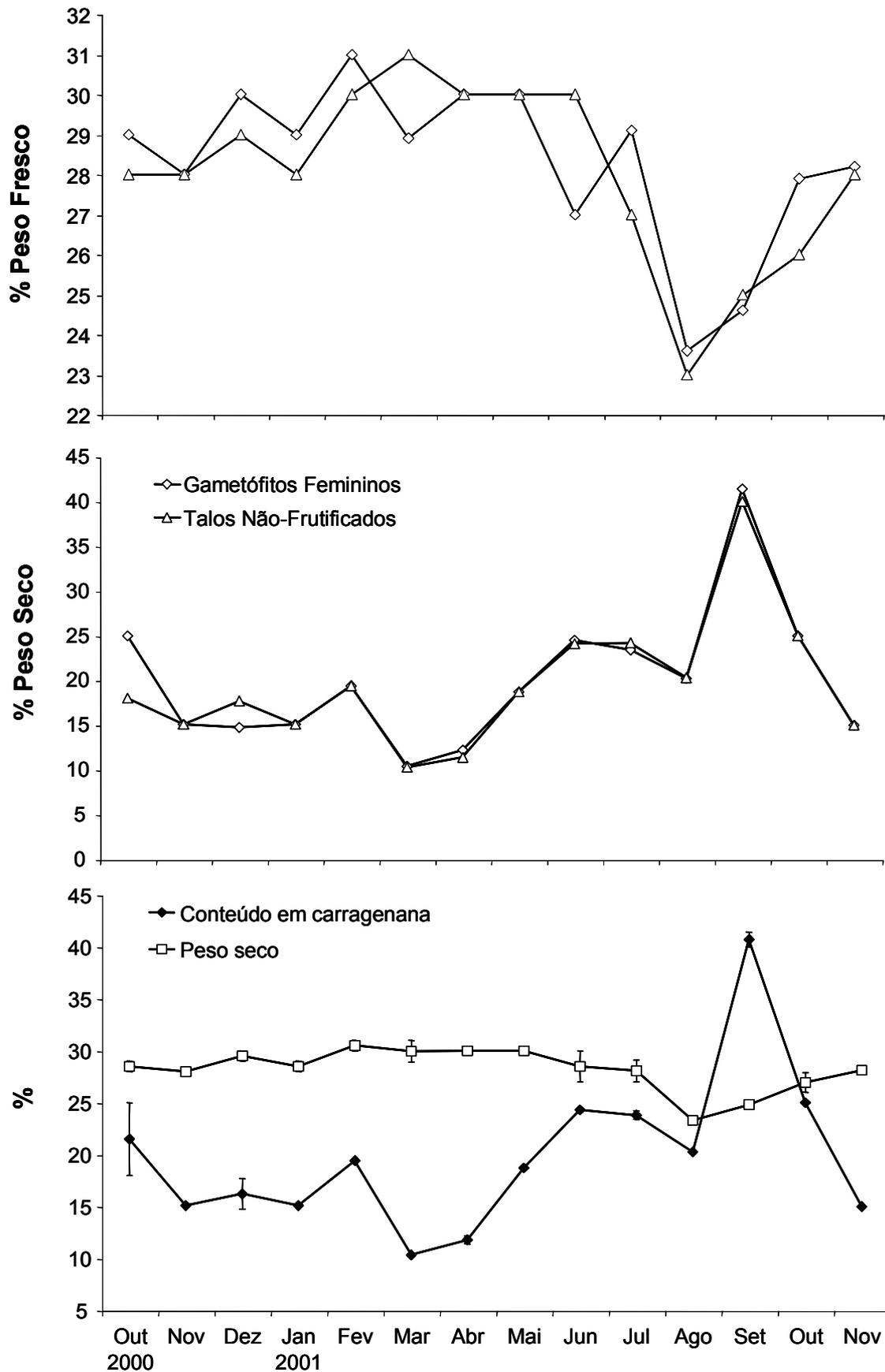


Figura 3.15 – Variação mensal do peso seco (A) e variação mensal do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *M. stellatus*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, $n = 2$) de *M. stellatus* (C).

3.2.8 – Estudo de uma população de *Ahnfeltiopsis devoniensis*

3.2.8.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.16) foram feitas de Maio de 2001 a Maio de 2002. A média anual desta espécie, no respeitante ao comprimento, foi de 4.5 ± 0.2 cm ($n = 13$); o máximo comprimento médio foi de 6.0 ± 0.7 cm ($n = 20 - 50$) em Outubro de 2001 e o mínimo de 3.0 ± 0.6 cm ($n = 20 - 50$) em Março de 2001. A amostragem respeitante à variação sazonal do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.8.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

Devido à existência de um número muito reduzido de talos (ver alínea 3.2.11.c) e para que a amostragem (relativamente ao peso seco e conteúdo em carragenana) possuisse significância estatística, os talos foram todos incluídos num único conjunto denominado “gametófitos” (ver características desta alga na alínea 1.3.5.b).

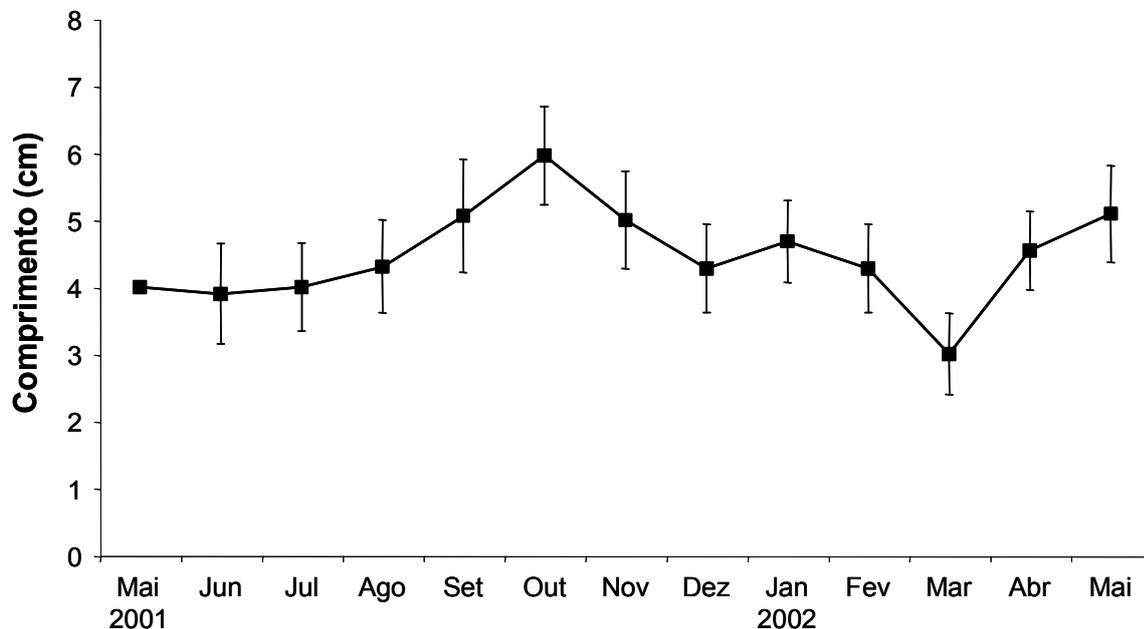


Figura 3.16 - Variação do comprimento (média ± erro padrão, $n = 20-50$) de *A. devoniensis*.

3.2.8.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

Foram feitas amostragens de Maio de 2001 a Maio de 2002. A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) encontra-se representada na Figura 3.17.

O peso seco médio, expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 17.1 % em Abril de 2002 e 32.3 % em Fevereiro de 2002. A média anual de peso seco foi de 22.8 ± 1.2 (n = 13).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado na amostra de Julho de 2001, com 13.6 % do peso seco. As amostras de Fevereiro e Março de 2002 apresentaram o conteúdo mínimo, com 7.4 % do peso seco. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 10.4 ± 0.5 % (n = 13). A percentagem de carragenana foi baixa durante todo o período de estudo; um pequeno incremento ocorreu no Verão (Junho de 2001).

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam uma variância com significado estatístico (ANOVA, p <0.001).

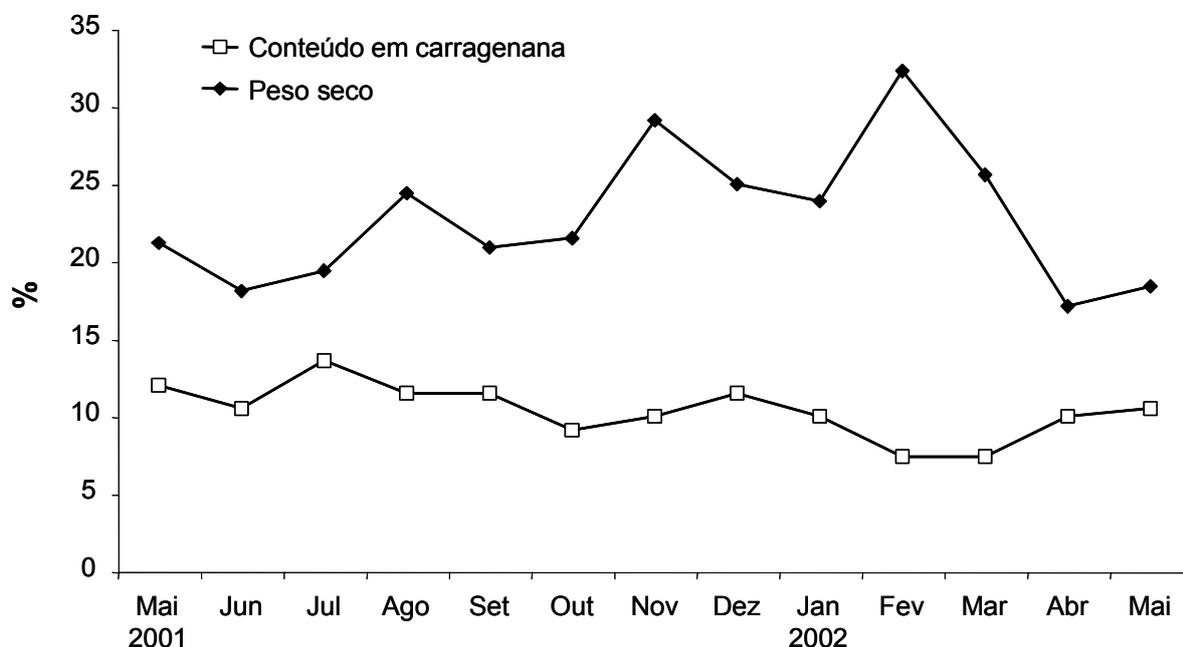


Figura 3.17 –Variação do conteúdo em carragenana e peso seco de *A. devoniensis*.

3.2.9 – Estudo de uma população de *Gymnogongrus crenulatus*

3.2.9.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.18) foram feitas de Novembro de 2000 a Novembro de 2001. A média anual desta espécie, no respeitante ao comprimento, foi de 6.3 ± 0.3 cm ($n = 13$); o máximo comprimento médio foi de 7.5 ± 1.2 cm ($n = 20 - 50$) em Abril de 2001 e o mínimo de 4.2 ± 0.2 cm ($n = 20 - 50$) em Janeiro de 2001. A amostragem respeitante à variação sazonal do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.9.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

Todos os talos pertencem à geração tetrasporoblástica (ver características desta alga na alínea 1.3.5.a).

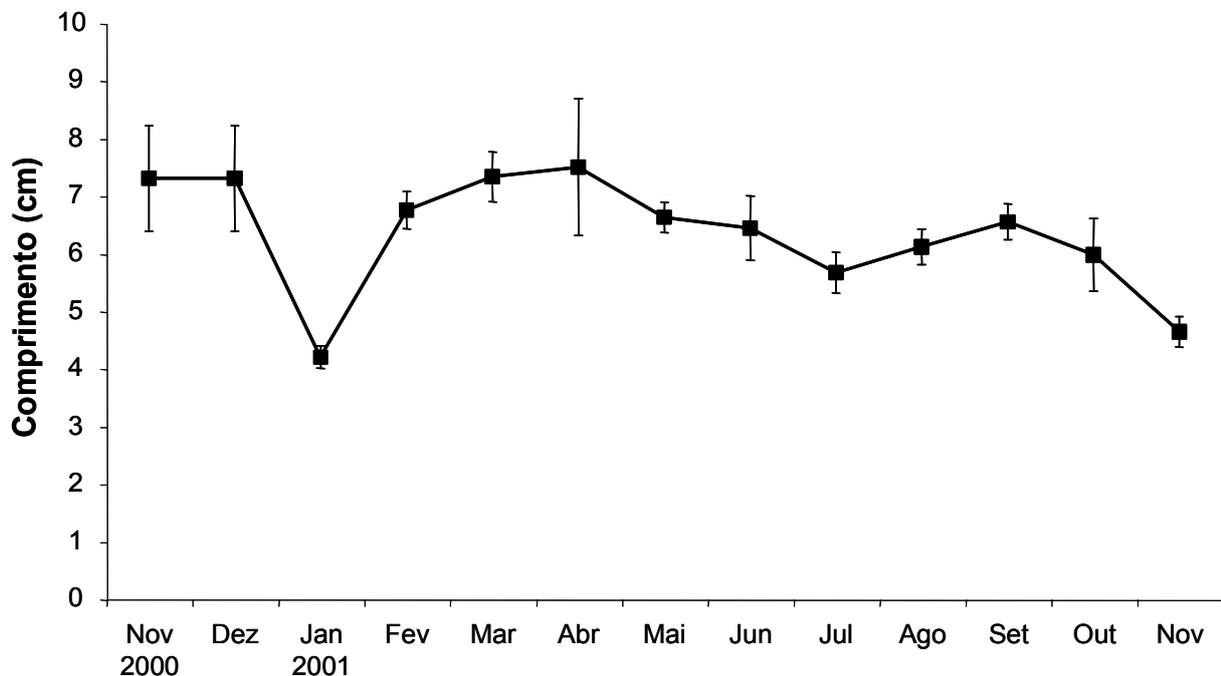


Figura 3.18 - Variação do comprimento (média \pm erro padrão, $n = 20-50$) de *G. crenulatus*.

3.2.9.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

Foram feitas amostragens de Novembro de 2000 a Novembro de 2001. A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) encontra-se representada na Figura 3.19.

O peso seco médio, expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 11.0 % em Novembro de 2001 e 26.4 % em Junho de 2001. A média anual de peso seco foi de 18.4 ± 1.3 (n = 13).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado na amostra de Junho de 2001, com 23.3 % do peso seco. A amostra de Novembro de 2001 apresenta o conteúdo mínimo, com 5.5 % do peso seco. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 12.6 ± 1.4 % (n = 13). A percentagem de carragenana foi baixa durante o Outono; um pequeno incremento ocorreu no Inverno; as amostras da Primavera e, em particular as de Verão, apresentam um maior conteúdo em carragenana (Junho de 2001).

A variação anual do conteúdo em carragenana (Figura 3.19) está correlacionada ($r = 0.7797$) com a variação anual do peso seco ($p < 0.01$).

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

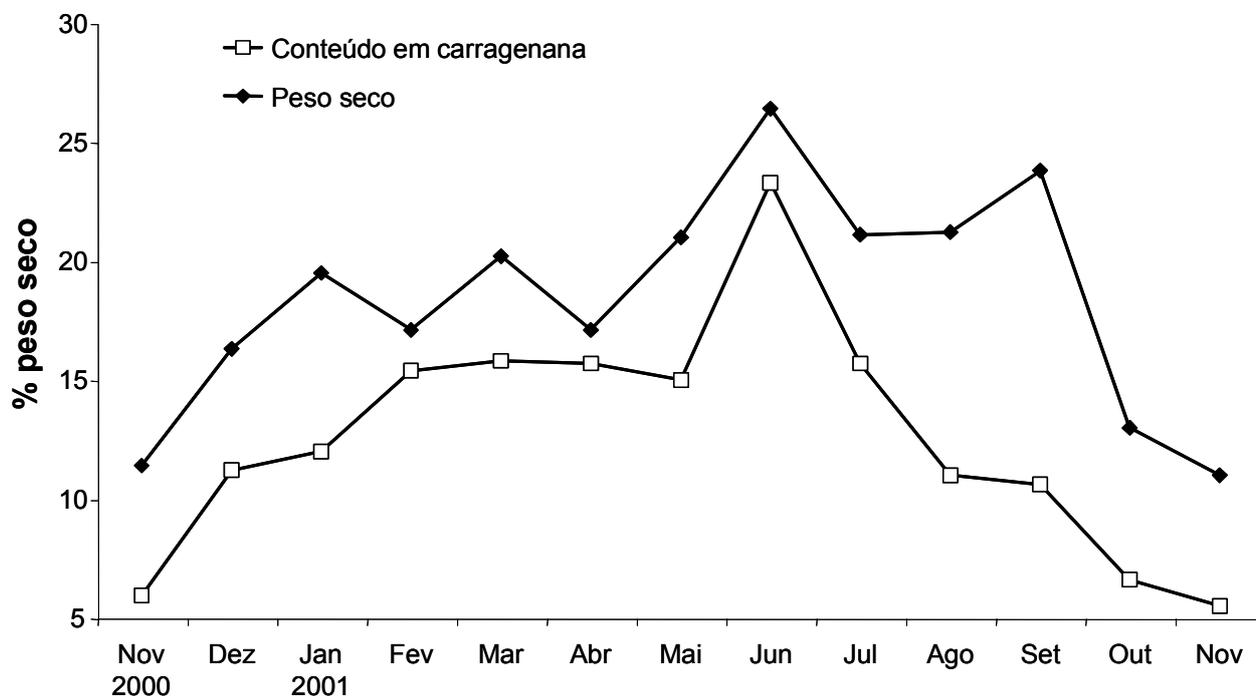


Figura 3.19 –Variação do conteúdo em carragenana e peso seco de *G. crenulatus*.

3.2.10 – Estudo de uma população de *Calliblepharis jubata*

3.2.10.a – Variação sazonal do comprimento

As medições do comprimento (Figura 3.20) foram feitas de Dezembro de 2000 a Dezembro de 2001. O máximo comprimento médio foi de 16.9 ± 1.8 cm ($n = 50 - 100$) em Agosto de 2001 e o mínimo de 6.4 ± 0.9 cm ($n = 50 - 100$) em Outubro de 2001. Os dados respeitantes à variação sazonal comprimento, apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.10.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.21. Os talos não-frutificados foram dominantes em todas as amostras, excepto na amostra de Agosto de 2001, tendo a sua percentagem variado de 28,6 % (Agosto de 2001) a 100.0 % (Dezembro de 2000 e Outubro de 2001). Os gametófitos femininos estiveram presentes em 11 de 13 amostras, variando a sua percentagem de 2.4 % (Março de 2001) a 71.4 % (Agosto de 2001). Os tetrasporófitos estiveram presentes em 4 de 13 amostras, com uma percentagem máxima de 17.3 % em Maio de 2001 e mínima de 5.3 % em Janeiro de 2002.

Comparando os talos frutificados, nomeadamente com os talos possuidores de cistocarpos (gametófitos femininos) (média = 20.3 ± 5.3 %, $n = 13$), os tetrasporófitos (talos com tetrasporocistos) são sempre menos abundantes (média = 11.3 ± 1.5 %, $n = 13$). A percentagem média de talos não-frutificados foi de 20.8 ± 5.6 % ($n = 13$).

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.2.10.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.22 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.22 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 5.3 % ($n = 1$) em Outubro de 2001 e 26.0 % ($n = 1$) em Novembro de 2000.

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de gametófitos femininos, com 40.4 % do peso seco, em Maio de 2001. Uma amostra de gametófitos femininos de Janeiro de 2001 apresentou o conteúdo mínimo, com 4 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (4.1 %, $n = 1$) em Dezembro de 2001 e o valor máximo (28.8 ± 6.7 %, $n = 3$) em Maio de 2001. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 13.7 ± 2.4 % ($n = 14$), com uma média de 17.3 ± 3.2 % ($n = 14$) nos gametófitos femininos, 25.0 ± 1.3 % ($n = 3$) nos tetrasporófitos e 11.2 ± 1.7 % ($n = 14$) nos talos não-frutificados.

A percentagem de carragenana foi baixa no Outono e Inverno; o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas na Primavera (Maio de 2001).

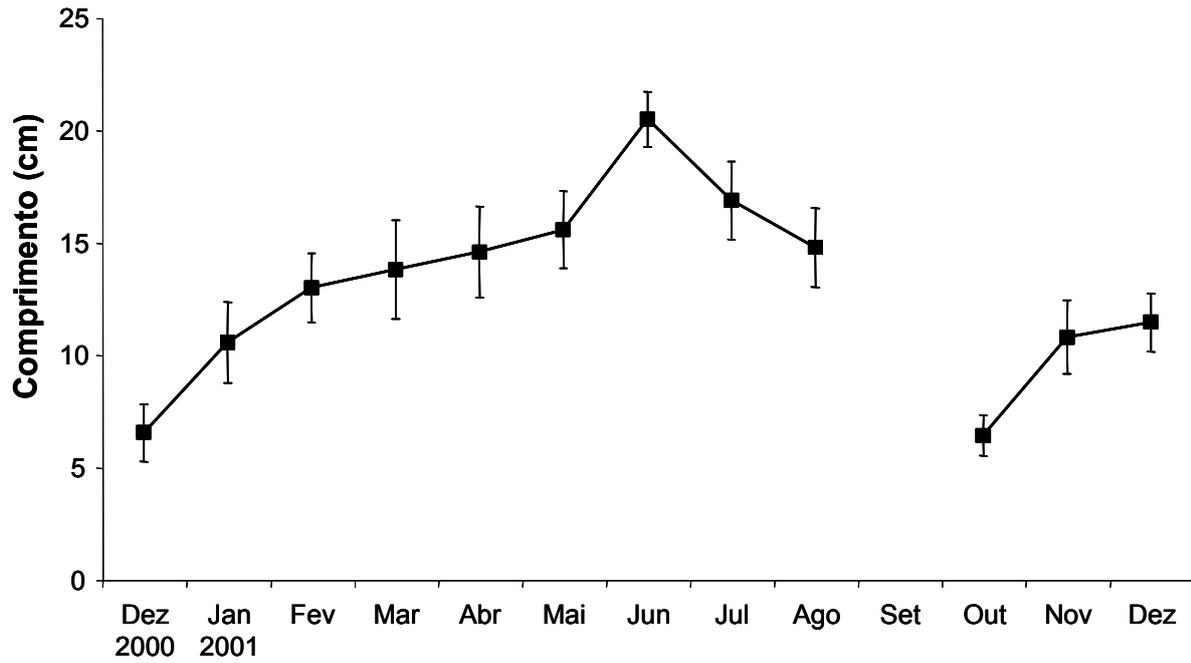


Figura 3.20 - Variação do comprimento (média \pm erro padrão, n = 50 -100) de *C. jubata*.

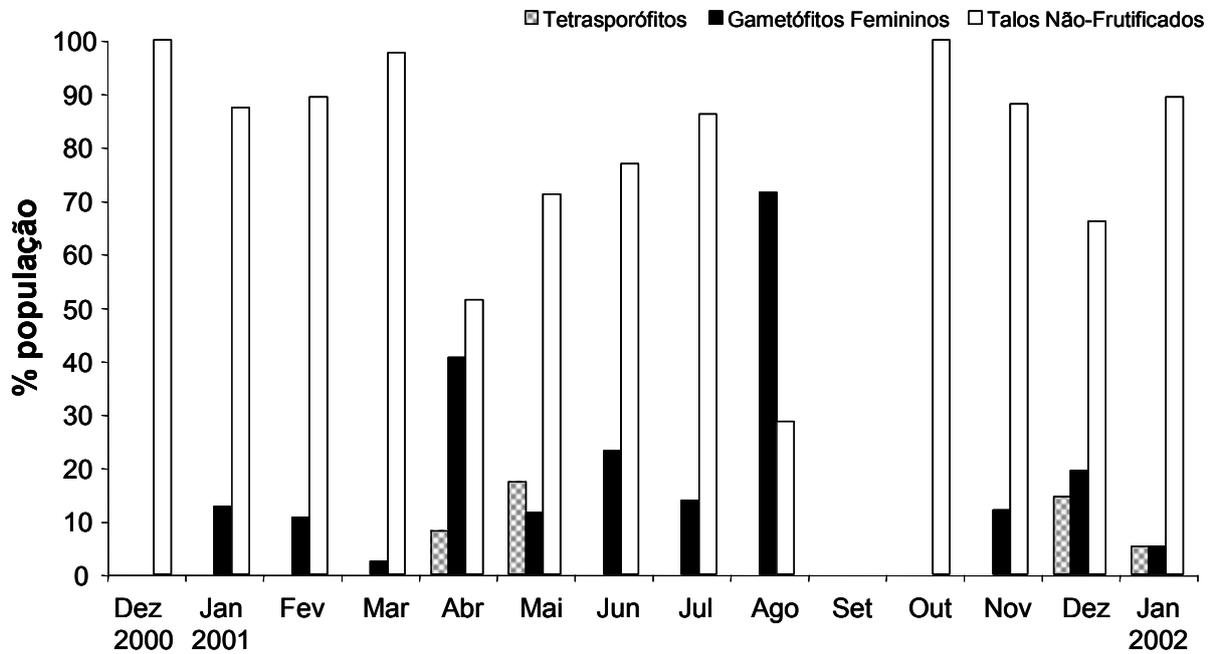


Figura 3.21 –Estrutura de uma população de *C. jubata*.

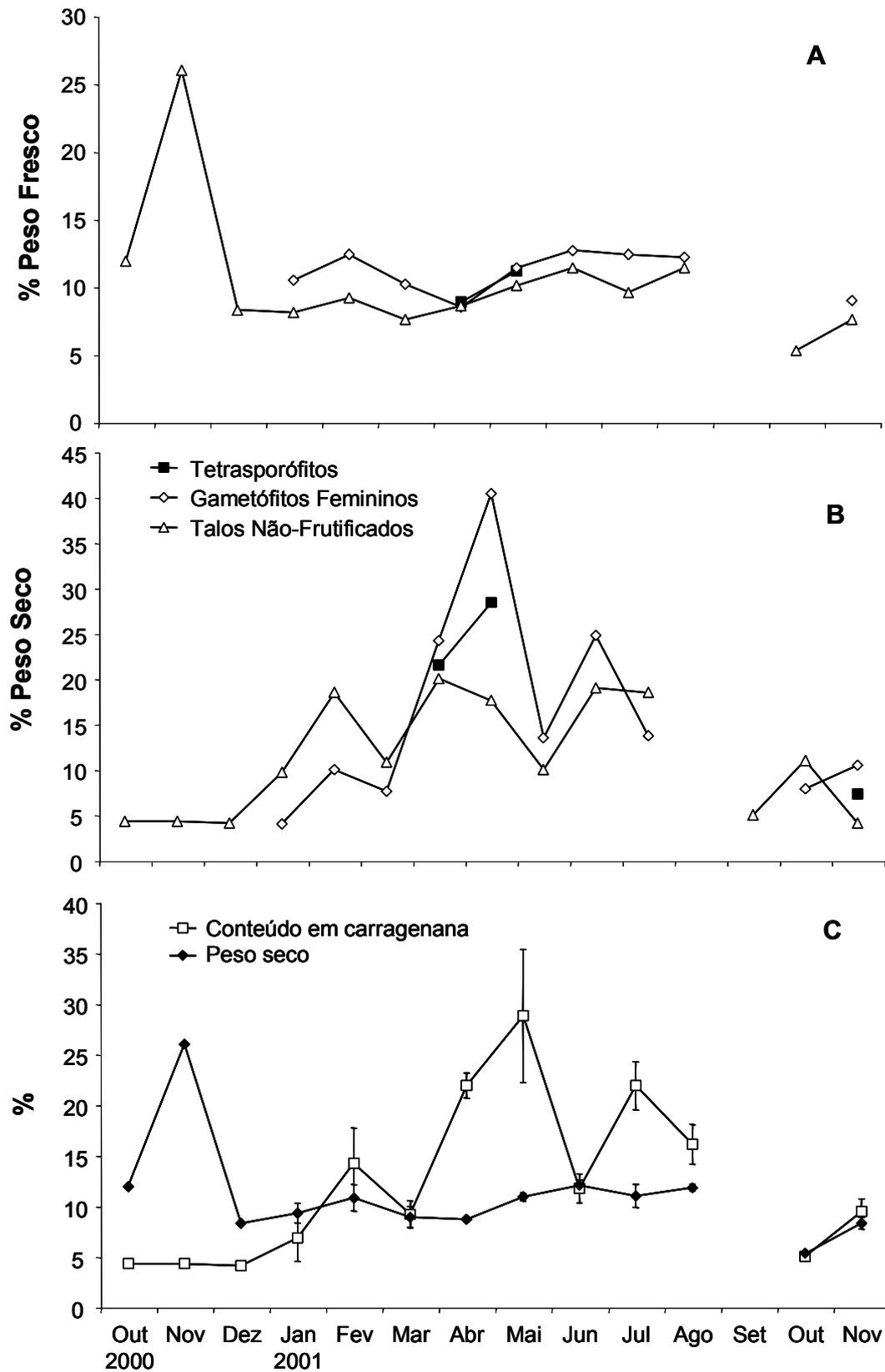


Figura 3.22 – Variação mensal do peso seco (A) e do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. jubata*. Variação média do conteúdo em carragenana e peso seco (média ± erro padrão, n = 3) de *C. jubata* (C).

3.2.11 – Estudo comparativo das carragenófitas presentes em Buarcos

3.2.11.a – Comprimento

O comprimento médio de cada carragenófitas estudada encontra-se representado na Figura 3.23.

O *C. jubata* é a carragenófitas de maior porte, com 12.9 ± 1.1 cm (n = 13) e a carragenófitas de menores dimensões é o *A. devoniensis*, com 4.5 ± 0.2 cm (n = 13).

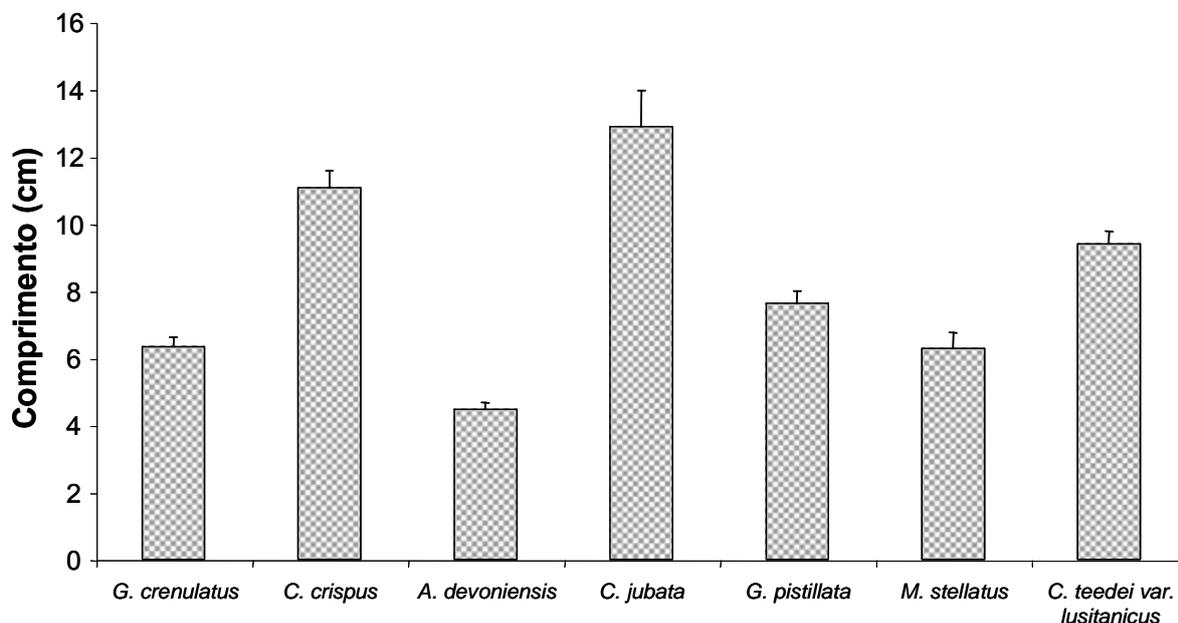


Figura 3.23 – Comprimento médio das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos (média \pm erro padrão, n = 13).

3.2.11.b – Peso seco e conteúdo em carragenana

O peso seco e conteúdo em carragenana médios, de cada carragenófitas estudada, encontram-se representados na Figura 3.24.

O Peso seco global médio, expresso em percentagem de peso fresco, teve o seu valor mínimo (10.8 ± 0.5 %, n = 13) nas amostras de *C. jubata* e o valor máximo (28.6 ± 0.6 %, n = 13) nas amostras de *M. stellatus*.

O conteúdo global médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (10.6 ± 0.6 %, n = 13) nas amostras de *A. devoniensis* e o valor máximo (40.1 ± 2.7 %, n = 13) nas amostras de *C. acicularis*.

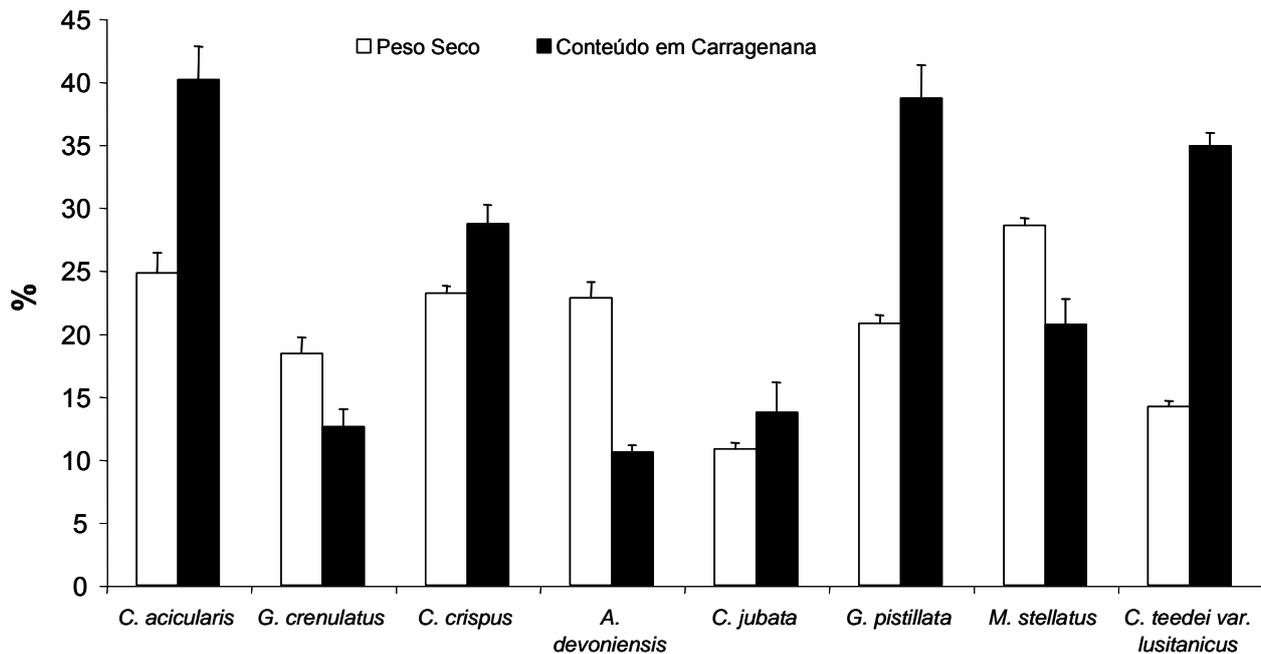


Figura 3.24 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) médios das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos (média \pm erro padrão, $n = 13$).

3.2.11.c – Cobertura no Outono/Inverno e Primavera/Verão

A cobertura das carragenófitas estudadas, expressa em percentagem, encontra-se representada na Figura 3.25.

A espécie com maior cobertura é o *C. crispus*, com 3.75 ± 0.5 % ($n = 46$) no período Outono/Inverno e 3.5 ± 0.5 % ($n = 46$) no período Primavera/Verão. A carragenófitas com menor cobertura é o *A. devoniensis*, com 0.1 ± 0.01 % ($n = 46$) em ambos os períodos.

O *C. crispus*, *C. acicularis*, *G. pistillata*, *C. jubata* e *G. crenulatus* apresentaram uma maior cobertura no período Outono/Inverno do que no período Primavera/Verão; pelo contrário, o *C. teedei var. lusitanicus* e o *M. stellatus* apresentaram uma maior cobertura no período Primavera/Verão do que no período Outono/Inverno.

No conjunto de todas as macroalgas presentes na área de estudo, 4 das carragenófitas estudadas apresentam, tanto no período de Outono/Inverno como no período de Primavera/Verão e entre as 12 mais representativas, das maiores coberturas (ver Figura 3.26 – A e B).

3.2.11.d – Dominância quantitativa no Outono/Inverno e Primavera/Verão

A dominância quantitativa (cobertura x biomassa) das 12 espécies mais representativas da área estudada encontra-se listada na Tabela 3.1 (Outono/Inverno) e na Tabela 3.2 (Primavera/Verão).

Tal como aconteceu com a cobertura (alínea 3.2.11.c), entre as 12 algas quantitativamente dominantes, 4 são carragenófitas.

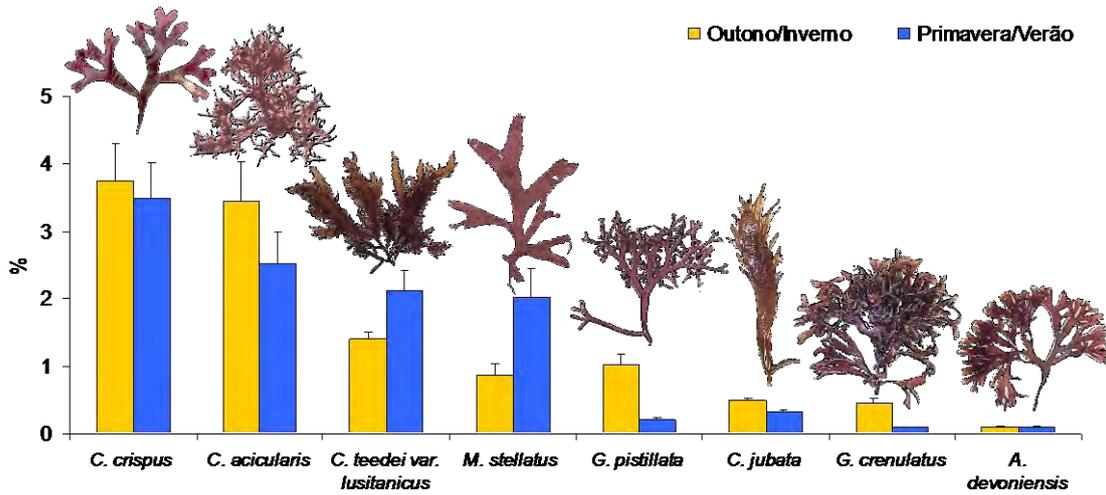


Figura 3.25 - Cobertura das carragenófitas presentes na Baía de Buarcos, nos períodos de Outono/Inverno e de Primavera/Verão (média ± erro padrão, n = 46).

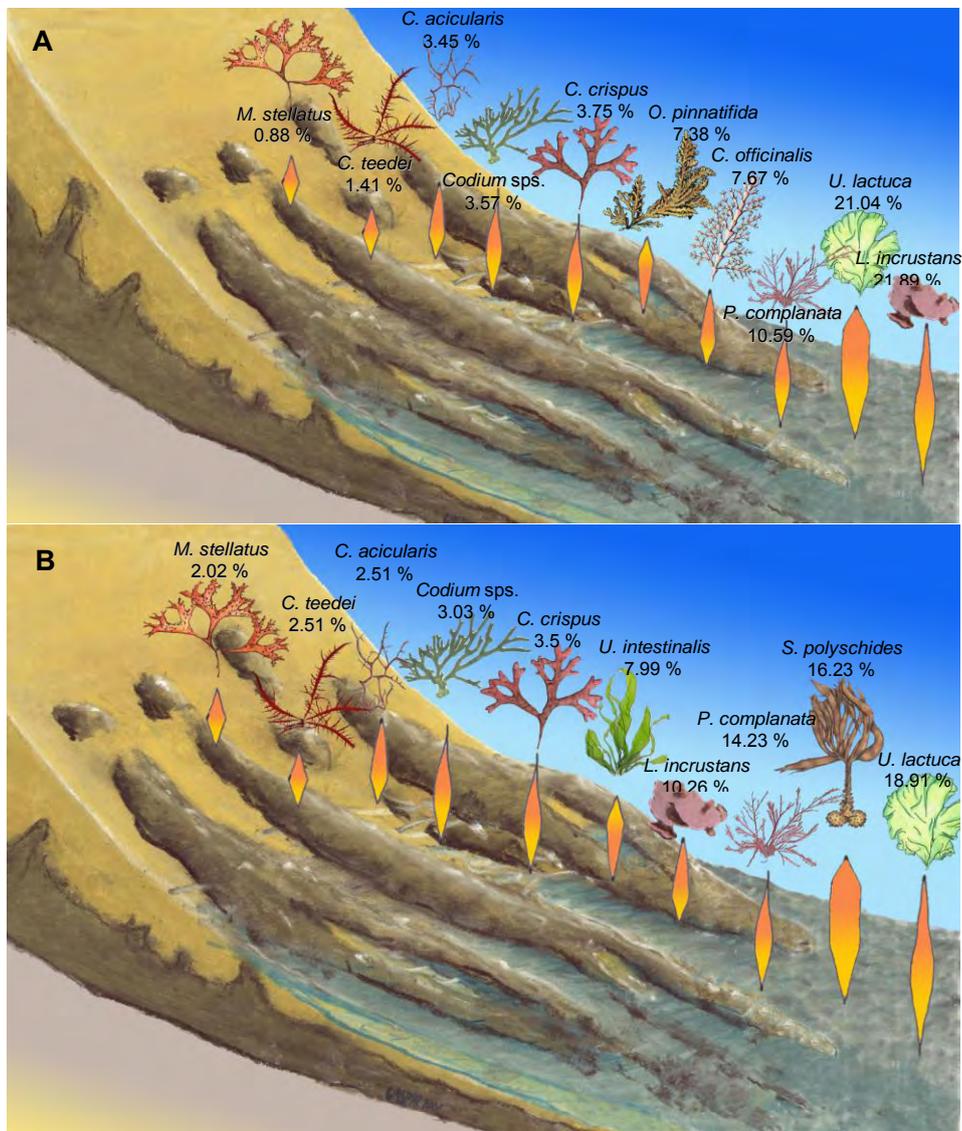


Figura 3.26 – Representação iconográfica da cobertura e distribuição das espécies mais representativas, nos períodos de Outono/Inverno (A) e de Primavera/Verão (B).

Tabela 3.1 – Dominância quantitativa das 12 espécies mais representativas no período Outono/Inverno

Espécie	Cobertura (%)	Biomassa (g m ⁻²)	Dominância quantitativa
<i>Lithophyllum incrustans</i> (R)	21.89	*	-
<i>Ulva lactuca</i> (C)	21.04	113	2378
<i>Pterosiphonia complanata</i> (R)	10.59	290	3071
<i>Corallina officinalis</i> (R)	7.67	553	4242
<i>Osmundea pinnatifida</i> (R)	7.38	453	3343
<i>Polysiphonia</i> sps. (R)	5.57	103	574
<i>C. crispus</i> (R)	3.75	318	1193
<i>Codium</i> sps. (C)	3.57	163	582
<i>C. acicularis</i> (R)	3.45	99	342
<i>Gelidium pusillum</i> (R)	2.36	194	458
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (R)	1.41	186	262
<i>M. stellatus</i> (R)	0.88	380	334

* Dada a natureza incrustante e calcária desta alga não foi possível determinar a sua biomassa; C – Chlorophyceae; R – Rhodophyceae.

Tabela 3.2 – Dominância quantitativa das 13 espécies mais representativas no período Primavera/Verão

Espécie	Cobertura (%)	Biomassa (g m ⁻²)	Dominância quantitativa
<i>Ulva lactuca</i> (C)	18.91	130	2458
<i>Saccorhiza polyschides</i> (P)	16.23	1663	26991
<i>Pterosiphonia complanata</i> (R)	14.23	358	5094
<i>Polysiphonia</i> sps. (R)	13.89	560	7778
<i>Lithophyllum incrustans</i> (R)	10.26	*	-
<i>Ulva intestinalis</i> (C)	7.99	163	1302
<i>Callithamnion tetricum</i> (R)	3.74	293	1096
<i>C. crispus</i> (R)	3.5	570	1995
<i>Codium</i> sps. (C)	3.03	473	1433
<i>C. acicularis</i> (R)	2.51	22	55
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> (R)	2.51	208	522
<i>M. stellatus</i> (R)	2.02	520	1050
<i>Corallina officinalis</i> (R)	1.3	508	660

* Dada a natureza incrustante e calcária desta alga não foi possível determinar a sua biomassa; C – Chlorophyceae; P – Phaeophyceae; R – Rhodophyceae.

3.3 – Estudo das variações geográficas das carragenófitas

3.3.1 – Dados físico-químicos

As datas das amostragens e os dados físico-químicos das diferentes estações de colheita encontram-se listados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Dados físico-químicos das estações de colheita

Local	Data	pH	Salinidade (S‰)	Temperatura da água (°C)	Temperatura do ar (°C)
Baleal	23/08/2002	8.2	32.5	18.6	29.4
S. M. Porto	24/08/2002	8.3	32.5	18.6	28.0
S. P. Moel	26/08/2002	8.3	32.0	16.3	27.8
Buarcos	11/08/2002	8.2	30.5	17.5	25.5
Aguda	12/06/2002	8.2	32.0	16.3	20.1
Miramar	12/07/2002	8.1	32.1	16.4	19.0
Lavadores	29/06/2002	8.2	30.5	16.1	19.0
Valadares	13/07/2002	8.1	30.4	16.1	19.0
A-Ver-o-Mar	26/07/2002	8.3	32.5	15.7	20.2
Aguçadoura	26/07/2002	8.3	32.5	15.7	20.3
Apúlia	26/07/2002	8.2	32.0	15.7	20.5
P. Norte	13/08/2002	8.0	31.0	15.1	21.0
Afife	11/09/2002	8.3	32.5	15.0	20.3
V. P. Âncora	13/08/2002	8.0	32.0	15.6	21.3
Moledo	11/09/2002	8.1	31.0	15.1	20.4

3.3.2 – Distribuição das carragenófitas pelas diferentes estações de colheita

A lista das carragenófitas presentes em cada uma das estações de colheita encontra-se descrita na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Distribuição das carragenófitas pelas diferentes estações de colheita

Carragenófitas	<i>C. crispus</i>	<i>G. pistillata</i>	<i>C. teedei</i>	<i>C. acicularis</i>	<i>M. stellatus</i>	<i>A. devoniensis</i>	<i>G. crenulatus</i>	<i>C. jubata</i>
Baleal			●	●		●	●	● (1)
S. M. Porto	● (1)	●			●		●	● (1)
S. P. Moel	●	●				●	●	
Buarcos	●	●	● (2)	●	●	●	●	●
Aguda	●	●	● (2)	● (1)	●	● (1)	●	●
Miramar	●		● (1,2)		●	●	●	●
Lavadores	●		● (2)		●		● (1)	
Valadares	●	●	● (2)		●	●	●	●
A-Ver-o-Mar	●	●	● (2)		●		●	●
Aguçadoura	●	●	● (2)	●	●		●	●
Apúlia	●	●	● (2)		●		●	●
P. Norte	●	●	● (2)	●	●		●	●
Afife	●	●			●	●	●	
V. P. Âncora	●	●	● (2)	●	●		●	● (1)
Moledo	●		● (2)		●	●	●	

1 – Presente mas insuficiente para fazer amostragem; 2 – var. *lusitanicus*.

3.3.3 – *C. crispus*

3.3.3.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta carragenófito, no respeitante ao comprimento (Figura 3.27), foi de 12.1 ± 0.3 cm ($n = 13$); o máximo comprimento médio foi de 14.8 ± 0.7 cm ($n = 100$) na amostra de Miramar e o mínimo de 10.5 ± 0.2 cm ($n = 100$) na amostra de S. P. Moel. A amostragem respeitante à variação geográfica do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA unifactorial, $p < 0.001$).

3.3.3.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.28. Os talos tetraspóricos estavam presentes em todas as estações de colheita com populações de *C. crispus*, sendo dominantes nas amostras a norte de Lavadores (excepto em Afife e V. P. Âncora); a sua percentagem variou de 20.0 % (Miramar) a 53.1 % (A-Ver-o-Mar). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras, excepto em A-Ver-o-Mar e Afife, tendo variando a sua percentagem de 5.6 % (Valadares) a 43.9 % (S. P. Moel); os gametófitos femininos foram dominantes nas amostras de S. P. Moel e Buarcos. Os talos não-frutificados estiveram presentes nas amostras de todas as estações, com uma percentagem máxima de 50.0 % em Afife e mínima de 11.1 % na amostra da Praia do Norte; os talos não-frutificados foram dominantes nas amostras de Aguda, Miramar e V. P. Âncora.

A percentagem média de talos não-frutificados foi de 35.2 ± 3.2 % ($n = 13$), a de talos tetraspóricos foi de 39.7 ± 3.1 % ($n = 13$) e a de gametófitos femininos foi de 24.8 ± 4.2 % ($n = 13$).

Os dados respeitantes à variação geográfica da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.05$).

3.3.3.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.29 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.29 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 20.7 ± 1.1 % ($n = 3$) na amostra de Aguda e 28.5 ± 0.1 % ($n = 3$) em Afife. Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.05$).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos tetraspóricos, com 41.9 % do peso seco, de Valadares. Uma amostra de gametófitos femininos de S. P. Moel apresentou o conteúdo mínimo, com 7.4 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (13.3 ± 3.2 , $n = 3$) na amostra de S. P. Moel e o valor máximo (29.0 ± 6.2 %, $n = 3$) na amostra de A-Ver-o-Mar. A média global do conteúdo em carragenana foi de 20.4 ± 1.4 % ($n = 13$), com uma média de 13.4 ± 1.4 % ($n = 11$) nos gametófitos femininos, 24.5 ± 2.6 % ($n = 13$) nos tetrasporófitos e 21.3 ± 2.4 % ($n = 13$) nos talos não-frutificados. A percentagem de carragenana foi baixa nas amostras de V. P. Âncora e Praia do Norte; o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas em A-Ver-o-Mar e Aguçadoura.

Os dados respeitantes à variação geográfica do conteúdo em carragenana apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

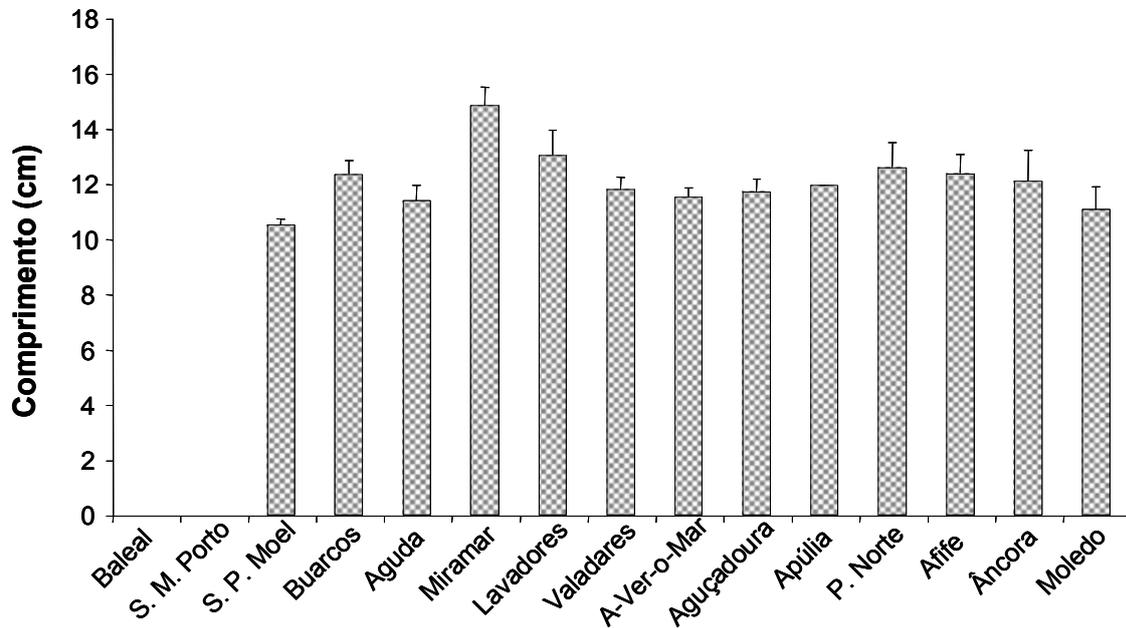


Figura 3.27 – Variação do comprimento de *C. crispus* nas diferentes estações de colheita (média \pm erro padrão, $n = 100$).

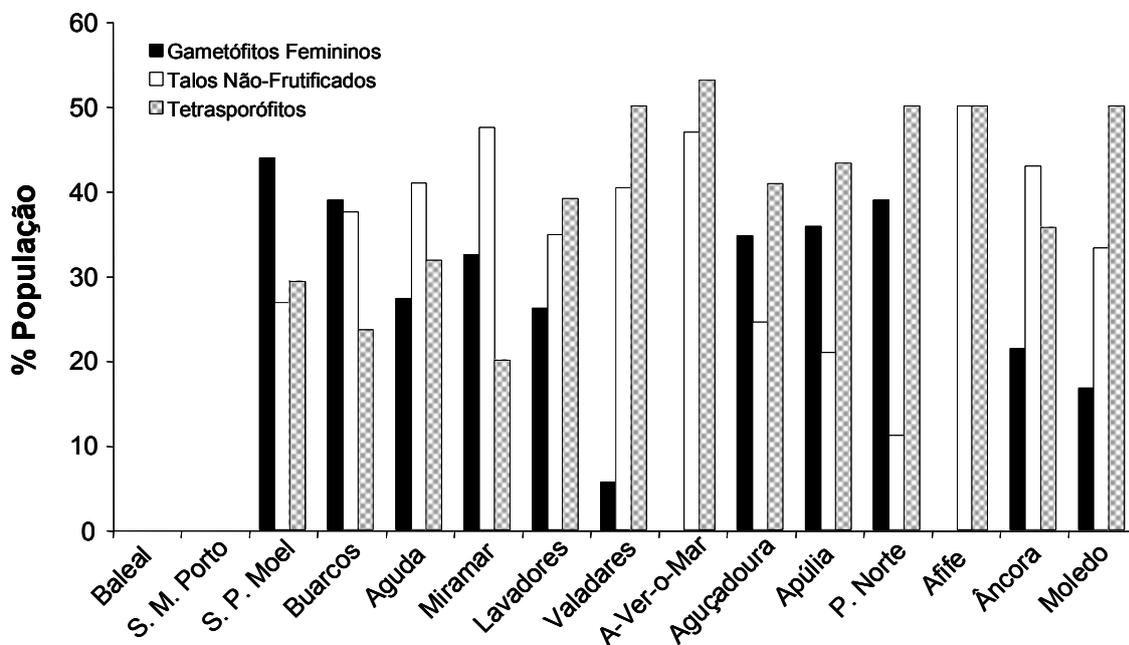


Figura 3.28 – Estrutura da população de *C. crispus* nas diferentes estações de colheita.

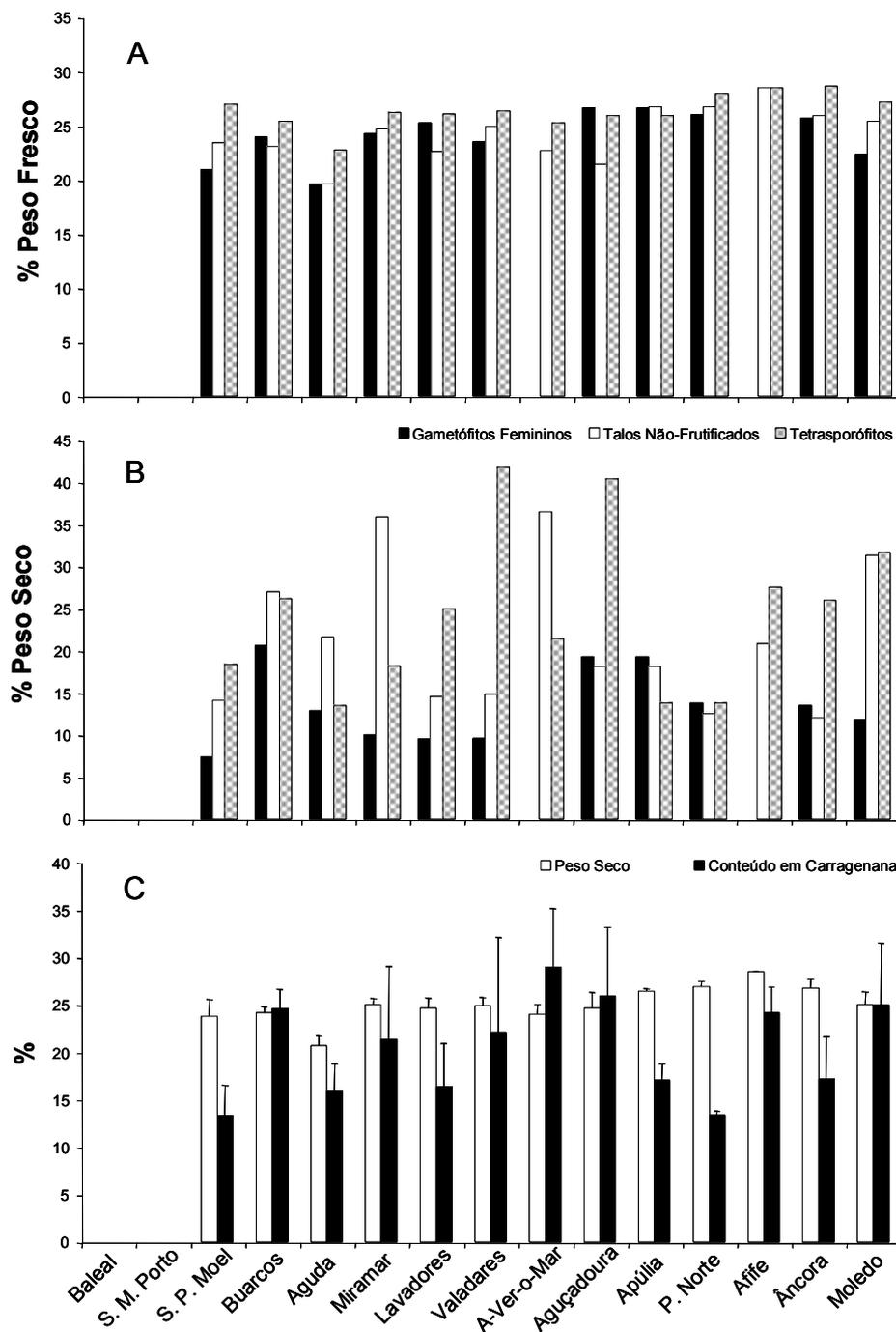


Figura 3.29 – Variação geográfica do peso seco (A) e do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. crispus*. Variação do conteúdo em carragenana e peso seco (média \pm erro padrão, $n = 3$) de *C. crispus* (C).

3.3.4 – *G. pistillata*

3.3.4.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta carragenófito, no respeitante ao comprimento (Figura 3.30), foi de 8.8 ± 0.5 cm ($n = 11$); o máximo comprimento médio foi de 12.2 ± 0.4 cm ($n = 100$) na amostra de A-Ver-o-Mar e o mínimo de 6.9 ± 0.5 cm ($n = 100$) na amostra de Valadares. A amostragem respeitante à variação geográfica do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.4.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

A percentagem de indivíduos de cada geração está representada na figura 3.31. Os talos tetraspóricos estavam presentes em todas as estações de colheita com populações de *G. pistillata*, excepto na amostra de S. M. Porto, sendo dominantes nas amostras de Buarcos, Aguda, A-Ver-o-Mar, Aguçadoura, Praia do Norte e V. P. Âncora; a sua percentagem variou de 5.6 % (Valadares) a 70.6 % (V. P. Âncora). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras excepto na de A-Ver-o-Mar e na de V. P. Âncora, tendo variando a sua percentagem de 4.2 % (Aguçadoura) a 100.0 % (S. M. Porto). Os talos não-frutificados estiveram presentes em todas as amostras excepto na de S. M. Porto e na de Aguda, com uma percentagem máxima de 53.3 % em Valadares e mínima de 15.2 % em A-Ver-o-Mar.

A percentagem média de talos não-frutificados foi de 28.9 ± 6.2 % ($n = 11$), a de talos tetraspóricos foi de 41.4 ± 8.9 % ($n = 11$), a de gametófitos femininos foi de 29.0 ± 8.9 % ($n = 11$) e a de talos heterospóricos foi de 0.7 ± 0.4 % ($n = 11$).

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

3.3.4.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos, heterospóricos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.32 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.32 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 20.4 ± 0.1 % ($n = 2$) em Aguda e 30.8 ± 1.3 % ($n = 3$) em Aguçadoura.

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos não-frutificados, com 65.4 % do peso seco, da Praia do Norte. Uma amostra de talos não-frutificados de Valadares apresentou o conteúdo mínimo, com 21.3 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (22.3 %, ± 7.5 , $n = 3$) na amostra de Afife e o valor máximo (45.4 ± 3.4 %, $n = 3$) na amostra de Aguda. A média global do conteúdo em carragenana foi de 38.2 ± 2.7 % ($n = 11$), com uma média de 42.2 ± 3.7 % ($n = 9$) nos gametófitos femininos, 33.4 ± 3.6 % ($n = 10$) nos tetrasporófitos, 41.5 ± 6.3 % ($n = 9$) nos talos não-frutificados e 25.4 ± 1.3 % ($n = 3$) nos talos heterospóricos.

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

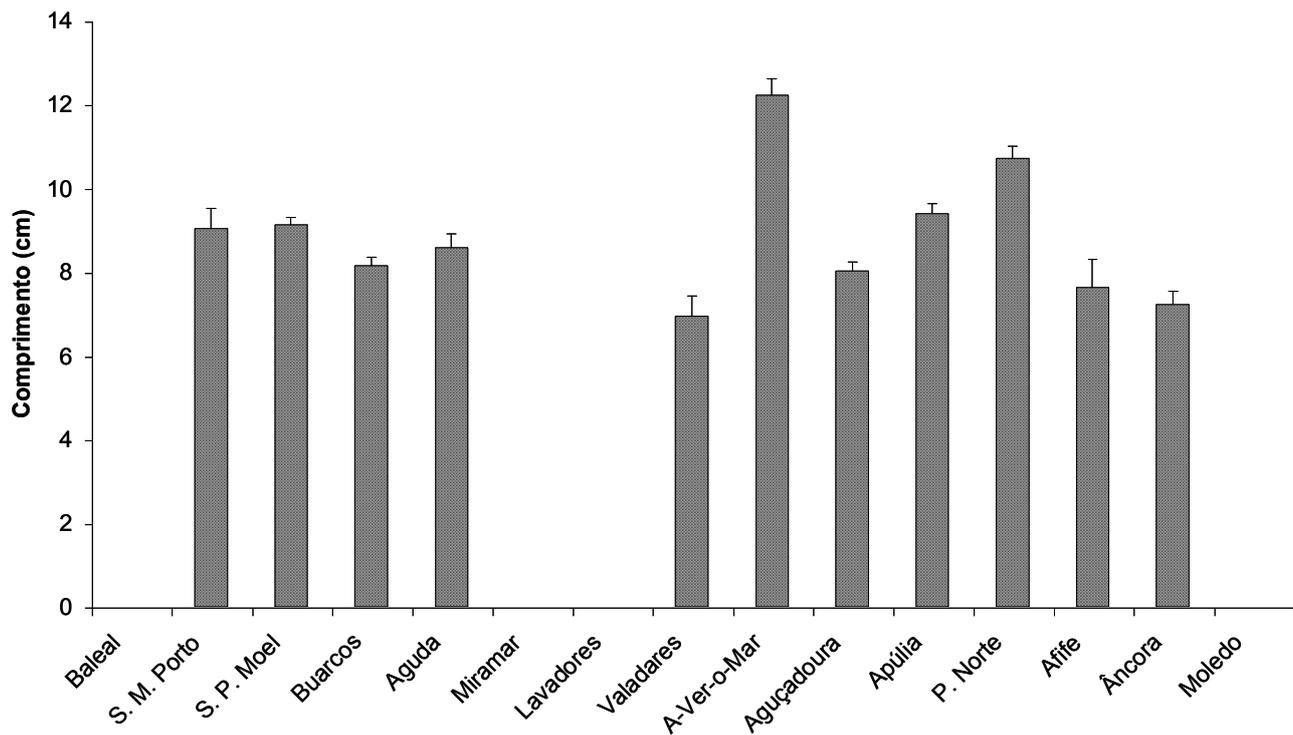


Figura 3.30 – Variação do comprimento de *G. pistillata* nas diferentes estações de colheita (média ± erro padrão, n = 100).

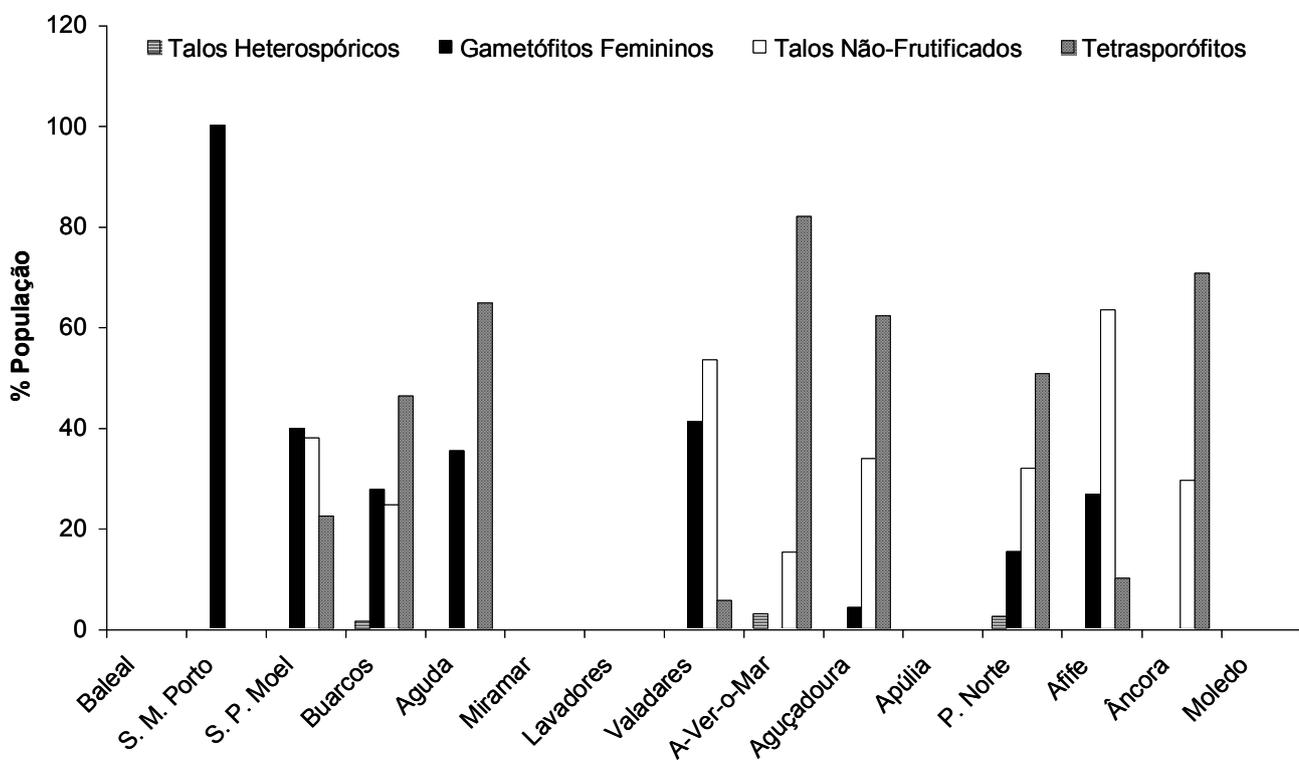


Figura 3.31 – Estrutura da população de *G. pistillata* nas diferentes estações de colheita.

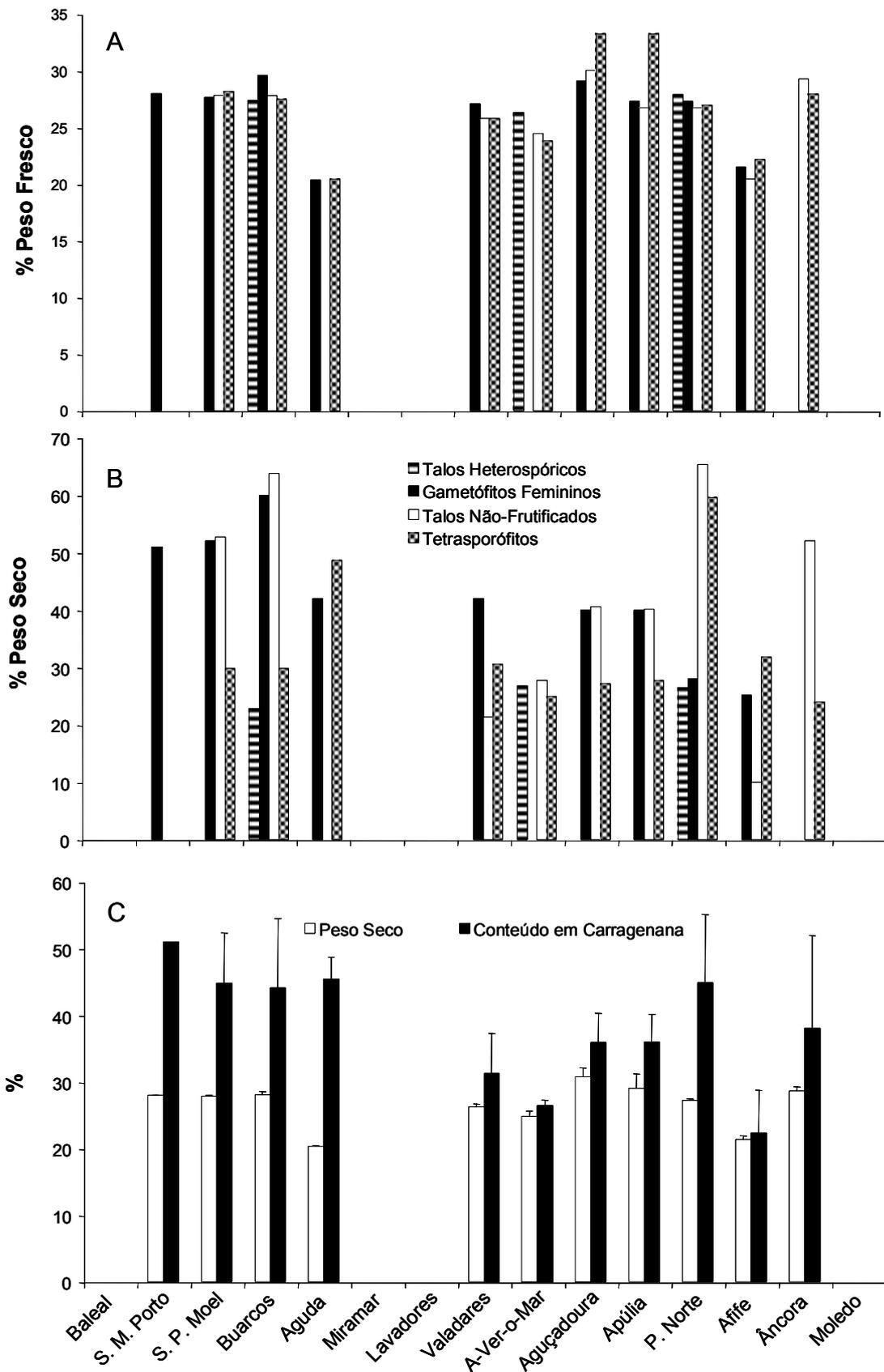


Figura 3.32 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *G. pistillata*. Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (média \pm erro padrão, n = 4) (C).

3.3.5 – *C. teedei*

3.3.5.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta carragenófito, no respeitante ao comprimento (Figura 3.33), foi de 10.4 ± 0.6 cm ($n = 11$); o máximo comprimento médio foi de 14.1 ± 1.9 cm ($n = 100$) na amostra de A-Ver-o-Mar e o mínimo de 8.0 ± 0.4 cm ($n = 100$) na amostra de Aguda. A amostragem respeitante à variação geográfica do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.5.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

A percentagem de indivíduos de cada geração está representada na figura 3.34. Os talos tetraspóricos estavam presentes em todas as estações de colheita com populações de *C. teedei*, sendo dominantes nas amostras de Aguda, Lavadores, Valadares, A-Ver-o-Mar, Aguçadoura, Apúlia, Praia do Norte e V. P. Âncora; a sua percentagem variou de 8.9 % (Buarcos) a 100.0 % (V. P. Âncora). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras excepto na de V. P. Âncora, tendo variando a sua percentagem de 7.5 % (P. do Norte) a 43.6 % (Buarcos). Os talos não-frutificados estiveram presentes, tal como os gametófitos femininos, em todas as amostras excepto na de V. P. Âncora, com uma percentagem máxima de 47.5 % em Buarcos e mínima de 9.8 % em Lavadores.

A percentagem média de talos não-frutificados foi de 24.2 ± 4.3 % ($n = 11$), a de talos tetraspóricos foi de 48.7 ± 6.9 % ($n = 11$) e a de gametófitos femininos foi de 27.1 ± 4.2 % ($n = 11$).

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

3.3.5.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.35 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.35 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 10.5 ± 0.8 % ($n = 3$) em Lavadores e 22.0 ± 0.9 % ($n = 3$) em Apúlia.

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos tetraspóricos, com 68.0 % do peso seco, de Aguda. Uma amostra de talos não-frutificados de Valadares e gametófitos femininos de Lavadores, apresentaram o conteúdo mínimo, com 10.0 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (14.2 ± 1.7 , $n = 3$) na amostra de Apúlia e o valor máximo (68.0 ± 7.5 %, $n = 3$) na amostra de Aguda. A média global do conteúdo em carragenana foi de 29.7 ± 4.3 % ($n = 11$), com uma média de 24.8 ± 4.4 % ($n = 10$) nos gametófitos femininos, 35.4 ± 5.1 % ($n = 11$) nos tetrasporófitos e 24.0 ± 4.6 % ($n = 10$) nos talos não-frutificados. A percentagem de carragenana foi baixa nas amostras de Apúlia e Praia do Norte; o maior conteúdo em carragenana foi registado nas amostras recolhidas em V. P. Âncora e Aguda.

A variação do conteúdo em carragenana (Figura 3.35 – C) está negativamente correlacionada ($r = -0.4175$) com a variação do peso seco ($p < 0.2$).

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médios apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

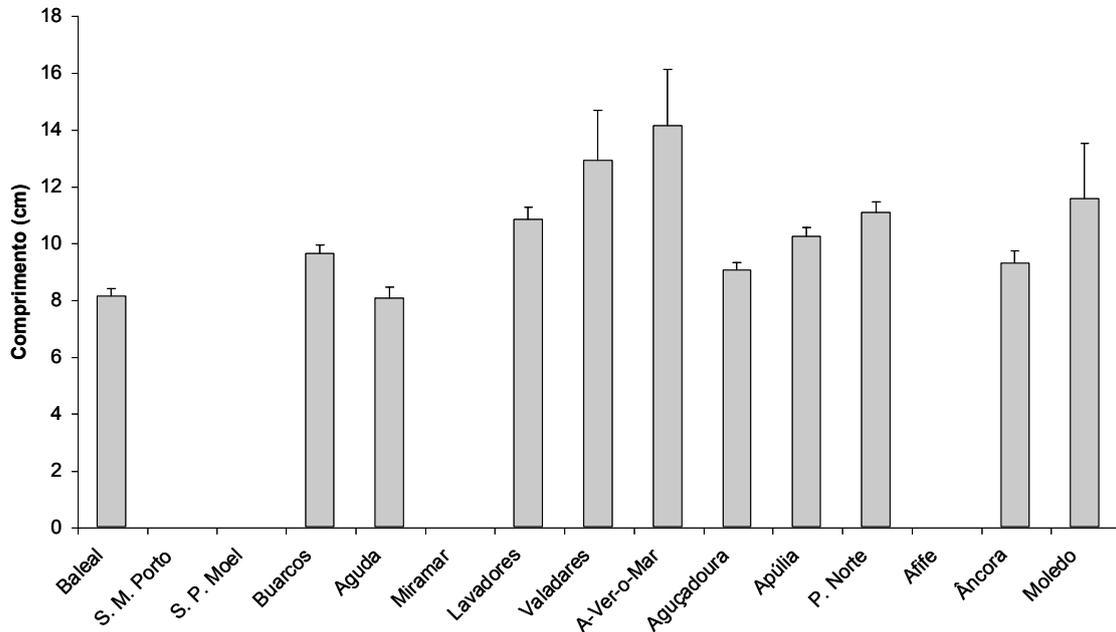


Figura 3.33 – Variação do comprimento de *C. teedei* nas diferentes estações de colheita (média ± erro padrão, $n = 100$).

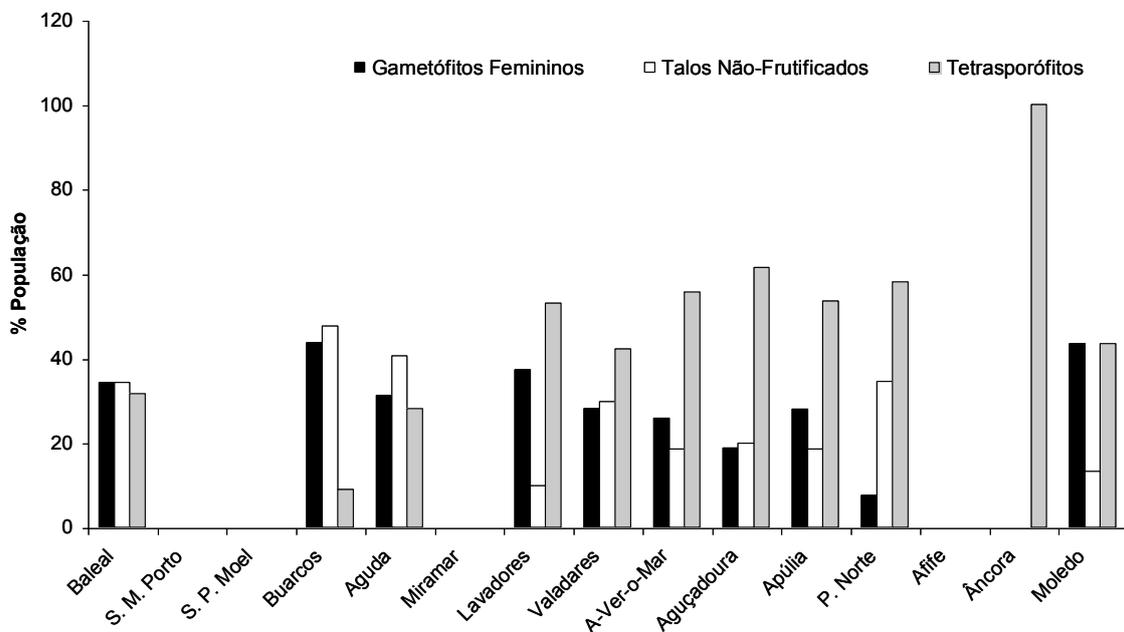


Figura 3.34 – Estrutura da população de *C. teedei* nas diferentes estações de colheita.

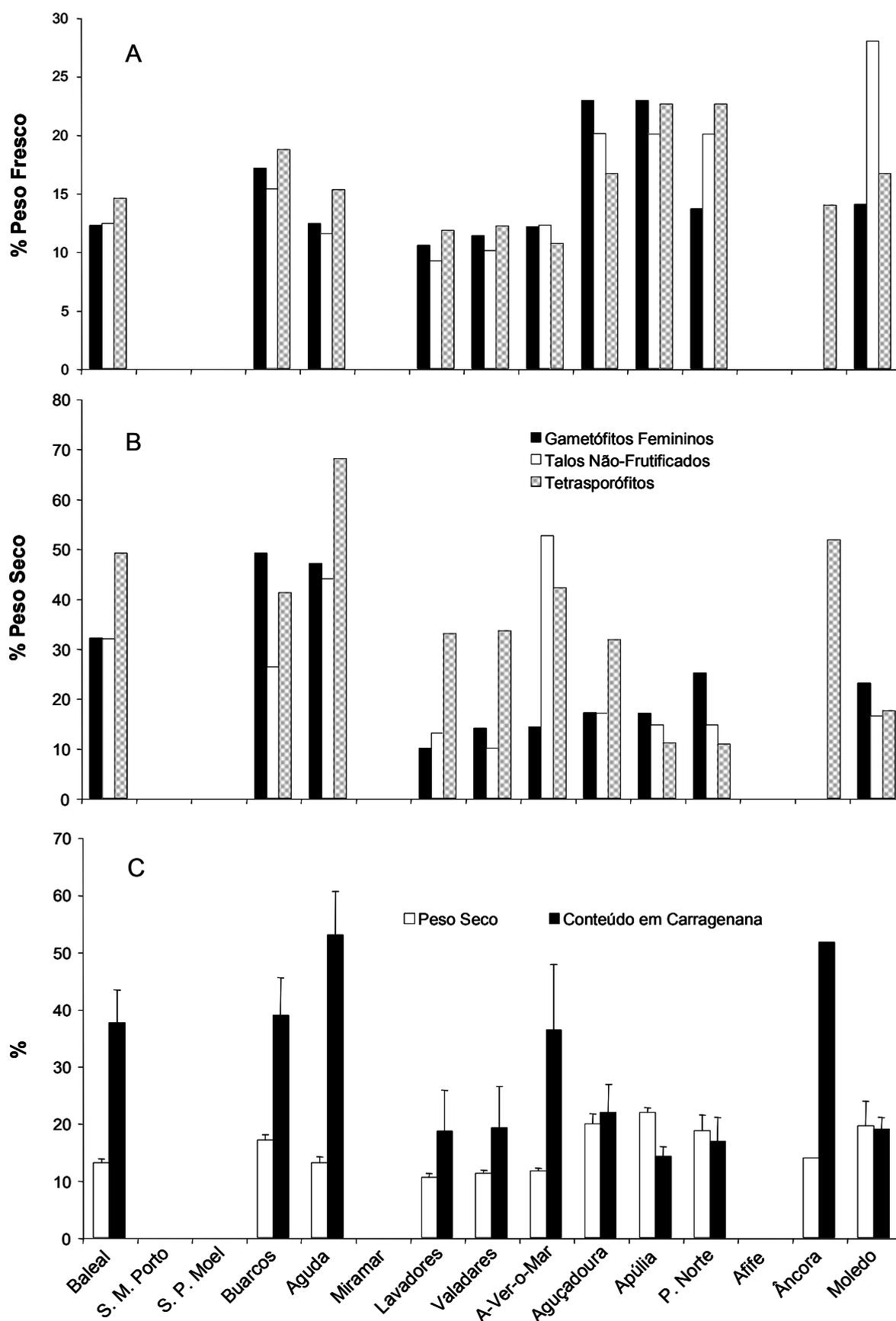


Figura 3.35 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. teedei*. Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (média \pm erro padrão, $n = 3$) (C).

3.3.6 – *C. acicularis*

3.3.6.a – Variação sazonal do comprimento

Devido à natureza dos talos desta espécie, como foi referido em 3.2.6, não foi possível proceder à medição do seu comprimento.

3.3.6.b – Variação sazonal da percentagem de cada geração

Devido às razões apontadas na alínea anterior também não foi feita a determinação mensal da percentagem de indivíduos de cada geração.

3.3.6.c – Variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana

Para que a amostragem, relativamente ao peso seco e conteúdo em carragenana, possuísse significância estatística, os talos foram todos incluídos num único grupo. A variação mensal do peso seco e do conteúdo em carragenana encontra-se representada na Figura 3.36.

O peso seco médio (Figura 3.36), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 17.2 %, na amostra do Baleal e 30.0 %, na amostra da Praia do Norte. A média global de peso seco foi de 21.4 ± 1.4 (n = 5).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado na amostra do Baleal, com 57.0 % do peso seco. Uma amostra de Aguçadoura apresentou o conteúdo mínimo, com 25.8 % do peso seco. A média global do conteúdo em carragenana foi de 42.3 ± 5.1 % (n = 5).

A variação global do conteúdo em carragenana está negativamente correlacionada ($r = -0.8314$) com a variação do peso seco ($p < 0.01$).

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

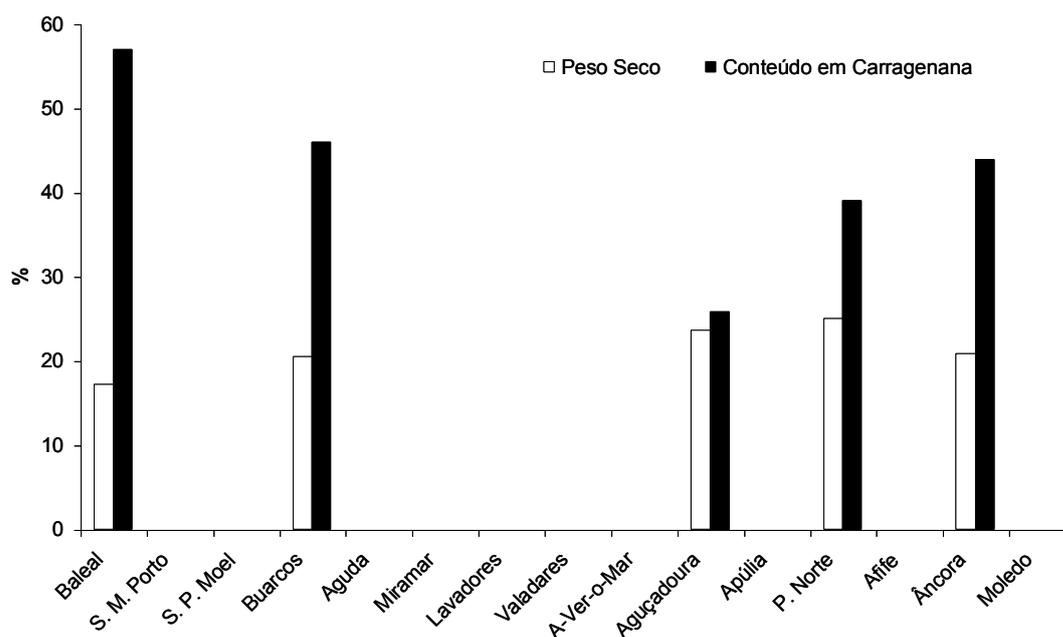


Figura 3.36 – Variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana no *C. acicularis*.

3.3.7 – *M. stellatus*

3.3.7.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta carragenófito, no respeitante ao comprimento (Figura 3.37), foi de 8.5 ± 0.5 cm ($n = 13$); o máximo comprimento médio foi de 12.6 ± 0.9 cm ($n = 100$) na amostra da Praia do Norte e o mínimo de 6.1 ± 0.8 cm ($n = 100$) na amostra de S. M. Porto. A amostragem respeitante à variação geográfica do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.7.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

A percentagem dos indivíduos de cada geração está representada na figura 3.38. Os gametófitos femininos estavam presentes em todas as estações de colheita com populações de *C. crispus*, excepto na amostra de Aguçadoura, sendo dominantes em todas as amostras excepto em Valadares; a sua percentagem variou de 62.7 % (Lavadores) a 100.0 % (Buarcos e Aguda). Os talos não-frutificados estiveram presentes em todas as amostras, excepto em Buarcos e Aguda, tendo variando a sua percentagem de 21.6 % (Afiife) a 100.0 % (Aguçadoura).

A percentagem média de talos não-frutificados foi de 34.9 ± 7.3 % ($n = 13$) e a de gametófitos femininos foi de 65.1 ± 7.3 % ($n = 13$).

Os dados respeitantes à variação geográfica da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

3.3.7.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.39 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.39 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 23.0 ± 1.0 % ($n = 2$) nas amostras de S. M. Porto (e Aguda) e 36.7 ± 0.2 % ($n = 2$) em Moledo.

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos não-frutificados, com 16.9 % do peso seco, da Praia do Norte. Uma amostra de talos não-frutificados de Aguçadoura, apresentou o conteúdo mínimo, com 4.0 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (4.0 %, $n = 1$) na amostra de Aguçadoura e o valor máximo (15.0 ± 0.2 %, $n = 2$) na amostra de Moledo. A média global do conteúdo em carragenana foi de 9.2 ± 0.8 % ($n = 23$), com uma média de 9.2 ± 1.2 % ($n = 12$) nos gametófitos femininos e 9.3 ± 1.3 % ($n = 11$) nos talos não-frutificados.

A variação global do conteúdo em carragenana (Figura 3.39 – C) está correlacionada ($r = 0.5499$) com a variação do peso seco ($p < 0.05$).

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

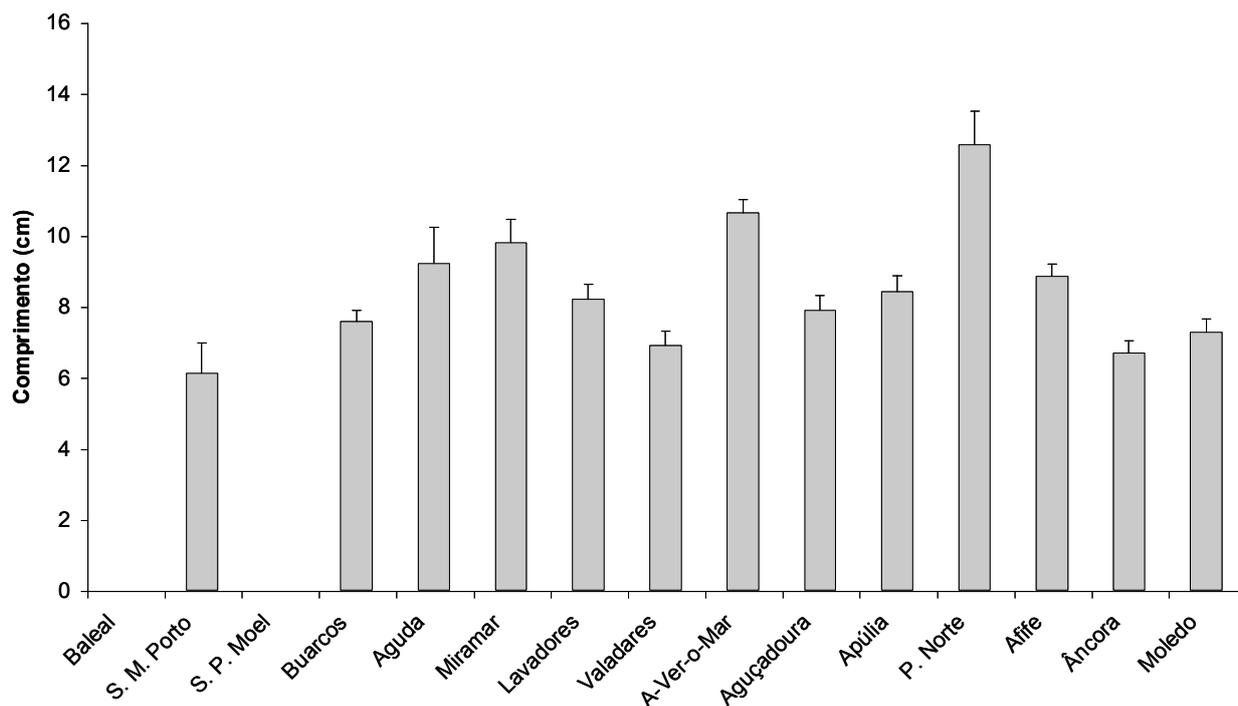


Figura 3.37 – Variação do comprimento de *M. stellatus* nas diferentes estações de colheita (média \pm erro padrão, n = 100).

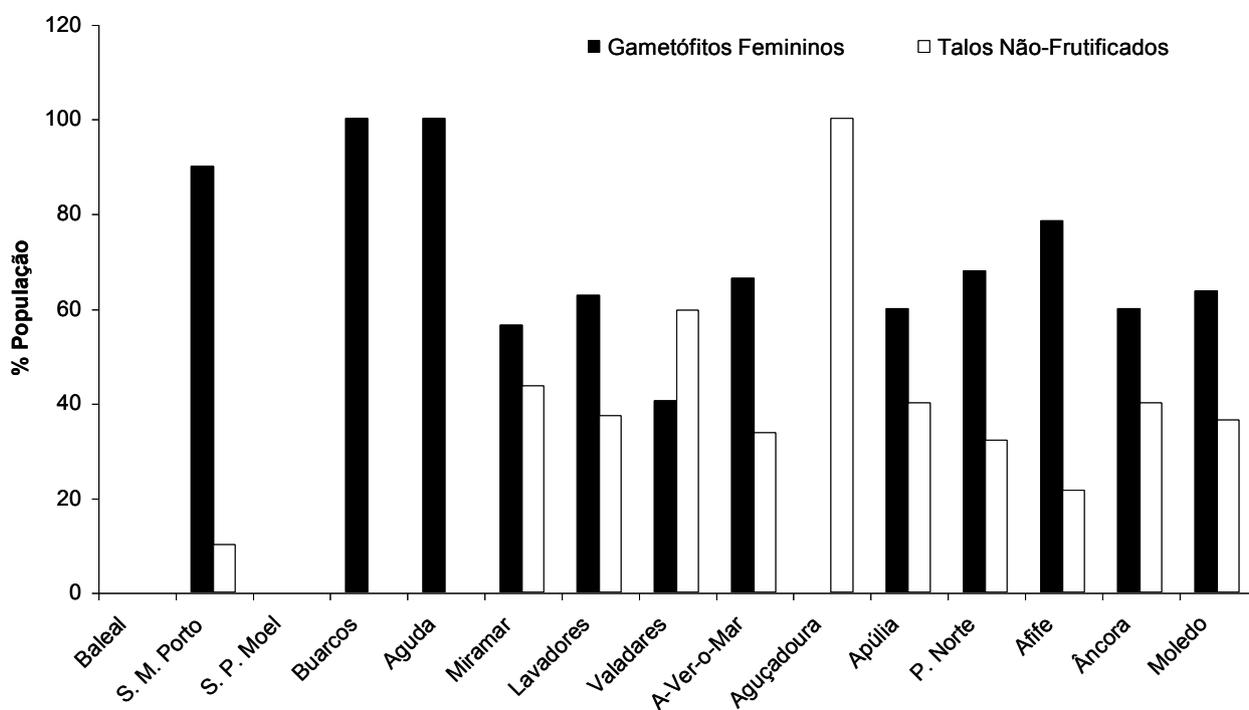


Figura 3.38 – Estrutura da população de *M. stellatus* nas diferentes estações de colheita.

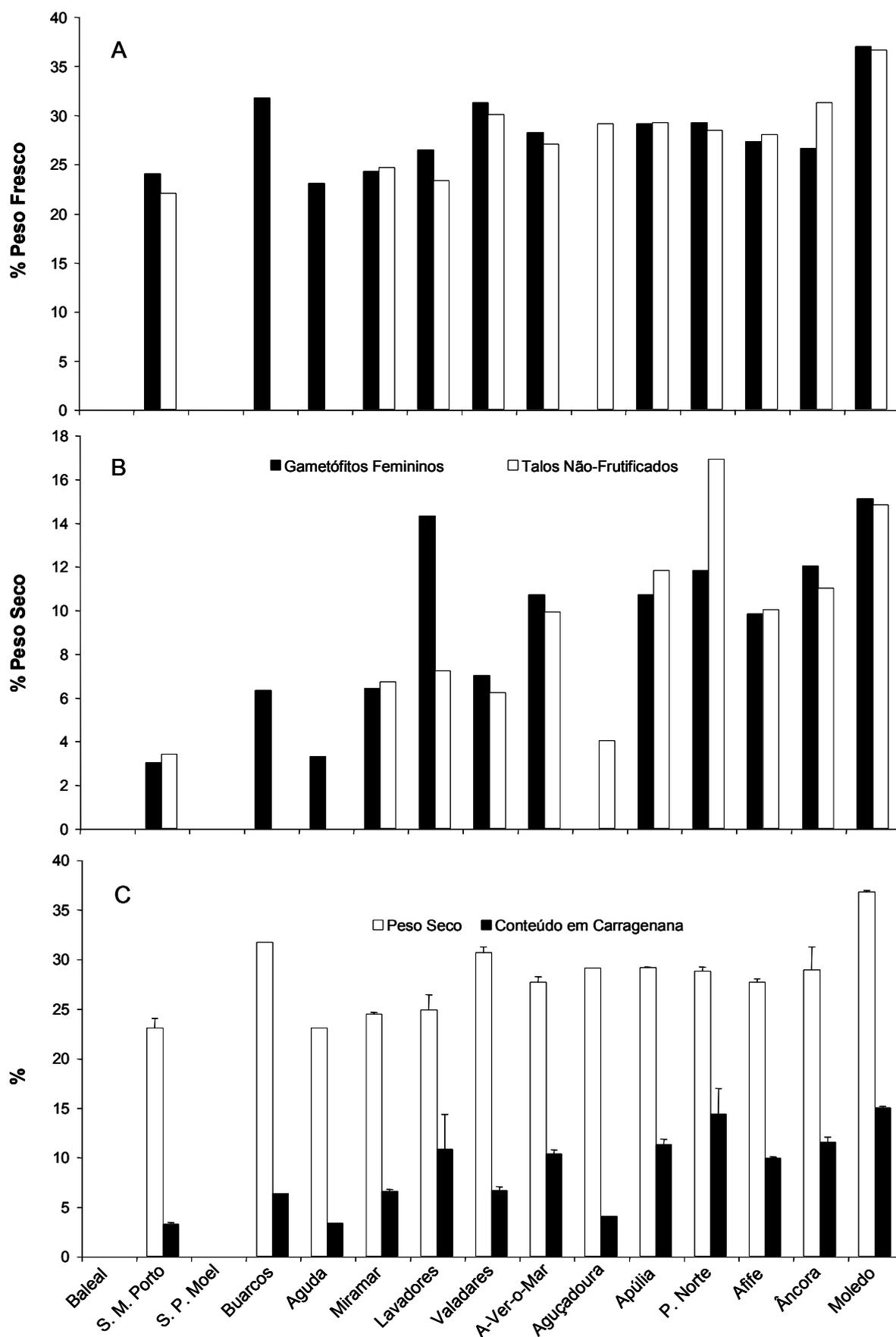


Figura 3.39 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *M. stellatus*. Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (média \pm erro padrão, $n = 2$) (C).

3.3.8 – *A. devoniensis*

3.3.8.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta espécie, no respeitante ao comprimento (Figura 3.40), foi de 4.5 ± 0.3 cm ($n = 7$); o máximo comprimento médio foi de 5.1 ± 0.2 cm ($n = 20 - 50$) em Buarcos e o mínimo de 3.2 ± 0.1 cm ($n = 20 - 50$) no Baleal. A amostragem respeitante à variação sazonal do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.8.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

Devido à existência de um número muito reduzido de talos (ver alínea 3.2.11.c) e para que a amostragem (relativamente ao peso seco e conteúdo em carragenana) possuisse significância estatística, os talos foram todos incluídos num único grupo denominado “gametófitos” (ver características desta alga na alínea 1.3.5.b).

3.3.8.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana encontra-se representada na Figura 3.41.

O peso seco médio, expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 17.0 %, na amostra de S. P. Moel e 19.4 %, na amostra de Miramar. A média global de peso seco foi de 18.4 ± 0.3 ($n = 7$).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado na amostra de Miramar, com 18.0 % do peso seco. Uma amostra de Afife apresentou o conteúdo mínimo, com 1.0 % do peso seco. A média global do conteúdo em carragenana foi de 7.4 ± 2.2 % ($n = 7$).

A variação global do conteúdo em carragenana está correlacionada ($r = 0.7107$) com a variação do peso seco ($p < 0.01$).

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.9 – *G. crenulatus*

3.3.9.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta espécie, no respeitante ao comprimento (Figura 3.42), foi de 5.5 ± 0.2 cm ($n = 14$); o máximo comprimento médio foi de 6.5 ± 0.3 cm ($n = 20 - 50$) em Buarcos e o mínimo de 4.3 ± 0.4 cm ($n = 20 - 50$) no Baleal. A amostragem respeitante à variação sazonal do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.9.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

Todos os talos pertencem à geração tetrasporoblástica (ver características desta alga na alínea 1.3.5.a).

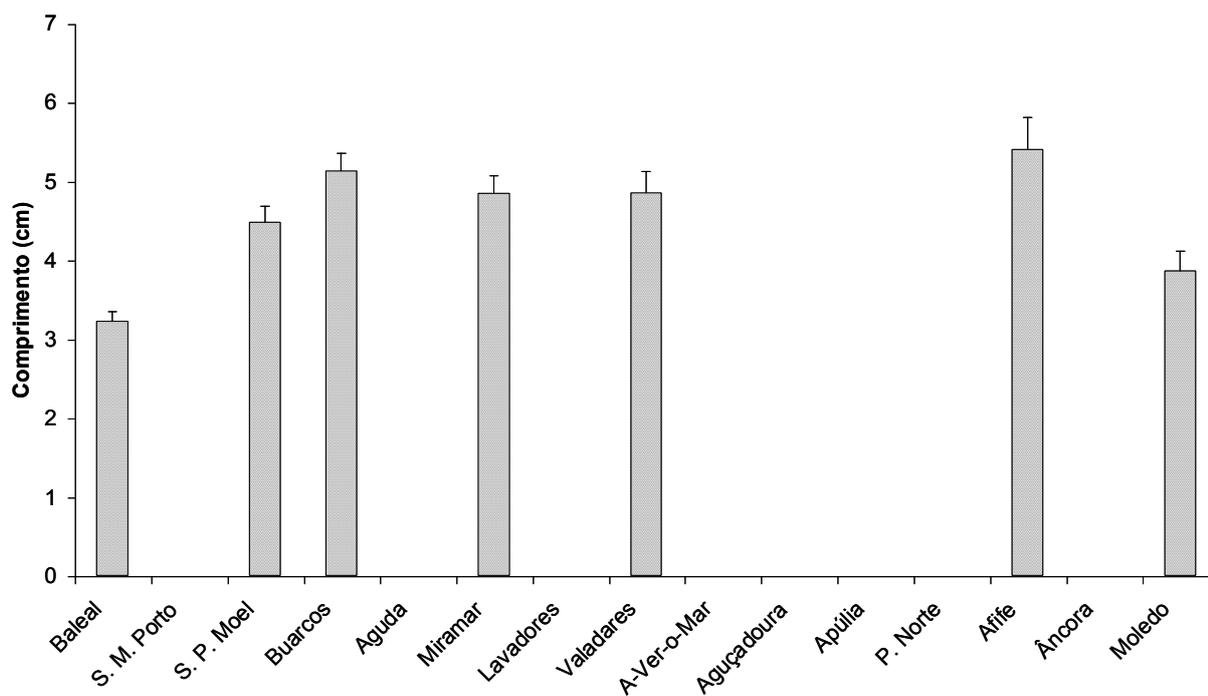


Figura 3.40 – Variação do comprimento de *A. devoniensis* nas diferentes estações de colheita (média \pm erro padrão, n = 20 - 50).

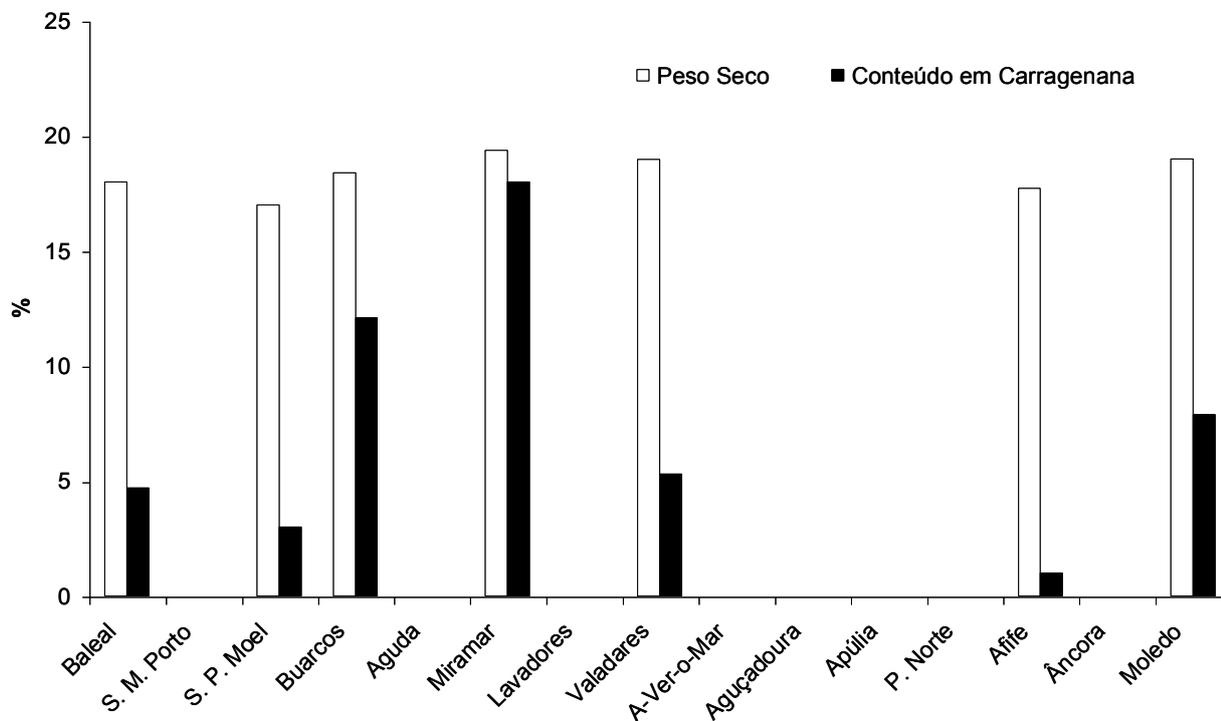


Figura 3.41 – Variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana no *A. devoniensis*.

3.3.9.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação geográfica do peso seco e do conteúdo em carragenana encontra-se representada na Figura 3.43.

O peso seco médio, expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 14.9 %, na amostra de Aguda e 24.6 %, na amostra de Moledo. A média global de peso seco foi de 19.4 ± 0.8 % (n = 14).

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado na amostra de Afife, com 26.1 % do peso seco. As amostras de S. P. Moel e Moledo apresentaram o conteúdo mínimo, com 3.0 % do peso seco. A média anual do conteúdo em carragenana foi de 11.2 ± 2.2 % (n = 14).

Os dados respeitantes à variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.01$).

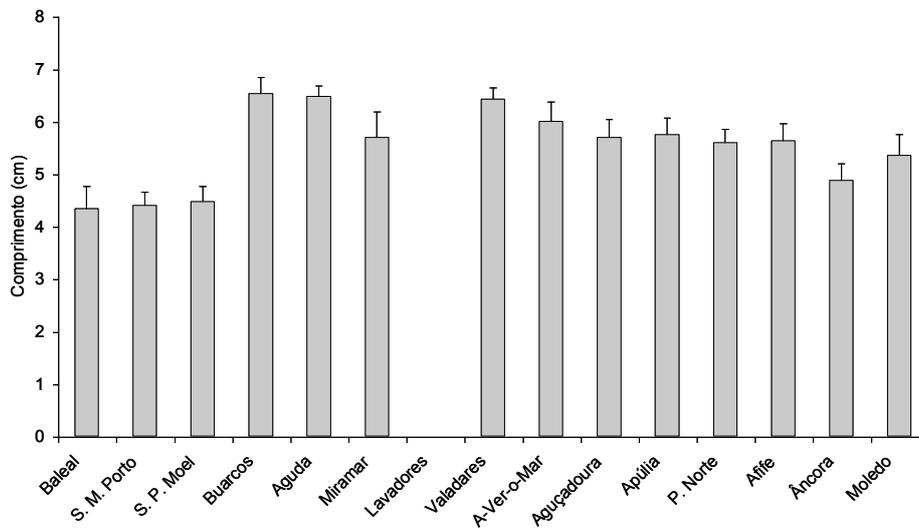


Figura 3.42 – Variação do comprimento de *G. crenulatus* nas diferentes estações de colheita (média ± erro padrão, n = 20 - 50).

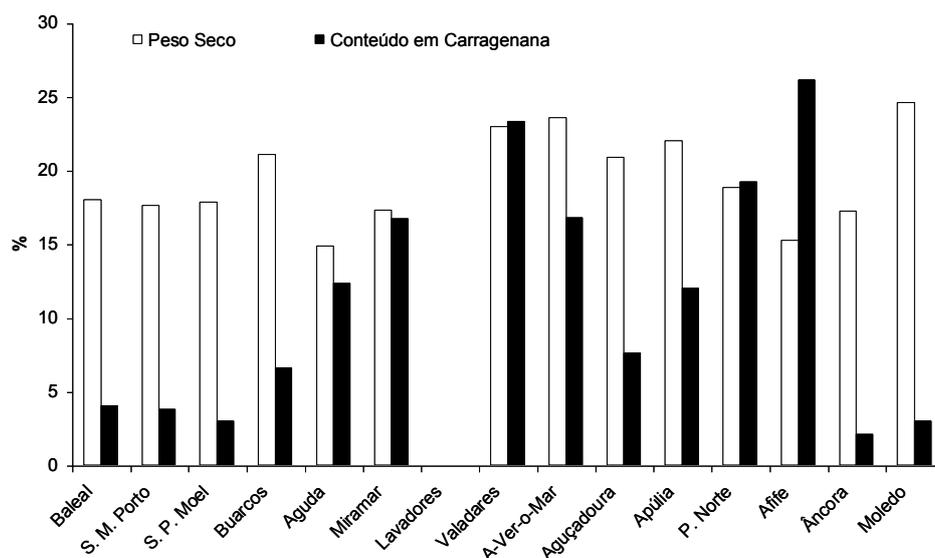


Figura 3.43 – Estrutura da população de *G. crenulatus* nas diferentes estações de colheita.

3.3.10 – *C. jubata*

3.3.10.a – Variação geográfica do comprimento

A média global desta carragenófito, no respeitante ao comprimento (Figura 3.44), foi de 16.5 ± 1.1 cm ($n = 8$); o máximo comprimento médio foi de 21.4 ± 1.0 cm ($n = 20-50$) na amostra de Aguda e o mínimo de 14.8 ± 0.7 cm ($n = 20-50$) na amostra de Miramar. A amostragem respeitante à variação geográfica do comprimento apresenta significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.10.b – Variação geográfica da percentagem de cada geração

A percentagem de indivíduos de cada geração está representada na figura 3.45. Os talos não-frutificados estiveram presentes em todas as amostras, feitas nas estações de colheita com populações de *C. jubata*, sendo dominantes em todas elas, excepto na amostra da Praia do Norte; a sua percentagem variou de 25.0 % (P. Norte) a 100.0 % (Aguçadoura). Os gametófitos femininos estiveram presentes em todas as amostras, excepto na amostra de Aguçadoura, tendo variando a sua percentagem de 15.22 % (A-Ver-o-Mar) a 75.0 % (P. Norte); os gametófitos femininos foram dominantes na amostra da P. Norte. Os tetrasporófitos estiveram presentes nas amostras de Aguda, Miramar e Valadares, com uma percentagem máxima de 13.3 % em Valadares e mínima de 4.2 % na amostra da Miramar.

A percentagem média de talos não-frutificados foi de 71.1 ± 7.8 % ($n = 8$), a de talos tetraspóricos foi de 4.3 ± 2.2 ($n = 8$) e a de gametófitos femininos foi de 25.2 ± 7.8 % ($n = 8$).

Os dados respeitantes à variação sazonal da percentagem de indivíduos de cada geração apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

3.3.10.c – Variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana

A variação mensal do peso seco (% do peso fresco) e do conteúdo em carragenana (% peso seco) dos gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados encontra-se representada na Figura 3.46 – A e B, respectivamente.

O peso seco médio (Figura 3.46 – C), expresso em percentagem do peso fresco, variou entre 9.1 ± 0.7 % ($n = 3$) na amostra de Aguda e 14.3 ± 0.1 % ($n = 2$) em Buarcos.

O conteúdo máximo em carragenana foi encontrado numa amostra de talos não-frutificados, com 34.5 % do peso seco, de Miramar. Uma amostra de tetrasporófitos de Aguda apresentou o conteúdo mínimo, com 9.5 % do peso seco.

O conteúdo médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (20.3 ± 6.3 , $n = 2$) na amostra de A-Ver-o-Mar e o valor máximo (28.9 ± 3.4 %, $n = 2$) na amostra de Buarcos. A média global do conteúdo em carragenana foi de 23.2 ± 1.0 % ($n = 8$), com uma média de 23.1 ± 1.9 % ($n = 7$) nos gametófitos femininos, 28.3 ± 2.1 % ($n = 8$) nos talos não-frutificados e 9.6 ± 0.3 % ($n = 3$) nos tetrasporófitos. A percentagem de carragenana foi relativamente constante de estação para estação, com valores sempre próximos da média global (ver Figura 3.46 - C).

Os dados respeitantes à variação geográfica do peso seco e conteúdo em carragenana médio apresentam significância estatística (ANOVA, $p < 0.001$).

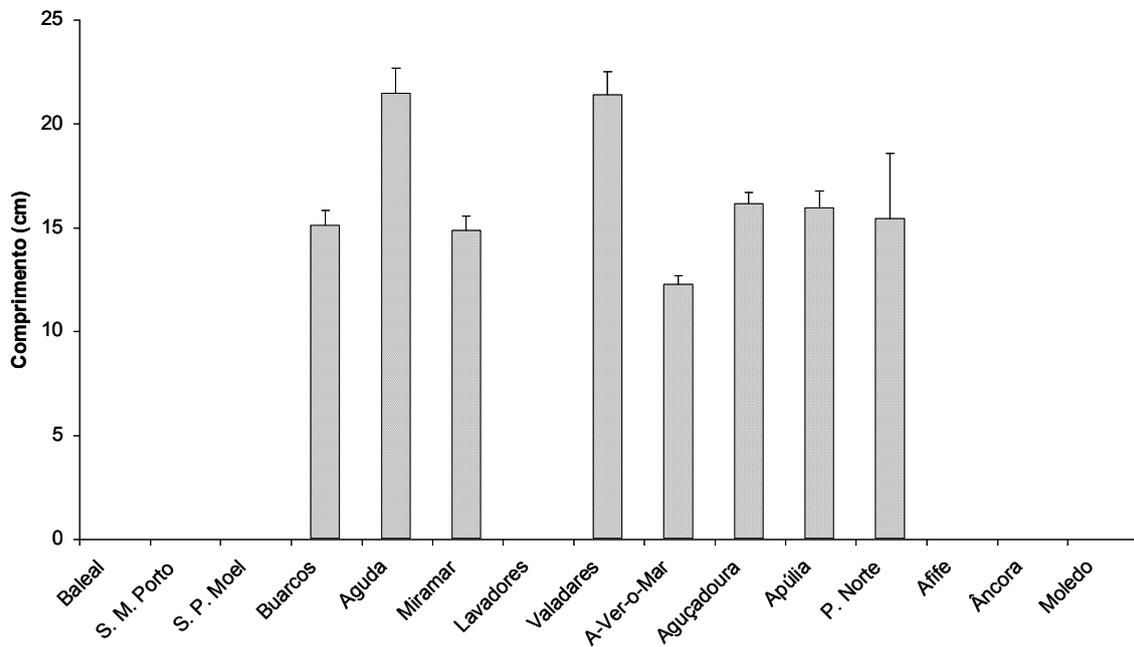


Figura 3.44 – Variação do comprimento de *C. jubata* nas diferentes estações de colheita (média \pm erro padrão, $n = 50 - 100$).

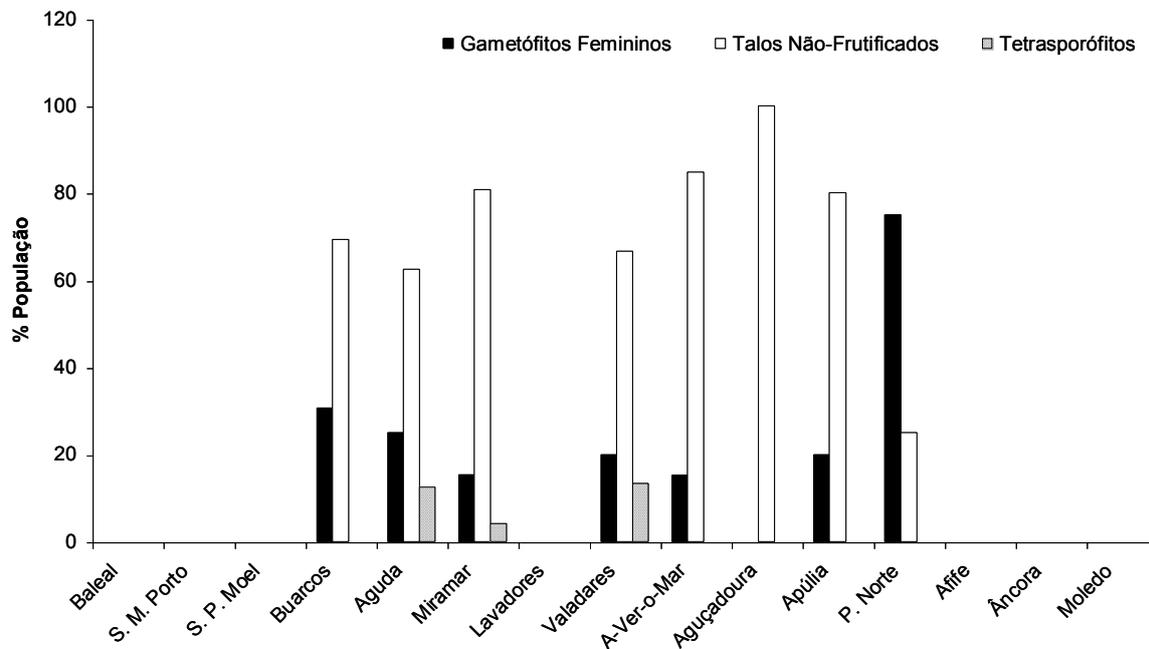


Figura 3.45 – Estrutura da população de *C. jubata* nas diferentes estações de colheita.

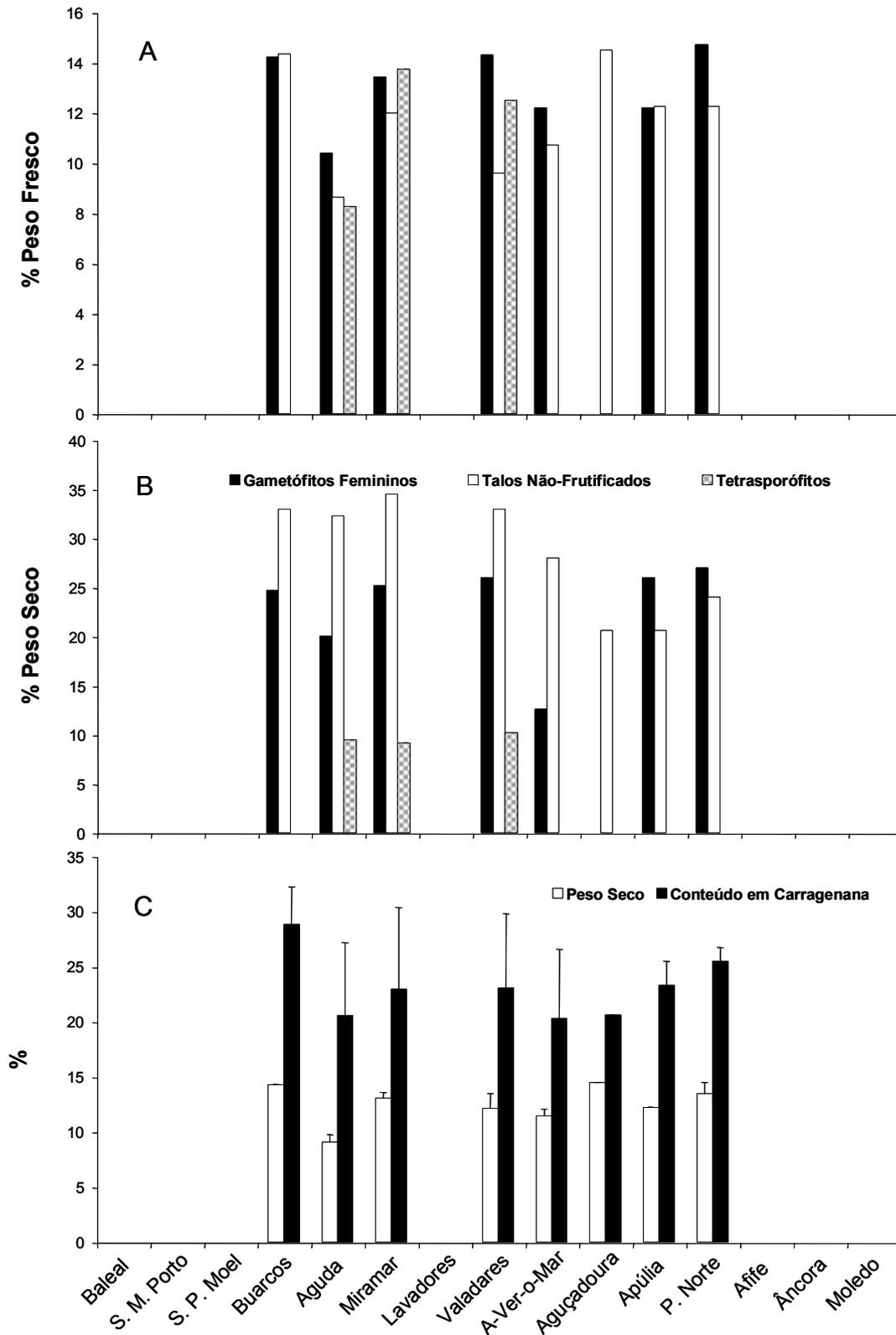


Figura 3.46 – Variação geográfica do peso seco (A), do conteúdo em carragenana (B) nas diferentes gerações de *C. jubata*. Variação do peso seco e conteúdo em carragenana (média \pm erro padrão, n = 2 - 3) (C).

3.3.11 – Estudo comparativo das carragenófitas de distintas origens geográficas

3.3.11.a – Comprimento

O comprimento médio de cada carragenófitas estudada encontra-se representado na Figura 3.47.

O *C. jubata* é a carragenófitas de maior porte, com 16.5 ± 1.1 cm (n = 8) e a carragenófitas de menores dimensões é o *A. devoniensis*, com 4.5 ± 0.3 cm (n = 7).

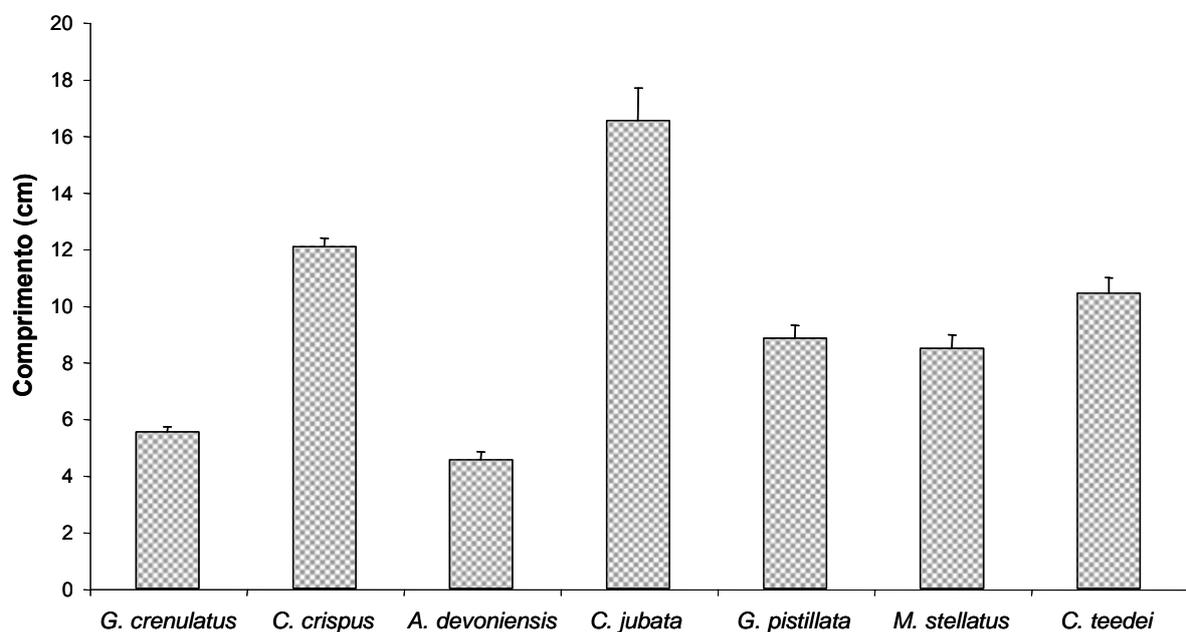


Figura 3.47 - Comprimento médio de cada carragenófitas (média \pm erro padrão).

3.3.11.b – Peso seco e conteúdo em carragenana

O peso seco e conteúdo em carragenana médios, de cada carragenófitas estudada, encontram-se representados na Figura 3.48.

O Peso seco global médio, expresso em percentagem de peso fresco, teve o seu valor mínimo (12.5 ± 6.3 %, n = 2) nas amostras de *C. jubata* e o valor máximo (28.1 ± 3.4 %, n = 2) nas amostras de *M. stellatus*.

O conteúdo global médio em carragenana, expresso em percentagem de peso seco, teve o seu valor mínimo (7.4 ± 2.2 %, n = 7) nas amostras de *A. devoniensis* e o valor máximo (42.3 ± 5.1 %, n = 5) nas amostras de *C. acicularis*.

3.3.12 – Estudo comparativo global das carragenófitas

3.3.12.a – Peso seco

Os dados comparativos entre a amostragem sazonal (realizada na Baía de Buarcos) e a amostragem geográfica, relativos ao peso seco, encontram-se representados na Figura 3.49. O *M. stellatus* apresenta, em qualquer das amostragens, o maior peso seco (28.1 ± 1.1 %, $n = 13$, na amostragem geográfica e 28.6 ± 0.6 %, $n = 14$, na amostragem sazonal). O *C. jubata* apresenta o menor peso seco (12.5 ± 0.6 %, $n = 8$, na amostragem geográfica e 10.8 ± 0.5 %, $n = 14$, na amostragem sazonal).

Os dados relativos ao peso seco, nos dois tipos de amostragem, apresentam um elevado coeficiente de correlação ($r = 0.8366$, $p < 0.01$).

3.3.12.b – Conteúdo em carragenana

Os dados comparativos entre a amostragem sazonal (realizada na Baía de Buarcos) e a amostragem geográfica, relativos ao conteúdo em carragenana, encontram-se representados na Figura 3.50. O *C. acicularis* apresenta, em qualquer das amostragens, o maior conteúdo em carragenana (42.3 ± 5.1 %, $n = 5$, na amostragem geográfica e 40.1 ± 2.7 %, $n = 13$, na amostragem sazonal). O *A. devoniensis* apresenta o menor peso seco (7.4 ± 2.2 %, $n = 7$, na amostragem geográfica e 10.4 ± 0.5 %, $n = 13$, na amostragem sazonal).

Os dados relativos ao conteúdo em carragenana, nos dois tipos de amostragem, apresentam um elevado coeficiente de correlação ($r = 0.8716$, $p < 0.01$).

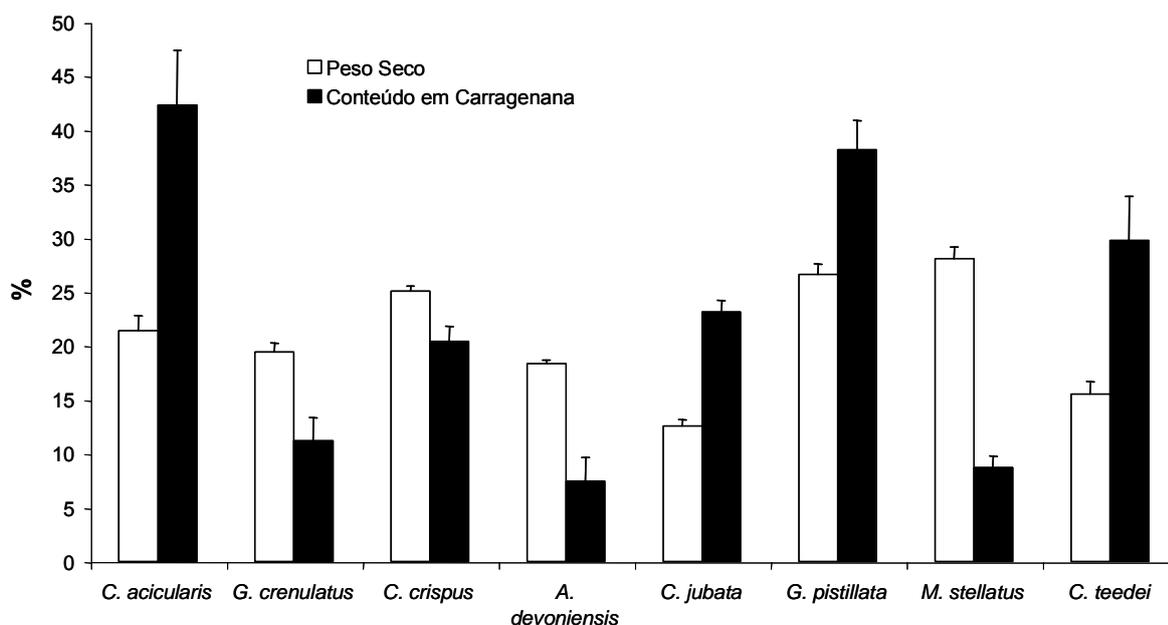


Figura 3.48 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) de cada carragenófitas

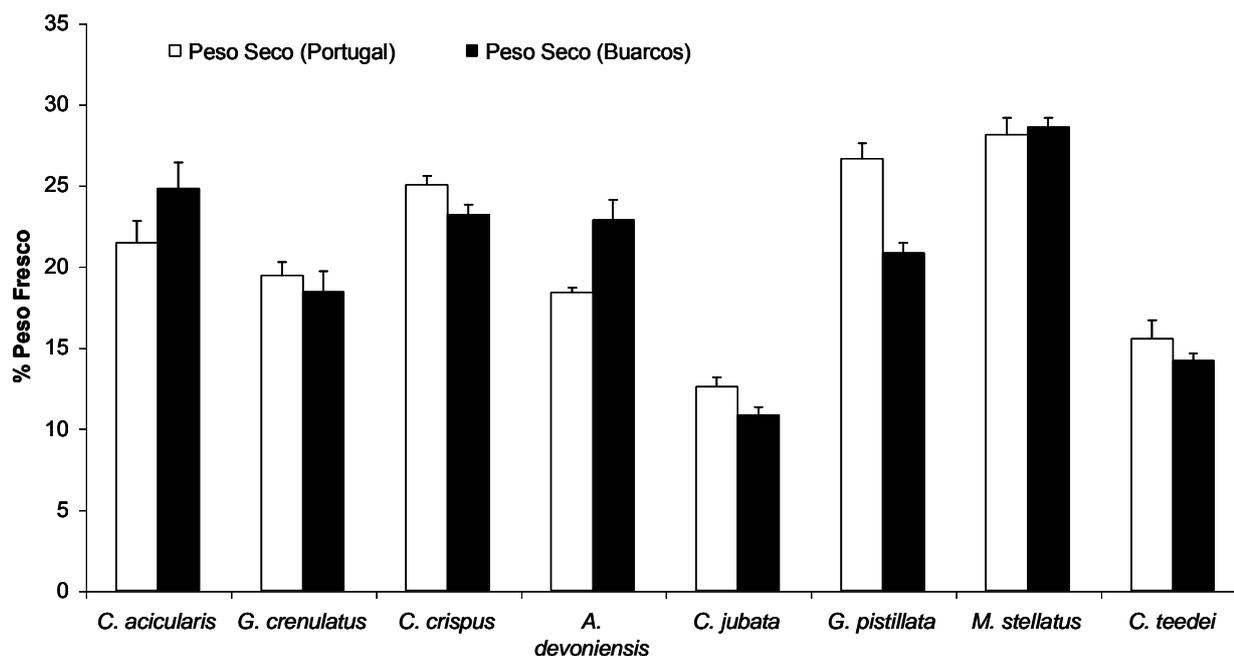


Figura 3.49 – Estudo comparativo das carragenófitas relativamente ao peso seco (média \pm erro padrão).

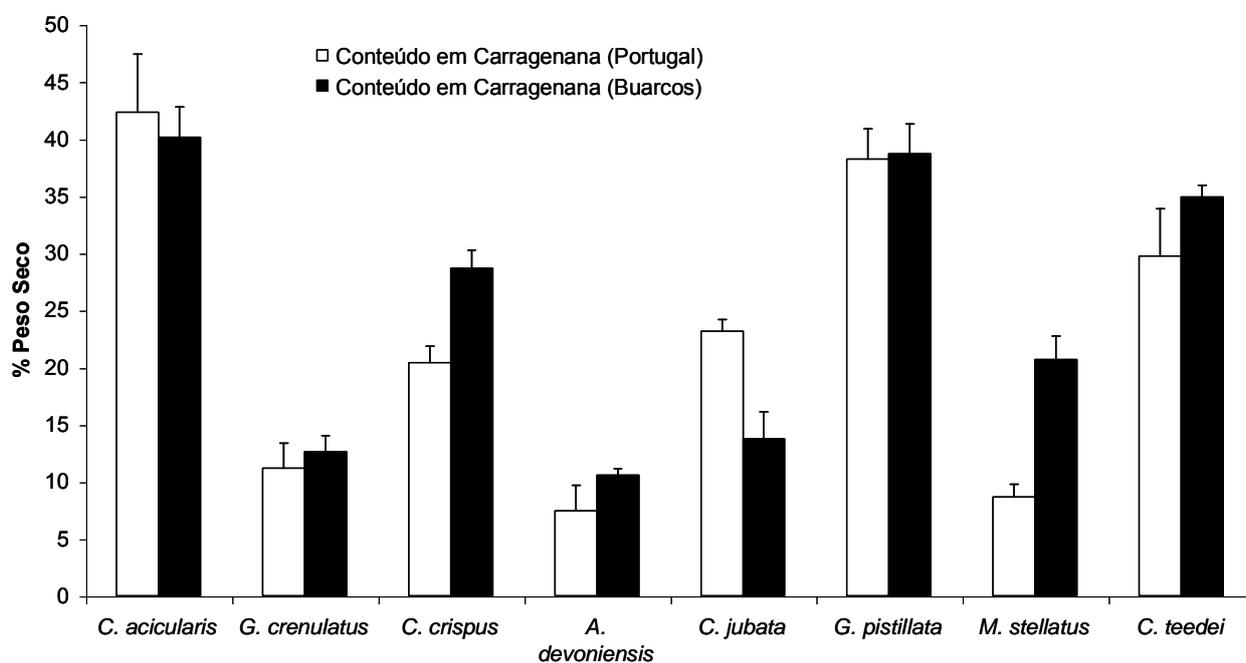


Figura 3.50 – Estudo comparativo das carragenófitas relativamente ao conteúdo em carragenana (média \pm erro padrão).

3.4 – Cultura laboratorial

3.4.1 – Evolução da biomassa

3.4.1.a – *M. stellatus*

O material algal foi cultivado em aquário de 100 litros por um período de adaptação de 1 mês. Seguidamente, 40.4 g (peso escorrido) de *M. stellatus* foram colocados no interior do cilindro de “plexiglass”, em 22 litros de água do mar filtrada, pH 8.0, 31 S‰, 16 ± 1 °C. O meio de cultura foi enriquecido com PES cada 5 dias. A cultura de *M. stellatus*, em cilindro de “plexiglass”, teve uma duração total de 57 dias.

A evolução do biomassa (peso fresco) e da velocidade de crescimento (percentagem por dia) encontra-se representada na Figura 3.51. A média global de crescimento foi de 0.3 ± 0.1 % dia⁻¹, com uma média de 0.4 ± 0.2 % dia⁻¹ no primeiro mês e 0.2 ± 0.02 % dia⁻¹, no segundo mês.

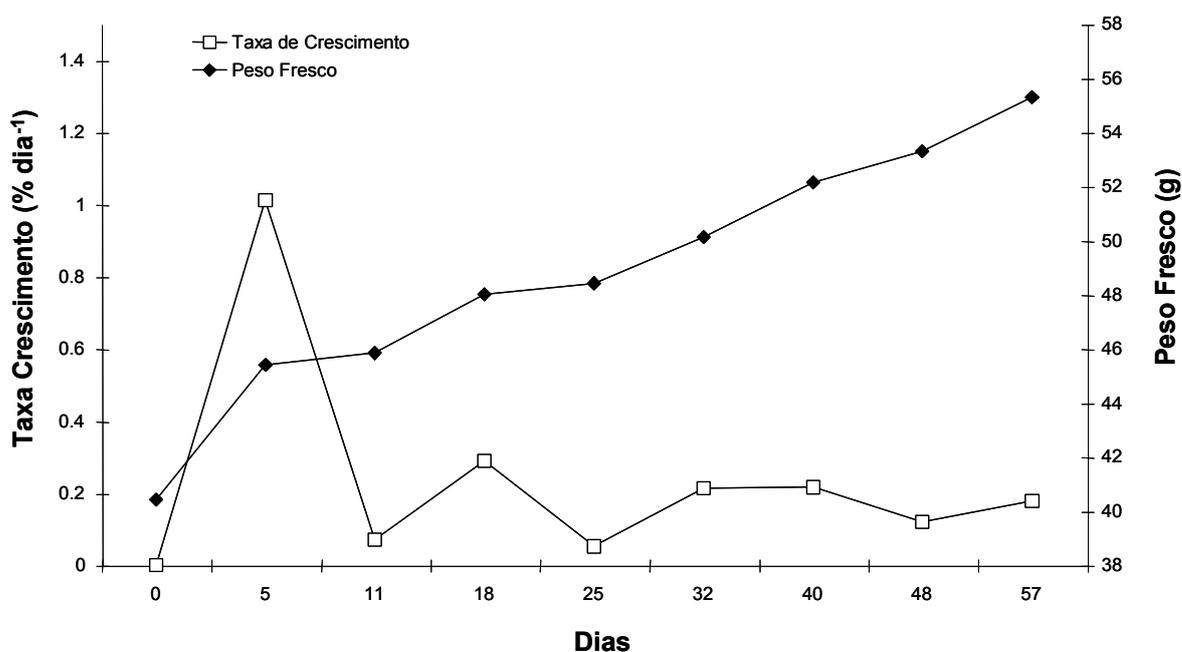


Figura 3.51 - Evolução do peso fresco (peso escorrido) e da velocidade de crescimento (percentagem por dia) do *M. stellatus* cultivado em cilindro de “plexiglass”.

3.4.1.b – *G. pistillata*

O material algal foi cultivado em aquário de 100 litros por um período de adaptação de 1 mês. Seguidamente, 40.9 g (peso escorrido) de *M. stellatus* foram colocados no interior do cilindro de “plexiglass”, em 22 litros de água do mar filtrada,

pH 8.0, 31 S‰, 16 ± 1 °C. O meio de cultura foi enriquecido com PES cada 5 dias. A cultura de *G. pistillata*, em cilindro de “plexiglass”, teve uma duração total de 55 dias.

A evolução do biomassa (peso fresco) e da velocidade de crescimento (percentagem por dia) encontra-se representada na Figura 3.52. A média global de crescimento foi de 0.2 ± 0.1 % dia⁻¹, com uma média de 0.2 ± 0.1 % dia⁻¹ no primeiro mês e 0.1 ± 0.01 % dia⁻¹, no segundo mês.

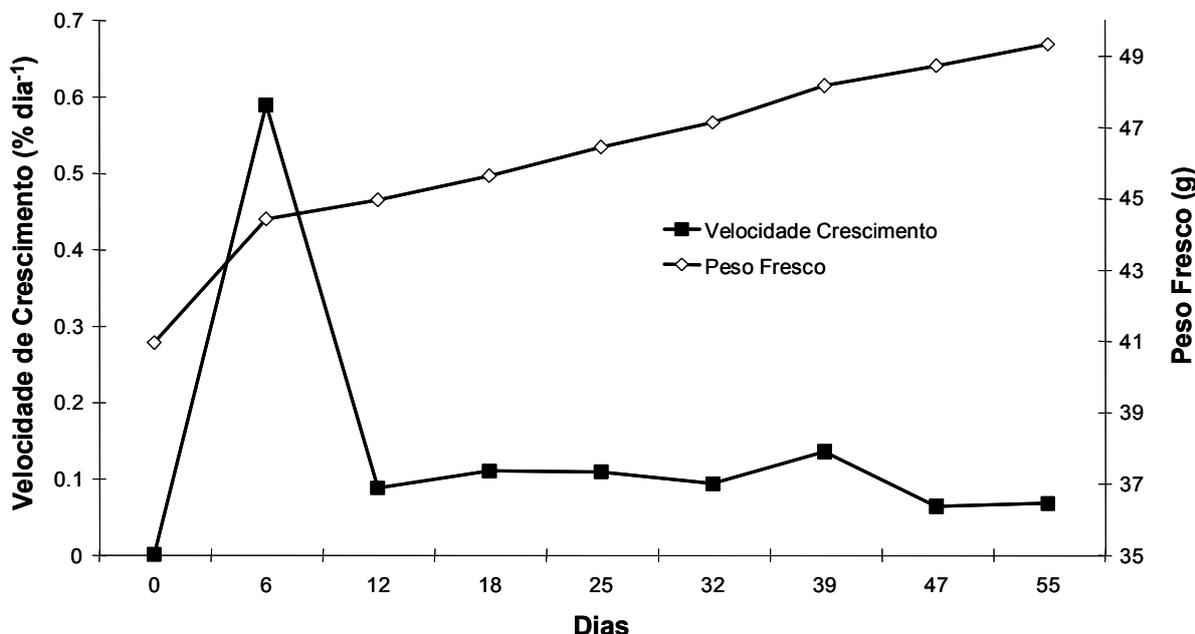


Figura 3.52 - Evolução do peso fresco (peso escorrido) e da velocidade de crescimento (percentagem por dia) da *G. pistillata* cultivada em cilindro de “plexiglass”.

3.4.2 – Estudo comparativo da relação peso seco/peso fresco e conteúdo em carragenanas entre o material cultivado e o material selvagem

3.4.2.a – *M. stellatus*

O peso seco (% do peso fresco) e o conteúdo em carragenana (% peso seco) do *M. stellatus* (gametófitos) – material selvagem, material cultivado em aquário (cultura de manutenção) e em cilindro de “plexiglass” – encontram-se representados na Figura 3.53.

Relativamente ao material selvagem, houve um incremento do conteúdo de carragenana no material cultivado em aquário (52 dias de cultura) e um decréscimo no material cultivado em cilindro de “plexiglass” (57 dias de cultura).

No que respeita ao peso seco, houve um incremento deste parâmetro no material cultivado no cilindro de “plexiglass” relativamente ao material selvagem. Os dados referentes ao peso seco estão negativamente correlacionados com os dados referentes ao conteúdo em carragenana ($r = -0.8199$, $p < 0.01$).

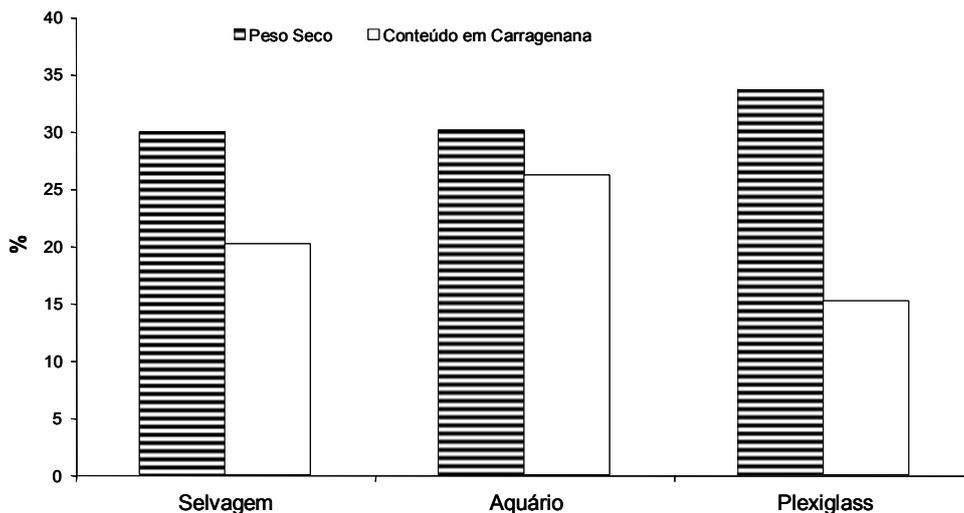


Figura 3.53 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) do *M. stellatus* selvagem, cultivada em aquário e em cilindro de “plexiglass”.

3.4.2.b – *G. pistillata*

O peso seco (% do peso fresco) e o conteúdo em carragenana (% peso seco) da *G. pistillata* (gametófitos femininos) – material selvagem, material cultivado em aquário (cultura de manutenção) e em cilindro de “plexiglass” – encontram-se representados na Figura 3.54.

Relativamente ao material selvagem, houve um decréscimo do conteúdo de carragenana no material cultivado; o decréscimo de conteúdo em carragenana foi mais acentuado no material cultivado em cilindro de “plexiglass”.

No que respeita ao peso seco, houve um ligeiro incremento deste parâmetro no material cultivado em aquário (52 dias de cultura) e um incremento mais notório no cilindro de “plexiglass” (55 dias de cultura), relativamente ao material selvagem. Os dados referentes ao peso seco estão negativamente correlacionados com os dados referentes ao conteúdo em carragenana ($r = -0.9616$, $p < 0.01$).

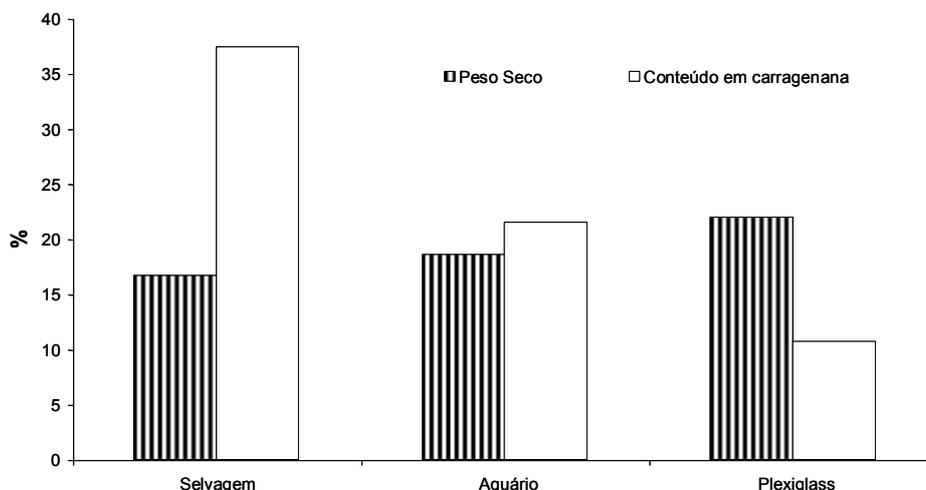


Figura 3.54 – Peso seco (% peso fresco) e conteúdo em carragenana (% peso seco) do *G. pistillata* selvagem, cultivada em aquário e em cilindro de “plexiglass”.

3.5 – Análise das carragenanas por espectroscopia vibracional

3.5.1 - Análise por FTIR-ATR de amostras padrão de carragenana

A Tabela 3.5-A agrupa os picos de absorção dos 8 principais tipos de carragenana.

A banda larga a 1240 cm^{-1} , observada em todos os espectros, está relacionada com o modo de vibração de tensão dos grupos S=O. Por essa razão, a sua intensidade relativa está relacionada com o conteúdo, na amostra, dos grupos éster S=O.

Em contraste com esta banda, sempre presente nas amostras de polissacarídeos sulfatados, existem diversas bandas vibracionais que são características das carragenanas. A banda de absorção a 930 cm^{-1} , por exemplo, está relacionada com as vibrações das pontes 3,6-anidrogactose, estando presente nos espectros das carragenanas kappa, iota e theta. Além desta, a banda a 845 cm^{-1} , associada às vibrações do $C_{(4)}\text{-O-SO}_3$, fragmento da gactose sulfatada, é característica dos espectros da carragenana kappa, mu, iota e nu. Por outro lado, a banda a 805 cm^{-1} , relacionada com as vibrações em torno de $C_{(2)}\text{-O-SO}_3$, fragmento da 3,4-anidrogactose sulfatada, só é observada nos espectros da carragenana iota e theta. Assim, a intensidade relativa dos picos 805 cm^{-1} e 845 cm^{-1} (rácio $805/845\text{ cm}^{-1}$) permitem determinar o rácio iota/kappa nas carragenanas híbridas.

O FTIR-ATR da carragenana kappa (Figura 3.55 - B) apresenta um pico a 845 cm^{-1} , relacionado com a presença de D-gactose-4-sulfato (G4S) e um pico proeminente a aproximadamente 930 cm^{-1} , que indica a presença de 3,6-anidro-D-gactose (DA).

A Figura 3.56 – B apresenta o espectro da carragenana iota. O espectro desta carragenana possui, tal como o da carragenana kappa, os picos a 845 cm^{-1} e a 930 cm^{-1} . Uma nova característica espectral surge aproximadamente a 805 cm^{-1} , indicando a presença do éster sulfato na posição 2 dos resíduos de anidro-D-gactose (DA2S), típico deste tipo de carragenana.

A Figura 3.57 – B apresenta o espectro da carragenana híbrida kappa/iota (extraída dos talos não frutificados de *C. teedei* var. *lusitanicus*). Este espectro apresenta uma forte absorvância a 1240 cm^{-1} (éster sulfato) e três outras bandas a 805 cm^{-1} (DA2S), a 845 cm^{-1} (G4S) e 930 cm^{-1} (DA). O grau de hibridização pode ser avaliado a partir do rácio entre a intensidade de absorção da banda 805 cm^{-1} e da banda 845 cm^{-1} .

Visto tratar-se de um espectro de uma carragenana obtida por extracção total (extracção aquosa – ver alínea 2.8.1) são visíveis alguns picos adicionais a 820 cm^{-1} (G/D6S), 825 cm^{-1} (G/D2S) e 867 cm^{-1} (G/D6S), correspondentes à presença dos precursores da carragenana kappa (carragenana mu) e da carragenana iota (carragenana nu).

O espectro FTIR-ATR da carragenana híbrida beta/kappa (extraída do *Betaphycus gelatinum*, Figura 3.58 - B) apresenta uma banda típica a $890\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, relacionada com a presença de β -D-gactose não sulfatada (G/D), presente na carragenana beta e uma banda a 845 cm^{-1} (G4S), relacionada com a presença de carragenana kappa.

O espectro FTIR-ATR da carragenana lambda (Figura 3.59 – B) apresenta uma banda larga entre os 820 e os 830 cm^{-1} , indicando a presença de um elevado conteúdo em éster sulfato.

A Figura 3.60 – C apresenta o espectro da carragenana híbrida ksi/theta (extraída dos tetrasporófitos de *C. teedei* var. *lusitanicus*). Este espectro apresenta uma banda estreita entre os 820 cm^{-1} e os 830 cm^{-1} .

Tabela 3.5-A – Identificação dos diferentes tipos de carragenana por FTIR-ATR. As carragenanas encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego e pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Ponte(s)/Grupo (s)	Código de letras	Tipo de Carragenana							
			Kappa (κ)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Beta (β)	Theta (θ)	Lambda (λ)	Ksi (ξ)
1240-1260	S=O dos ésteres sulfato		++	++	++	+++	-	++	+++	++
1070	C-O da 3,6-anidrogactose	DA	+	-	+	-	+	o	-	-
970-975	Galactose	G/D	+	o	+	o	+	+	-	-
930	C-O da 3,6-anidrogactose	DA	+	-	+	-	+	+	-	-
905	C-O-SO ₃ em C ₂ da 3,6-anidrogactose	DA2S	-	-	+	-	-	+	-	-
890-900	β-D-galactose não sulfatada	G/D	-	-	-	-	+	-	-	-
867	C-O-SO ₃ em C ₆ da galactose	G/D6S	-	+	-	+	-	-	+	-
845	C-O-SO ₃ em C ₄ da galactose	G4S	+	+	+	+	-	-	-	-
825-830	C-O-SO ₃ em C ₂ da galactose	G/D2S	-	-	-	+	-	+	+	a
815-820	C-O-SO ₃ em C ₆ da galactose	G/D6S	-	+	-	+	-	-	+	-
805	C-O-SO ₃ em C ₂ da 3,6-anidrogactose	DA2S	-	-	+	-	-	+	-	-

-, ausente; +, médio; ++, proeminente; +++, muito proeminente; o, pico em forma de ombro; a, pico agudo.

3.5.2 - Análise por FT-Raman de amostras padrão de carragenana

A Tabela 3.5-B agrupa os picos de absorção das 8 principais fracções de carragenana.

Tal como acontece nos espectros de FTIR-ATR, a presença de uma banda larga a 1240-1260 cm⁻¹, observada em todos os espectros (excepto no de carragenana beta), está relacionada com o conteúdo total, na amostra, de ésteres sulfato.

O FT-Raman da carragenana kappa (Figura 3.55 - A) apresenta um pico proeminente a 845-850 cm⁻¹, relacionado com a presença de D-galactose-4-sulfato (G4S) e um pico a 925-935 cm⁻¹, que indica a presença de 3,6-anidro-D-galactose (DA).

A Figura 3.56 - A apresenta o espectro da carragenana iota. O espectro desta carragenana possui, para além dos picos a 845-850 cm⁻¹ e 925-935 cm⁻¹, também presentes na carragenana kappa, um pico a 804-808 cm⁻¹, que indica a presença do éster sulfato na posição 2 dos resíduos de anidro-D-galactose (DA2S).

A Figura 3.57 - B apresenta o espectro da carragenana híbrida kappa/iota (extraída do *C. teedei* var. *lusitanicus*, talos não frutificados). Este espectro apresenta uma forte absorvância a 1250 cm⁻¹ (éster sulfato) e três outras bandas: 805 cm⁻¹ (DA2S), 847 cm⁻¹ (G4S) e 930 cm⁻¹ (DA).

Visto tratar-se de um espectro de uma carragenana nativa, obtido pelo método de extracção total, são visíveis alguns picos adicionais a 820 cm⁻¹ (G/D6S), 825 cm⁻¹

(G/D2S) e 867 cm^{-1} (G/D6S), correspondentes à presença dos precursores da carragenana kappa (carragenana mu) e da carragenana iota (carragenana nu). Os picos 825 cm^{-1} e 867 cm^{-1} são mais visíveis no espectros de FT-Raman do que nos de FTIR-ATR (ver Figura 3.57 – A e C).

O espectro FT-Raman da carragenana beta (extraída do *Betaphycus gelatinum*) encontra-se representado na Figura 3.58 – A. Este espectro apresenta uma banda típica a $890\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, relacionada com a presença de β -D-galactose não sulfatada (G/D).

O espectro FT-Raman da carragenana lambda (Figura 3.59 – A) apresenta duas bandas na região espectral $815\text{-}830\text{ cm}^{-1}$: uma a $815\text{-}825\text{ cm}^{-1}$ (G/D6S) e outra a $825\text{-}830\text{ cm}^{-1}$ (G/D2S).

A Figura 3.60 – A apresenta o espectro da carragenana híbrida ksi/theta (extraída dos tetrasporófitos de *C. teedei* var. *lusitanicus*). Este espectro apresenta 3 bandas na região espectral $815\text{-}850\text{ cm}^{-1}$: $825\text{-}830\text{ cm}^{-1}$ (G/D2S), referente à carragenana theta; $815\text{-}825\text{ cm}^{-1}$ (G/D6S) e $845\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ (G4S), referente à carragenana ksi.

Tabela 3.5-B – Identificação dos diferentes tipos de carragenana por FT-Raman. As carragenanas encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego e pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Nº de Onda (cm^{-1})	Ponte(s)/Grupo(s)	Código de letras	Tipo de Carragenana							
			Kappa (κ)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Beta (β)	Theta (θ)	Lambda (λ)	Ksi (ξ)
1240-1260	S=O dos ésteres sulfato		++	++	++	+++	-	++	++	++
1075-1085	C-O da 3,6-anidrogalactose	DA	+++	-	+++	-	+	+	-	-
970-975	Galactose	G/D	+	+	o	o	+	+	-	-
925-935	C-O da 3,6-anidrogalactose	DA	+	-	+	-	+	+	-	-
905-907	C-O-SO ₃ em C ₂ da 3,6-anidrogalactose	DA2S	-	-	+	-	-	+	+	+
890-900	β -D-galactose não sulfatada	G/D	-	-	-	-	+	-	-	-
867-871	C-O-SO ₃ em C ₆ da galactose	G/D6S	-	o	-	+	-	-	+	-
845-850	C-O-SO ₃ em C ₄ da galactose	G4S	++	+	++	+	-	-	-	-
825-830	C-O-SO ₃ em C ₂ da galactose	G/D2S	-	-	-	+	-	+	+	+
815-825	C-O-SO ₃ em C ₆ da galactose	G/D6S	-	o	-	o	-	-	+	-
804-808	C-O-SO ₃ em C ₂ da 3,6-anidrogalactose	DA2S	-	-	++	-	-	+	-	-

-, ausente; +, médio; ++, proeminente; +++, muito proeminente; o, pico em forma de ombro; (*) decomposto em dois picos, característicos da carragenina Ksi: 815 e 850 cm^{-1} (Pereira *et al.* 2003).

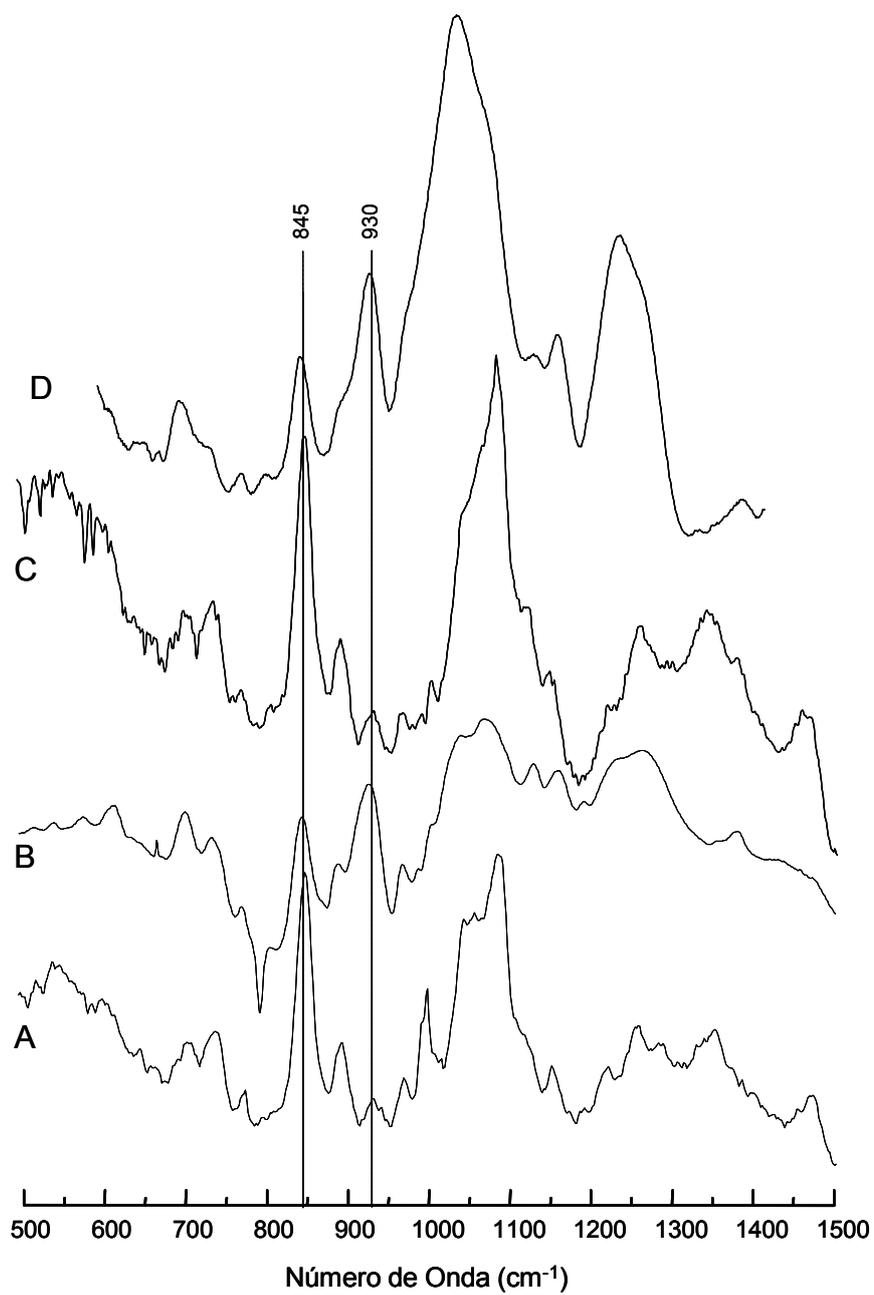


Figura 3.55 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana kappa; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de *Kappaphycus alvarezii*.

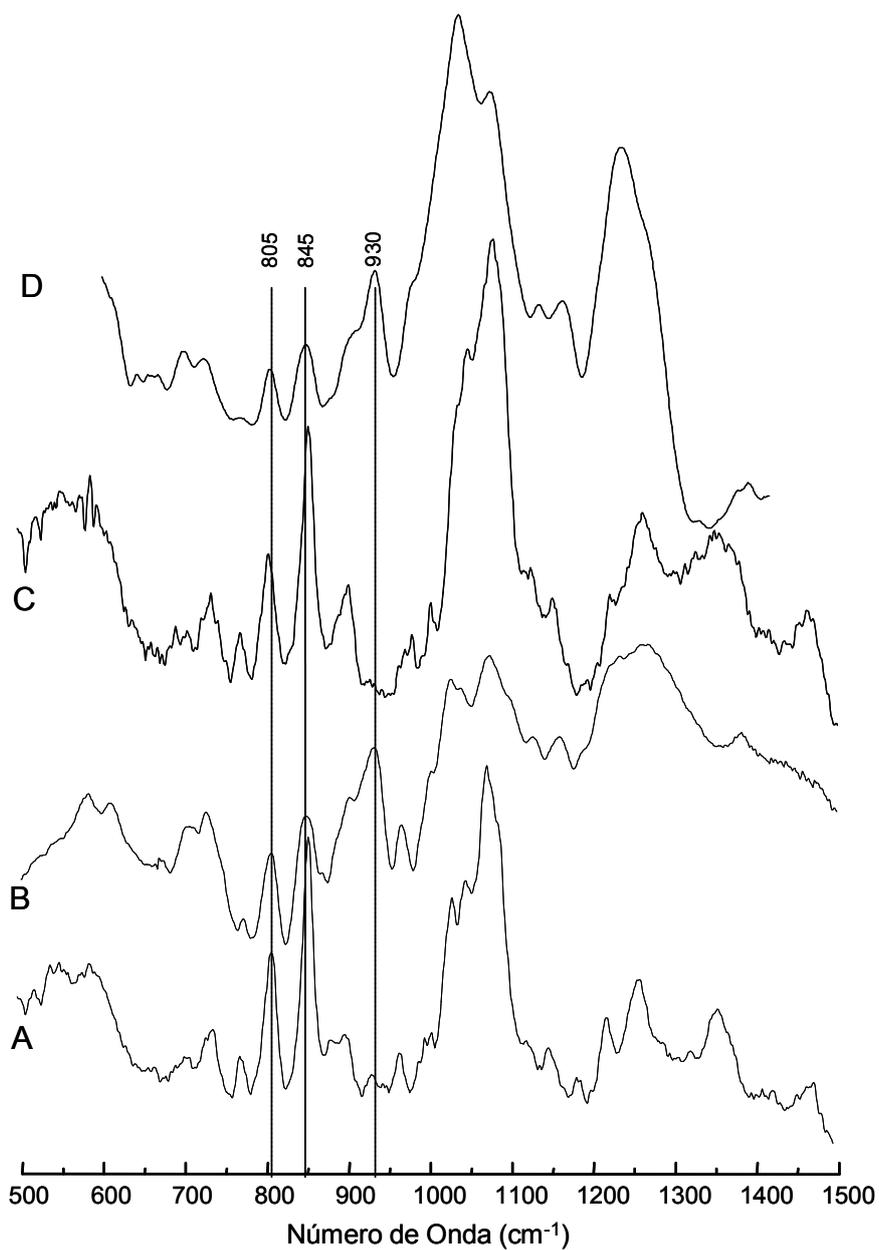


Figura 3.56 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana iota; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de *Eucheuma denticulatum*.

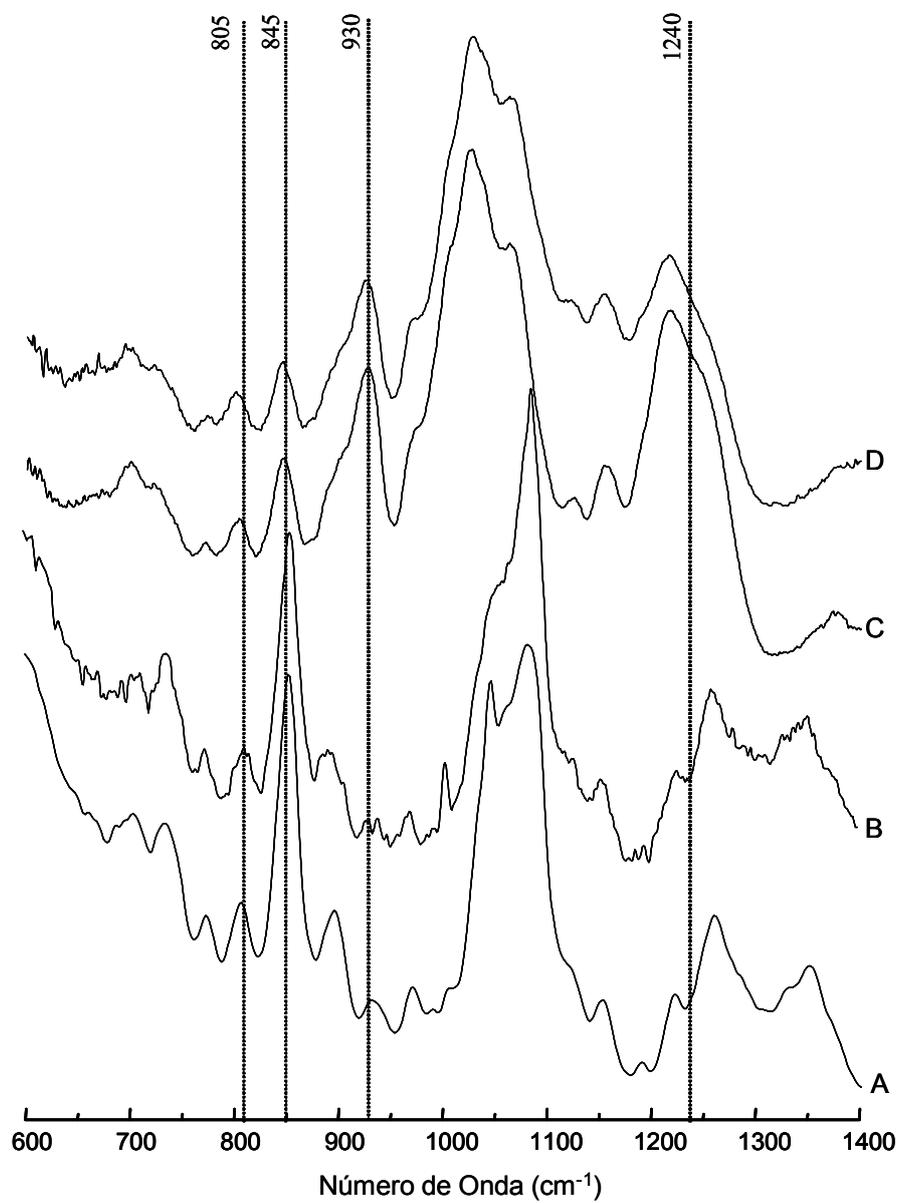


Figura 3.57 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana híbrida kappa/iota; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*.

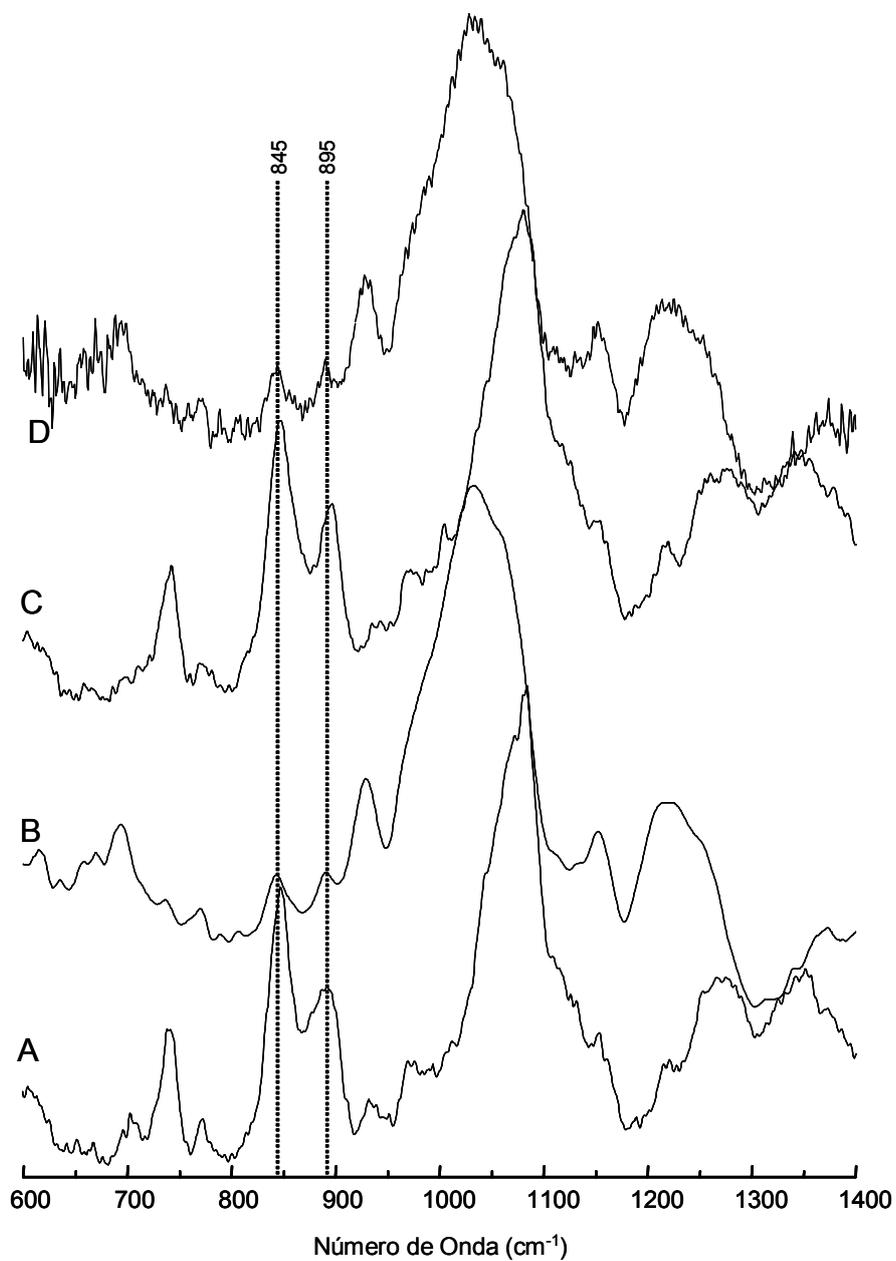


Figura 3.58 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana híbrida beta/kappa; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de *Betaphycus gelatinum*.

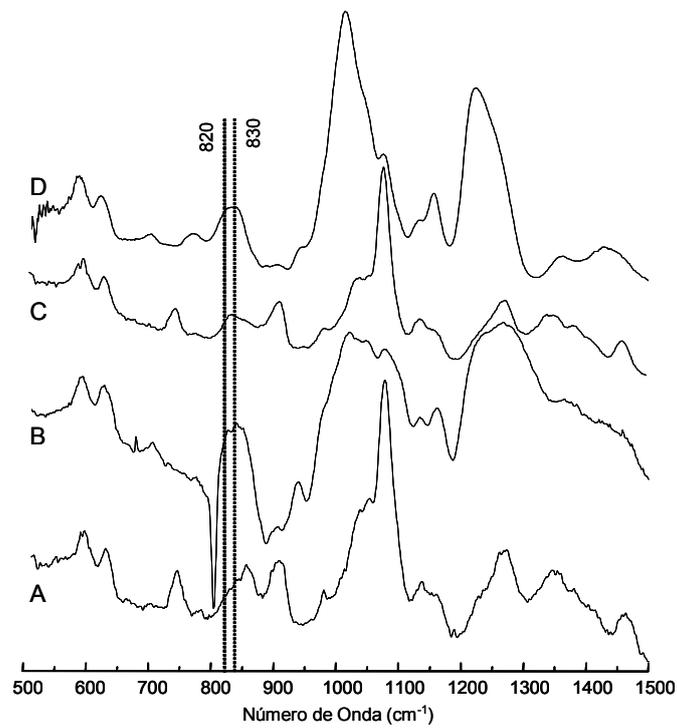


Figura 3.59 – Espectros FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de carragenana lambda; FT-Raman (C) e FTIR-ATR (D) de *Chondrus crispus*.

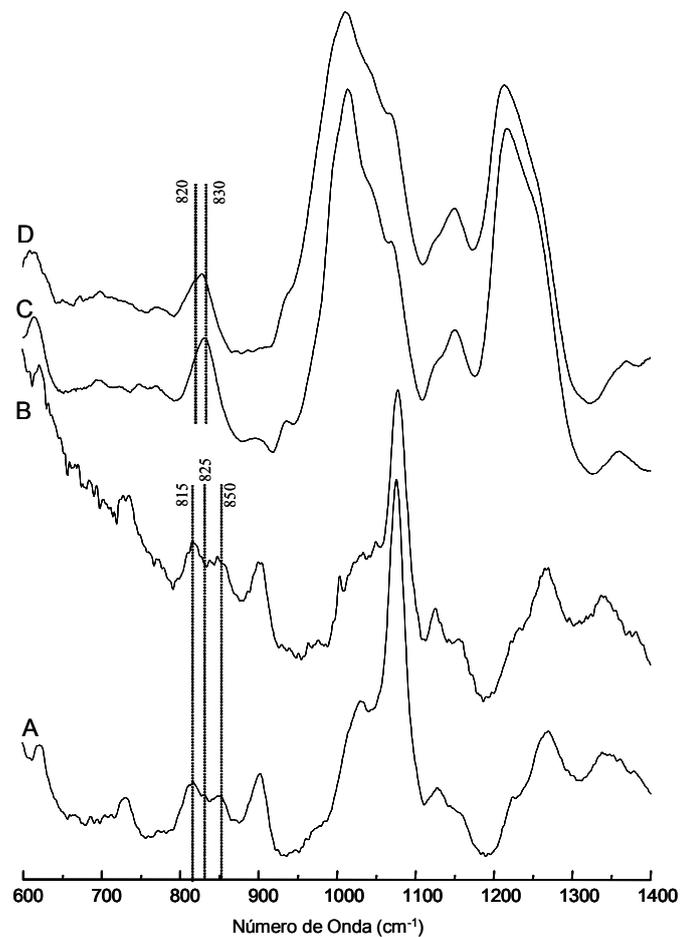


Figura 3.60 – Espectros FT-Raman de carragenan ksi/tetha (A) e de talos tetraspóricos de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (B); Espectros FTIR-ATR de carragenana ksi/tetha (C) e de talos tetraspóricos de *C. teedei* var. *lusitanicus* (D).

3.5.3 – Análise por FTIR-ATR e FT-Raman directamente em pó de alga (alga seca moída)

Na Figura 3.61 encontram-se representados 4 espectros de FT-Raman do *C. crispus* (gametófitos femininos), correspondentes aos diferentes ensaios de despigmentação (ver alínea 2.7 e 2.8.1), com vista à redução da fluorescência originada pelo laser do aparelho de espectroscopia Raman. O espectro da Figura 3.61 – A corresponde ao pó de alga tratado com uma mistura de acetona e metanol (ver alínea 2.8.1); este espectro apresenta alguma fluorescência, sobretudo na zona espectral 600-875 cm^{-1} e os picos apresentam-se pouco definidos. O espectro da Figura 3.61 – B corresponde à alga fresca tratada com hipoclorito de cálcio 4 % (30 s), posteriormente seca e moída. O espectro da Figura 3.61 – C corresponde à alga seca moída (obtida a partir de um exemplar de herbário) tratada com hipoclorito de cálcio 4 % (60 s). Finalmente, o espectro da Figura 3.61 – D corresponde à análise de carragenana nativa (ver alínea 2.8.1). Este últimos 3 espectros não apresentam qualquer indício de fluorescência e os picos apresentam-se perfeitamente definidos, sem qualquer ruído de fundo.

Visto tratar-se de uma alga produtora de uma carragenana híbrida kappa/iota, os picos diagnósticos referenciados na Figura 3.61 são o 805 cm^{-1} (DA2S), correspondente à carragenana iota e o 850 cm^{-1} (G4S), correspondente à carragenana kappa.

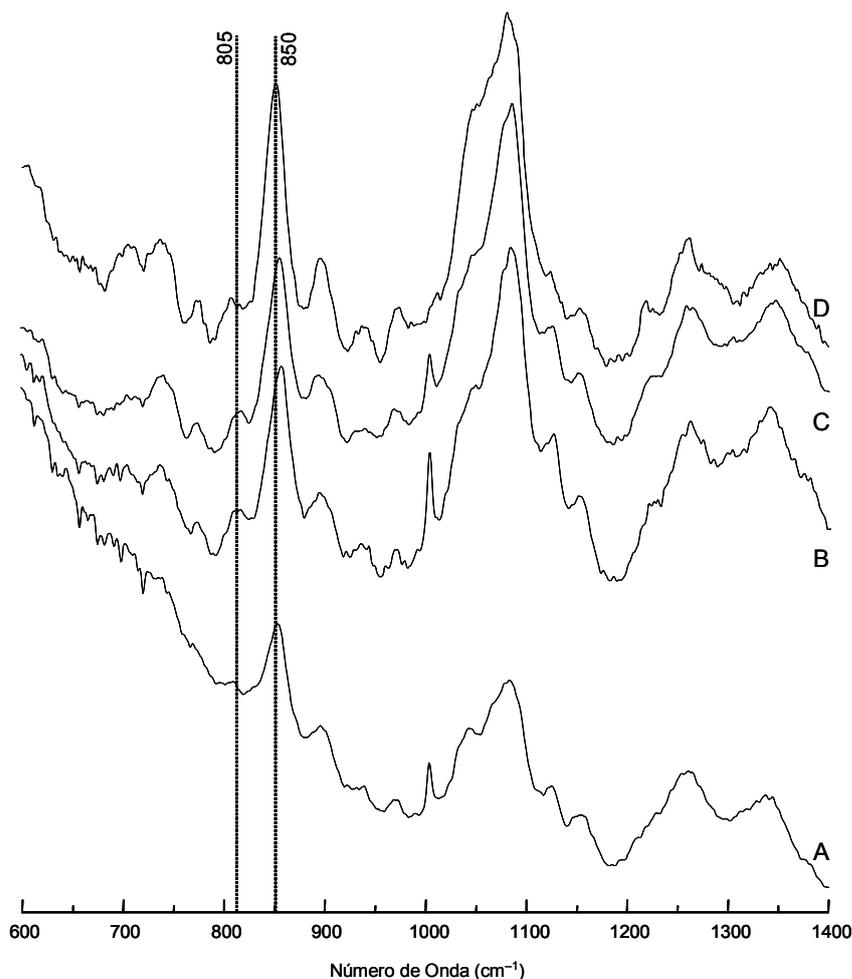


Figura 3.61 – Espectro FT-Raman de pó de alga (gametófitos femininos de *C. crispus*) tratado com uma mistura de acetona e metanol (A). Espectro FT-Raman de alga fresca tratada com hipoclorito de cálcio 4% (30 s), posteriormente seca e moída (B). Espectro de alga seca moída (obtida a partir de um exemplar de herbário) tratada com hipoclorito de cálcio 4% (60 s) (C). Espectro da carragenana nativa extraída de *C. crispus* (D).

A Figura 3.55 – D e C apresenta os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae). Estes espectros apresentam um pico a 845 cm^{-1} (G4S) e um pico proeminente a aproximadamente 930 cm^{-1} (DA) em FTIR-ATR.

A Figura 3.56 – D, C apresenta os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do *Eucheuma denticulatum* (Solieriaceae). Os espectros desta alga possuem, tal como os de *K. alvarezii*, picos a 845 cm^{-1} (G4S) e a 930 cm^{-1} (DA). Uma nova característica espectral surge aproximadamente a 805 cm^{-1} (DA2S), típica das algas possuidoras de carragenana iota.

A Figura 3.57 – D, C apresenta os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do *C. teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae - talos não frutificados). Este espectro apresenta uma forte absorvância a 1240 cm^{-1} (éster sulfato) e três outras bandas a 805 cm^{-1} (DA2S), a 845 cm^{-1} (G4S) e 930 cm^{-1} (DA). O grau de hibridização (iota/kappa) pode ser avaliado a partir do rácio entre a intensidade de absorção da banda 805 cm^{-1} e da banda 845 cm^{-1} , do espectro de FTIR-ATR, tal como é calculado nos espectros das carragenanas extraídas. Além dos picos de maior proeminência, atrás referidos, são visíveis 3 picos adicionais a 820 cm^{-1} (G/D6S), 825 cm^{-1} (G/D2S) e 867 cm^{-1} (G/D6S), correspondentes à presença dos precursores da carragenana kappa (carragenana mu) e da carragenana iota (carragenana nu); estes 2 últimos são mais evidentes no espectro de FT-Raman (Figura 3.57 – C).

Os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do *Betaphycus gelatinum* (Solieriaceae) encontram-se representados na Figura 3.58 – D, C. Estes espectros apresentam uma banda típica a $890\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, relacionada com a presença de β -D-galactose não sulfatada (G/D).

O espectro FTIR-ATR do *C. crispus* (Gigartinaceae) (Figura 3.59 – D) apresenta uma banda larga entre os 820 e os 830 cm^{-1} , indicando a presença de um elevado conteúdo em éster sulfato. O espectro de FT-Raman (Figura 3.59 - C) apresenta duas bandas na região espectral $815\text{-}830\text{ cm}^{-1}$.

A Figura 3.60 – D apresenta o espectro FTIR-ATR dos tetrasporófitos de *C. teedei* var. *lusitanicus*. Este espectro apresenta uma banda estreita entre os 820 cm^{-1} e os 830 cm^{-1} . Em contrapartida o espectro de FT-Raman (Figura 3.60 - B) apresenta três picos: 815 cm^{-1} e 850 cm^{-1} para a carragenana ksi e 825 cm^{-1} para a carragenana theta.

3.5.4 – Análise dos ficocolóides produzidos pelas carragenófitas

3.5.4.a – Carragenófitas portuguesas

A informação sobre as datas de colheita, geração, tipo e quantidade de carragenana produzida por cada uma das algas estudadas (e dos respectivos códigos), encontra-se na Tabela 3.6.

Os espectros FTIR-ATR da carragenana (extracção alcalina) dos gametófitos femininos *C. crispus*, *M. stellatus*, *G. pistillata* (Gigartinaceae) e talos não frutificados do *C. crispus* (Figura 3.62) apresentam bandas de forte absorção na região 930 cm^{-1} (DA) e na região 845 cm^{-1} (G4S), típicas da carragenana kappa. Estes espectros apresentam reduzida absorvância na região 805 cm^{-1} (DA2S), o que significa a presença de pequenas quantidades de carragenana iota. O rácio entre as bandas de absorção 805 e 445 cm^{-1} foi calculado e usado como parâmetro para determinar o grau de hibridização kappa/iota (ver Figuras 3.62, 3.63, 3.64 e 3.65).

Nos gametófitos femininos e talos não frutificados de *C. teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaeae), os espectros FTIR-ATR (Figura 3.63) apresentam forte absorção a 930 e 845 cm^{-1} e absorção média na banda 805 cm^{-1} .

Para a espécie *A. devoniensis*, *G. crenulatus* (Phylloporaceae) e *C. jubata* (Solieriaceae), os espectros FTIR-ATR apresentam bandas de absorção a 930, 845 e 805 cm^{-1} , que representam o tripleto característico da variante iota, quando esta é, normalmente, a fracção dominante numa carragenana híbrida (Figuras 3.64 e 3.65). No entanto, o rácio 805/845 é inferior em *A. devoniensis* e em *G. crenulatus*, relativamente ao apresentado pelo *C. jubata* e pelo *E. denticulatum* (ver alínea 3.5.4.b).

Os espectros FTIR-ATR (Figura 3.66 – Q, R, S) dos tetrasporófitos de *G. pistillata* e de *C. crispus* apresentam uma banda larga na região espectral 820-830 cm^{-1} , característica da carragenana lambda (ou da variante resultante da modificação alcalina – a carragenana theta). Os espectros FT-Raman destas amostras (Figura 3.67 – Q, R, S) apresentam uma banda larga na região espectral 820-830 cm^{-1} o que confirma a presença de carragenana lambda (ou o respectivo derivado, por modificação alcalina, a carragenana theta).

Os espectros FTIR-ATR das amostras tetraspóricas das espécies do género *Chondracanthus* apresentam bandas estreitas a 830 cm^{-1} e uma pequena absorção a 820 cm^{-1} , o que indica presença de carragenana ksi (Figura 3.66 – T, U). No entanto, os espectros FT-Raman das carragenanas destas algas apresentam 3 bandas na região espectral 815-850 cm^{-1} : 825-830 cm^{-1} (G/D2S), referente à carragenana theta; 815-825 cm^{-1} (G/D6S) e 845-850 cm^{-1} (G4S), referente à carragenana ksi (Figura 3.68 – T, U).

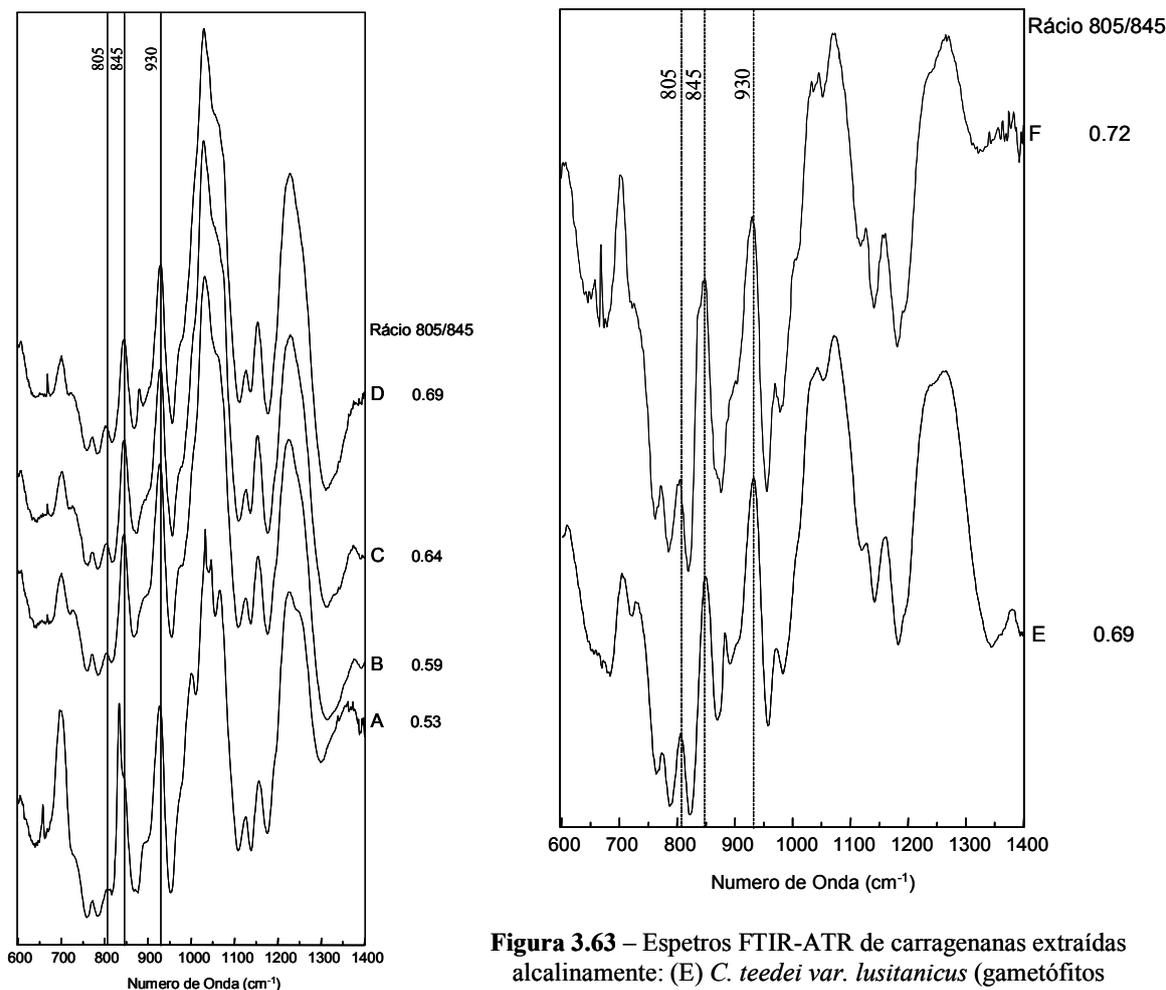


Figura 3.63 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (E) *C. teedei* var. *lusitanicus* (gametófitos femininos); (F) *C. teedei* var. *lusitanicus* (talos não-frutificados).

Figura 3.62 – Espectros FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (A) *C. crispus* (talos não-frutificados); (B) *C. crispus* (gametófitos femininos); (C) *M. stellatus* (gametófitos femininos); (D) *G. pistillata* (gametófitos femininos).

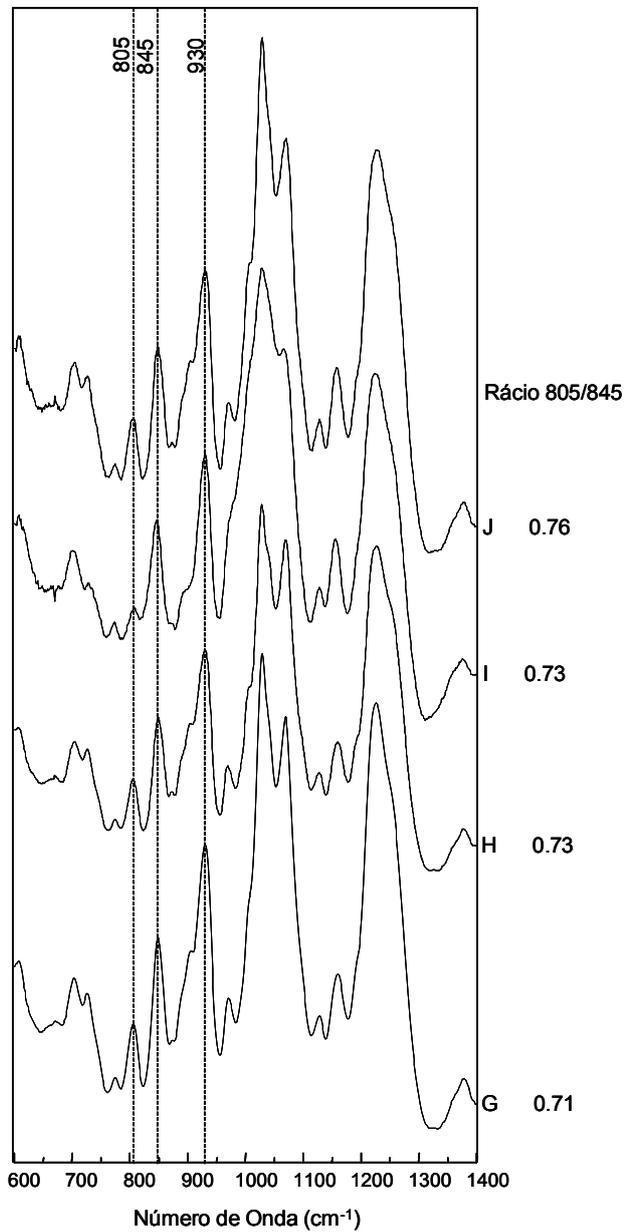


Figura 3.64 – Espectros de FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (G) *A. devoniensis* (gametófitos femininos), (H) *A. devoniensis* (talos não-frutificados), (I) *G. crenulatus* (talos tetrasporoblásticos), (J) *A. devoniensis* (gametófitos femininos).

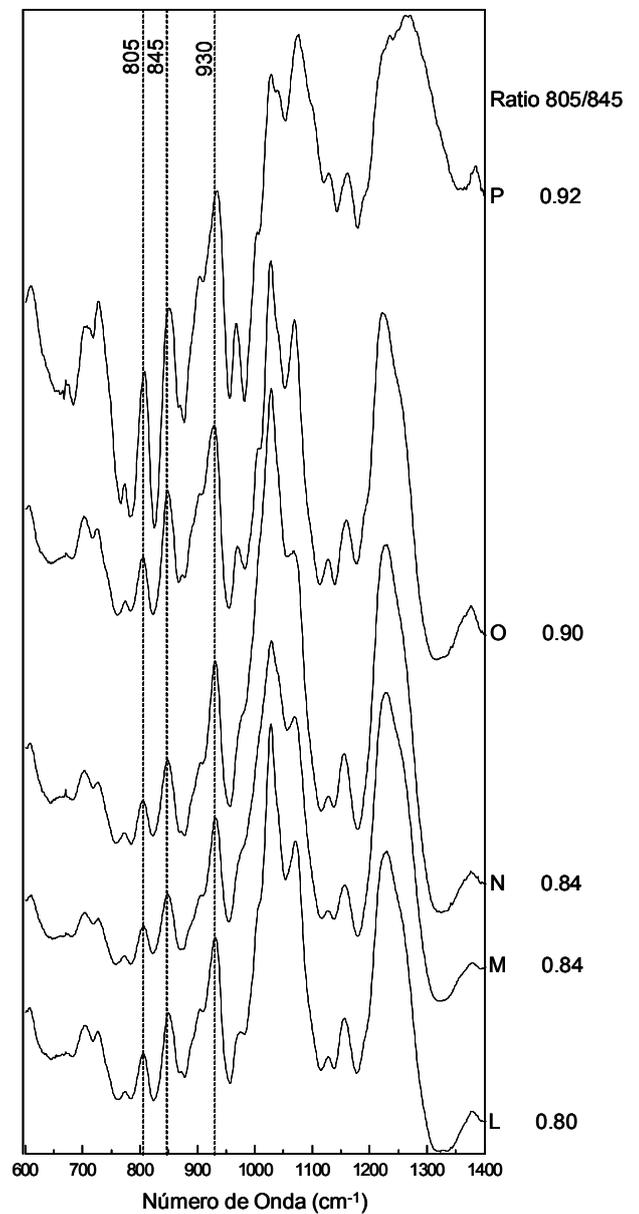


Figura 3.65 – Espectros de FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (L) *C. jubata* (talos não-frutificados), (M) *C. jubata* (tetrasporófitos), (N) *C. jubata* (gametófitos femininos), (O) *G. crenulatus* (talos tetrasporoblásticos), (P) *E. denticulatum*.

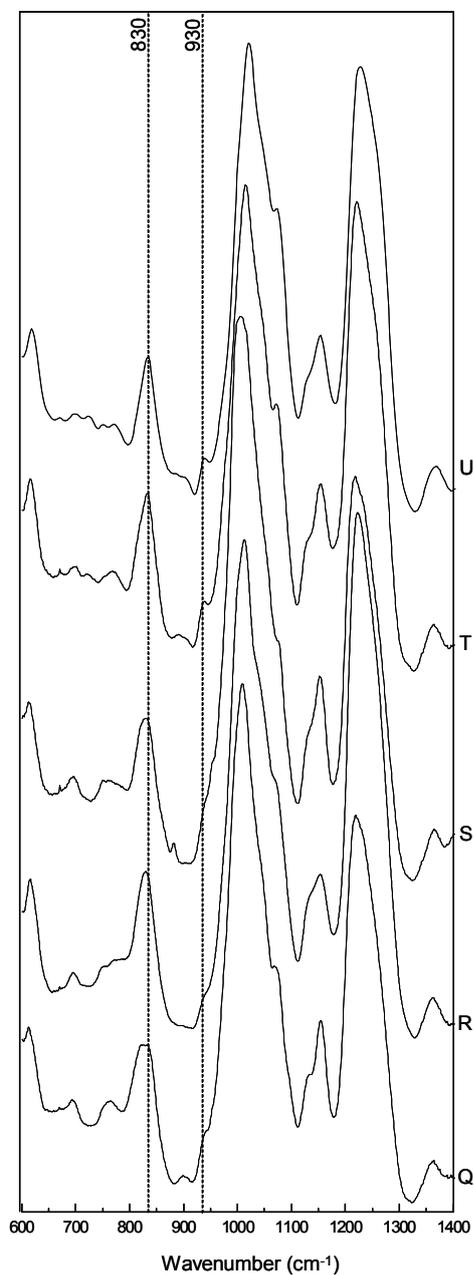


Figura 3.66 – Espectros de FTIR-ATR de carragenanas extraídas alcalinamente: (Q) *C. crispus* (tetrasporófitos), (R) *G. pistillata* (talos heterospóricos), (S) *G. pistillata* (tetrasporófitos), (T) *C. acicularis* (tetrasporófitos), (U) *C. teedei* var. *lusitanicus* (tetrasporófitos).

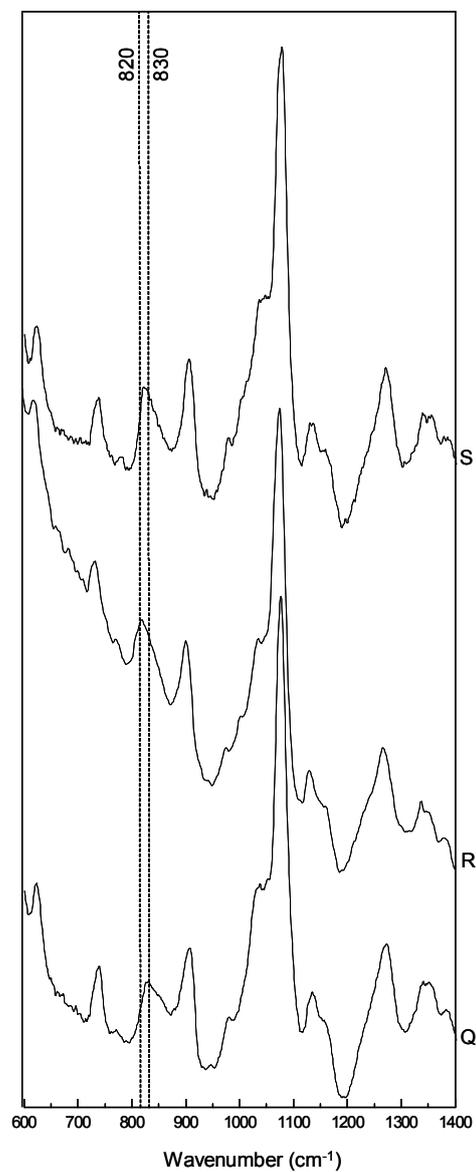


Figura 3.67 – Espectros de FT-Raman de carragenanas extraídas alcalinamente: (Q) *C. crispus* (tetrasporófitos), (R) *G. pistillata* (talos heterospóricos), (S) *G. pistillata* (tetrasporófitos).

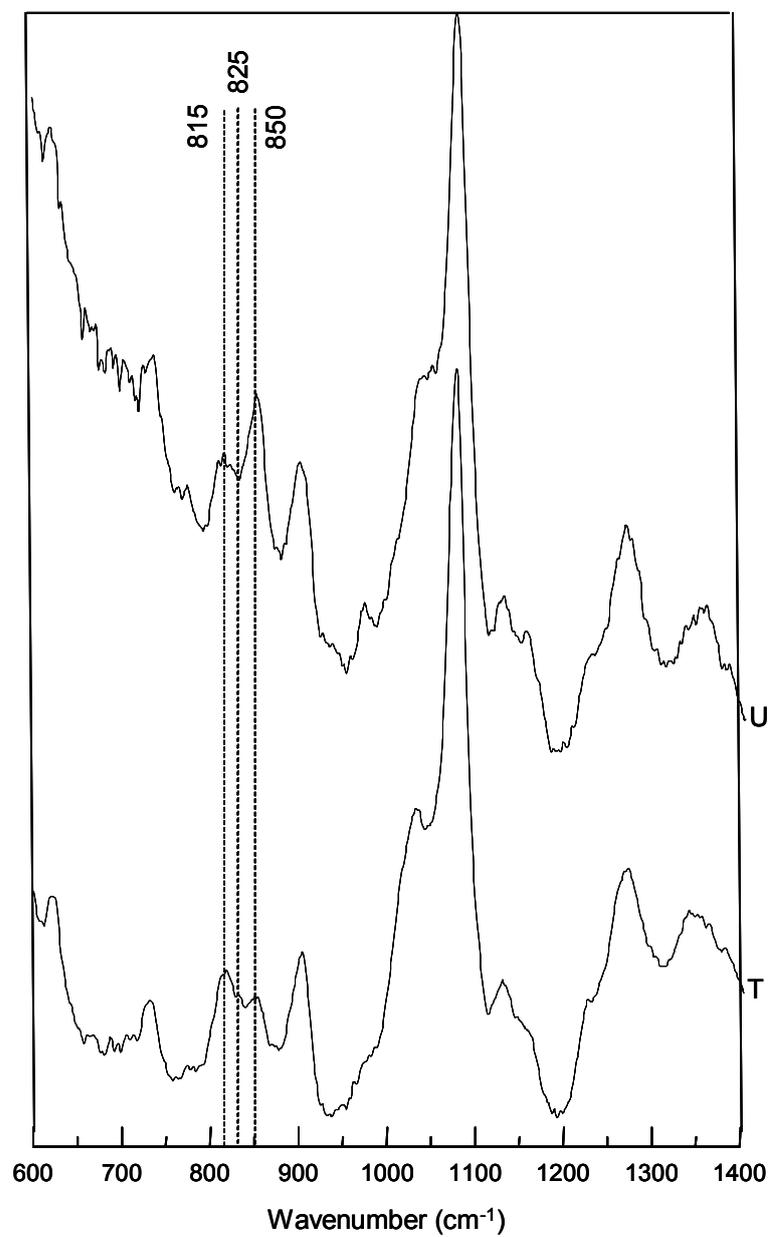


Figura 3.68 – Espectros de FT-Raman de carragenanas extraídas alcalinamente: (T) *C. acicularis* (tetrasporófitos), (U) *C. teedei* var. *lusitanicus* (tetrasporófitos).

Tabela 3.6 – Composição das carragenanas produzidas pelas carragenófitas portuguesas estudadas, determinada por espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman)

Código	Carragenófitas	Geração	Data de colheita	Carragenana ¹		
				% peso seco	Alcalina	Nativa
A	<i>Chondrus crispus</i>	NF	Dez. 2000	14.0 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
B	<i>C. crispus</i>	GF	Fev. 2001	23.2 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
C	<i>Mastocarpus stellatus</i>	G	Ago. 2001	20.3 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
D	<i>Gigartina pistillata</i>	GF	Mar. 2002	49.8 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
V	<i>G. pistillata</i>	H (♀)	Fev. 2002	58.5 %	-	κ - ι (μ/v)
E	<i>Chondrachantus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Jun. 2001	35.0 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
F	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	Jun. 2001	43.6 %	κ - ι	κ - ι (μ/v)
G	<i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i>	G	Jul. 2001	13.6 %	ι - κ	ι - κ (v)
H	<i>A. devoniensis</i>	NF	Ago. 2001	11.5 %	ι - κ	ι - κ (v)
I	<i>Gymnogongrus crenulatus</i>	TB	Abr. 2002	9.7 %	κ - ι	-
J	<i>A. devoniensis</i>	G	Dez. 2001	11.5 %	ι - κ	-
L	<i>Calliblepharis jubata</i>	NF	Mar. 2001	10.8 %	ι - κ	ι - κ (v)
M	<i>C. jubata</i>	T	Mai. 2001	28.4 %	ι - κ	-
N	<i>C. jubata</i>	GF	Abr. 2001	24.2 %	ι	ι (v)
O	<i>G. crenulatus</i>	TB	Nov. 2001	11.0 %	ι - κ	-
Q	<i>C. crispus</i>	T	Mai. 2001	36.6 %	λ	λ
R	<i>G. pistillata</i>	H (⊕)	Fev. 2002	58.5 %	-	ξ - λ
S	<i>G. pistillata</i>	T	Apr. 2002	55.6 %	ξ - λ	-
T	<i>Chondrachantus acicularis</i>	T	Ago. 2001	36.6 %	ξ - θ	ξ - θ
U	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	Jun. 2001	36.6 %	ξ - θ	ξ - θ

T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos Femininos; G – Gametófitos; NF – Talos Não-Frutificados; TB – Talos Tetrasporoblásticos; H – Talos Heterospóricos: (ramos ♀) - ramos portadores de cistocarpos; (ramos ⊕) - ramos portadores de soros de tetrasporocistos; 1 - As carragenanas encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego; as letras entre parêntesis () correspondem aos precursores biológicos das carragenanas, presentes nas amostras de pó de alga.

Os espectros FT-Raman do pó de alga (composição nativa das carragenanas - ver alínea 2.7) dos gametófitos femininos *C. crispus* (B), *M. stellatus* (C), *G. pistillata* (D), dos talos não frutificados de *C. crispus* (A) e de *C. teedei* var. *lusitanicus* (E) (ver

Figura 3.69) apresentam 2 bandas na região 807 cm^{-1} (DA2s) e 850 cm^{-1} (G4S), típicas das carragenanas híbridas kappa/iota. Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos precursores biológicos destas carragenanas (mu e nu): 821 cm^{-1} (G/D6S), 830 cm^{-1} (G/D2S) e 870 cm^{-1} (G/D6S).

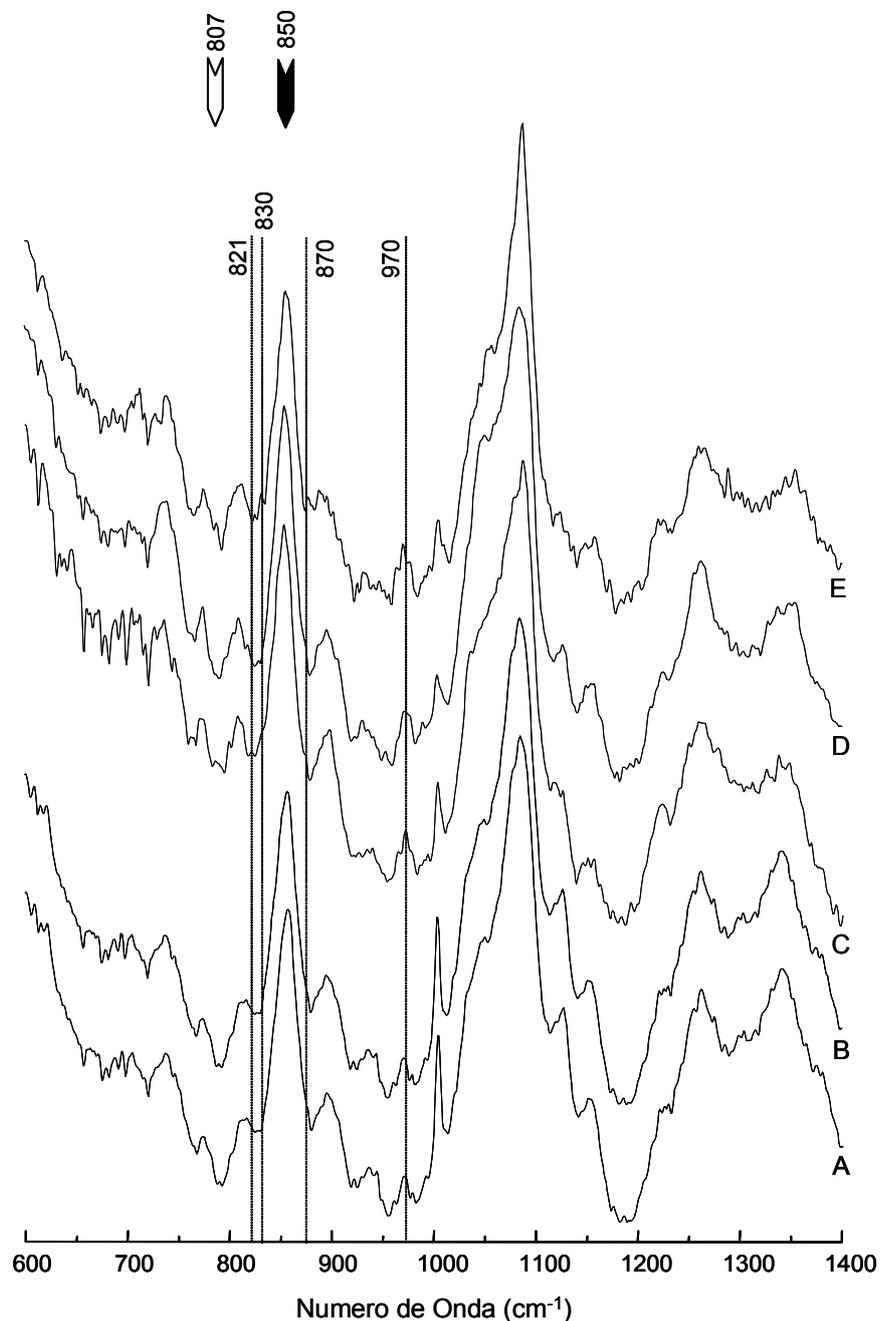


Figura 3.69 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (A) *C. crispus* (talos não-frutificados); (B) *C. crispus* (gametófitos femininos); (C) *M. stellatus* (gametófitos femininos); (D) *G. pistillata* (gametófitos femininos); (E) *C. teedei* var. *lusitanicus* (talos não-frutificados). Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos precursores biológicos e as setas largas indicam os picos correspondentes às carragenanas principais (iota e kappa, respectivamente).

Os espectros FT-Raman do pó de alga dos gametófitos femininos de *C. teedei* var. *lusitanicus* (F), *A. devoniensis* (G) e dos talos não frutificados de *A. devoniensis* (H) (ver Figura 3.70) apresentam 2 bandas na região 807 cm^{-1} (DA2S) e 850 cm^{-1} (G4S), típicas das carragenanas híbridas kappa/iota. Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos precursores biológicos das carragenanas, mu e nu em *C. teedei* var. *lusitanicus* e nu nas restantes: 821 cm^{-1} (G/D6S), 830 cm^{-1} (G/D2S) e 870 cm^{-1} (G/D6S).

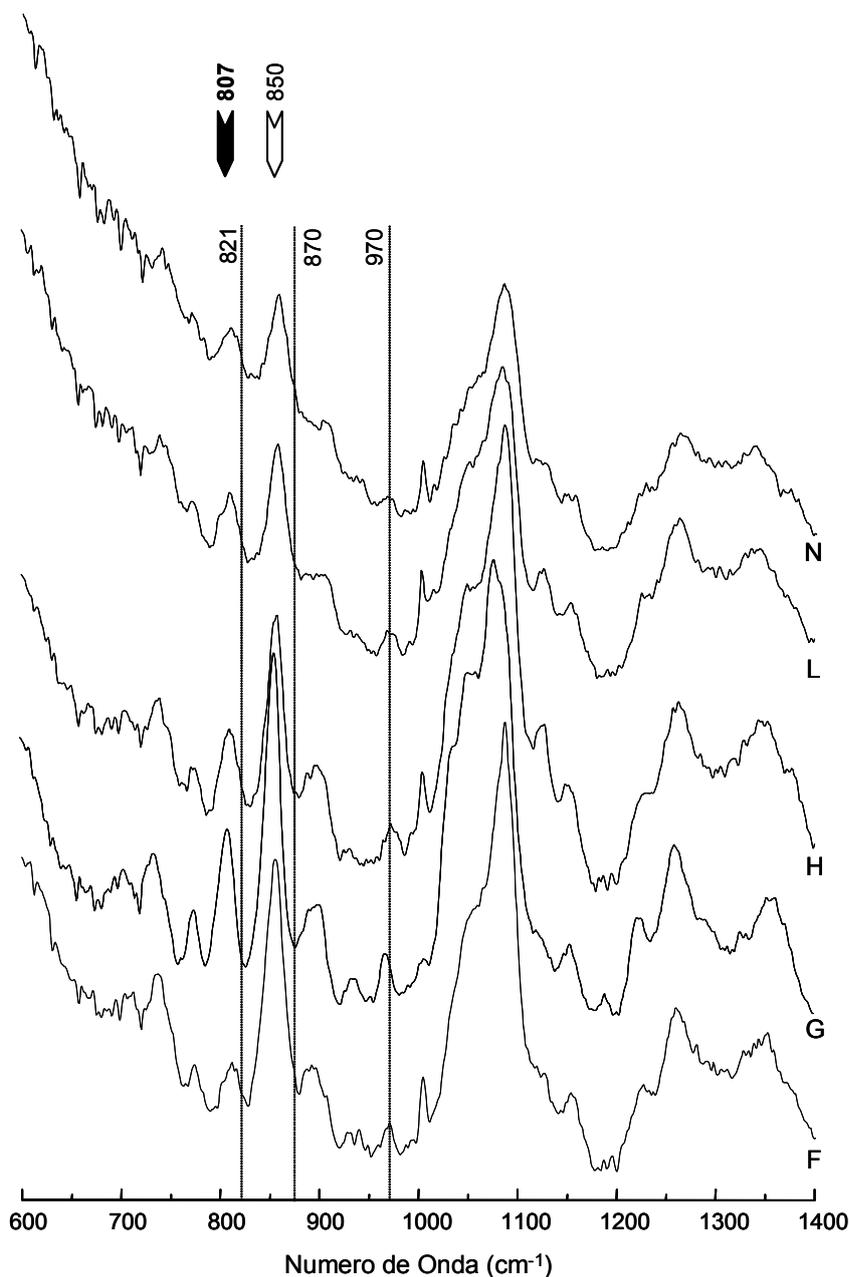


Figura 3.70 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (F) *C. teedei* var. *lusitanicus* (gametófitos femininos); (G) *A. devoniensis* (gametófitos femininos); (H) *A. devoniensis* (talos não-frutificados); (L) *C. jubata* (talos não-frutificados); (N) *C. jubata* (gametófitos femininos). Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes aos precursores biológicos e as setas largas indicam os picos correspondentes às carragenanas principais (iota e kappa, respectivamente).

Da análise do espectro de FT-Raman do pó de alga obtido a partir das ramificações providas de cistocarpos dos talos heterospóricos de *G. pistillata* (Figura 3.71 – V), conclui-se que o tipo de ficocolóide produzido é uma carragenana híbrida kappa/iota/um/nu. O espectro apresentado é perfeitamente idêntico aos resultantes da análise do pó de alga dos gametófitos femininos de *G. pistillata* (Figura 3.71 – D) e da carragenana nativa kappa/iota/mu/nu (Figura 3.71*). Os espectros apresentam 2 bandas na região 807 cm^{-1} (DA2s) e 850 cm^{-1} (G4S), típicas das carragenanas híbridas kappa/iota. As setas indicam os picos referentes às carragenanas mu e nu, precursores da carragenana kappa e iota, respectivamente: 815 cm^{-1} (G/D6S), 825 cm^{-1} (G/D6S), 830 cm^{-1} (G/D2S), 871 cm^{-1} (G/D6S) e 970 cm^{-1} (G/D).

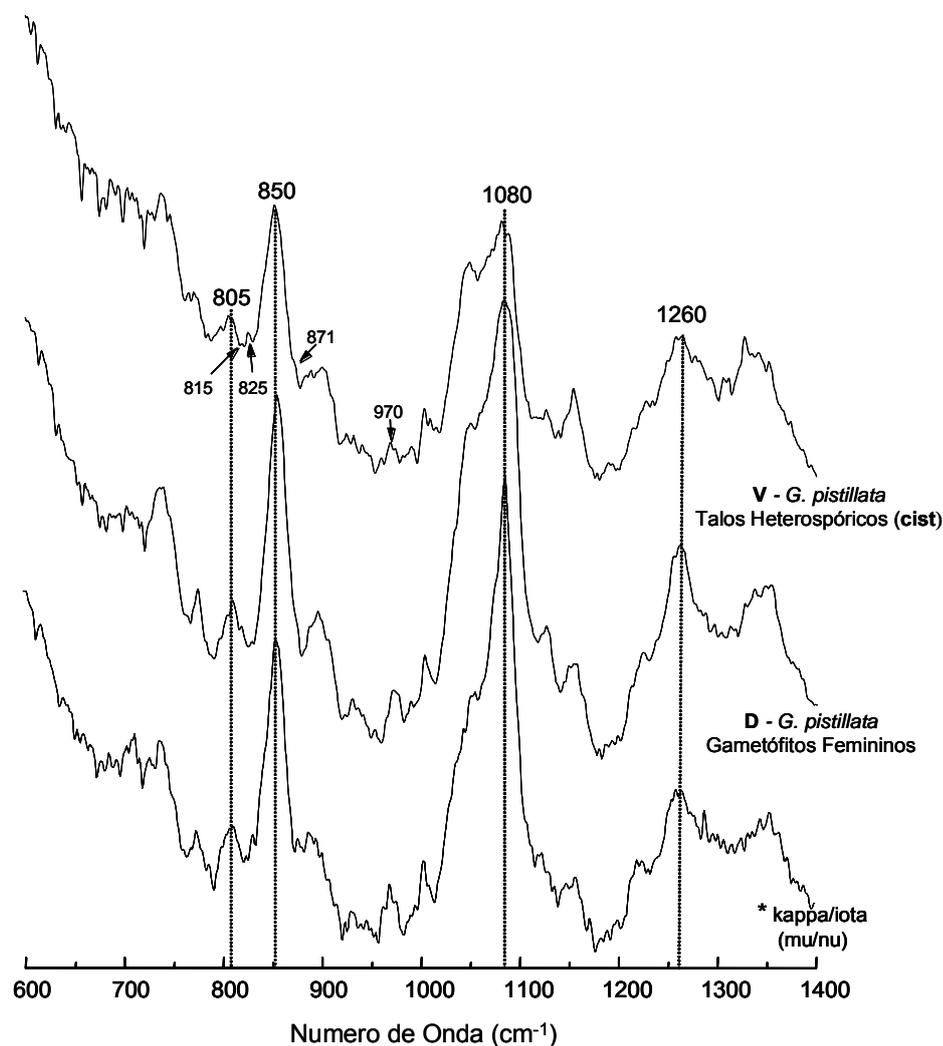


Figura 3.71 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (V) *G. pistillata* (Talos Heterospóricos - ramificações portadoras de cistocarpos); (D) *G. pistillata* (Gametófitos Femininos). (*)

Espectro FT-Raman da carragenana nativa kappa/iota/mu/nu. Os traços a pontilhado correspondem aos picos referentes às carragenanas predominantes (kappa e iota) e as setas indicam os picos correspondentes aos precursores biológicos (só indicados no espectro V).

Da análise do espectro de FT-Raman do pó de alga obtido a partir das ramificações providas de soros de tetrasporocistos dos talos heterospóricos de *G. pistillata* (Figura 3.72 – R), conclui-se que o tipo de ficocolóide produzido é uma carragenana híbrida ksi/lambda. O espectro apresentado é idêntico ao resultante da análise da carragenana extraída, alcalinamente, dos tetrasporófitos de *G. pistillata* (Figura 3.72 – S). O espectro de *C. chondrus* T é semelhante ao espectro FT-Raman duma amostra comercial de carragenana lambda pura (Figura 3.72*). Os picos diagnóstico (ver Tabela 3.5-B), da presença de uma carragenana lambda, são os picos fundidos 815 cm^{-1} (G/D6S) e 830 cm^{-1} (G/D2S).

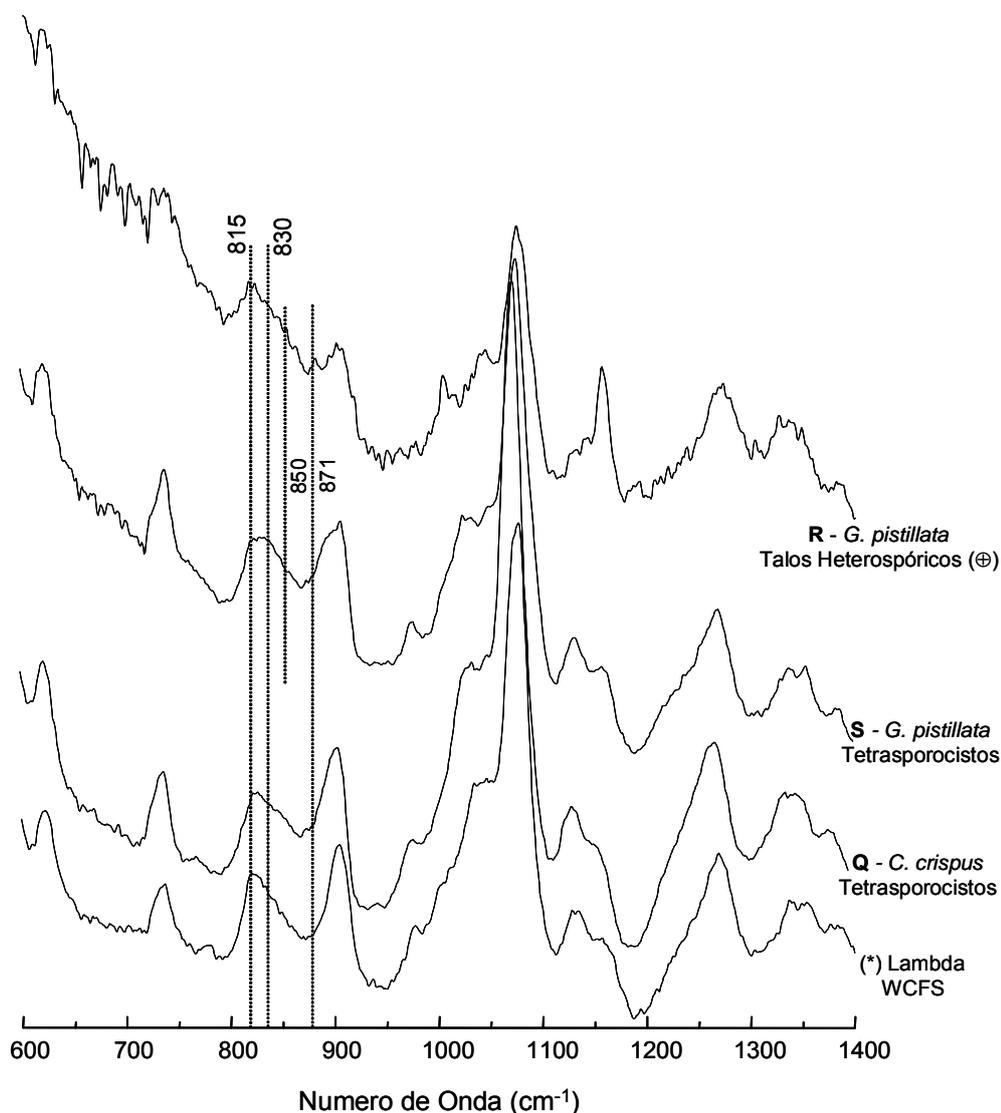


Figura 3.72 – Espectros FT-Raman: (Q) *C. crispus* (Tetrasporófitos); (R) *G. pistillata* (Talos Heterospóricos - ramificações portadoras de soros de tetrasporocistos); (S) *G. pistillata* (Tetrasporófitos - carragenana extraída alcalinamente). (*) Espectro FT-Raman de uma amostra comercial de carragenana lambda pura (WCFS).

Os espectros FT-Raman do pó de alga: (T) *C. acicularis* (Tetrasporocistos) e (U) *C. teedei* var. *lusitanicus* (Tetrasporocistos) (ver Figura 3.73) apresentam 3 bandas na região espectral 815 cm^{-1} (G/D6S), 825 cm^{-1} (G/D2S) e 850 cm^{-1} (G4S), típicas das carragenanas híbridas ksi/theta.

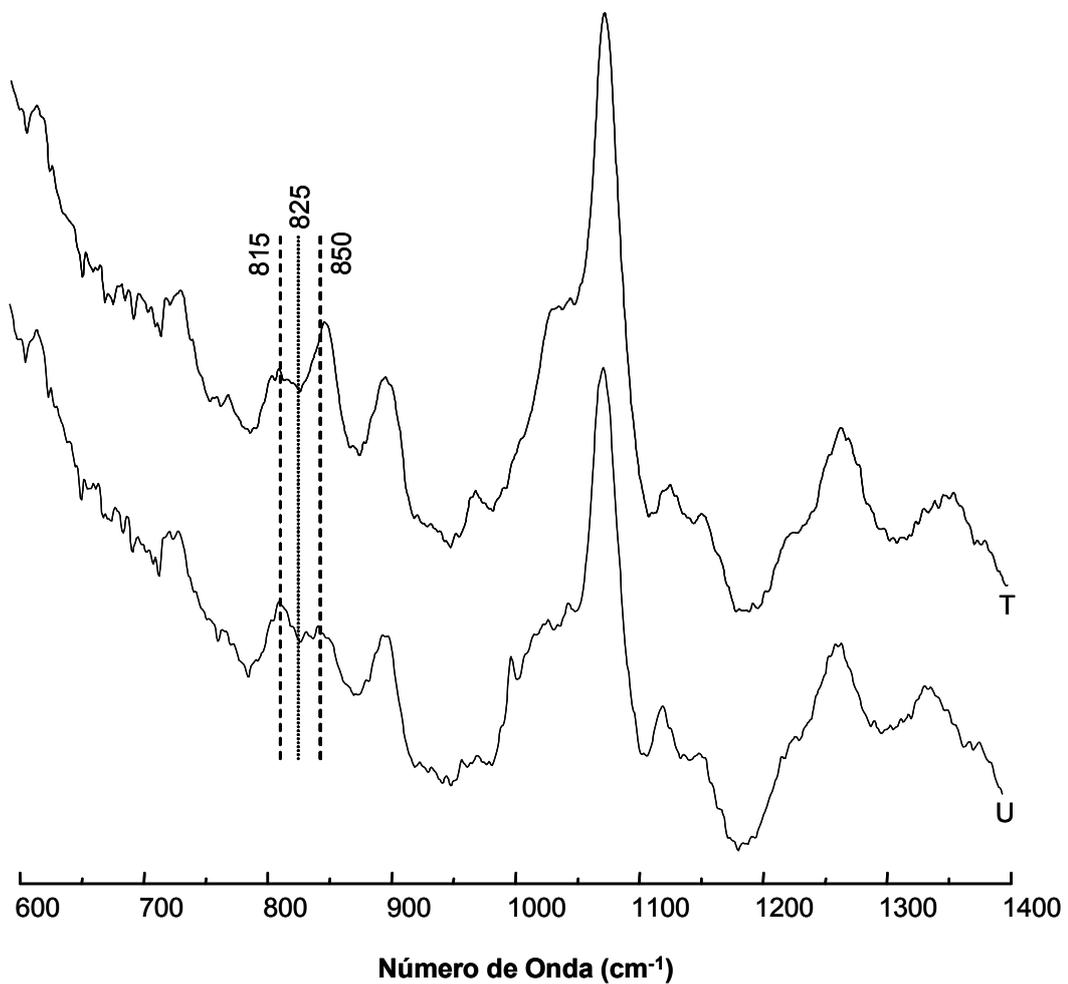


Figura 3.73 – Espectros FT-Raman de pó de alga: (T) *C. acicularis* (Tetrasporocistos); (U) *C. teedei* var. *lusitanicus* (Tetrasporocistos).

3.5.4.b – Carragenófitas usadas a nível industrial e outras carragenófitas

Todas as espécies aqui referidas foram fornecidas pela “Degussa Texturant Systems” (Baupre, França). A informação sobre as espécies, geração, os países de colheita, tipo e quantidade de carragenana produzida por cada uma das algas estudadas (e dos respectivos códigos), encontra-se na Tabela 3.7. As fotografias de algumas das algas aqui referidas encontram-se na Figura 3.80.

Os espectros FTIR-ATR (Figura 3.74) do pó de alga do *Kappaphycus alvarezzi* (Solieriaceae), principal fonte de carragenana kappa a nível industrial, apresentam bandas de forte absorção na região 930 cm^{-1} (DA) e na região 845 cm^{-1} (G4S), típicas da presença de carragenana kappa. Estes espectros apresentam reduzida absorvância na região 805 cm^{-1} (DA2S), o que significa a presença de pequenas quantidades de carragenana iota. O rácio entre as bandas de absorção 805 e 845 cm^{-1} foi calculado e usado como parâmetro para determinar o grau de hibridação iota/kappa. O rácio variou de 0.59 (E1) e 0.72 (D4), estas variações do rácio estão relacionadas com a duração da cultura da alga e com a quantidade de precursor (μ) presente à data da colheita do *K. alvarezzi*.

Os espectros FT-Raman (ver Figura 3.75) do pó de alga (excepto E6) de *K. alvarezzi* (D1 – Tanzânia; D3 – Indonésia; D4 – Filipinas; D5 – Madagáscar; E4 – Panamá) e de *K. striatum* (D5 – Madagáscar) apresentam uma banda proeminente na região 845 cm^{-1} (G4S), típica das carragenanas compostas predominantemente pela fracção kappa e um pico ténue a 805 cm^{-1} (DA2S), correspondente à presença de uma pequena quantidade de carragenana iota. Os traços a pontilhado correspondem aos picos (em forma de ombro) referentes ao precursor biológico da carragenana kappa (μ): 821 cm^{-1} (G/D6S) e 870 cm^{-1} (G/D6S). Os picos referentes ao precursor da carragenana kappa de *K. striatum* são muito ténues, pelo que se pode concluir que esta alga é constituída, sobretudo, por carragenana kappa. Por outro lado, a carragenana nativa (E6), extraída de *K. alvarezii* (Panamá), possui uma quantidade significativa de carragenana μ , pois os picos relativos a este precursor apresentam-se perfeitamente visíveis (ver Figura 3.75 – E6).

Os espectros FT-Raman (Figura 3.76 – A) e FTIR-ATR (Figura 3.76 – B) apresentam, simultaneamente, picos característicos da carragenana kappa e da carragenana lambda, visto tratar-se de uma amostra industrial de *C. crispus* (Gigartinaceae), colhida no Canadá, com mistura de gerações. Os espectros FT-Raman e FTIR-ATR apresentam uma banda proeminente na região 845 cm^{-1} (G4S) no primeiro caso e a 850 (G4S), típicas de uma carragenana predominantemente kappa e um pico ténue a 805 cm^{-1} (DA2S), correspondente à presença de uma pequena quantidade de carragenana iota (não assinalado). O traço fino corresponde ao pico (em forma de ombro em Raman) referente ao precursor biológico da carragenana kappa (μ): 871 cm^{-1} (G/D6S). A presença da carragenana lambda é demonstrada pela presença, em ambos os espectros, de uma banda fundida a $811\text{-}827\text{ cm}^{-1}$ no FTIR-ATR e $815\text{-}830\text{ cm}^{-1}$ no FT-Raman. A presença de um pico proeminente a 930 no espectro FTIR-ATR está relacionado com a presença de DA relativa às carragenanas gelificantes.

A Figura 3.77 apresenta os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do *Chondracanthus chamissoi* (Gigartinaceae) colhido no Chile. Esta espécie apresenta grandes semelhanças, tanto morfológicas como bioquímicas, com o *C. teedei* var. *lusitanicus* colhido em Portugal. Relativamente à análise dos espectros FTIR-ATR das amostras D11a (gametófitos femininos) e D11c (talos não-frutificados), podemos concluir que estes produzem uma carragenana híbrida do tipo kappa/iota. Os rácios calculados (respectivamente 0.79 e 0.77) são semelhantes aos apresentados pela análise

dos ficocolóides produzidos pelo *C. teedei* var. *lusitanicus* (gametófitos femininos e talos não frutificados). A análise do pó de alga por FT-Raman revela-nos a presença de uma carragenana híbrida, do tipo kappa/iota mas, além disso, a presença dos precursores biológicos das carragenanas gelificantes, ou seja, carragenana mu e nu (picos 815 cm^{-1} e 970 cm^{-1}). Finalmente, o espectro FT-Raman do pó de alga dos tetrasporófitos de *C. chamissoi* (D11b) revela a presença de uma outra carragenana híbrida: ksi/theta. Os picos que permitem diagnosticar a presença destas carragenanas são, respectivamente: 815 cm^{-1} (G/D6S) e 850 cm^{-1} (G4S), para a carragenana ksi; 808 cm^{-1} (DA2S) e 825 cm^{-1} (G/D2S) para a carragenana theta.

Os espectros FTIR-ATR (Figura 3.78) do pó de alga do *Eucheuma denticulatum* (Solieriaceae), principal fonte de carragenana iota a nível industrial, apresentam bandas de forte absorção na região 905 cm^{-1} (DA2S) e na região 805 cm^{-1} (DA2S), típicas da presença de carragenana iota. O rácio entre as bandas de absorção 805 e 845 cm^{-1} foi calculado e usado como parâmetro para determinar o grau de hibridação iota/kappa. A amostra das Filipinas (D9) apresenta um menor rácio (0.88) do que a da Tanzânia (D8), com 0.92. Em qualquer dos casos, a carragenana produzida é quase exclusivamente constituída por carragenana iota. Pela análise dos espectros de FT-Raman do pó de alga desta carragenófito (Figura 3.78 – D8, D9), confirma-se a presença de uma carragenana predominantemente constituída pela fracção iota (pico 807 cm^{-1} , DA2S) e pelo respectivo precursor nu (picos 825 cm^{-1} - G/D2S e 970 cm^{-1} - G/D).

A Figura 3.79 apresenta os espectros FTIR-ATR e FT-Raman do pó de alga (D12a) e da carragenana extraída alcalinamente (D12b) do *B. gelatinum* (Solieriaceae), principal fonte industrial de carragenana beta. Os espectros FTIR-ATR do pó de alga (D12a) e da carragenana (D12b) de *B. gelatinum*, apresentam bandas de forte absorção na região 845 cm^{-1} (G4S) e na região 890 cm^{-1} (β -D-galactose não sulfatada), típicas da presença de uma carragenana híbrida kappa/beta. O rácio entre as bandas de absorção 845 e 890 cm^{-1} foi calculado e usado como parâmetro para determinar o grau de hibridação kappa/beta. Um rácio de aproximadamente 1, em ambos os casos (carragenana nativa – pó de alga e carragenana de extracção alcalina), indica a presença de uma carragenana híbrida constituída por percentagens idênticas de fracções kappa e beta. A análise do pó de alga por FT-Raman revela-nos a presença de uma carragenana híbrida, do tipo kappa/beta mas, além disso, a presença dos precursores biológicos das carragenanas gelificantes, ou seja, carragenana mu e gamma (picos 815 cm^{-1} e 869 cm^{-1}) (Chopin *et al.*, 1999a). Estes picos, referentes aos precursores, desaparecem no espectro relativo à carragenana extraída alcalinamente (D12b).

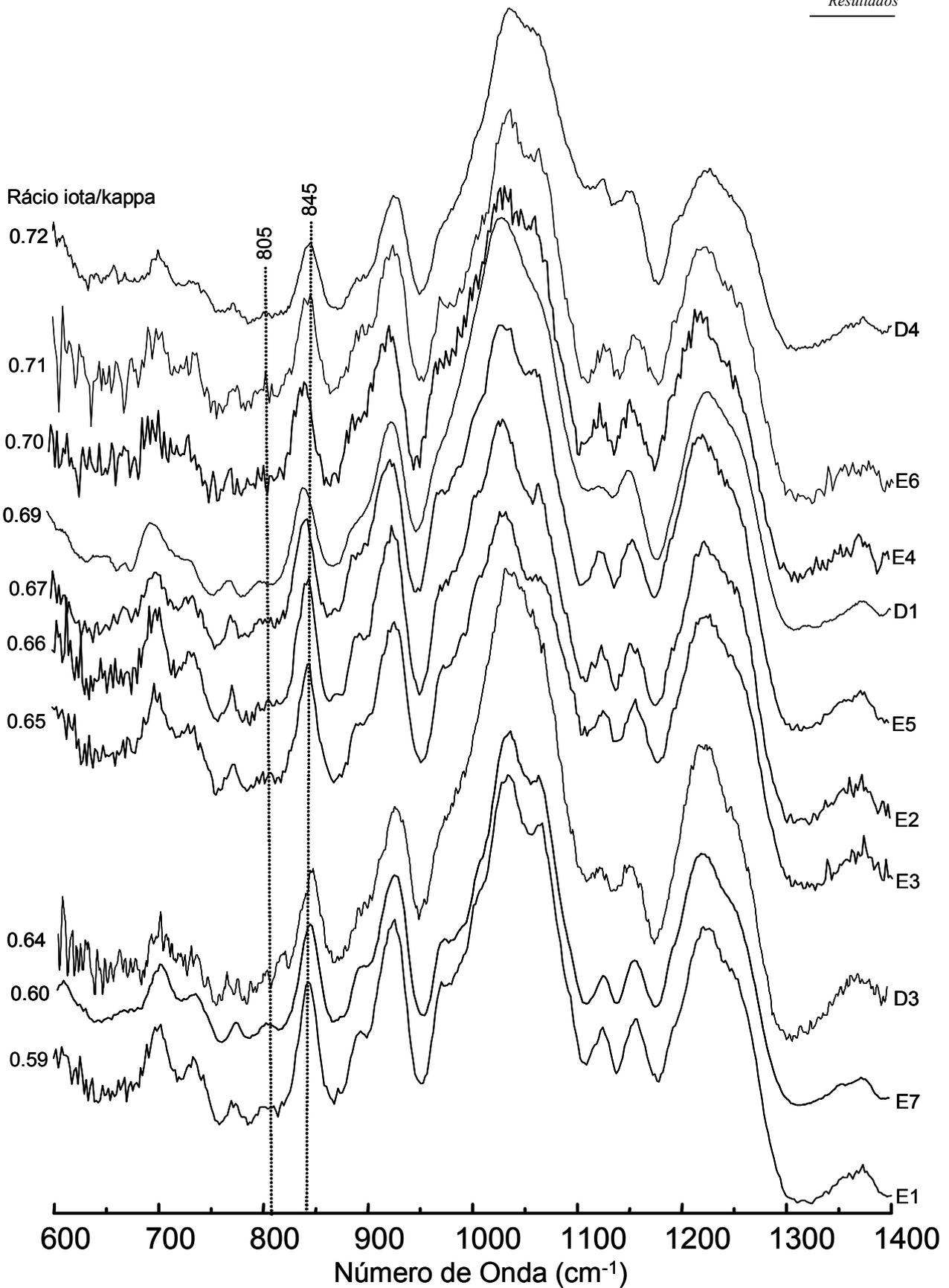


Figura 3.74 – Espectros FTIR-ATR: (E1 – E7) carragenana nativa de *K. alvarezii* do Panamá (carragenana extraída e analisada após períodos crescentes de cultura da alga); (D3) pó de alga de *K. alvarezii* da Indonésia; (D1) pó de alga de *K. alvarezii* da Tanzânia; (D4) pó de alga de *K. alvarezii* das Filipinas.

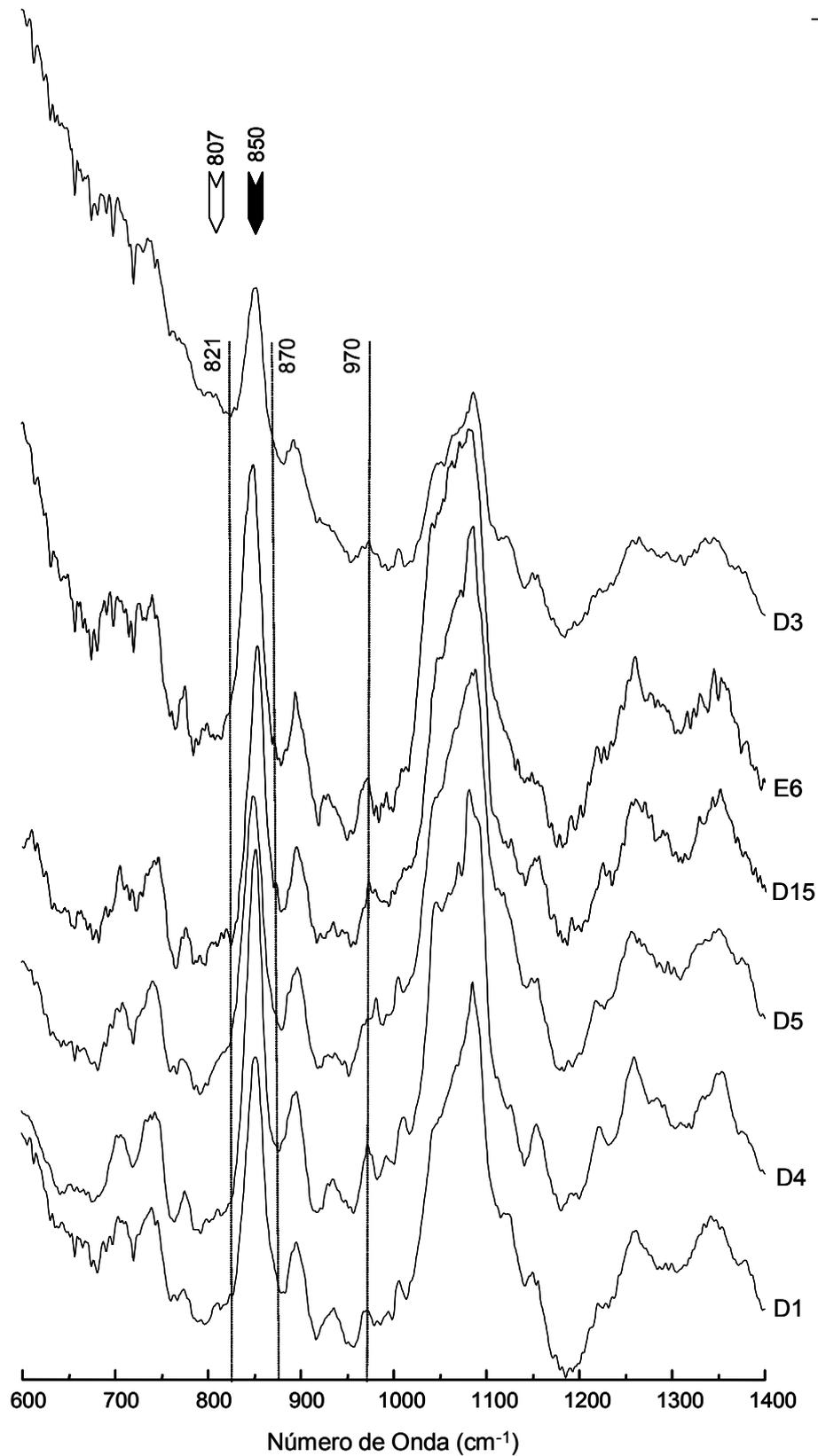


Figura 3.75 – Espectros FT-Raman: D1 - pó de alga de *K. alvarezii* (Tanzânia); D4 - pó de alga de *K. alvarezii* (Filipinas); D5 - pó de alga de *K. striatum* (Madagáscar); D15 – pó de alga de *K. isiforme* (Colômbia); E6 - carragenana nativa de *K. alvarezii* (Panamá); D3 – pó de alga de *K. alvarezii* (Indonésia).

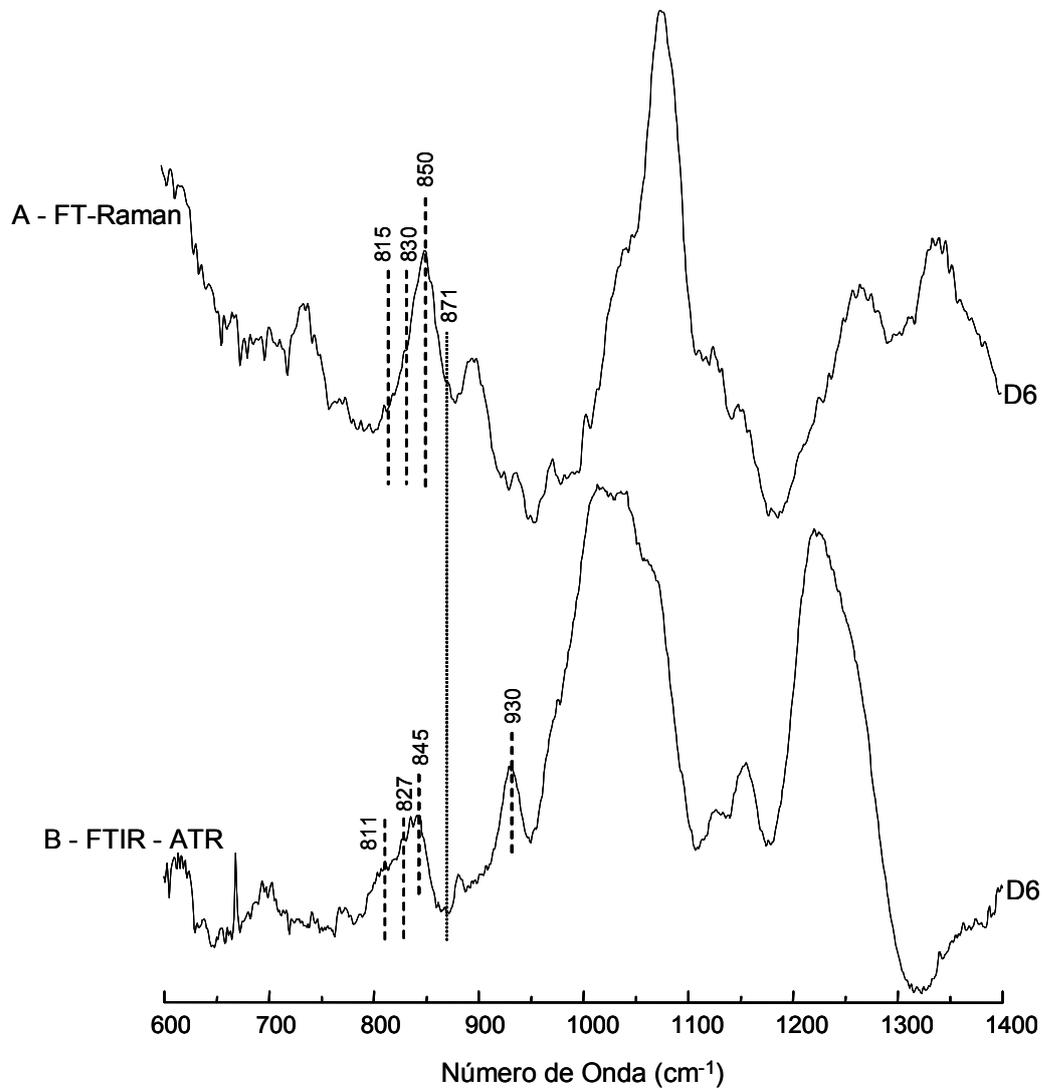


Figura 3.76 – Espectros de FT-Raman (A) e FTIR-ATR (B) de *C. crispus* (D6), com origem no Canadá. Visto tratar-se de uma mistura de gerações (amostra industrial), os espectros apresentam, simultaneamente, picos característicos da carragenana híbrida kappa/iota e da carragenana lambda.

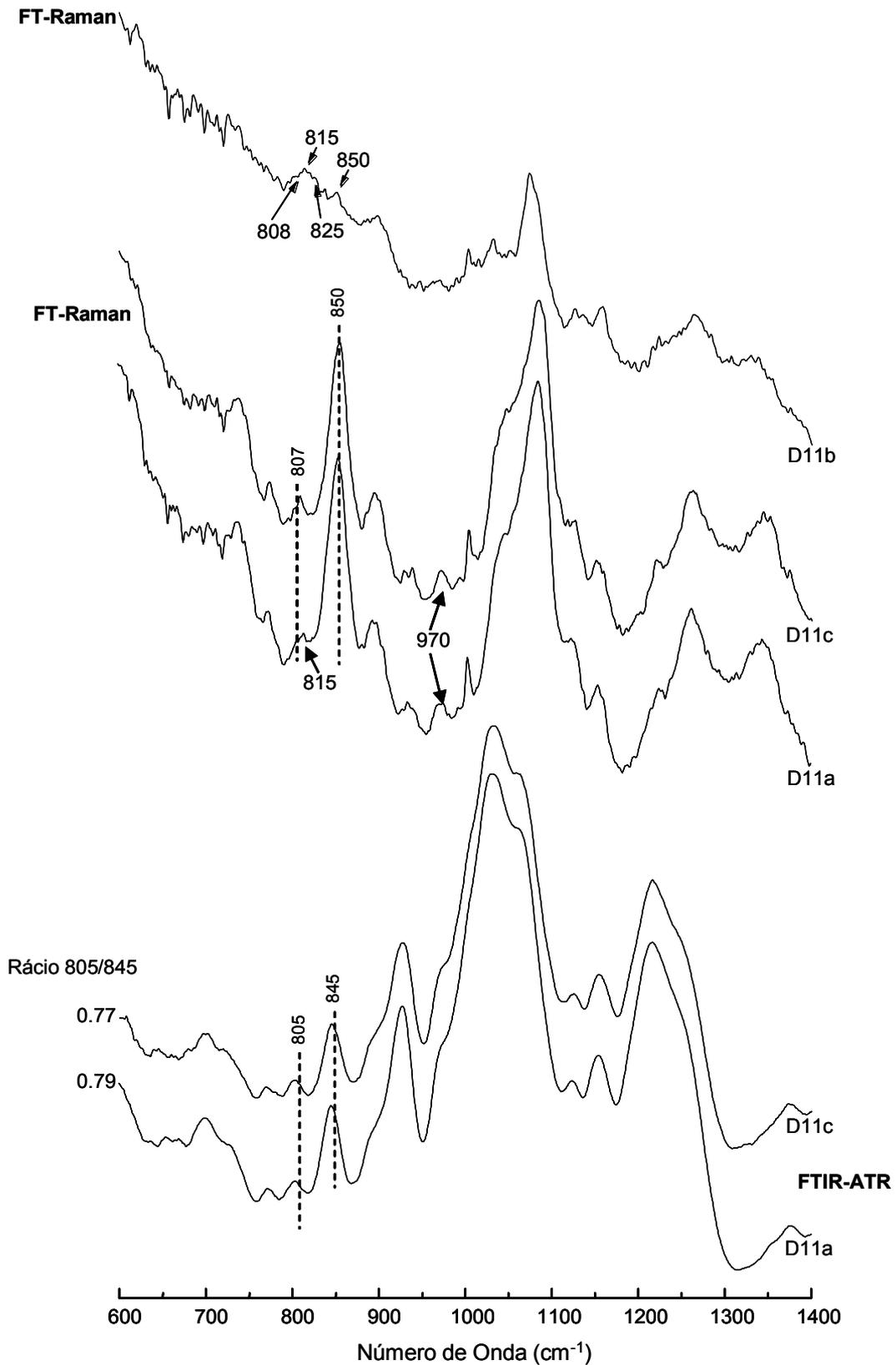


Figura 3.77 – Espectros de FTIR-ATR e FT-Raman de *C. chamissoi* (Chile): D11a – gametófitos femininos; D11b – tetrasporófitos; D11c – talos não-frutificados.

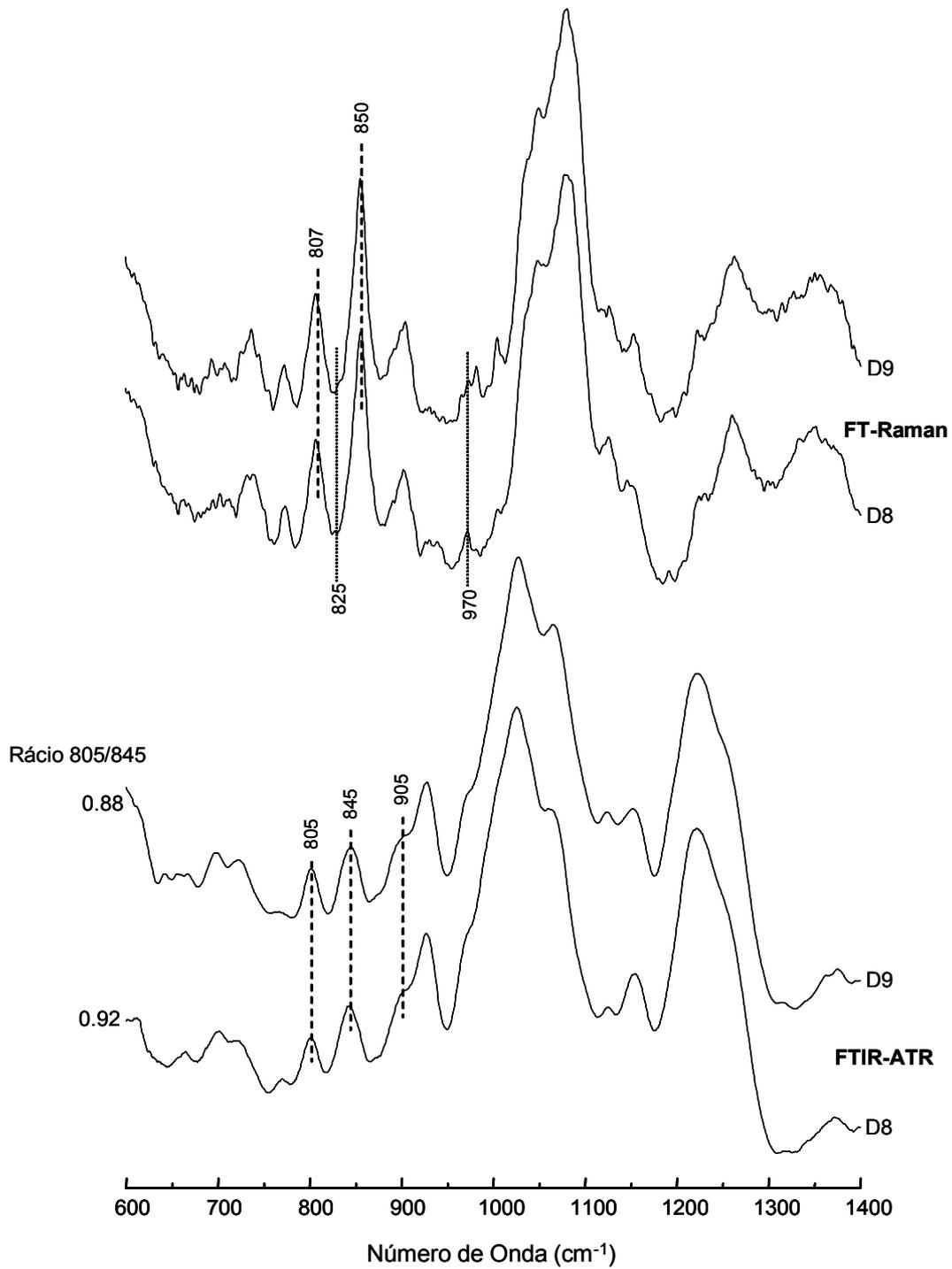


Figura 3.78 – Espectros de FTIR-ATR e FT-Raman de *E. denticulatum*: D8 – Tanzânia; D9 – Filipinas. Esta espécie, em ambos os casos, produz predominantemente carragenana iota.

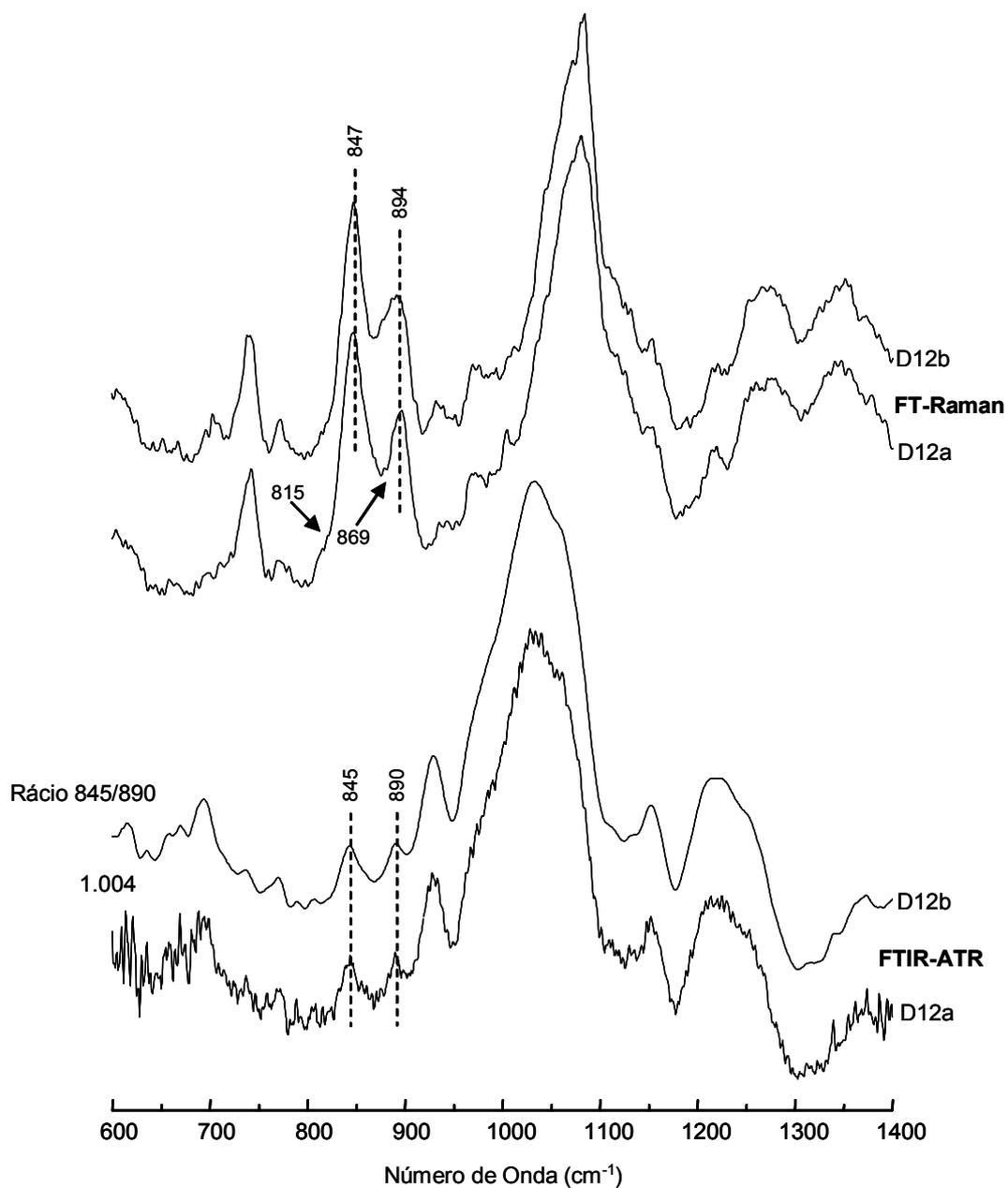


Figura 3.79 – Espectros de FTIR–ATR e FT-Raman de *B. gelatinum* (Filipinas): D12a – pó de alga; D12b – carragenana híbrida kappa/beta (extraída alcalinamente).

Tabela 3.7 – Composição das carragenanas produzidas pelas carragenófitas usadas a nível industrial, determinada por espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman)

Código	Carragenófitas	Geração	Origem	Carragenana ¹		
				% peso seco	Análise por FTIR-ATR (rácio iota/kappa)	Composição Nativa ²
D1	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	-	Tanzânia (C)	18.7	0.69	kappa/iota (mu)
D2	<i>Sarcothalia crispata</i>		Chile	16.7	-	kappa/iota (mu/nu)
D3	<i>K. alvarezii</i>	-	Indonésia (C)	20.0	0.64	kappa/iota (mu)
D4	<i>K. alvarezii</i>	-	Filipinas (C)	30.4	0.72	kappa/iota (mu)
D5	<i>K. striatum</i>	-	Madagáscar (C)	75.6	-	kappa/iota (mu)
D6	<i>Chondrus crispus</i>	Mistura	Canada (S)	33.8	kappa/iota (mu/nu) lambda	kappa/iota (mu/nu) lambda/alfa
D7	<i>K. alvarezii</i>	-	Filipinas (C)	84.4	-	-
D8	<i>Eucheuma denticulatum</i>	-	Tanzânia (C)	31.5	0.88	iota/kappa (nu)
D9	<i>E. denticulatum</i>	-	Filipinas (C)	39.7	0.92	iota (nu)
D10	<i>E. denticulatum</i>	-	Madagáscar (C)	35.3	-	iota (nu)
D11a	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	GF	Chile (S)	14.2	0.79	kappa/iota (mu/nu)
D11b	<i>C. chamissoi</i>	T	Chile (S)	24.6	-	ksi/theta
D11c	<i>C. chamissoi</i>	NF	Chile (S)	13.5	0.77	kappa/iota (mu/nu)
D12a	<i>Betaphycus gelatinum</i>	-	Filipinas (C)	71.0	kappa/beta 1.004	kappa/beta (mu/gamma)
D12b	<i>B. gelatinum</i> (carragenana NaOH)	-	Filipinas (C)	71.0	kappa/beta 1.004	kappa/beta ⁵
D13a	<i>S. crispata</i>	NF	Chile (S)	14.6	-	kappa/iota (mu/nu)
D13b	<i>S. crispata</i>	GF	Chile (S)	5.4	-	kappa/iota (mu/nu)
D14	<i>Mastocarpus papillatus</i>	GF	Chile (S)	5.4	-	kappa/iota (mu/nu)
D15	<i>Eucheuma isiforme</i>	-	Colômbia (C)	20.4	-	kappa/iota (mu)
E1 – E7	<i>K. alvarezii</i> ⁴	-	Panamá (C)	-	0.50 – 0.71 ⁽³⁾	kappa/iota (mu)

T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos femininos; G – Gametófitos; NF – Talos não-frutificados; C – Alga cultivada; S – Alga selvagem; 1 - As carragenanas encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego; as letras entre parêntesis () correspondem aos precursores biológicos das carragenanas, presentes nas amostras de pó de alga; 2 – A identificação da composição nativa das carragenanas foi feita com base na análise por FT-Raman do pó de alga; 3 – Análise de carragenana nativa (extração aquosa); 4 – Alga submetida a períodos crescentes de cultura; 5 – análise da carragenana híbrida kappa/iota (obtida por extração alcalina, ou seja, sem precursores) por FT-Raman.

3.6 – Análise dos ficocolóides por RMN

3.6.1 – Análise por ¹H-RMN de amostras padrão de carragenana

Foram analisadas por ¹H-RMN amostras de carragenana comerciais (ver alínea 2.9) e amostras de carragenanas extraídas: κ (kappa), ι (iota), λ (lambada), μ (mu), ν (nu), θ (theta), β (beta) e ξ (ksi). Algumas destas carragenanas foram obtidas por extracção total (ver alínea 2.8.1) e por extracção alcalina (ver alínea 2.8.2), a partir das seguintes espécies: *Betaphycus gelatinum*, *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Eucheuma denticulatum*, *Gigartina skottsbergii*, *Kappaphycus alvarezii* e *Sarconema scinaoides*.

Os deslocamentos químicos obtidos neste estudo encontram-se sumariados na Tabela 3.7. Os deslocamentos químicos dos protões anoméricos-α das carragenanas apresentados na Tabela 3.8, são ligeiramente diferentes daqueles apresentados na literatura (Ciancia *et al.*, 1993a; van de Velde *et al.*, 2002a).

Tabela 3.8 – Deslocamentos químicos (ppm) dos protões α-anoméricos das carragenanas, com referência ao standard interno DSS a 0 ppm^a.

Carragenana	Monossacarídeo ^b	Deslocamento químico (ppm)
β (beta)	DA	5.074
ι (iota)	DA2S	5.292
κ (kappa)	DA	5.093
λ (lambada)	D2S,6S	5.548
ν (nu)	D2S,6S	5.501
μ (mu)	D6S	5.238
θ (theta)	DA2S	5.30
ξ (ksi)	D2S	5.49

- a. Carragenana (30 mg ml⁻¹), DSS (10 mM) e Na₂HPO₄ (20 mM) em D₂O, determinado a 65 °C.
 b. Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994)

Em adição às unidades repetitivas de carragenana mais comuns encontram-se, frequentemente, “contaminantes” em amostras laboratoriais e industriais de carragenana. O ácido pirúvico é um componente comum que surge nalgumas carragenanas de estrutura complexa; este forma um acetal cíclico nas posições 4 e 6 de resíduos da galactose 3-ligada. Este substituinte pode ser identificado pela presença, nos espectros de RMN, de sinais característicos. O ácido pirúvico é também detectável nos espectros de ¹H-RMN pela ressonância do protão metil com um deslocamento químico de 1.44 ppm relativamente ao DSS. Em adição ao sinal do metil são observados na região dos protões anoméricos sinais característicos a 5.30 ppm e 5.49 ppm.

No espectro de ¹H-RMN, o amido florídeo, contaminante natural das carragenanas, detecta-se pela presença do sinal do protão anomérico da α(1·4) -ligada D-glucopiranosil, a 5.35 ppm. A ressonância do protão anomérico da α(1·6) -ligada D-glucopiranosil surge com o deslocamento químico a 0.39 ppm.

Quando é aplicado 2-propanol, para precipitar as carragenanas num extracto líquido (método usado nalguns processos laboratoriais e industriais de extracção de carragenanas) surge, num espectro de ¹H-RMN, um sinal (triplete) característico a 1.169 ppm.

3.6.2 – Análise por ^{13}C -RMN de amostras padrão de carragenana

Amostras de carragenanas comerciais (ver lista na alínea 2.9) e de carragenanas extraídas em água e em solução aquosa alcalina (*Betaphycus gelatinum*, *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Eucheuma denticulatum*, *Gigartina skottsbergii*, *Kappaphycus alvarezii* e *Sarconema scinaoides*) foram analisadas por ^{13}C -RMN.

A atribuição das ressonâncias das carragenanas observadas nos espectros de ^{13}C -RMN foi feita com base nos espectros e nos dados sumariados na literatura (van de Velde *et al.*, 2002a; Pereira *et al.*, 2003). Os dados referentes aos deslocamentos químicos obtidos neste estudo encontram-se sumariados na Tabela 3.9. Os deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C NMR da carragenana kappa e iota, relativamente ao DSS estão de acordo com os reportados pela literatura (Pereira *et al.*, 2003), apesar destes terem sido determinados sob diferentes condições. De uma forma geral, os deslocamentos químicos sumariados na Tabela 3.8 são maiores (em média cerca de 2.1 ppm) do que os referidos por van de Velde *et al.* (2002a). Esta diferença é igual à diferença entre os deslocamentos referentes ao DMSO, incluindo aos referidos por (Usov *et al.*, 1980), relativamente aos medidos com o DSS.

Tabela 3.9 – Deslocamentos químicos ^{13}C -RMN (ppm) das principais carragenanas, com referência ao standard interno DSS a 0 ppm^a.

Carragenana	Unidade ^b	Deslocamentos químicos (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β (beta)	G	104.81	71.72	82.58	68.56	77.55	63.49
	DA	96.81	72.40	81.64	80.33	79.26	71.72
ι (iota)	G4S	104.43	71.53	79.06	74.34	77.04	63.52
	DA2S	94.29	77.15	80.04	80.55	79.29	72.02
κ (kappa)	G4S	104.70	71.72	80.98	76.25	77.00	63.49
	DA	97.34	72.11	81.41	80.54	79.07	71.72
λ (lambda)	G2S	105.61	79.61	77.99	66.35	76.51	63.45
	D2S,6S	93.85	77.04	71.76	82.61	70.89	70.25
μ (mu)	G4S	107.00	72.69	80.54	76.25	77.1	63.48
	D6S	100.26	70.7	72.8	81.40	70.5	69.89
ν (nu)	G4S	106.96	72.40	82.42	73.36 ^d	77.15	63.58
	D2S,6S	100.53	78.58	70.37	82.13	70.37	70.02
θ (theta)	G2S	102.57	79.8	79.4	69.97	77.05	63.38
	DA2S	97.81	77.05	79.6	81.75	79.2	72.35
ξ (ksi) ^c	G2S	105.44			66.92		
	D2S	94.94					

a. Carragenana (30 mg ml⁻¹), DSS (10 mM) e Na₂HPO₄ (20 mM) em D₂O, determinado a 65 °C.

b. Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al.* (1994).

c. Só algumas poucas ressonâncias do espectro da carragenana ξ estão atribuídas na literatura (Falshaw e Furneaux, 1995a). Um estudo detalhado da interpretação do espectro RMN da carragenana híbrida ξ/θ está a decorrer neste momento e o resultado será publicado brevemente (Usov, A. I.; Shashkov, A. S.; Rollema, H. S.; Pereira, L.; Van de Velde, F. *Carbohydr. Res.*, em preparação).

3.6.3 – Análise dos ficocolóides produzidos pelas carragenófitas

3.6.3.a – Carragenófitas portuguesas

A informação sobre as datas de colheita, geração, tipo e quantidade de carragenana produzida por cada uma das algas estudadas, encontra-se na Tabela 3.10. O resumo da análise da composição (por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$) das carragenanas obtidas a partir das diferentes carragenófitas portuguesas estudadas encontra-se na Tabela 3.11.

Os espectros $^1\text{H-RMN}$ das carragenanas extraídas alcalinamente dos gametófitos de *Ahnfeltiopsis devoniensis* (Figura 3.81) revelam, na zona dos protões anoméricos, dois sinais principais a 5.29 ppm e a 5.09 ppm. Estes sinais correspondem aos protões anoméricos da carragenana iota (DA2S) e da carragenana kappa (DA), respectivamente. Um componente menor, detectado no espectro B (Figura 3.81), origina um sinal ténue a 5.50 ppm que corresponde à presença da carragenana nu (D2S,6S). As intensidades das ressonâncias anteriormente referidas são usadas para quantificar cada um dos componentes presentes na carragenana extraída do *A. devoniensis* (Tabela 3.10).

A Figura 3.82 apresenta os espectros $^1\text{H-RMN}$ das carragenanas extraídas de *Calliblepharis jubata* (F e G - talos não frutificados, H - gametófitos femininos e I - talos tetraspóricos). Todos os espectros, excepto o espectro G, apresentam três sinais principais: 5.50 ppm (carragenana nu), 5.29 ppm (carragenana iota) e 5.09 ppm (carragenana kappa). O espectro G apresenta um só sinal, na zona dos protões anoméricos, correspondente à carragenanas iota (5.29 ppm).

Os espectros $^1\text{H-RMN}$ das carragenanas do *Chondracanthus acicularis* encontram-se representados na Figura 3.83. O espectro J (carragenana extraída alcalinamente dos gametófitos femininos) apresenta dois sinais proeminentes a 5.29 ppm (carragenana iota) e a 5.09 ppm (carragenana kappa) e dois sinais ténues a 5.49 ppm (piruvato) e a 5.35 ppm (amido florídeo). O espectro L (carragenana extraída aquosamente dos gametófitos femininos) apresenta os mesmos sinais do espectro J, estando apenas ausente o sinal 5.35 ppm referente ao amido florídeo. O espectro M (carragenana extraída dos talos – aparentemente - tetraspóricos de *C. acicularis*) apresenta sinais a 5.49 ppm (carragenana ksi), 5.30 ppm (carragenana theta) e 5.093 ppm (carragenana kappa). A presença de carragenana kappa nesta amostra pode ser explicada pelo facto de, como explicado anteriormente (ver alínea 3.3.7), devido à natureza dos talos desta espécie (delgados e muito emaranhados) não ser fácil separar as diferentes gerações, ou então, como referido noutros trabalhos (Gaspar, 2002) o *C. acicularis* poder apresentar, tal como a *Gigartina pistillata*, talos heterospóricos, apresentando, simultaneamente no mesmo talo, ramos com cistocarpos e ramos com soros de tetrasporocistos.

As carragenanas dos talos não-frutificados de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* revelam, na zona dos protões anoméricos dos espectros de $^1\text{H-RMN}$, dois sinais proeminentes: um a 5.29 ppm e outro a 5.09 ppm (Figura 3.84 – N, O). Estes sinais correspondem aos protões anoméricos da carragenana iota (DA2S) e da carragenana kappa (DA), respectivamente. Os componentes menores, detectados nos espectros das carragenanas dos gametófitos femininos (Figura 3.84 – P, Q) originam sinais ténues a 5.35 ppm e correspondem os protões anoméricos do amido florídeo, contaminante natural de algumas amostras de carragenanas. Outros componentes menores encontrados nos espectros das carragenanas nativas (Figura 3.84 – R, S) dão origem a sinais a 5.50 ppm (carragenana mu) e 5.24 ppm (carragenana nu) e

correspondem aos precursores biológicos das carragenanas gelificantes kappa e iota, respectivamente.

O espectro ^{13}C -RMN da carragenana extraída alcalinamente (gametófitos femininos e talos não frutificados) apresentam, na região anomérica, três picos principais (Figura 3.86 – P, N): 104.43 ppm, referente ao carbono anomérico dos resíduos de β -D-galactose-4-sulfato (**G4S**), comum às carragenanas kappa e iota; 97.34 ppm, correspondente ao carbono anomérico da 3-6-anidro-galactose (**DA**) da carragenana kappa e 94.29 ppm relativo ao carbono anomérico da anidro-galactose-2-sulfato (**DA2S**) da carragenana iota.

Os espectros de ^{13}C da carragenana nativa e extraída alcalinamente dos tetrasporófitos (Figura 3.86 – U, T) mostram sinais a 105.44 ppm e 94.94 ppm, relativos aos carbonos anoméricos da carragenana ksi, e 102.57 ppm e 97.81 ppm, relativos aos carbonos anoméricos da carragenana theta. Os espectros de ^1H -NMR (Figura 3.85) confirmam o diagnóstico resultante da análise dos espectros de ^{13}C , apresentando sinais a 5.49 ppm (carragenana ksi), 5.30 ppm (carragenana theta), em todas as amostras estudadas: T (carragenana extraída alcalinamente dos talos tetraspóricos); U (carragenana nativa obtida dos talos tetraspóricos); e V (carragenana nativa modificada alcalinamente).

A Figura 3.87 apresenta espectros ^1H -RMN de uma amostra comercial (WCFS) de carragenana lambda e das carragenanas extraídas de gametófitos femininos (GF) de *C. crispus* e de *G. pistillata*, de tetrasporófitos (T) e de talos heterospóricos – ramos portadores de soros tetraspóricos ($\text{H}\oplus$) de *Gigartina pistillata* (extração alcalina). Estes espectros apresentam cinco sinais distintos: 5.09 ppm (carragenana kappa), 5.29 ppm (carragenana iota), 5.55 ppm (carragenana lambda), 5.49 (carragenana ksi), 5.30 ppm (piruvato) e 5.35 (amido florídeo).

A Figura 3.88 apresenta os espectros ^1H -RMN das carragenanas extraídas alcalinamente de *Gymnogongrus crenulatus* (talos tetrasporoblásticos). Todos os espectros apresentam dois sinais principais: 5.09 ppm (carragenana kappa) e 5.29 ppm (carragenana iota). Dois sinais secundários surgem a 5.35 ppm (amido florídeo) e a 5.49 ppm (piruvato).

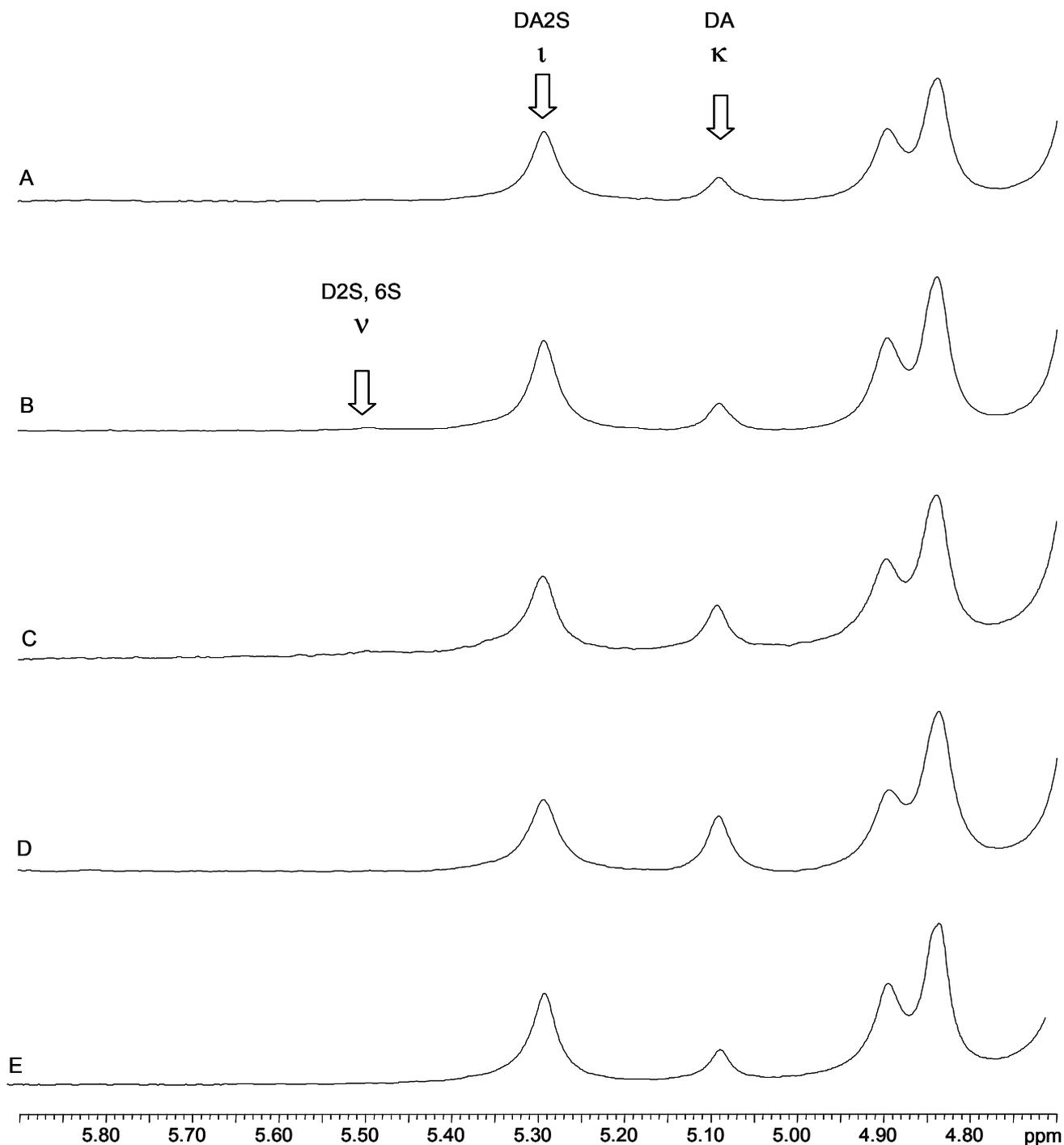


Figura 3.81 – Espectros $^1\text{H-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Ahnfeltiopsis devoniensis*: A, B, C, D, E (gametófitos, extracção alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

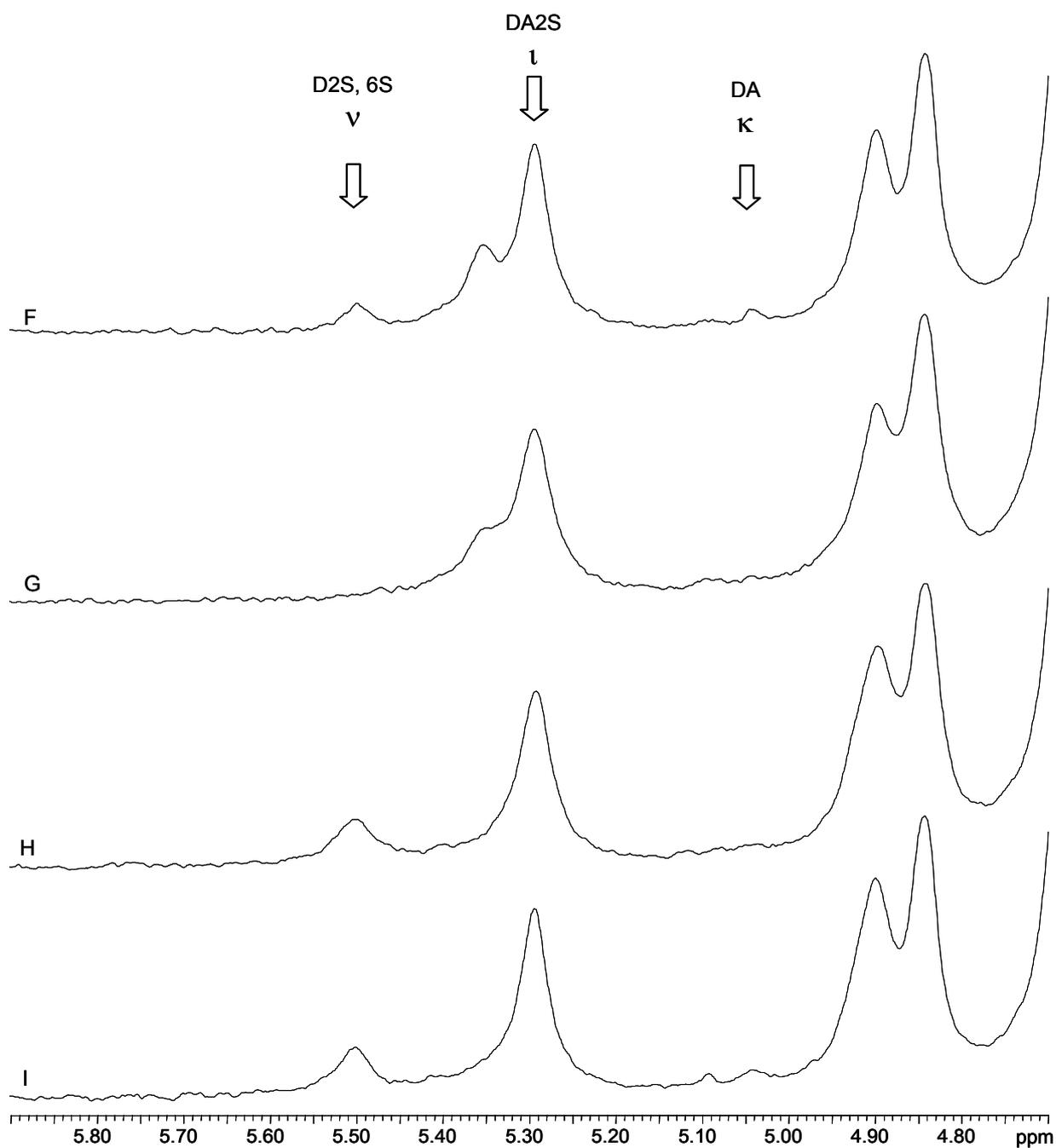


Figura 3.82 – Espectros $^1\text{H-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Calliblepharis jubata*: F (talos não frutificados – extracção alcalina); G (talos não frutificados – extracção alcalina); H (gametófitos femininos – extracção alcalina); I (tetrasporófitos – extracção alcalina). As diferentes fracções e carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

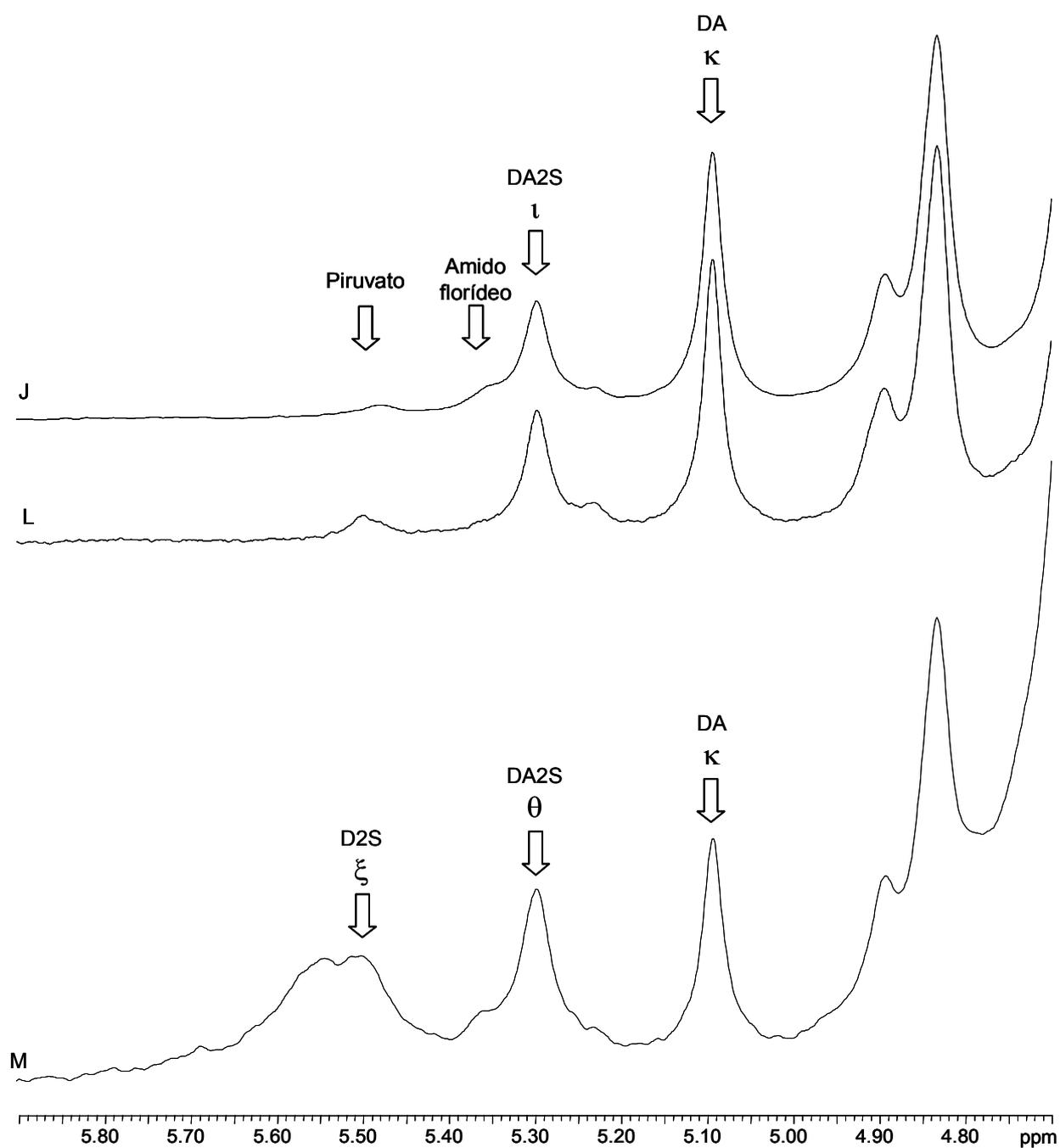


Figura 3.83 – Espectros ¹H-NMR das carragenanas extraídas de *Chondracanthus acicularis*: J (gametófito feminino - extração alcalina); L (gametófito feminino - extração aquosa); M (mistura de gerações ou talos heterospóricos – extração alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

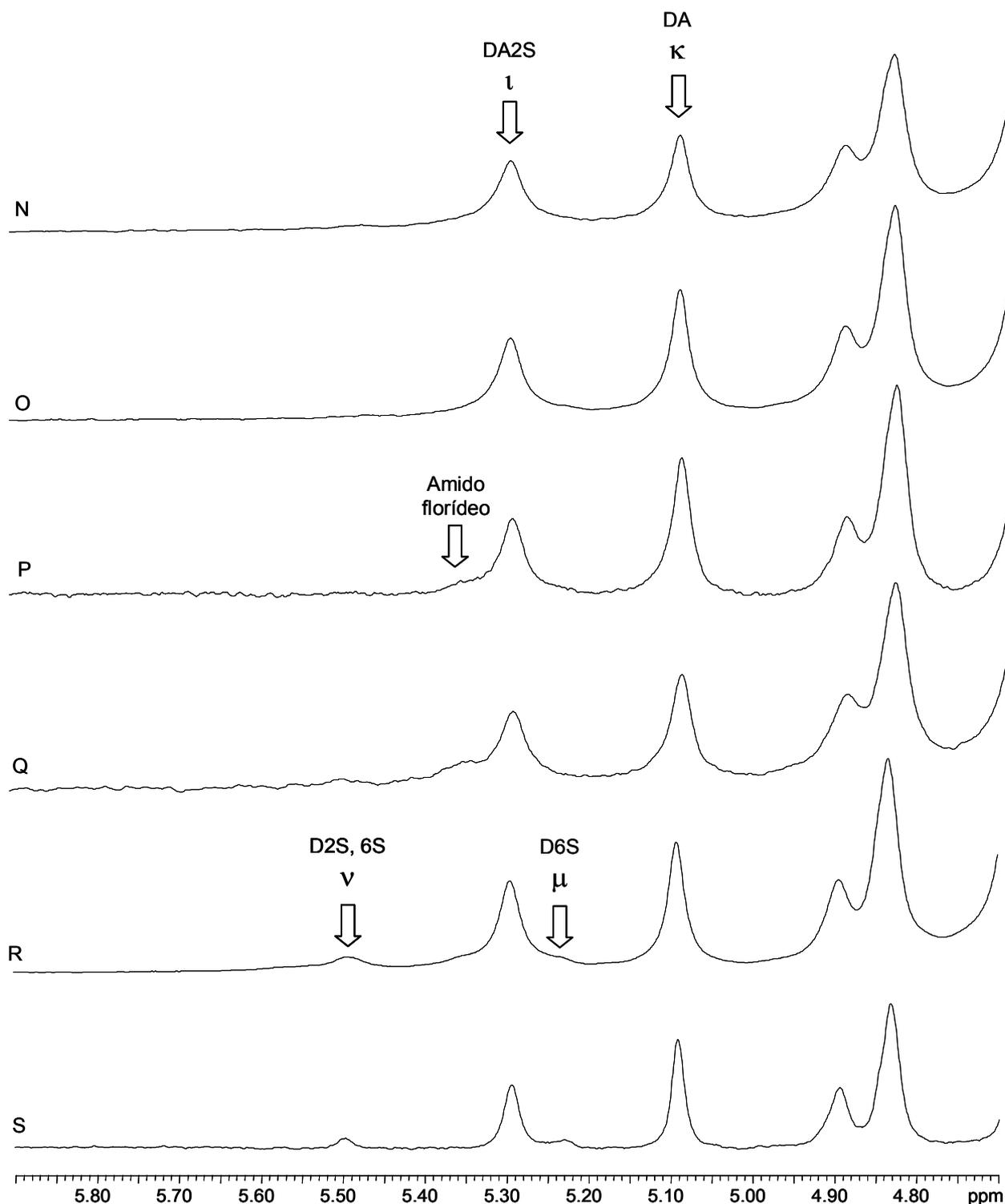


Figura 3.84 – Espectros ¹H-NMR das carragenanas extraídas de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: N (talos não frutificados – extracção alcalina); O (talos não frutificados – extracção alcalina); P (gametófitos femininos – extracção alcalina); Q (gametófitos femininos – extracção alcalina); R (talos não frutificados – extracção aquosa); S (gametófitos femininos – extracção aquosa). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

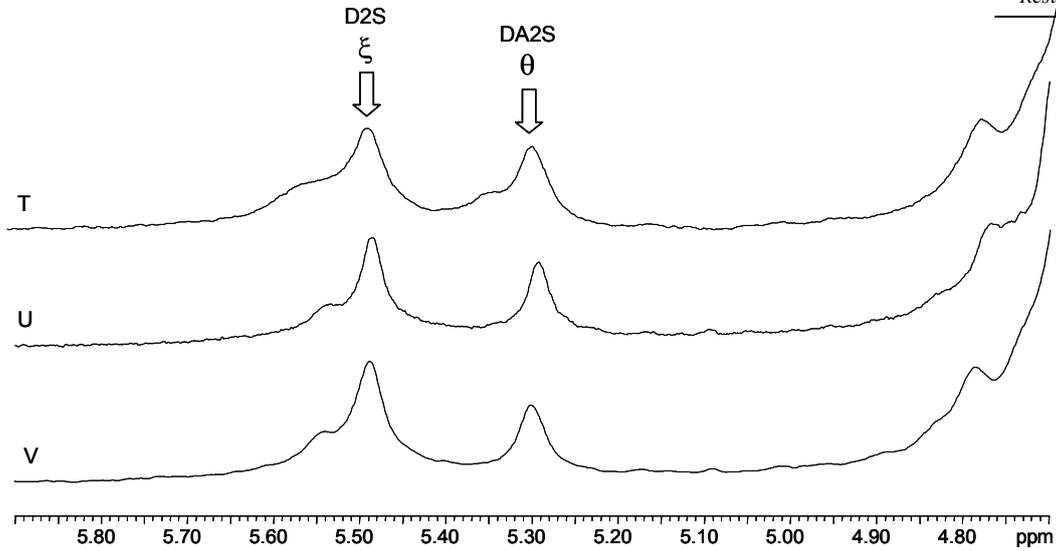


Figura 3.85 – Espectros $^1\text{H-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: T (tetrasporófitos - extracção alcalina); U (tetrasporófitos - extracção aquosa); V (tetrasporófitos – transformação alcalina da amostra U). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

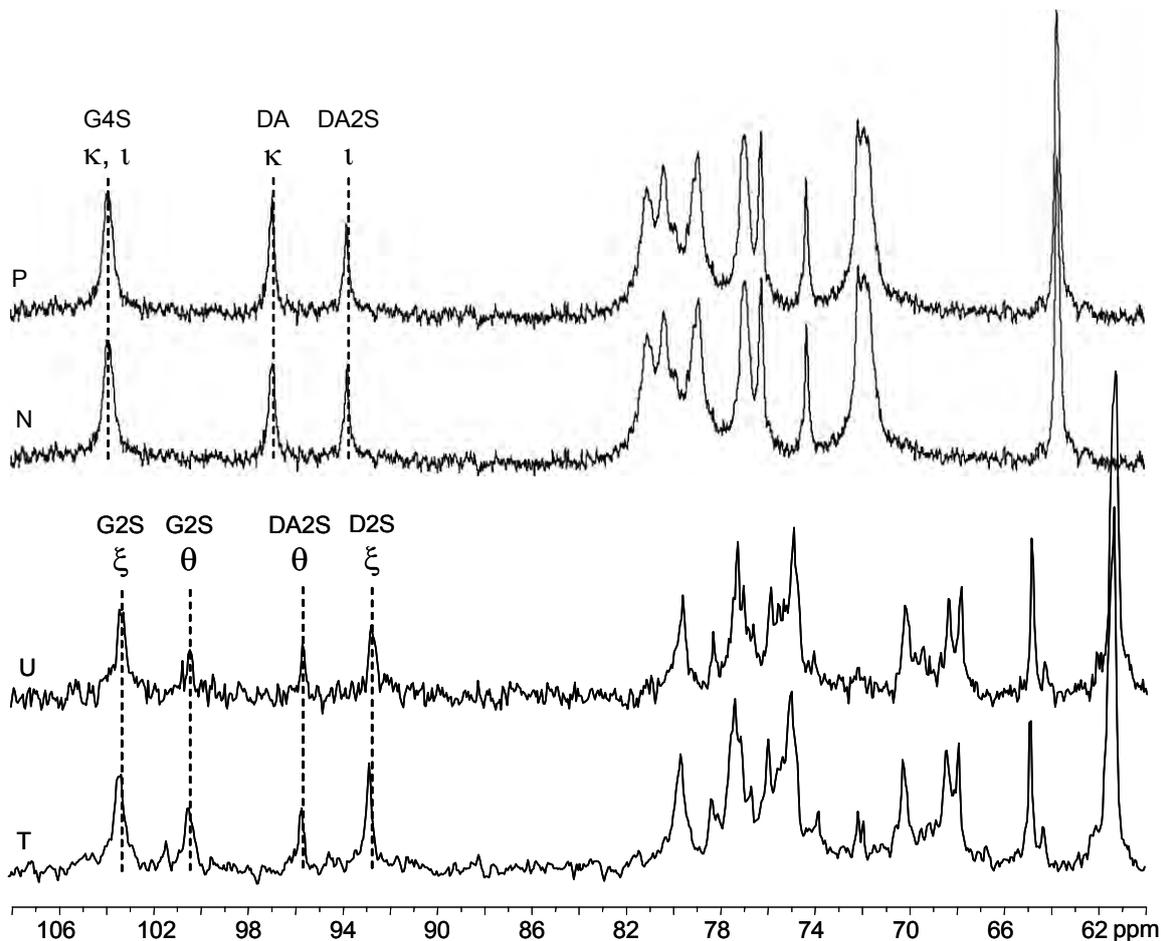


Figura 3.86 – Espectros $^{13}\text{C-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: P (gametófitos femininos - extracção alcalina); N (talos não frutificados - extracção alcalina); U (tetrasporófitos – extracção aquosa); T (tetrasporófitos – extracção alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

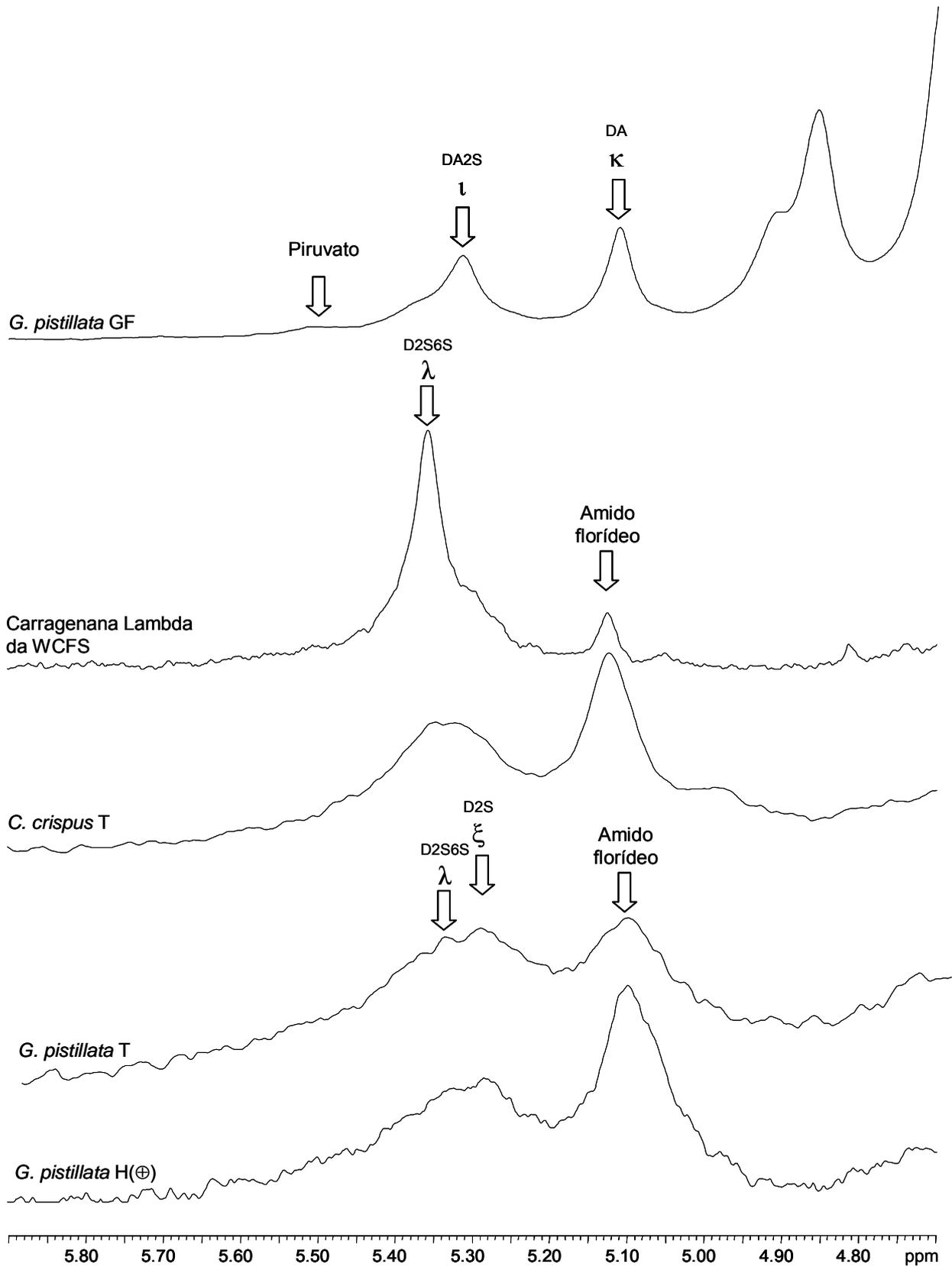


Figura 3.87 – Espectros ¹H-RMN de uma amostra comercial (WCFS) de carragenana lambda e das carragenanas extraídas de gametófitos femininos (GF) de *C. crispus* e *G. pistillata*, de tetrasporófitos (T) e de talos heterospóricos – ramos portadores de soros tetraspóricos (H[⊕]) de *Gigartina pistillata* (extração alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

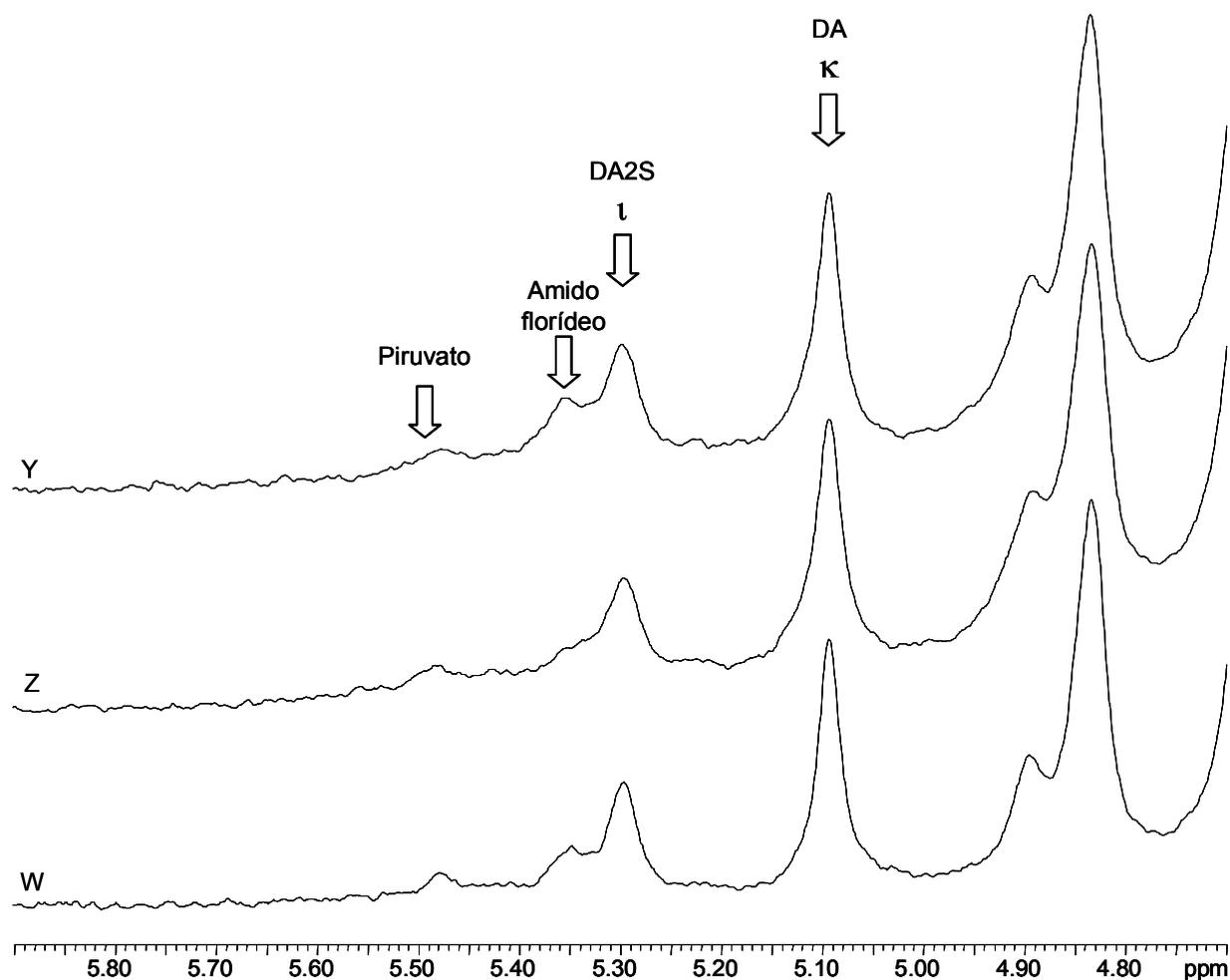


Figura 3.88 – Espectros $^1\text{H-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Gymnogongrus crenulatus*: Y (talos tetrasporoblásticos - extração alcalina); Z (talos tetrasporoblásticos - extração alcalina); W (talos tetrasporoblásticos - extração alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

Tabela 3.10 – Composição das carragenanas produzidas por cada carragenófito estudada, determinada por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$

Código	Carragenófito	Geração	Data de colheita	Carragenana produzida		
				Tipo de extracção	% peso seco	Composição da carragenana [†] (% mole)
A	<i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i>	G	Ago. 2001	NaOH	12.1	19.8 kappa, 80.2 iota
B	<i>A. devoniensis</i>	G	Jul. 2001	NaOH	11.0	16.7 kappa, 81.1 iota, 2.2 nu
C	<i>A. devoniensis</i>	G	Jun. 2001	NaOH	6.4	29.4 kappa, 70.6 iota
D	<i>A. devoniensis</i>	G	Dez. 2001	NaOH	13.2	22.3-34.7 kappa, 65.3-77.7 iota
E	<i>A. devoniensis</i> ²	G	Jul. 2002	NaOH	18.0	18.5 kappa, 81.5 iota
F	<i>Calliblepharis jubata</i>	NF	Mai. 2001	NaOH	17.6	2.0 kappa, 89.3 iota, 8.7 nu (25.0 % amido florídeo)
G	<i>C. jubata</i>	NF	Fev. 2002	NaOH	18.5	100.0 iota (23.8 % amido florídeo)
H	<i>C. jubata</i>	GF	Abr. 2001	NaOH	26.5	79.7 iota, 20.1 nu
I	<i>C. jubata</i>	T	Mai. 2001	NaOH	21.1	1.7 kappa, 79.8 iota, 18.5 nu
J	<i>Chondracanthus acicularis</i>	GF	Jul. 2001	NaOH	55.5	60.4 kappa, 34.4 iota, 5.2 piruvato (6.4 % amido florídeo)
L	<i>C. acicularis</i>	GF	Jul. 2001	H ₂ O	-	58.8 kappa, 34.5 iota, 6.8 piruvato
M	<i>C. acicularis</i>	Mistura	Out. 2001	NaOH	61.0	22.8 kappa, 31.4 theta, 45.9 ksi
N	<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Dez. 2001	NaOH	25.9	49.8 kappa, 50.2 iota
O	<i>C. teedei</i> lus.	NF	Ago. 2002	NaOH	26.2	55.8 kappa, 44.2 iota
P	<i>C. teedei</i> lus.	GF	Jun. 2001	NaOH	43.6	58.1 kappa, 41.9 iota (5.0 % amido florídeo)
Q	<i>C. teedei</i> lus.	GF	Fev. 2002	NaOH	39.6	55.7 kappa, 44.3 iota (11.4 % amido florídeo)
R	<i>C. teedei</i> lus.	NF	Nov. 2003	H ₂ O	-	47.2 kappa, 45.8 iota, 0.7 mu, 6.3 nu
S	<i>C. teedei</i> lus.	GF	Abr. 2003	H ₂ O	-	52.7 kappa, 37.5 iota, 4.6 mu, 5.2 nu
T	<i>C. teedei</i> lus.	T	Set. 2001	NaOH	35.6	33.0 theta, 67.0 ksi
U	<i>C. teedei</i> lus.	T	Nov. 2003	H ₂ O	-	33.0 theta, 67.0 ksi
V	<i>C. teedei</i> lus.	T	Nov. 2003	Transformação alcalina de "U"	-	33.0 theta, 67.0 ksi
Fig. 3.87	<i>Gigartina pistillata</i>	GF	Ago. 2001	NaOH	59.7	48.7 kappa, 44.5 iota, 6.8 piruvato, amido florídeo
Fig. 3.87	<i>G. pistillata</i>	T	Mar. 2002	NaOH	35.5	lambda, ksi
Fig. 3.87	<i>G. pistillata</i>	H ⊕	Set. 2001	NaOH	54.4	piruvato, amido florídeo

Tabela 3.10 (Continuação)

Fig. 3.87	<i>C. crispus</i>	T	Fev. 2002	NaOH	39.1	100.0 lambda amido florídeo
Y	<i>Gymnogongrus crenulatus</i>	TB	Set. 2001	NaOH	5.3	59.7 kappa, 31.5 iota, 1.7 mu, 7.1 piruvato (13.3 % amido florídeo)
Z	<i>G. crenulatus</i>	TB	Fev. 2002	NaOH	11.2	60.0 kappa, 28.9 iota, 4.0 mu, 7.1 piruvato (4.9 % amido florídeo)
W	<i>G. crenulatus</i>	TB	Mar. 2003	NaOH	16.6	64,1 kappa, 30.8 iota, 5.1 piruvato (11.2 % amido florídeo)
K	<i>Mastocarpus stellatus</i>	G	Fev. 2002	NaOH	22.5	61.8 kappa, 35.9 iota, 2.3 piruvato (7.4 % amido florídeo)
Xb	<i>M. stellatus</i>	G	Cultura laboratorial em "plexiglass"	NaOH	15.2	59.0 kappa, 41.0 iota

T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos femininos; G – Gametófitos; NF – Talos não-frutificados; TB – Talos tetrasporoblásticos; 1 – A fracção molar dos componentes de cada carragenana é calculada a partir da intensidade integrada do próton anomérico correspondente / somatório das intensidades integradas de todos os prótons anoméricos relativos a cada unidade de carragenana (incluindo a carragenana com piruvato); 2 - Amostra colhida em Miramar;

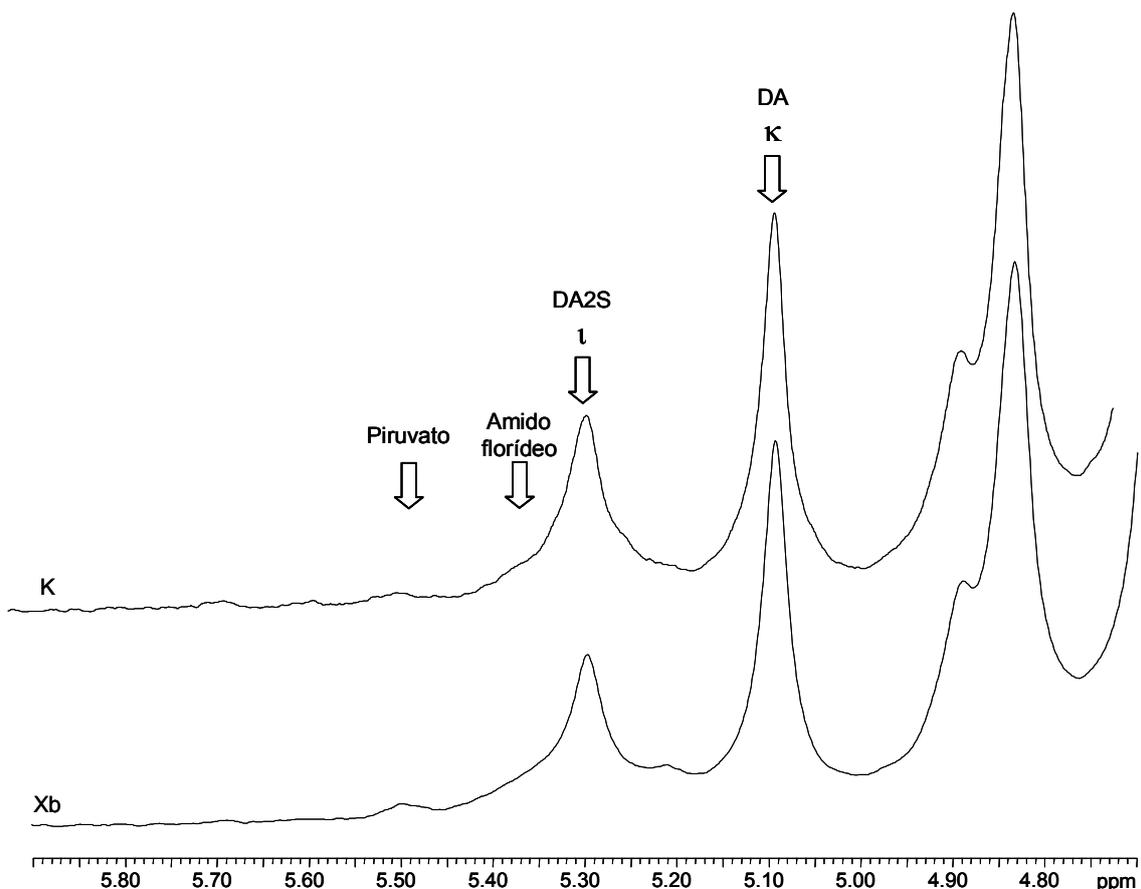


Figura 3.89 – Espectros $^1\text{H-NMR}$ das carragenanas extraídas de *Mastocarpus stellatus*: K (gametófitos - extração alcalina); Xb (gametófitos de cultura laboratorial - extração alcalina). As diferentes fracções de carragenana, constituintes de cada amostra, encontram-se identificadas por letras do alfabeto grego. O código de letras refere-se à nomenclatura desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994).

Tabela 3.11 – Quadro síntese da análise da composição (por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$) das carragenanas obtidas a partir das diferentes carragenófitas portuguesas estudadas

Carragenófitas e tipo de extracção	Composição das carragenanas produzidas ^a								Amido florídeo (%) ^c
	Kappa (%mole)	Iota (%mole)	Mu (%mole)	Nu (%mole)	Lambda (%mole)	Theta (%mole)	Ksi (%mole)	Piruvato (%mole) ^b	
<i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i> G									
NaOH	17 – 35	65 – 82	-	-	-	-	-	-	-
<i>Calliblepharis jubata</i> GF									
NaOH	-	80	-	20	-	-	-	-	-
<i>Calliblepharis jubata</i> NF									
NaOH	0 – 2	89 - 100	-	0 - 9	-	-	-	-	23 - 25
<i>Calliblepharis jubata</i> T									
NaOH	2	80	-	19	-	-	-	-	-
<i>Chondracanthus acicularis</i> GF									
H ₂ O	59	34	-	-	-	-	-	7	-
NaOH	60	35	-	-	-	-	-	5	7
<i>Chondracanthus acicularis</i> T (Obs. mistura de gerações ou talos heterospóricos)									
NaOH	23	-	-	-	-	31	45	-	-
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> GF									
H ₂ O	53	37	5	5	-	-	-	-	-
NaOH	58	42	-	-	-	-	-	-	5
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> NF									
H ₂ O	47 – 51	39 – 46	0 – 2	7 – 9	-	-	-	-	0 - 3
NaOH	49 – 51	49 – 51	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i> T									
H ₂ O	-	-	-	-	-	33	67	-	-
NaOH	-	-	-	-	-	33	67	-	-
<i>Gigartina pistillata</i> GF									
NaOH	49	45	-	-	-	-	-	6	-
<i>Gymnogongrus crenulatus</i> TB									
NaOH	60 - 64	29 - 32	2 - 4	-	-	-	-	5 - 7	5 - 13
<i>Mastocarpus stellatus</i> G									
NaOH	59 - 62	36 - 41	-	-	-	-	-	2	7

- a. A fracção molar dos componentes de cada carragenana é calculada a partir da intensidade integrada do protão anomérico correspondente / somatório das intensidades integradas de todos os protões anoméricos relativos a cada unidade de carragenana (incluindo a carragenana com piruvato). As amplitudes indicam que para algumas espécies foram analisadas, por espectroscopia $^1\text{H-RMN}$, várias amostras.
- b. Intensidade integrada do sinal a 5.49 ppm da carragenana com piruvato / somatório das intensidades integradas de todos os protões anoméricos de cada carragenana identificada.
- c. Intensidade integrada do sinal a 5.35 ppm / intensidade integrada total entre 5.0 e 5.7 ppm.
- T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos femininos; G – Gametófitos; NF – Talos não-frutificados; TB – Talos tetrasporoblásticos.

3.6.3.b – Carragenófitas usadas a nível industrial

Várias espécies de algas usadas a nível industrial (“CP Kelco” e “Degussa texturant systems”) na extracção de carragenanas foram analisadas por espectroscopia de $^1\text{H-NMR}$. A lista das carragenanas, algas que lhes deram origem, fornecedores e a respectiva composição (%mole) encontra-se descrita na Tabela 3.12.

Tabela 3.12 – Composição molecular das carragenanas produzidas comercialmente baseada em espectroscopia de $^1\text{H-NMR}$

Fornecedor	Carragenófitas	Composição das carragenanas (%mole)					Outros componentes (%)		
		κ	ι	μ	ν	λ	Piruvato	n.i.	Amido florídeo
CP Kelco	<i>Agardhiella</i> sp.	1	97				2		11
CP Kelco	<i>Catenella impudica</i>	8	89	1			2		
CP Kelco	<i>Chondrus crispus</i>	75	25						
CP Kelco	<i>C. crispus</i>	70	28	2					2
Degussa	<i>C. crispus</i>	64	36					6	6
CP Kelco	<i>Eucheuma denticulatum</i>	4	96					1	
Degussa	<i>E. denticulatum</i>	4	96				4		12
CP Kelco	<i>E. platycladum</i>	79	17	3	1				
CP Kelco	<i>Gigartina skottsbergii</i>	59	41						1
CP Kelco	<i>Grateloupia indica</i>	39	53				8		5
CP Kelco	<i>Hypnea musciformis</i>	98	2						1
CP Kelco	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	93	7						
Degussa	<i>K. alvarezii</i>	90	10						1
CP Kelco	<i>Mazaella laminarioides</i>	55	43	2					
Degussa	<i>M. laminarioides</i> + <i>Sarcothalia crispata</i>	45	47				8	6	7
CP Kelco	<i>Sarconema scinaoides</i>	4	68			2	26	14	15
CP Kelco	<i>Sarcothalia crispata</i>	57	42	1					

n.i. – não identificado

3.7 – Peso molecular, composição catiónica das carragenanas estudadas e “diagrama de Stancioff”

3.7.1– Peso molecular de carragenanas extraídas de carragenófitas portuguesas

Foi feita a determinação do peso molecular por Sec-Malls de amostras de carragenanas extraídas (Tabela 3.13) e de extractos líquidos contendo carragenanas em solução (Tabela 3.14). De uma forma geral pode-se concluir que as carragenanas híbridas de *C. crispus* (alga usada a nível industrial) e de *C. teedei* var. *lusitanicus* possuem pesos moleculares idênticos (ver Tabela 3.14). Relativamente às mesmas espécies, a família das carragenanas lambda (lambda e híbridos ksi/theta) têm pesos moleculares superiores aos das carragenanas da família kappa (híbridos kappa/iota) (ver Tabela 3.14). De uma forma geral, as amostras resultantes da extracção aquosa apresentam um peso molecular mais baixo do que as amostras extraídas alcalinamente (ver Tabela 3.13).

Tabela 3.13 – Peso molecular médio das carragenanas extraídas

Carragenófito	Geração	Carragenana	Data de colheita	Tipo de extracção	Peso Molecular (kDa)
<i>Chondracanthus acicularis</i>	GF	kappa/iota/ piruvato	Jul. 2001	Aquosa	396
<i>C. acicularis</i>	GF	kappa/iota	Jul. 2001	Alcalina	403
<i>C. acicularis</i>	T (ou H)	kappa/ksi/theta	Out. 2001	Aquosa	725
<i>Chondrus crispus</i>	NF	kappa/iota	Ago. 2001	Aquosa	440
<i>C. crispus</i>	NF	kappa/iota	Ago. 2001	Alcalina	827
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	kappa/iota/mu/ nu	Jun. 2003	Aquosa (em autoclave)	43
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	kappa/iota/nu/ nu	Out. 2001	Aquosa	542
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	kappa/iota	Fev. 2002	Alcalina	682
<i>Gigartina pistillata</i>	T	Lambda	Nov. 2003	Aquosa	519
<i>Mastocarpus stellatus</i>	G	kappa/iota/ piruvato	Mai. 2001	Aquosa	491

T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos femininos; G – Gametófitos; NF – Talos não-frutificados; TB – Talos tetrasporoblásticos; H – Talos heterospóricos.

Tabela 3.14 – Peso molecular médio da solução de carragenanas (extracto líquido antes da precipitação alcoólica das carragenanas)

Carragenófito	Geração	Carragenana produzida	Data de colheita	Extracção aquosa	Extracção alcalina
				PM (kDa)	PM (kDa)
<i>Chondrus crispus</i> <i>crispus</i>	GF	kappa/iota	Fev. 2001	535.9	559.0
<i>C. crispus</i>	NF	kappa/iota	Fev. 2001	*	627.7
<i>C. crispus</i>	T	lambda	Out. 2001	1641	*
<i>Chondracanthus teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	kappa/iota	Set. 2001	677.6	*
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	kappa/iota	Ago. 2002	635.9	719.3
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	ksi/theta	Mai. 2001	*	950.7

* Não foi possível a determinação do PM devido à existência de agregados de grandes dimensões.

3.7.2 – Peso molecular, composição catiónica e “diagrama de Stancioff”

3.7.2.a – Composição catiónica das carragenanas em estado bruto

A composição catiónica das carragenanas obtidas a partir das carragenófitas portuguesas estudadas (extracção laboratorial alcalina – ver alínea 2.8.3) e a partir das carragenófitas usadas a nível industrial (extracção industrial alcalina – ver alínea 2.8.1) foi determinada por ICP-AES (ver alínea 2.19).

Tabela 3.15 – Composição catiónica determinada por ICP-AES (%mole)

Fornecedor da carragenana	Carragenófito	Composição catiónica (%mole)			
		Na	K	Ca	Mg
CP Kelco	<i>Agardhiella sp.</i>	13	35	46	7
Univ. Coimbra	<i>Ahnfeltiopsis devoniensis G</i>	86	11	3	0
Univ. Coimbra	<i>A. devoniensis G</i>	92	6	3	0
Univ. Coimbra	<i>A. devoniensis G</i>	90	6	4	0
Univ. Coimbra	<i>A. devoniensis G</i>	83	14	2	0
Univ. Coimbra	<i>A. devoniensis G</i>	83	15	2	1
Univ. Coimbra	<i>Caliblepharis jubata NF</i>	89	9	1	1
CP Kelco	<i>Catenella impudica</i>	25	9	59	7
Univ. Coimbra	<i>Chondracanthus teedei var. lusitanicus GF</i>	83	11	2	5
Univ. Coimbra	<i>C. teedei var. lus. NF</i>	82	2	8	7
CP Kelco	<i>Chondrus crispus</i>	5	85	8	2
CP Kelco	<i>C. crispus</i>	52	44	2	3
Degussa	<i>C. crispus</i>	43	52	5	n.d.
CP Kelco	<i>Euclima denticulatum</i>	32	33	35	n.d.
Degussa	<i>E. denticulatum</i>	43	54	4	n.d.
CP Kelco	<i>E. platycladum</i>	25	47	27	1
CP Kelco	<i>Gigartina skottsbergii</i>	15	60	15	10
CP Kelco	<i>Grateloupia indica</i>	25	41	30	5
Univ. Coimbra	<i>Gymnogongrus crenulatus TB</i>	88	10	2	1
CP Kelco	<i>Hypnea musciformis</i>	2	95	2	1
CP Kelco	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	6	93	1	n.d.
Degussa	<i>K. alvarezii</i>	35	64	1	n.d.
CP Kelco	<i>Mazaella laminarioides</i>	25	55	9	10
Degussa	<i>M. laminarioides + Sarcothalia crispata</i>	57	40	3	n.d.
CP Kelco	<i>Sarconema scinaoides</i>	4	11	79	6
CP Kelco	<i>S. crispata</i>	53	39	1	7

T – Tetrasporófitos; GF – Gametófitos femininos; G – Gametófitos; NF – Talos não-frutificados; TB – Talos tetrasporoblásticos; n.d. – não determinado.

3.7.2.b – Composição das amostras purificadas

Algumas amostras de carragenana foram seleccionadas e, em seguida, purificadas através da diálise em NaCl (ver alínea 2.12). As suas características encontram-se sumariadas na Tabela 3.16. A partir da percentagem relativa da fracção kappa, presente em cada uma das carragenanas seleccionadas (híbridos kappa/iota), foi construído o denominado “diagrama de Stancioff” (Figura 3.90).

Tabela 3.16 – Composição das amostras purificadas

Código ^a	Carragenófitas ^b	Conteúdo em kappa (%mole) ^c	Peso molecular (kDa) ^d	Conteúdo em Na (%mole) ^e
	<i>Agardhiella sp.</i>	1	175	98
	<i>Eucheuma denticulatum</i>	3	388	98
	<i>E. denticulatum</i>	4	256	99
	<i>Catenella impudica</i>	8	168	98
B	<i>Ahnfeltiopsis devoniensis G</i>	17	n.d.	92
A	<i>A. devoniensis G</i>	20	656	86
D*	<i>A. devoniensis G</i>	22	1020	83
C	<i>A. devoniensis G</i>	29	n.d.	90
D*	<i>A. devoniensis G</i>	35	n.d.	83
N	<i>Chondracanthus teedei var. lusitanicus NF</i>	50	1148	82
	<i>Sarcothalia crispata</i>	57	644	99
	<i>Gigartina skottsbergii</i>	62	411	97
	<i>Chondrus crispus</i>	74	599	98
	<i>Eucheuma platycladum</i>	83	370	98
	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	90	404	98
	<i>K. alvarezii</i>	93	444	98
	<i>Hypnea musciformis</i>	98	842	99

a – código das amostras portuguesas (ver Tabela 3.10); b – G (gametófitos); NF (talos não-frutificados); c – fracção molar determinada por espectroscopia ¹H-RMN; d – determinado por análise SEC-MALLS; n.d. – não determinado; e) fracção molar dos catiões presentes na amostra determinado por análise ICP; * amostras apresentando amplitude na percentagem de cada uma das fracções constituintes do híbrido dentro da mesma colheita.

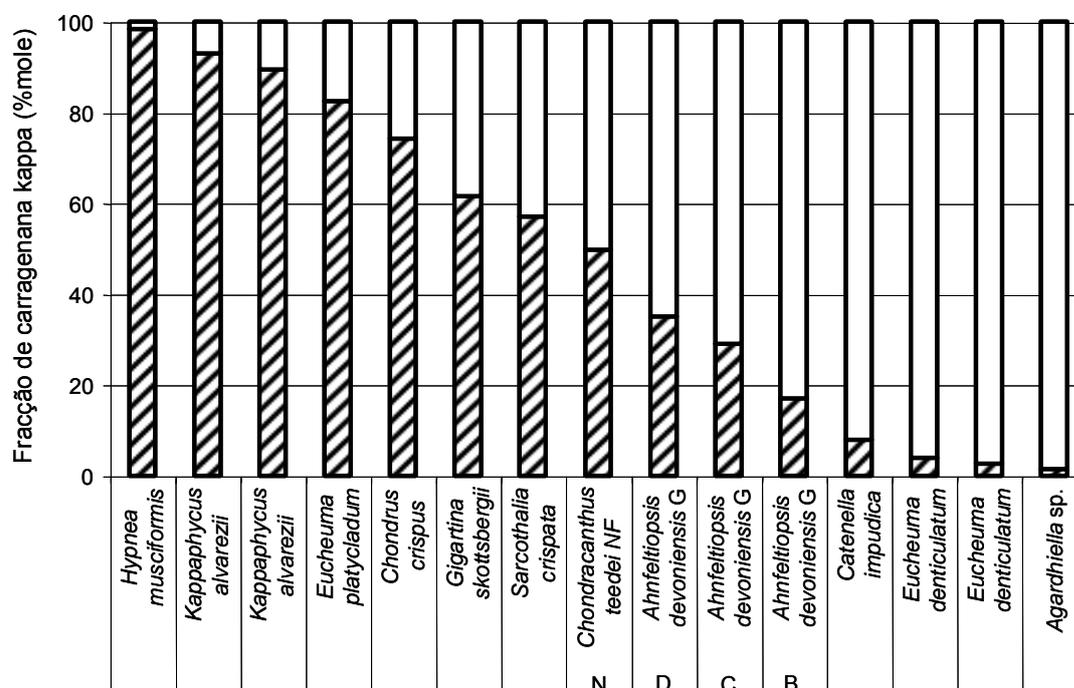


Figura 3.90 – Conteúdo da fracção kappa em carragenanas híbridas kappa/iota purificadas (“Diagrama de Stancioff”).

3.8 – Aspectos morfológicos, anatómicos, citológicos e citoquímicos de carragenófitas seleccionadas

3.8.1 – *Chondracanthus teedei* e *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae)

A espécie *Chondracanthus teedei* é facilmente identificável: o pequeno disco basilar que a liga ao substrato desenvolve frondes que podem atingir entre 5 a 10 cm de altura; os eixos principais, atenuados para ambas as extremidades, terminam em ponta e deles partem ramos pinulados; os râmulos terminais são pequenos, espiciformes e horizontalmente patentes (Figura 3.91 – A a I). Os cistocarpos, pouco numerosos, em geral solitários, sésseis e globosos, são produzidos nas pínulas ou na parte dilatada das margens dos ramos; os soros de tetrasporocistos têm também uma localização marginal. As frondes, cartilaginéo-membranáceas, apresentam uma coloração púrpura-violácea (Figura 3.91 - A) que escurece pela dessecação, tornando-se amarelo-esverdeada (Figura 3.91 – D e E) após exposição solar. Neste estudo foram encontrados exemplares de *C. teedei* no Baleal (ver Tabela 3.4).

Os exemplares colhidos nas restantes estações de colheita (Tabela 3.4) apresentam diferenças muito evidentes em relação aos espécimes colhidos em Roscoff (França) (Figura 3.91 – A, B e C) e no Baleal (Figura 3.91 – D a I). Os eixos principais das frondes, tal como as suas ramificações, são mais largos (atingindo 1 cm nas porções mais velhas) conferindo um aspecto mais robusto aos talos que, por vezes, ultrapassam os 20 cm de altura (Figura 3.91 – J, L e M); a ramificação é mais densa e luxuriante e as pínulas desenvolvem-se não só nas margens dos ramos, mas também superficialmente (Figura 3.94 – C); estas pínulas são patentes, simples – algumas vezes bífidas – e muito agudas, dando às frondes um aspecto espinescente; os cistocarpos, globosos e sésseis como na espécie tipo, são aqui muito numerosos e formam-se, tanto nas pínulas que se desenvolvem na margem dos ramos (Figura 3.92 – C), como nas que se formam na superfície da fronde. Pela existência deste conjunto de características, estes exemplares foram incluídos num *taxon* distinto, denominado *C. teedei* var. *lusitanicus* (Rodrigues, 1957, 1958).

Os tetrasporófitos (Figura 3.94) exibem soros de tetrasporocistos, com o aspecto de manchas vermelho-escuras, salientes no talo, sobre o eixo principal e sobre as ramificações laterais (Figura 3.94 – C e D). Os tetrasporocistos mostram disposição cruciada dos tetrásporos (Figura 3.94 – F e G), que se libertam por rotura do córtex, sendo os soros velhos preenchidos por filamentos medulares (Guiry, 1984).

O exame de cortes transversais do talo mostra uma estrutura multiaxial (Figura 3.92 – G e H, Figura 3.94 – H a L), com dois tipos de filamentos (cladomos): de crescimento ilimitado e de crescimento limitado. Os filamentos de crescimento ilimitado, presentes na zona medular (Figura 3.92 – G e H), apresentam células alongadas, hialinas, de contorno aparentemente estrelado (Figura 3.94 – L). Os filamentos de crescimento limitado formam a zona cortical (Figura 3.92 – G e H, Figura 3.94 – I), cujas células hialinas de contorno irregular, presentes na parte interna, passam a elípticas e arredondadas, em direcção aos bordos. A zona cortical (na região mediana do talo) apresenta 8 a 9 (± 2) camadas de células. Entre a zona cortical e a zona medular é possível delimitar uma zona de transição (Figura 3.92 – G e H, Figura 3.94 – J).

Na Figura 3.94 – E e F (cortes semi-finos ao nível de um soro de tetrasporocistos) é evidente que as zonas mais intensamente coradas pelo azul de toluidina se localizam nos espaços intercelulares, sobretudo na zona cortical.



Figura 3.92 – *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: gametófito feminino frutificado, portador da geração carposporófito, colhido em Buarcos (A e B); detalhe de um ramo portador de cistocarpos (C); corte transversal de cistocarpos segundo orientação indicada na figura C (D e E); carpósporos no interior do cistocarpo (F); corte transversal do talo segundo a orientação indicada na figura C (G e H). Coloração pelo lactofenol azul (D a H).

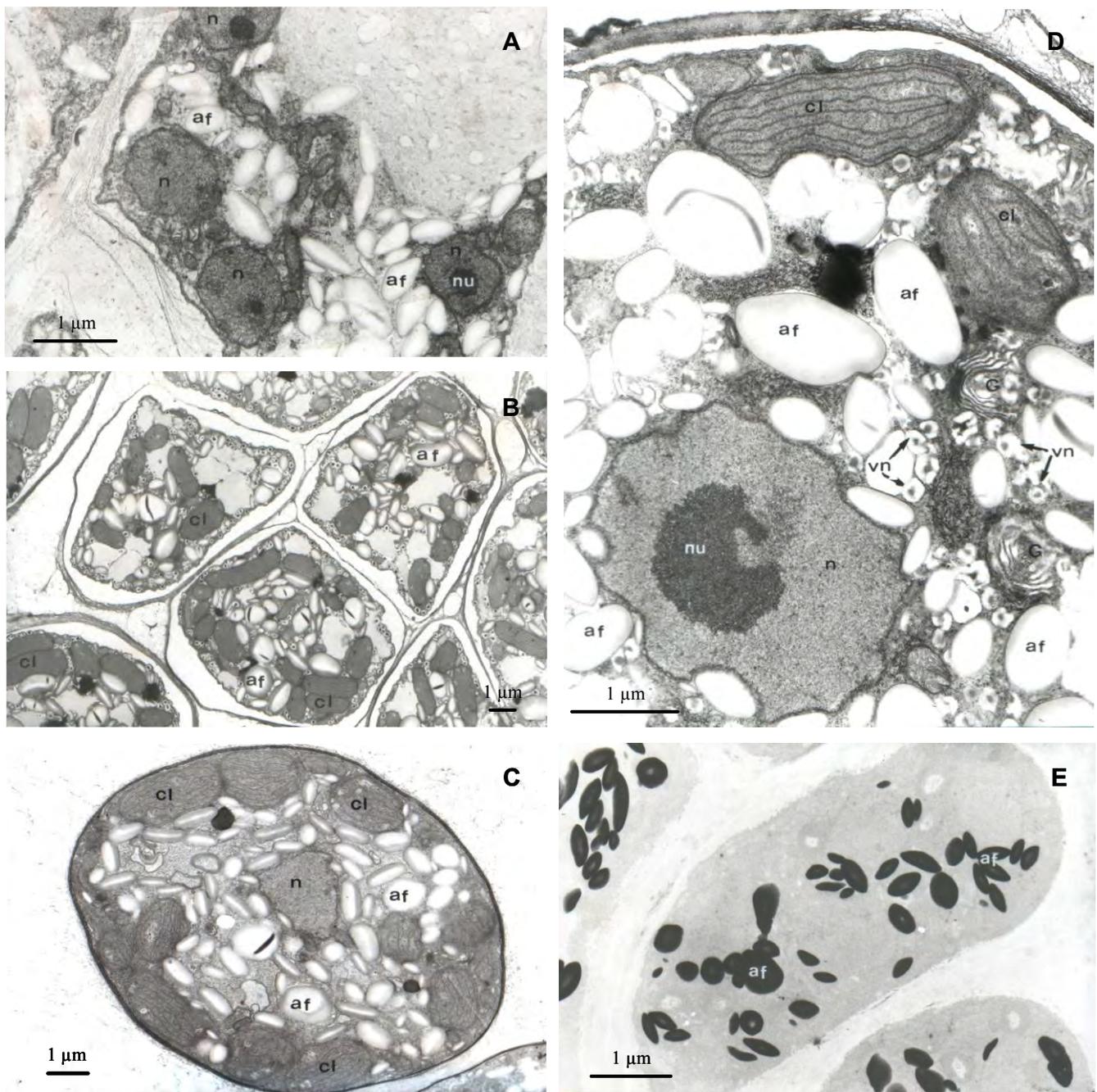


Figura 3.93 – *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: ultraestrutura do gametófito feminino frutificado, mostrando parcialmente uma célula plurinucleada (A) e alguns aspectos da diferenciação dos carpósporos (B e C); pormenores ultraestruturais de um carpocisto, nomeadamente no respeitante ao núcleo, cloroplastos, Golgi e vesículas nucleadas (D); notar a abundância de grãos de amido florídeo que dão reacção positiva ao “teste de Thiéry” (E).
af – amido florídeo, **cl** – cloroplasto, **G** – Golgi, **n** – núcleo, **nu** – nucléolo, **vn** – vesículas nucleadas.

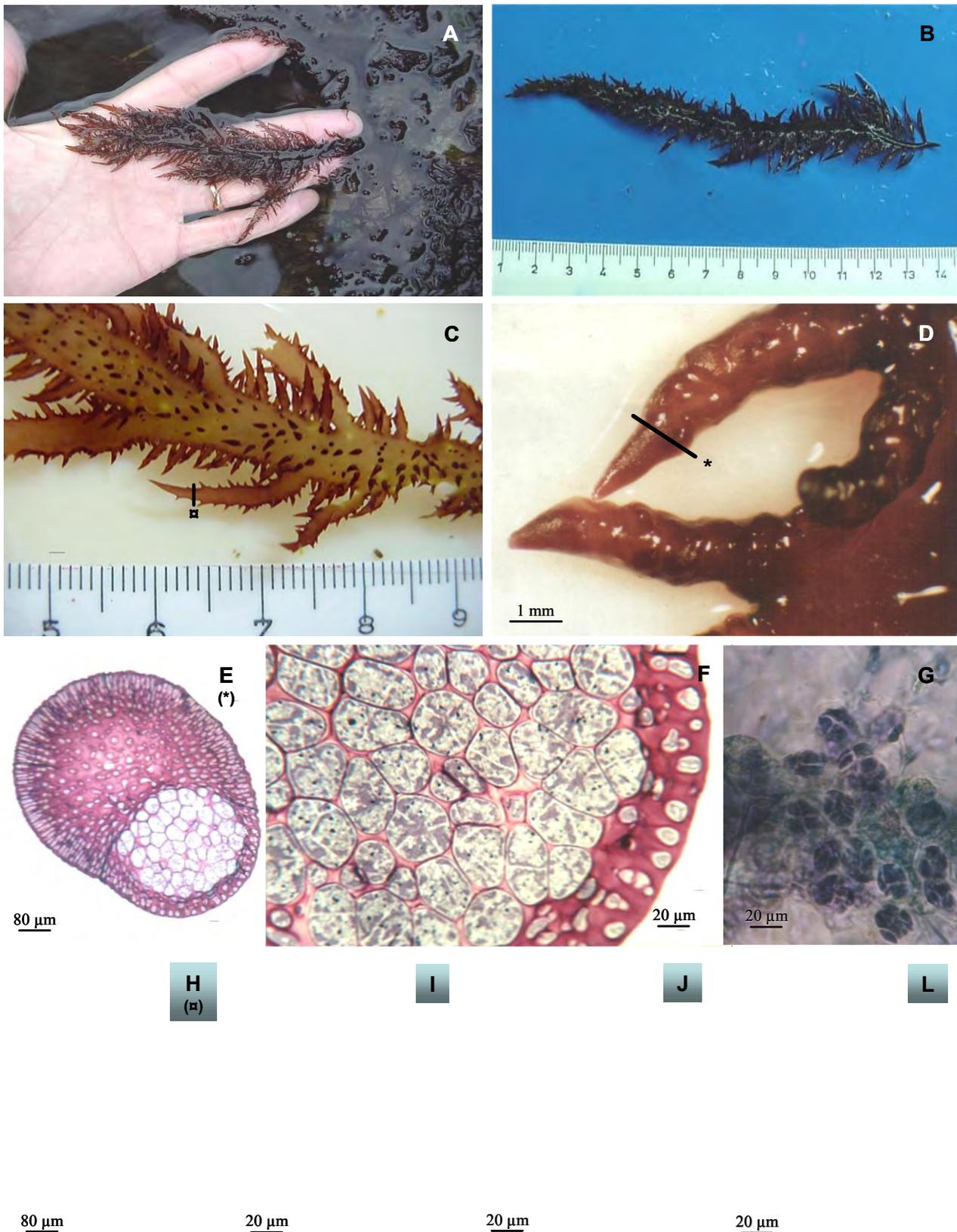


Figura 3.94 – *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: tetrasporófito frutificado, portador de tetrasporocistos, colhido em Buarcos (A, B e C); detalhe de ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C); corte transversal de um ramo ao nível de um soros de tetrasporocisto, segundo a orientação indicada na figura D (E); detalhes mostrando tetrasporocistos e tetrásporos (F e G); corte transversal do talo segundo orientação indicada na figura C (H); detalhes mostrando o córtex (I), zona de transição (J) e medula (L). Coloração pelo azul de toluidina (E e F) e pelo lactofenol azul (G a L).

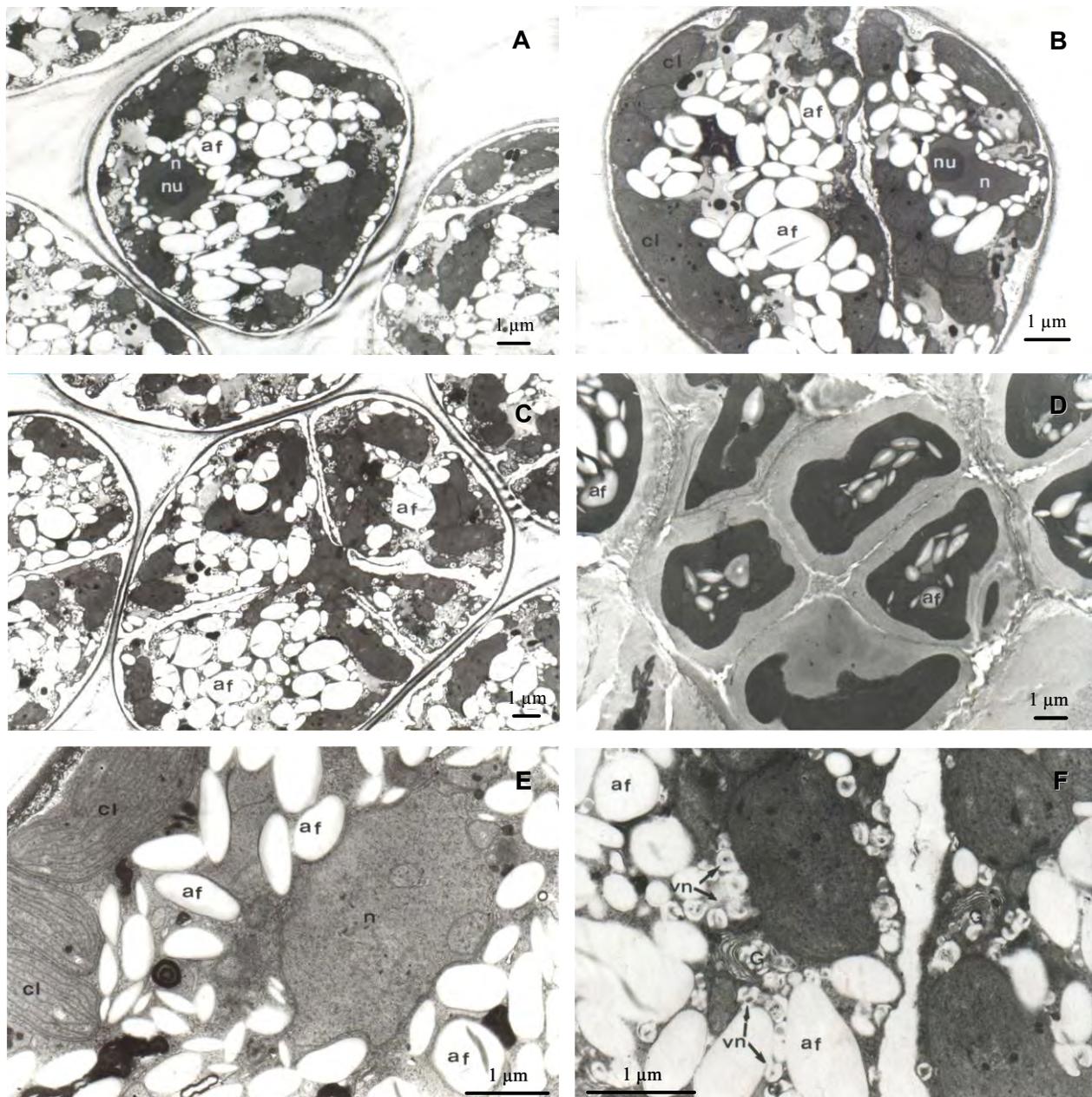


Figura 3.95 – *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (ultraestrutura do tetrasporocisto): fases sucessivas da formação dos tetrásporos por divisão cruciada do tetrasporocisto (A a D); Vistas parciais de dois estádios de maturação de tetrasporocistos mostrando detalhes ultraestruturais do núcleo e cloroplastos (E), do Golgi e vesículas nucleadas (F).
af – amido florídeo, **cl** – cloroplasto, **G** – Golgi, **n** – núcleo, **nu** – nucléolo, **vn** – vesículas nucleadas.

A ultraestrutura dos tetrasporocistos (Figura 3.95) de *C. teedei* var. *lusitanicus* pode resumir-se do seguinte modo: o núcleo, com um nucléolo bem individualizado, é pobre em cromatina condensada (Figura 3.95 – A e B); os cloroplastos, para além dos seus característicos tilacóide periférico e tilacóides internos não associados, mostram sistematicamente várias áreas de ADN e inclusões electronodensas (Figura 3.95 – B e E); para além dos grãos de amido florídeo, que representam o componente celular mais abundante, uma grande parte do restante citoplasma é ocupado por dictiosomas muito activos que produzem numerosas vesículas com um núcleo denso (vesículas nucleadas) (Figura 3.95 – F). Tal como acontece nos carposporocistos maduros, as vesículas fundem-se para constituir vacúolos fibrilares (Figura 3.96 – C) que parecem participar na elaboração da parede. Todo este sistema e o amido dão reacção positiva ao “teste de Thiéry” (3.96 – B e C).

De um modo geral, a ultraestrutura do carposporocisto (gametófito feminino) não se apresenta significativamente diferente da do tetrasporocisto (tetrasporófito) antes da divisão da célula (Figura 3.93).

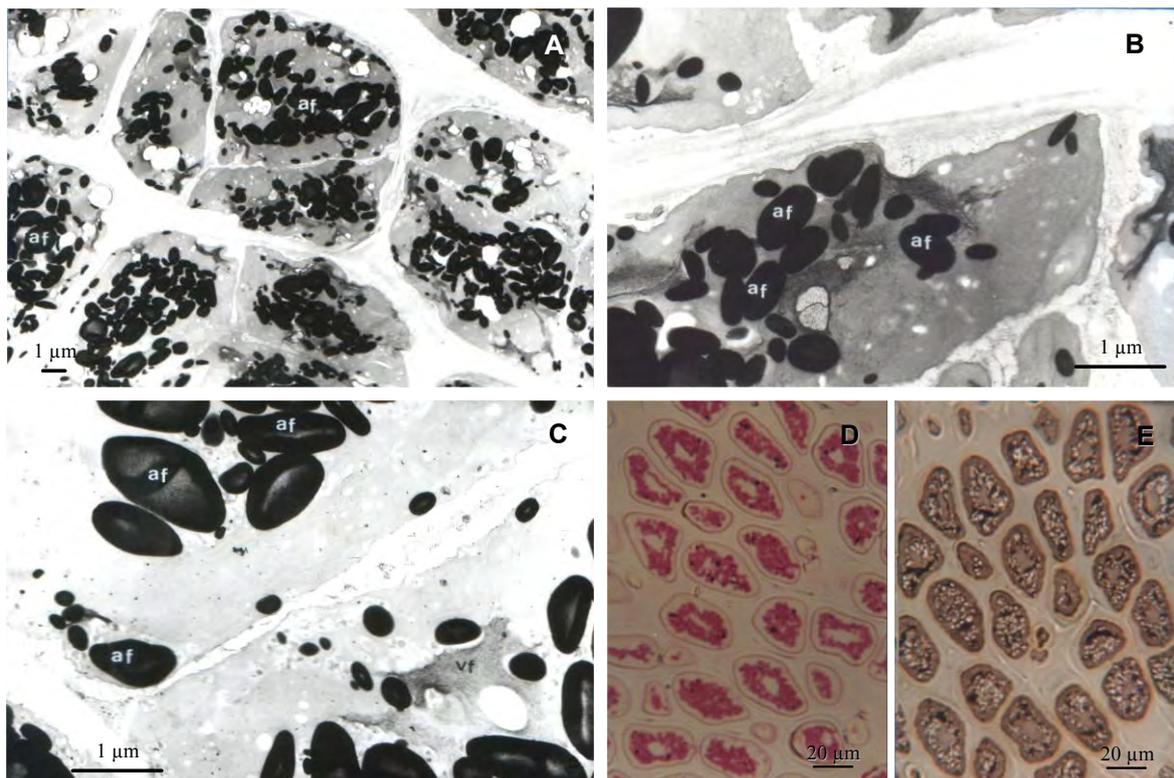


Figura 3.96 – *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*: aspectos citoquímicos em M.O. e M.E. da geração tetrasporófito, mostrando tetrasporocistos após “coloração” pelo PAS (D), negro de Sudão B (E) e técnica de Thiéry (A, B e C). Notar que reagem positivamente a esta técnica não só o amido florídeo, mas também as vesículas nucleadas, os vacúolos fibrilares e algumas porções da parede.

af – amido florídeo, vf – vacúolos fibrilares.

3.8.2 – *Gigartina pistillata* (Gigartinaceae)

Esta espécie apresenta-se sob a forma de talos erectos, cilíndricos ou comprimidos, até 20 cm de altura, vermelho-escuro ou vermelho-acastanhado, cartilaginoso-elásticos, dicotómicamente ramificados, aderentes ao substrato por intermédio dum disco de fixação (Figura 3.97 e 3.98). Os talos cistocárpicos (Figura 3.97 – B) mostram uma ramificação dicotómica mais abundante do que os tetraspóricos (Figura 3.98 - B). A *G. pistillata*, apesar de ser a espécie tipo do género, não apresenta a maioria das características típicas das frondes de outras espécies de *Gigartina* (Kim, 1976; Gayral, 1982; Hommersand *et al.*, 1992).

O talo desta alga exhibe uma estrutura multiaxial, na qual é possível reconhecer uma zona central com elementos estrelados de grande dimensão (Figura 3.97 - F) e uma zona cortical de células densas, pequenas, formando cadeias ramificadas e fortemente pigmentadas (Figura 3.97 – F e 3.98 - F).

O gametófito feminino possui cistocarpos que, num estágio inicial, não sobressaem do talo – setas estreitas (Figura 3.97 - C) tornando-se, porém, evidentes na fase final do seu desenvolvimento – setas largas (Figura 3.97 - C). Estes cistocarpos, normalmente sésseis (Figura 3.97 – B, C e D), quando surgem numa posição terminal, aparentam ser pedunculados.

O tetrasporófito apresenta soros de tetrasporocistos embebidos na superfície do talo (Figura 3.98 – D e E), em áreas marginais, localizadas essencialmente em zonas de ramificação.

Em ambas as gerações, uma vez que a região medular das frondes é composta por células estreladas, muito semelhantes às células corticais internas (Figura 3.97 - F), a demarcação entre a medula e o córtex não é nítida.

Os **talos heterospóricos** recolhidos na baía de Buarcos apresentam uma “morfologia híbrida”, onde parecem estar associados talos tipicamente tetraspóricos e cistocárpicos bem desenvolvidos (Figura 3.99). A parte tetrasporófito do talo (zona direita da Figura 3.99 - A) apresenta soros de tetrasporocistos, ligeiramente salientes, de forma lenticular, mais escuros que as restantes partes do talo (Figura 3.99 - C), em tudo semelhantes aos observados nos talos isomórficos tetrasporofíticos normais. Em contrapartida, a parte carpospórica do talo (Figura 3.99 – A, zona esquerda do talo), mostra ramificações dicotómicas abundantes, portadoras de cistocarpos em posição intercalar (Figura 3.99 – B) ou terminal.

A diferenciação dos carposporócitos e tetrasporócitos, nestes talos heterospóricos, é semelhante ao que ocorre nos talos isospóricos de *G. pistillata*. No estudo ultrastrutural da carposporogénese (Figura 3.102 - A), para além de características típicas das Rhodophyceae (cloroplastos com tilacóide periférico e tilacóides internos não associados, grãos de amido florídeo extraplastidial...), o aparelho de Golgi evidencia-se pelo seu desenvolvimento e actividade, bem patente na abundância de dictiosomas e vesículas nucleadas que, como já foi referido, parecem desempenhar um papel chave na génese dos vacúolos fibrilares e subsequente edificação da parede celular (Figura 3.102).

Exceptuando a sua divisão meiótica cruciada, da qual resultam os tetrásporos (Figura 3.102 - B), as características ultrastruturais das células-mãe dos tetrásporos parecem ser idênticas às observadas durante a carposporogénese (Figuras 3.102 – A e B). Em síntese: sob o ponto de vista ultrastrutural, a citodiferenciação dos carpósporos e dos tetrásporos, nos talos heterospóricos de *G. pistillata*, é comparável à que ocorre nos talos isospóricos (gametófitos femininos e tetrasporófitos, respectivamente).

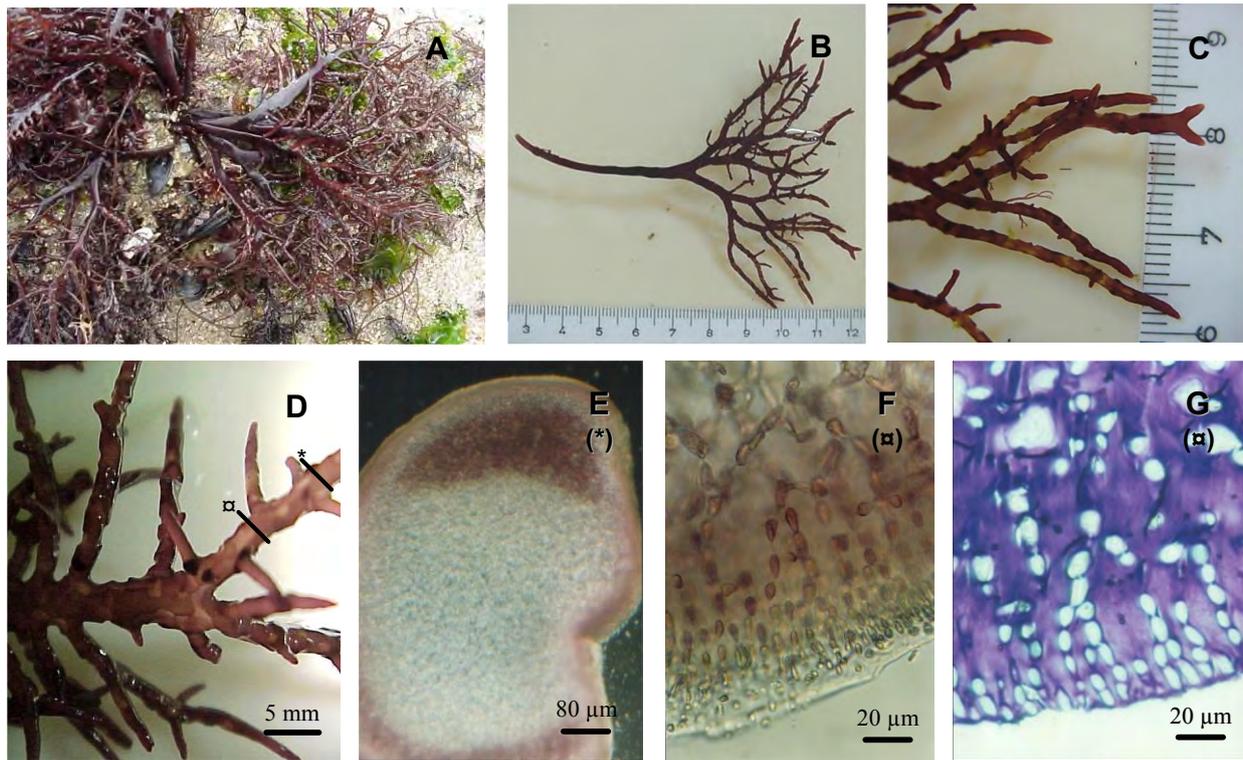


Figura 3.98 – *Gigartina pistillata*: tetrasporófito frutificado, portador de soros de tetrasporocistos (A a G); ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C e D); corte transversal de um ramo ao nível de um soros de tetrasporocisto, segundo a orientação indicada na figura D (E); corte transversal do talo segundo orientação indicada na figura D (F e G). Coloração pelo azul de toluidina (G).

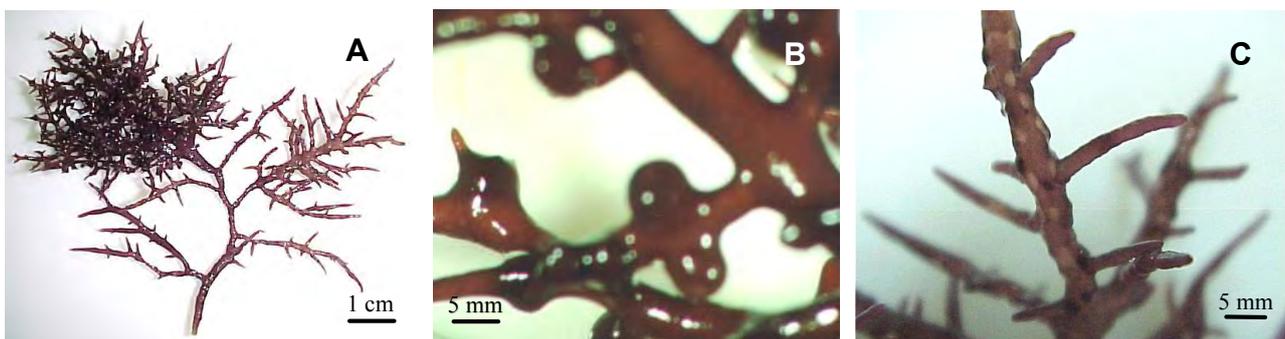


Figura 3.99 – *Gigartina pistillata*: talo heterospórico (A) apresentando ramos portadores de cistocarpos (zona esquerda do talo) e de soros de tetrasporocistos (zona direita do talo); ampliações dos ramos portadores de cistocarpos (B) e dos ramos portadores de soros de tetrasporocistos (C).

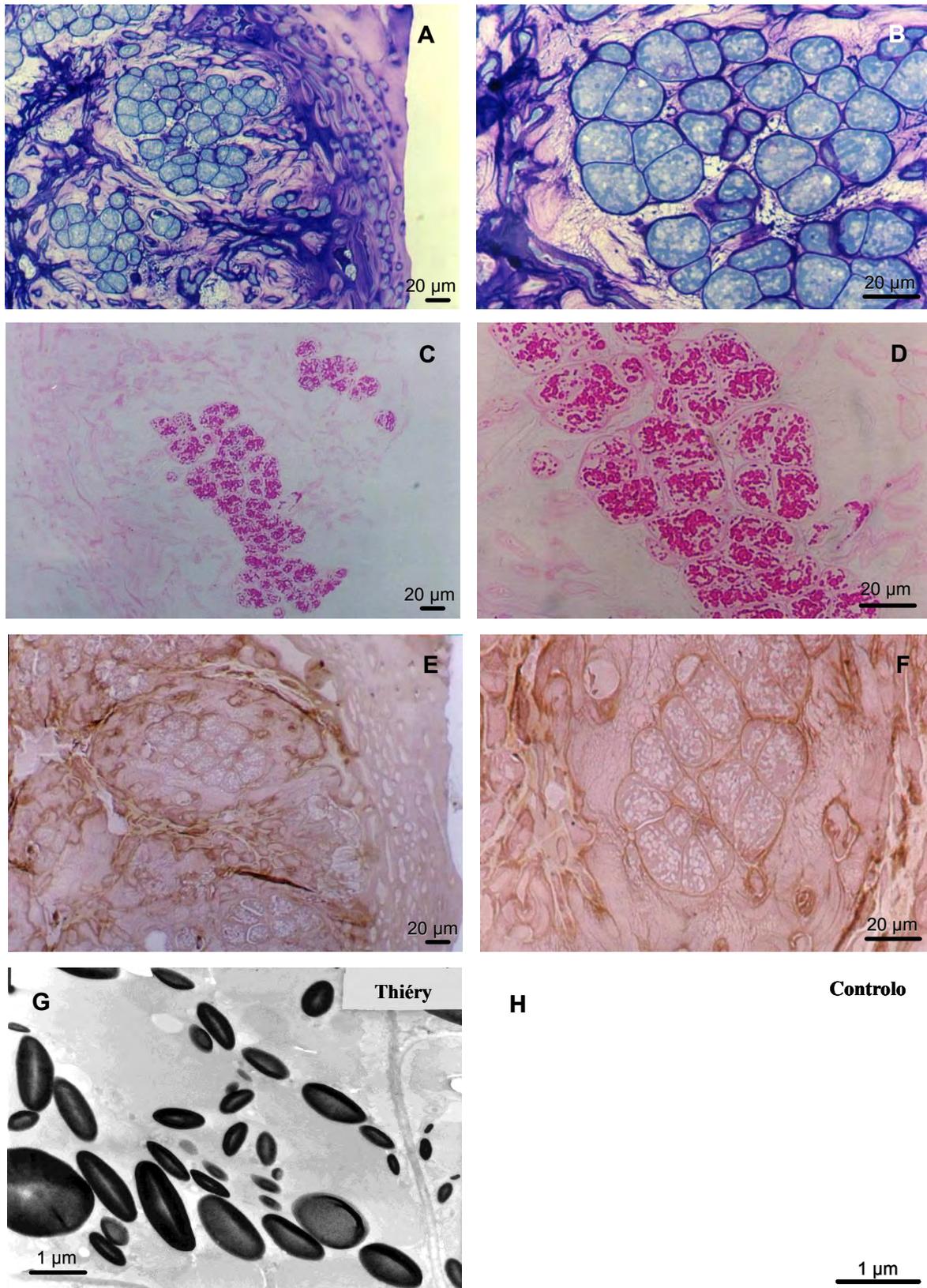


Figura 3.100 – *Gigartina pistillata*: carposporogénese (A a H); aspectos citoquímicos em MO e ME após “coloração” pelo azul de toluidina (A e B), PAS (C e D), negro de Sudão B (E e F) e técnica de Thiéry (G).

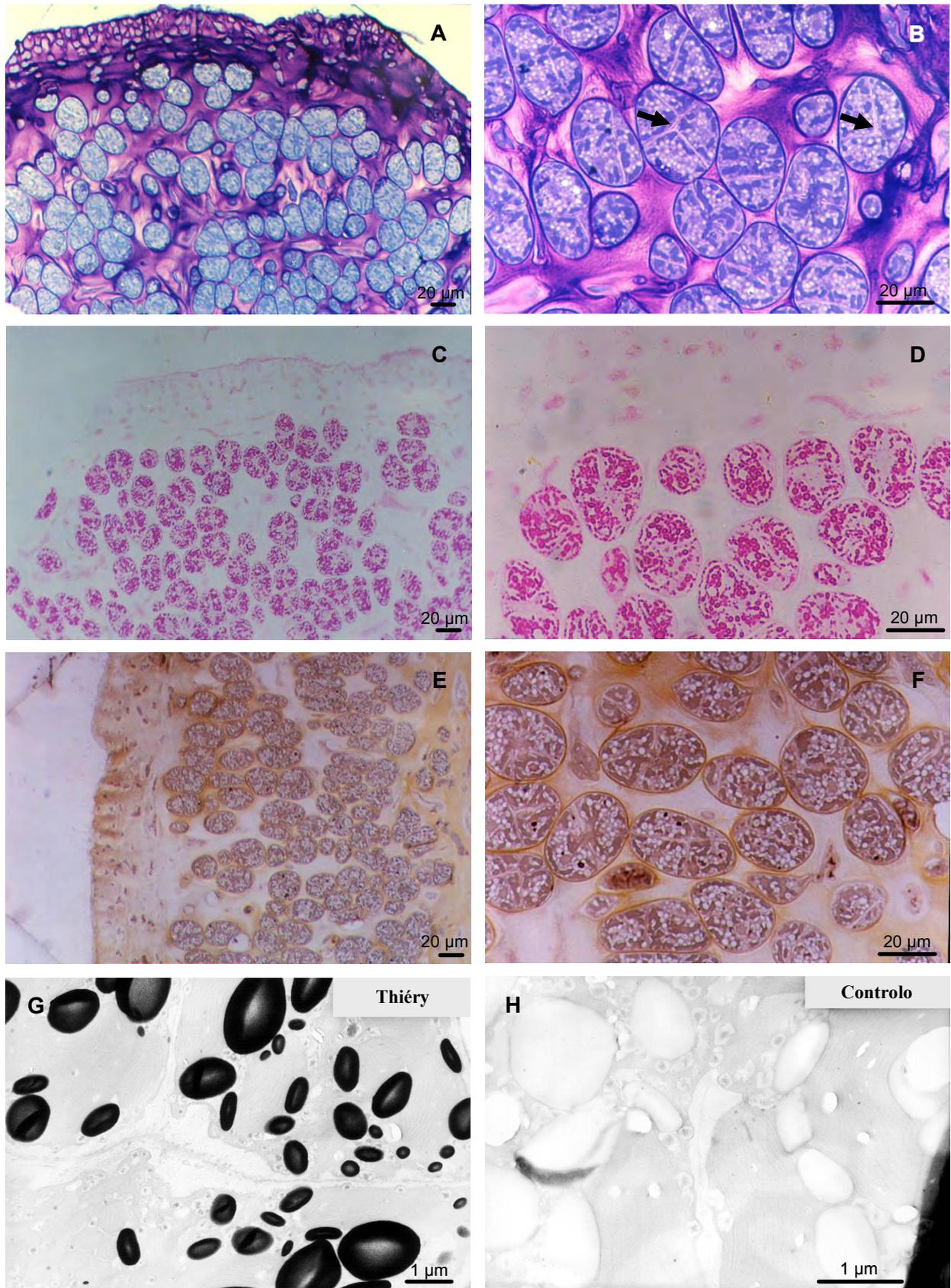


Figura 3.101 – *Gigartina pistillata*: tetrasporogênese (A a H); aspectos citoquímicos em MO e ME após “coloração” pelo azul de toluidina (A e B), PAS (C e D), negro de Sudão B (E e F) e técnica de Thiéry (G).

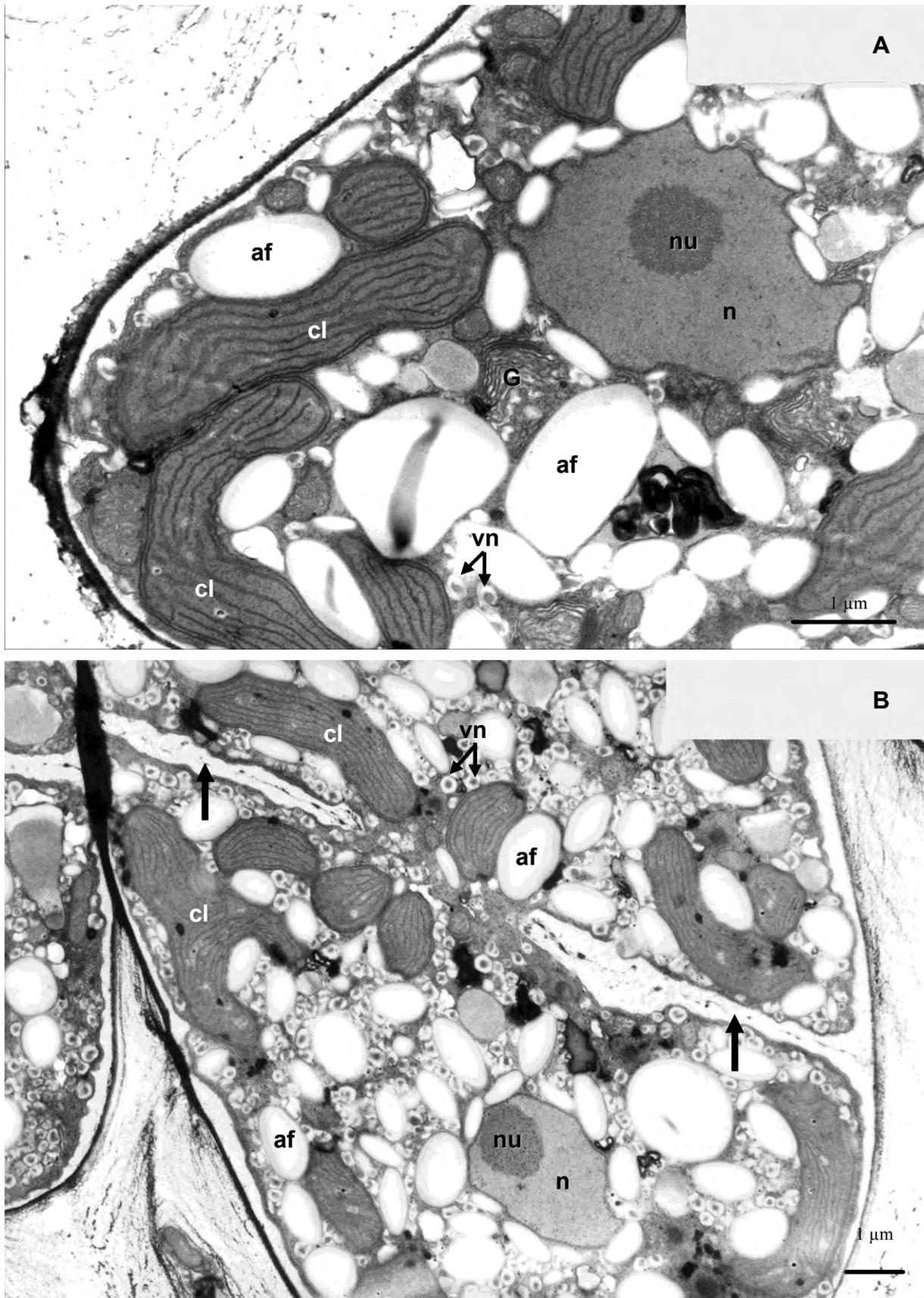


Figura 3.102 – *Gigatina pistillata* (talo heterospórico): A - ultraestrutura do carpósporo em desenvolvimento (carposporogênese); B - ultraestrutura da formação dos tetrásporos (tetrasporogênese).

af – amido florídeo, cl – cloroplastos, G – Golgi, n – núcleo, nu – nucléolo, vn – vesículas nucleadas.



3.8.3 – *Gymnogongrus crenulatus* e *Ahnfeltiopsis devoniensis* (Phylloporaceae)

Os membros da classe Phylloporaceae aqui estudados (*G. Crenulatus* e *A. devoniensis*), apesar de pertencerem a géneros diferentes, têm uma morfologia semelhante que os torna, por vezes, difíceis de distinguir. No entanto, a sua separação pode se feita com base nalgumas características chave:

a) O *G. crenulatus* possui um talo cartilaginoso, vermelho-escuro, com altura até 10 cm (Figura 3.104 – A e B), sendo a estipe cilíndrica, curta e originada num pequeno disco de fixação. O *G. crenulatus* apresenta ramificações sub-dicotómicas em forma de cinta e ápices arredondados, frequentemente mais pálidos do que o resto da fronde (Figura 3.104 – C). As estruturas reprodutoras são externas (Figura 3.104 – C e D), formando pequenas excrescências (tetrasporoblastos).

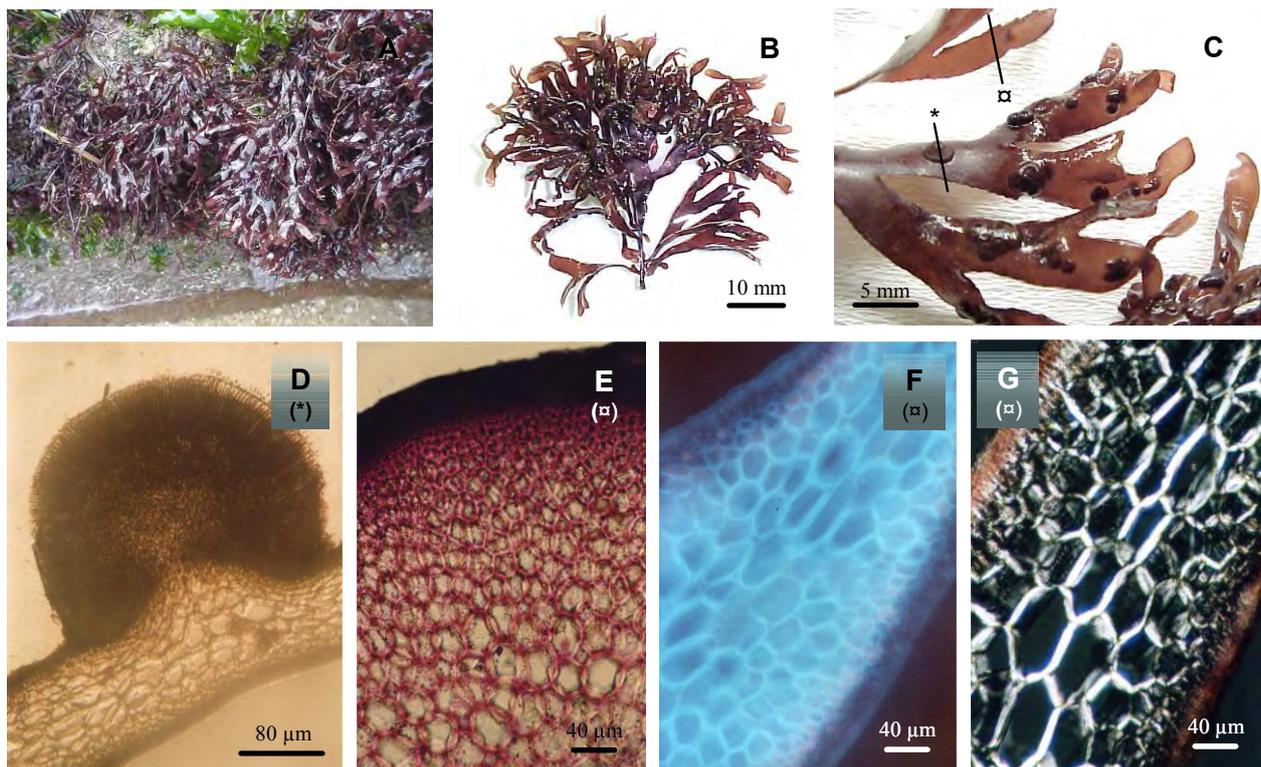


Figura 3.104 – *Gymnogongrus crenulatus*: talo tetrasporoblástico (A a D), portador de tetrasporoblastos (C); corte transversal do tetrasporoblasto segundo orientação indicada na figura C (D); corte transversal do talo segundo a orientação indicada na figura C (E a G), corados pelo azul de toluidina (E), branco de calcoflúor (F) e observado num microscópio de polarização (G).

b) O *A. devoniensis* tem, em geral, dimensões inferiores a 10 cm, uma cor vermelho-acastanhado. As extremidades ramificadas dicotomicamente, porém, exibem cor pálida, quase esbranquiçada (Figura 3.105 – A a C). As frondes, em forma de pequenos tufos, mostram-se profusamente ramificadas (Figura 3.105 – A). Os gametófitos femininos apresentam cistocarpos esféricos, ligeiramente salientes em ambos os lados das ramificações e com uma auréola esbranquiçada ao seu redor (ver setas na Figura 3.105 – C).

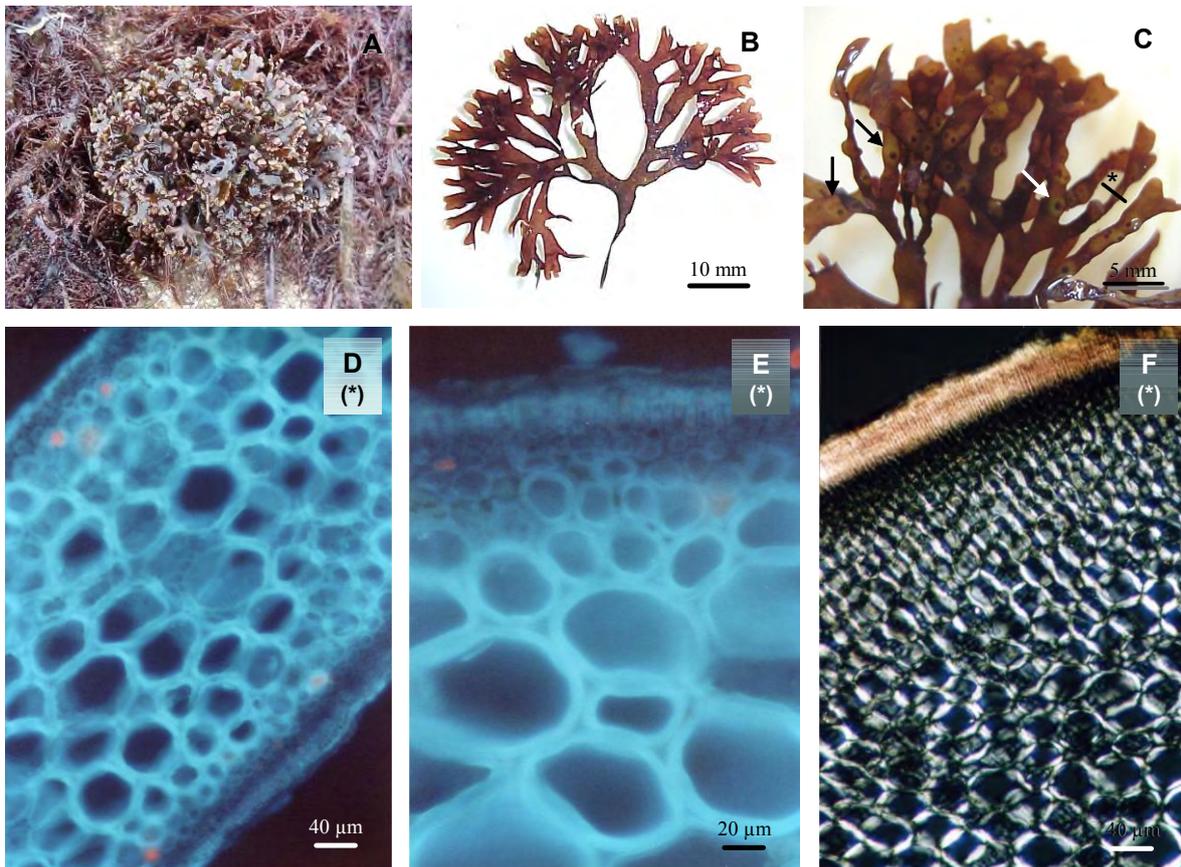


Figura 3.105 – *Ahnfeltiopsis devoniensis*: gametófito feminino frutificado, portador da geração carposporófito (A a C); ramos portadores de cistocarpos - setas (C); corte transversal do talo, segundo orientação indicada na figura C (D a F); aspectos citoquímicos em M.O., mostrando um corte transversal do talo após “coloração” pelo branco de calcoflúor (D e E) e observado num microscópio de polarização (F).

3.8.4 – Aspectos citoquímicos

3.8.4.a – Técnicas de coloração citoquímica

Tendo em vista complementar este estudo morfológico-estrutural com dados de natureza citoquímica utilizámos algumas técnicas de coloração em microscopia óptica (MO), por vezes adaptadas à detecção a nível ultraestrutural (ME), essencialmente orientadas para a identificação e localização de compostos de natureza polissacarídica. Os resultados essenciais foram os seguintes:

a) Coloração com azul de toluidina: Os cortes transversais de *G. pistillata* (Figura 3.98 – G e L) e de *G. crenulatus* (Figura 3.104 – E), mostram uma forte reacção nas zonas periféricas do talo (zona cortical), enquanto as zonas mais internas (zona medular) apresentam uma coloração mais ténue. Na zona medular a coloração pelo azul de toluidina é mais intensa sobretudo nos espaços intercelulares (Figura 3.97 – L).

De notar ainda, em *G. pistillata*, que o material intercelular existente entre os tetrasporocistos (Figura 3.101 – A e B) reage mais intensamente ao azul de toluidina do que o material intercelular presente entre os carpósporos (Figura 3.100 – A e B).

Relativamente à *G. pistillata* cultivada (Figura 3.103 - A) é possível observar que a reacção ao azul de toluidina, num corte transversal do talo, é intensa nas zonas periféricas do talo e ténue nas zonas internas (Figura 3.103 – B). A reacção ao azul de toluidina, normalmente intensa na zona cortical, deixa de se observar no corte de talo submetido a um processo de extracção de carragenanas (Figura 3.103 – C).

b) Coloração com branco de calcoflúor: as zonas internas dos talos reagem a este corante de forma mais intensa do que as zonas periféricas (Figura 3.97 – H e M), denotando a presença de β -glicano sobretudo nas paredes das células medulares. De notar também, a reacção muito forte ao branco de calcoflúor das paredes das células medulares de *G. crenulatus* (Figura 3.104 – F) e, em particular, de *A. devoniensis* (Figura 3.105 – D e E).

Estas áreas apresentam-se birrefringentes quando observadas ao microscópio óptico de polarização, indiciando a presença de uma estrutura com organização cristalina (Figuras 3.97 – I e N, 3.104 – G e 3.105 – F).

c) Reacção do PAS: as inclusões citoplasmáticas de reserva (grãos de amido florídeo) reagem positivamente ao PAS (Figuras 3.96 – D, 3.100 – C e D, 3.101 – C e D)

d) Teste de Thiéry: as reservas extraplastidiais de amido florídeo reagem positivamente a este teste (Figuras 3.93 – E, 3.96 – A a C, 3.100 – G e 3.101 – G).

e) Negro de Sudão B: de notar que a inclusões citoplasmáticas de reserva (grãos de amido florídeo), que reagem positivamente ao PAS e à técnica de Thiéry, não coram nem com o azul de toluidina, nem com o negro de Sudão B (Figura 3.100 – E/F e Figura 3.101 – E/F).

3.8.4.b – Micro-análise EDX

Os dados obtidos da análise por EDX dos tecidos de talos de *G. pistillata* GF, apresentados sob a forma de % (percentagem atómica) de enxofre, são interpretados como correspondentes à presença de carragenana (McCandless *et al.*, 1977). No interior de uma célula cortical (citoplasma, plastos e grãos de amido florídeo) os níveis de enxofre estão abaixo do detectável, mas quantidades significativas deste elemento estão presentes tanto na parede celular como na matriz intercelular (Figura 3.103 – D). As quantidades de enxofre detectadas denunciam a existência de um gradiente de concentração, da parte mais interior da parede celular até a matriz intercelular: parte interior da parede celular (3.98 %); parte exterior da parede celular (7.19 %); zona de transição entre a parede e a matriz (10.39 %); matriz intercelular (11.43 %).

Os tecidos submetidos a um processo de extracção alcalina (ver alínea 2.8.3) não apresentam quantidades de enxofre detectáveis.

4 – DISCUSSÃO

4 – Discussão

4.1 – Organização e natureza bioquímica dos polissacarídeos presentes nas carragenófitas

4.1.1 - Aspectos ultraestruturais de algumas Gigartinales estudadas

As Gigartinales constituem a maior ordem, em número de famílias, das Rhodophyceae (Kraft, 1981; Graham e Wilcox, 2000), mas a ultraestrutura, das células envolvidas na reprodução, tem sido um tema pouco explorado, em particular no que concerne à tetrasporogénese. Assim, a ultraestrutura da carposporogénese tem sido objecto de estudo em diversas espécies das famílias Gigartinaceae (Tsekos, 1981, 1983; Tsekos e Schnepf, 1983), Gracilaraceae (Delivopoulos e Tsekos, 1985b, a, 1986), Solieriaceae (Klepacki *et al.*, 1995), Caulacanthaceae (Delivopoulos e Diannelidis, 1990b, a) e Plocamiaceae (Kugrens e Delivopoulos, 1986). Em contrapartida, tem sido muito menos estudada a tetrasporogénese (Pereira e Mesquita, 1994; Pereira *et al.*, 2002b; Estevez e Caceres, 2003; Ouriques e Bouzon, 2003).

Estes estudos e outros, sobre a morfogénese do talo e das estruturas reprodutoras, mostram a existência de grandes contrastes nos padrões de desenvolvimento nas diferentes espécies, o que tem motivado a publicação de vários trabalhos sobre a sistemática das famílias da ordem Gigartinales (Maggs, 1990; Maggs *et al.*, 1992; Hommersand *et al.*, 1993; Hommersand *et al.*, 1994; Fredericq e Ramirez, 1996; Fredericq *et al.*, 1999; Hommersand *et al.*, 1999; Fredericq *et al.*, 2002). Pelo contrário, os estudos ao M.E. revelaram uma certa homogeneidade estrutural a nível celular (Delivopoulos e Tsekos, 1986; Delivopoulos e Diannelidis, 1990a; Tsekos, 1996; Tsekos *et al.*, 1996b).

Neste nosso trabalho foram analisados alguns aspectos ultraestruturais da carposporogénese e tetrasporogénese do *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* e da *Gigartina pistillata*. Nesta última espécie foi possível estudar, simultaneamente, numa única fronde (talo heterospórico), estes dois aspectos da génese espórica (ver Figuras 3.98, 3.93, 3.100 e 3.101).

Em termos gerais, as células reprodutoras (carpósporos e tetrásporos), quando ainda se encontram encerrados nas respectivas estruturas reprodutoras (cistocarpos e soros tetráspóricos, respectivamente), encontram-se embebidas numa mucilagem confluyente (ver Figuras 3.93 – E e F, 3.99 – A e B e 3.100 – A e B) e apresentam características que, em termos gerais, são concordantes com descrições anteriores (ver Resultados e (Tsekos, 1981, 1983; Tsekos e Schnepf, 1983; Delivopoulos e Tsekos, 1986; Delivopoulos e Diannelidis, 1990b, a)). Relativamente ao aparelho de Golgi há a salientar a sua intensa actividade, traduzida pela produção de inúmeras vesículas nucleadas (ver Figuras 3.92 – D, 3.94 – F e 3.101) que, segundo vários autores, desempenham funções chave na formação da parede celular (Delivopoulos e Tsekos, 1986; Tsekos e Reiss, 1988; Tsekos, 1996). Assim, as paredes destas células resultam da contribuição das vesículas derivadas dos dictiosomas e também de sacos de mucilagem com origem em membranas concêntricas citoplasmáticas (Delivopoulos e Diannelidis, 1990b, a), ou no retículo endoplasmático (Delivopoulos e Tsekos, 1986; Tsekos e Schnepf, 1991; Tsekos, 1996). Na formação dos tetrásporos em *G. pistillata* é de notar a presença de um grande número de vesículas nucleadas, aquando da formação centrípeta dos septos, durante a divisão do tetrasporocisto (ver Figura 3.101 – B), o que

sugere a participação activa destas estruturas na génese da parede celular, durante a tetrasporogénese. De notar ainda que, durante o último estágio da diferenciação dos tetrásporos (ver Figura 3.94 – D), o número e tamanho dos grãos de amido florídeo sofre uma substancial redução, indicando que este polissacarídeo de reserva é usado, provavelmente, na síntese de parte dos componentes estruturais da parede celular (Zinoun, 1993).

4.1.2 – Localização celular dos polímeros de celulose e de carragenana

As matrizes extracelulares das algas vermelhas são compostas por uma rede de microfibrilhas de celulose associada a material amorfo que inclui polímeros de galactanas sulfatadas, mucilagens e celulose. Em contraste com as paredes, relativamente rígidas, de outras algas, as da maioria das algas vermelhas são flexíveis e de consistência suave, devido à presença de grandes quantidades de material amorfo e de uma menor presença da componente fibrillar (celulose) (Gretz e Vollmer, 1989; Gretz *et al.*, 1997; Graham e Wilcox, 2000).

A matriz extracelular das carragenófitas é constituída, em grande parte, por poligalactanas sulfatadas hidrofílicas. A presença de D-galactose e anidro-D-galactose distingue as carragenanas mais sulfatadas, dos agares menos sulfatados (anidro-L-galactose) (Craigie, 1990; Knutsen *et al.*, 1994). A função e significado fisiológico da matriz estão relacionados com a adaptação mecânica, hidratação e regulação osmótica das carragenófitas ao meio marinho, onde vivem (Kloareg e Quatrano, 1988; Carpita e Gibeaut, 1993; Whitney *et al.*, 1999).

A localização dos polímeros extracelulares *in situ*, por intermédio de técnicas citoquímicas (com base química e/ou física) (ver Tabela 1.5 e alínea 2.13.3), permite complementar os dados obtidos pelas técnicas espectroscópicas (vibracional e de ressonância - ver alínea 2.10) e cromatográficas (ver alínea 2.11).

A distribuição dos polissacarídeos sulfatados nos talos de *C. teedei* var. *lusitanicus* (Figura 3.93), *G. pistillata* (Figuras 3.96 e 3.97), *Gymnogongrus crenulatus* (Figura 3.103) e *Ahnfeltiopsis devoniensis* (Figura 3.104), apresenta um gradiente similar ao observado em várias outras carragenófitas, nomeadamente no *C. crispus* (Gordon e Mccandless, 1973; Gordon-Mills e Mccandless, 1975; Gordon-Mills *et al.*, 1978) e em agarófitas, como a *Pterocladia capillacea* (Rascio *et al.*, 1991). Ou seja, existe uma maior concentração de polissacarídeos sulfatados na parte mais externa dos talos, sobretudo na zona cortical (ver Figuras 3.96 – G, 3.102 – B e 3.103 – E) comparativamente à parte mais interna (zona medular).

Relativamente à localização da celulose, a coloração de cortes transversais de *G. pistillata* (Figura 3.96 – H, M), *G. crenulatus* (Figura 3.103 – F) e *A. devoniensis* (Figura 3.104 – D, E), pelo branco de calcoflúor (para a localização do β -glicano), permitiu-nos constatar que as paredes das células medulares, em particular as de *G. crenulatus* e *A. devoniensis*, coram mais intensamente do que as paredes das células corticais. Esta observação é corroborada pela forte birrefringência apresentada pelas paredes das células medulares (ver Figuras 3.96 – N, 3.103 – G e 3.104 – F), quando observadas sob luz polarizada, denotando a presença de uma estrutura altamente ordenada no “núcleo” das paredes celulares (“core walls”). A zona cortical apresenta uma fraca birrefringência e uma reacção mais ténue ao branco de calcoflúor, indicando uma concentração de β -glicano mais reduzida do que na zona medular.

Esta organização da parede celular está de acordo com o observado em carragenófitas de elevado valor comercial (Gretz *et al.*, 1997). Tal como acontece com o *K. alvarezii*, uma das principais fontes industriais de carragenana kappa (Bixler, 1996), as carragenófitas por nós analisadas (*G. pistillata*, *G. crenulatus* e *A. devoniensis*) têm, na celulose, o principal componente polissacarídico fibrillar da parede celular (ver Figura 3.103 – D), variando o seu nível de organização (e, conseqüentemente o índice de cristalinidade) de acordo com o tamanho das células (Hoffmann *et al.*, 1995; Lechat *et al.*, 1997; Lechat *et al.*, 2000).

Os resultados da análise por EDX mostram que as concentrações mais elevadas de enxofre e, conseqüentemente, de carragenana, se localizam nas paredes celulares e na matriz intercelular, havendo um gradiente crescente de carragenana da região mais interna da parede celular em direcção à matriz intercelular, tal como acontece em *C. crispus* (McCandless *et al.*, 1977).

4.1.3 – Extracção das carragenanas

As carragenanas nativas são, na maior parte das vezes, combinações de unidades idealizadas de carragenana (ver Tabela 1.1), ocorrendo variações na estrutura, não só de alga para alga, mas também de geração para geração. As diferenças estruturais das carragenanas também afectam as propriedades físico-químicas do ficocolóide e, conseqüentemente, as suas diferentes utilizações a nível industrial.

Como vimos, a caracterização da composição polissacarídica natural pode ser feita através da análise directa do pó de alga seca (ver alínea 3.5.3 e 4.1.4), com recurso a diferentes metodologias espectroscópicas: FTIR-DRIFTS (Chopin e Whalen, 1993), FTIR-ATR (Pereira e Mesquita, 2004) e FT-Raman (Pereira *et al.*, 2004; Pereira e Mesquita, 2004).

No entanto, para a identificação das diferentes fracções de carragenana e dos respectivos precursores biológicos por ^{13}C - e ^1H -RMN, é necessário proceder à extracção dos ficocolóides, tendo o cuidado de não haver transformação alcalina dos mesmos. A esse método de extracção é normalmente dado o nome de “extracção total” ou “extracção aquosa” (Zinoun, 1993).

Os precursores biológicos (mu e nu) das carragenanas gelificantes (kappa e iota) contêm um grupo éster sulfato na posição 6 da unidade α -D-galactose 4-ligada (ver Figura 1.6). Este tipo de estrutura reduz a capacidade da carragenana formar um gel, devido à interrupção das sequências das unidades repetitivas de carrabiose, responsáveis pela formação das estruturas de dupla hélice típicas da fase de gel (ver alínea 1.6.2 e Figura 1.9). Grande parte das unidades 6-sulfatadas é convertida na correspondente 3,6-anidro, durante um longo (30 a 48 h), altamente alcalino (normalmente 0.1 M CaCO_3), processo de extracção. A nível industrial, os processos de extracção usados têm por objectivo potenciar a rentabilidade e incrementar o poder gelificante das carragenanas. Alternativamente, uma menor percentagem de unidades precursoras 6-sulfatadas são convertidas no correspondente 3,6-anidro, em processamentos extractivos de curta duração (2 a 4 h) e brandamente alcalinos (0.02 a 0.1 M NaOH), como acontece no método usado no nosso laboratório (ver alínea 2.8.2). Neste tipo de processamento é possível extrair carragenanas contendo ainda os respectivos precursores biológicos (ver Tabela 3.10, código B, F e H). O processo de extracção moderadamente alcalino é usado, a nível industrial, quando se pretende obter carragenanas solúveis a frio e/ou com capacidade viscosificante (Falshaw *et al.*, 2003).

O fraccionamento das carragenanas pelo KCl, usado habitualmente na extracção industrial, tem por objectivo separar a fracção gelificante da não-gelificante,

respectivamente carragenana kappa e carragenana lambda (ver alínea 1.5.2). A existência de extractos com mistura de fracções gelificantes e não-gelificantes resulta da utilização industrial de material algal pertencente à família Gigartineae, dos géneros *Chondrus*, *Gigartina* e *Chondracanthus*, usualmente colhido em populações selvagens (ver Tabela 1.7).

No método laboratorial usado neste trabalho, não é necessário o fraccionamento por KCl, pois as algas usadas foram cuidadosamente separadas em diferentes grupos, consoante a espécie e geração a que pertenciam. Segundo Smith e Cook (1953) a técnica de fraccionamento pela adição de KCl permite, para além da separação da carragenana kappa da carragenana lambda, a separação da carragenana iota, pois este ficocolóide não forma agregados na presença de iões de potássio. No entanto, a separação da carragenana kappa da carragenana iota só é possível quando estas se encontram em misturas e não numa estrutura híbrida (van de Velde *et al.*, 2001), como é o caso das carragenanas produzidas pelos gametófitos de *C. crispus*, *M. stellatus*, *G. pistillata*, *C. acicularis* e *C. teedei* var. *lusitanicus*, analisadas neste trabalho. Ou seja, as carragenanas produzidas pela geração gametófito (fase haplóide) destas algas são copolímeros, denominados por carragenana “kappa-2” ou “weak-gelling” (Falshaw *et al.* 2003), e não uma mistura de duas ou mais fracções de carragenana (Bixler *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2001).

O método de extracção laboratorial alcalino, usado neste estudo (Pereira *et al.*, 2003) possibilita a extracção de carragenanas com baixo índice de degradação (Ciancia *et al.*, 1993b) e, conseqüentemente, com elevado peso molecular (ver Tabelas 3.13 e 3.14), vindo confirmar que a extracção de carragenanas da família kappa e beta, mesmo em condições “suaves” (baixas pressões e temperaturas), promove a ciclização dos precursores. No entanto, nalguns casos, é possível encontrar carragenanas extraídas sob estas condições, ainda com uma pequena percentagem de precursores biológicos (ver, por exemplo, a composição da carragenana extraída do *Calliblepharis jubata* NF – Tabela 3.10, código F).

Comparativamente às carragenanas obtidas a nível industrial (ver Tabela 3.15 e 3.16), as carragenanas extraídas das algas portuguesas apresentam, quase sempre, elevados pesos moleculares, confirmando a existência de um processo químico de ciclização e um baixo índice de degradação no método de extracção usado no nosso laboratório.

Naturalmente que as variações na rentabilidade das extracções também se reflectem nas características físico-químicas das carragenanas. Para além da maior ou menor percentagem dos precursores biológicos presentes nas amostras (ver alínea 4.1.3), o peso molecular das carragenanas também varia grandemente consoante o método de extracção usado. Os resultados da análise por SEC-MALLS (ver método na alínea 2.11 e respectivos resultados em 3.7) mostram uma grande variação no peso molecular das carragenanas, com valores a oscilar entre 43 e 1641 kDa. O peso molecular das carragenanas depende, para além do método de extracção, das espécies usadas. As amostras de carragenana extraídas pelo método de extracção laboratorial (ver alínea 2.8.2) apresentam o peso molecular mais elevado (ver Tabela 3.16). Provavelmente existem, para além da temperatura e do tempo de extracção, outros factores que afectam o peso molecular das amostras de carragenana. De uma maneira geral podemos concluir que as amostras nativas de carragenana (ver método de extracção em 2.8.2), resultantes da extracção aquosa, exibem um menor peso molecular do que as resultantes da extracção alcalina (ver Tabela 3.13 e 3.14). Podemos ainda afirmar que o peso molecular das carragenanas dos talos tetraspóricos é, em geral, superior ao das carragenanas dos talos gametófitos (gametófitos femininos e não-

frutificados). No primeiro caso, a explicação para a diferença dos pesos moleculares verificados, está relacionada com a presença de uma maior ou menor quantidade de precursores biológicos nas amostras de carragenana. Como foi referido anteriormente, a presença de precursores (μ e ν) nas carragenanas nativas, com um éster sulfato na posição 6 da unidade α -D-galactose 4-ligada (ver Figura 1.6), impede a formação de cadeias longas de carragenana, promovendo a interrupção das sequências das unidades repetitivas de carrabiose e, conseqüentemente, um menor peso molecular (ver extracção aquosa em autoclave do *C. teedei* var. *lusitanicus* GF na Tabela 3.13). O tratamento alcalino promove a ciclização das carragenanas pela eliminação do sulfato presentes nos ésteres sulfato, em C-6, nos precursores biológicos. A nível laboratorial e industrial, a reacção de ciclização é levada a cabo pelo ião hidróxido (OH^-), presente nas soluções alcalinas de NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$, como catalisador, promovendo a formação de pontes de 3,6-anidro. Na natureza, a eliminação do sulfato e conseqüente ciclização da carragenana, é catalizada por uma sulfohidrolase (Wong e Craigie, 1977, 1978).

A ciclização *in vivo* das carragenanas μ e ν (da qual resulta a carragenana kappa e iota, respectivamente) é similar à que ocorre nos processos químicos intervenientes na extracção alcalina laboratorial e/ou industrial (Ciancia *et al.*, 1993b). No entanto, ao contrário do que é referido por estes autores, os derivados ciclizados da carragenana lambda (sobretudo carragenana theta) também se encontram na natureza (ver alínea 4.1.4), o que implica a existência de um processo de ciclização promovido, *in vivo*, por enzimas adequadas.

As carragenanas da família kappa e lambda diferem na quantidade e distribuição dos grupos sulfato (Painter, 1983); assim, nas carragenanas lambda o agrupamento de ésteres sulfato em torno do hidroxil, em C-3 da unidade α , funciona como escudo contra a polarização ou ionização, reduzindo o rácio da reacção de ciclização. Na prática, o tratamento alcalino usado no nosso laboratório não é suficiente para promover a transformação da carragenana lambda na forma ciclizada theta. A nível industrial, grande parte das carragenanas extraídas dos tetrasporófitos do género *Chondrus* e *Gigartina* são misturas de carragenana lambda e theta pois, neste caso, a ciclização é incompleta e mais lenta do que aquela que ocorre no tratamento alcalino das carragenanas da família kappa (Ciancia *et al.*, 1993b; Falshaw *et al.*, 2003).

4.1.4 – Uso da espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman) na caracterização dos ficocolóides

Como foi referido no capítulo “introdução” (alínea 1.5.4), a determinação sistemática da composição polissacarídica nativa das algas teve início com os trabalhos de Chopin e Whalen (1993), através da análise directa de pó de alga por FTIR-DRIFTS. No presente trabalho foram aplicadas metodologias inovadoras na determinação da composição nativa dos colóides produzidos pelas várias carragenófitas portuguesas e pelas principais carragenófitas de uso industrial. Com o recurso a técnicas de espectroscopia vibracional, nomeadamente FTIR-ATR e FT-Raman, tornou-se possível determinar, com precisão, os ficocolóides presentes em cada alga, sem haver necessidade de proceder a longos e complexos processos de extracção e fraccionamento das carragenanas e de outros ficocolóides (Pereira *et al.*, 2003; Pereira e Mesquita, 2004).

Após a análise de diversas algas produtoras de carragenanas da família lambda (ver Tabela 3.6 e 3.7), podemos concluir que as variantes da carragenana lambda (theta e ksi) existem, com frequência, na natureza. Assim, a ideia de que os derivados ciclizados da carragenana lambda só se encontram em carragenanas extraídas da fase

diplóide das Gigartinaceae, através dos tratamentos alcalinos usados na indústria (extracções feitas a pressões e temperaturas elevadas) (Ciancia *et al.*, 1993b), não é correcta. Alguns trabalhos recentes, feitos com base na análise por RMN de carragenanas extraídas em condições pouco agressivas (pressões e temperaturas baixas), referem a possibilidade dos derivados ciclizados (theta) da carragenana lambda resultarem de processos enzimáticos que ocorrem nas próprias algas (van de Velde *et al.*, 2004).

O *Chondrus crispus*, uma espécie economicamente importante da família Gigartinaceae, foi uma das primeiras algas em que a composição das carragenanas produzidas pela geração gametófita e pela geração tetrasporófito foi usada na confirmação da identificação de talos denominados “não-frutificados” (NF), permitindo uma melhor compreensão da ecologia desta espécie (McCandless *et al.*, 1973). Como foi referido na “Introdução”, as Gigartinaceae possuem um ciclo biológico trigenético, com gametófitos e tetrasporófitos de vida livre e independente, mas morfologicamente isomórficos (Fredericq *et al.*, 1992; Scrosati *et al.*, 1994). Facilmente identificáveis quando as estruturas reprodutoras estão presentes, as diferentes gerações são, no entanto, muito difíceis de distinguir visualmente quando os talos se apresentam sem frutificações. Nesta situação, dois métodos são comumente usados na separação dos gametófitos e dos tetrasporófitos: o método do resorcinol e o da fluorescência (Yaphe, 1965; Fournet *et al.* 1993) (Brown *et al.*, *in press*).

Com a descoberta de que a carragenana kappa era predominante nos ficocolóides produzidos pelos gametófitos e a carragenana lambda nos tetrasporófitos, o reagente acetal-resorcinol, originalmente desenvolvido para determinar a quantidade de 3,6-anidrogactose e frutose em polissacrídeos (Yaphe e Arsenaul, 1965), passou a ser usado na distinção das duas gerações. A utilidade da técnica foi incrementada quando Dyck *et al.* (1985) mostraram que poderia ser directamente aplicada nos talos, sem haver necessidade duma extracção das carragenanas. Assim, o reagente fica vermelho quando aplicado aos gametófitos e mantém a cor original quando aplicado aos tetrasporófitos. Este teste permitiu, durante muitos anos, a investigação da estrutura das populações e os padrões da zonação vertical das diferentes gerações de *C. crispus* e de outras espécies da família Gigartinaceae (Lazo *et al.*, 1981; Dyck *et al.*, 1985; Bolton e Joska, 1993; Dyck e De Wreede, 1995; Lindgren e Alberg, 1996; Otaiza *et al.*, 2001).

No caso dos estudos feitos com o *C. crispus*, também tem sido usado um segundo método, na distinção das duas gerações, com base nos trabalhos de Fournet *et al.* (Fournet *et al.*, 1993), nos quais se estabeleceu uma correlação entre a geração e a iridescência apresentada pelos respectivos talos. Ou seja, os gametófitos apresentavam iridescência azulada (que faz lembrar uma mancha oleosa, sobre o talo), enquanto que os tetrasporófitos não apresentavam qualquer tipo de iridescência. A iridescência apresentada por esta alga foi estudada por Craigie *et al.* (1992) e está relacionada com o número, espessura e espaçamento das lamelas cuticulares. Apesar de haver outros géneros, da família Gigartinaceae, que apresentam iridescência (por exemplo a *Iridaea*), este método da identificação das diferentes gerações não pode ser usado como em *C. crispus* (Fournet *et al.*, 1993; Brown *et al.*, *in press*).

No entanto, estas metodologias (do resorcinol e da iridescência) apresentam inúmeras restrições à sua aplicação e um baixo nível de fiabilidade (Brown *et al.*, *in press*). O método baseado na iridescência tem a sua aplicação restrita ao *C. crispus* e a outras (poucas) espécies com iridescência. A técnica do resorcinol só pode ser aplicado em algas (gametófitos) que produzam ficocolóides cujo componente principal seja a carragenana kappa. Além disso, o teste do resorcinol só é útil quando existe uma alternância bioquímica na produção das carragenanas, de acordo com a alternância das

gerações, tal como acontece nas Gigartinaceae, Petrocelidaceae e nalguns géneros da família Phylloporaceae (ver alínea 1.8 e 4.1.6), não podendo ser aplicada na distinção de gerações em algas de outras famílias da ordem Gigartinales.

Anderson *et al.* (1968b), Stancioff e Stanley (1969), Christiaen e Bodard (1983), foram os pioneiros no uso da espectroscopia de infravermelho com o objectivo de definir a natureza de alguns ficoclóides (carragenana e agar) e a confirmar a alternância bioquímica dos ficocolóides produzidos pelas duas gerações (gametófita e esporófita) de algumas algas da família Gigartinaceae (McCandless *et al.*, 1983). A espectroscopia de infravermelho (IR, “Infrared”) permite revelar uma informação detalhada, a nível molecular, relativamente às propriedades e à estrutura dos polissacarídeos (Pereira *et al.*, 2003). Esta espectroscopia mede as vibrações dos grupos funcionais e das pontes polares, fornecendo informações relativas à estrutura molecular dos compostos analisados. A composição de cada ficocolóide pode, assim, ser determinada pela análise das diferentes intensidades de radiação infravermelha absorvida (Griffiths e de Haseth, 1986).

A espectroscopia de IR foi, até há pouco tempo, a técnica vibracional mais usada no estudo da composição química dos ficocolóides. As suas vantagens principais são: necessita apenas de pequenas quantidades de amostra (alguns miligramas); é um método fiável e não agressivo (Givernaud-Mouradi, 1992; Pereira *et al.*, 2003). No entanto, durante muitos anos, esta técnica de espectroscopia vibracional implicou morosos e laboriosos procedimentos na obtenção de espectros com um bom rácio sinal/ruído (Chopin e Whalen, 1993). Essa limitação foi ultrapassada com o desenvolvimento de aparelhos de IR associados a programas de análise algorítmica (transformada de Fourier), que deram origem à espectroscopia de FTIR (“Fourier Transform IR”).

Nos aparelhos de FT todas as frequências de varrimento são efectuadas simultaneamente, possibilitando a obtenção de dados de forma extremamente rápida, permitindo repetidas análises do composto, num curto período de tempo. Assim, passou a ser possível a obtenção de espectros com um rácio sinal/ruído muito melhorado e num curto espaço de tempo (Williams e Fleming, 1980). Chopin e Whalen (1993) desenvolveram um método de análise em DRIFTS (“Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy” – espectroscopia de infravermelho de reflectância difusa), que permitiu a determinação da composição química das carragenanas pela análise directa de alga seca finamente moída, passando a não haver a necessidade de efectuar a extracção dos colóides. No entanto, esse método implica a preparação de pastilhas com uma mistura do pó de alga seca e KBr, num rácio de aproximadamente 1:10 (pó de alga:KBr).

Mais recentemente, Pereira *et al.* (2003) desenvolveram uma técnica de análise com base na espectroscopia de FTIR-ATR (“Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflectance” – FTIR de reflectância total atenuada), que passou a permitir a análise da composição dos ficocolóides presentes nas algas marinhas (carragenanas, agar e ácido algínico), a partir de pó de alga seca, sem haver a necessidade de preparar pastilhas de KBr (Pereira *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004) (ver alínea 2.7).

Em contraste com o FTIR, a aplicação da espectroscopia “Laser Raman” tradicional estava limitada a compostos não orgânicos, devido à fluorescência induzida pelo laser de luz visível e ao elevado ruído de fundo dos espectros de compostos bioquímicos. Outro problema adicional recorria do facto de haver uma grande probabilidade da amostra ser destruída pela elevada energia do feixe de luz usado (Pereira *et al.*, 2003). Entretanto, com a utilização de lasers nd:YAG, operando a 1064 nm, foi possível diminuir o nível de fluorescência na análise de amostras de origem biológica.

Os aparelhos opti-electrónicos progrediram drasticamente durante a última década em consequência da evolução da tecnologia do estado sólido (Pereira *et al.*, 2004), tendo como resultado a construção de diodos laser compactos, eficientes e fiáveis, a emitir luz do visível ao infravermelho. Os actuais aparelhos de laser Raman combinam essa nova geração de diodos laser e um conjunto de filtros apropriados, que permitem a análise de amostras de origem biológica, sem haver o risco de destruição do material (Pereira *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004).

Durante muito tempo, a espectroscopia laser Raman foi considerada, por alguns autores (Givernaud-Mouradi, 1992), uma técnica complementar da espectroscopia de IR. No entanto, certas bandas de fraca intensidade nos espectros de IR surgem nítidas em Raman, possibilitando uma completa e correcta interpretação dos espectros vibracionais (Pereira e Mesquita, 2004). Em estudos comparativos dos diferentes tipos de carragenana, os espectros de FTIR-ATR fornecem, normalmente, toda a informação necessária ao correcto diagnóstico dos polissacarídeos analisados. No entanto, O FT-Raman permite uma identificação mais precisa dos diferentes colóides, em particular das diferentes fracções pertencentes à família da carragenana Lambda (Pereira e Mesquita, 2003; Pereira *et al.*, 2003) (ver Tabela 1.1) e dos precursores biológicos da carragenana kappa e iota (respectivamente, mu e nu) (Pereira e Mesquita, 2004).

Com a combinação destas duas técnicas espectroscópicas (FTIR-ATR e FT-Raman), é agora possível a identificação rápida e fiável de todos os principais tipos de ficocolóide: ácido algínico, agar, carragenana-kappa, -mu, -iota, -nu, -beta, -gamma, -lambda, -theta e -ksi (ver Tabela 3.5-A e 3.5-B) (Pereira *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004), tanto a partir de amostras de ficocolóides extraídos como de amostras de alga seca moída. A aplicação conjunta destas técnicas espectroscópicas tem, como principais vantagens, as seguidamente descritas:

- a) Constitui uma metodologia rápida e simples na análise dos ficocolóides. Bastam alguns minutos, em vez dos vários dias necessários à extracção dos colóides (ver alínea 1.5.1, no capítulo 1 e alínea 2.8, no capítulo 2).
- b) Requer pequenas quantidades de material algal (algumas gramas de peso fresco ou miligramas de peso seco), possibilitando a análise de amostras herborizadas e, inclusivamente, de algas ou porções de alga de reduzidas dimensões;
- c) Visto que as algas são sujeitas a um processo de manipulação e tratamento mínimos (são simplesmente secas e moídas), a composição determinada representa, o mais fielmente possível, a composição natural do ficocolóide por elas produzido.

O estudo das carragenanas e/ou pó de alga seca, por espectroscopia vibracional (FTIR-ATR e FT-Raman), permitiu-nos determinar as bandas chave para cada um dos principais tipos de carragenana (ver Tabela 3.5-A e 3.5-B). Assim, todos os espectros (ver Figuras 3.55 a 3.60) apresentam bandas de forte absorção na região $1210-1260\text{ cm}^{-1}$, correspondentes ao S=O dos ésteres sulfato (excepto a carragenana beta) e na região $1010-1080\text{ cm}^{-1}$, correspondentes à ligação glicosídica, comum a todas as carragenanas (Pereira *et al.*, 2003). Os outros grupos químicos são característicos de cada tipo de carragenana (ver Tabelas 3.4 e 3.5): 3,6-anidrogactose (DA) a $925-935\text{ cm}^{-1}$; gactose-4-sulfato (G4S) a $845-850\text{ cm}^{-1}$; gactose-2-sulfato (G/D2S) a $820-830\text{ cm}^{-1}$; gactose-6-sulfato (G/D6S) a $810-820\text{ cm}^{-1}$ e 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S) (Roberts e Quemener, 1999; Pereira *et al.*, 2003).

No espectro de FTIR-ATR, tanto a carragenana kappa como a iota, apresentam uma banda a 845-850 cm^{-1} (ver Figuras 3.55 a 3.57), mas a banda 800-805 cm^{-1} é característica e distintiva da carragenana iota (ver Figuras 3.55 e 3.56).

O formato da banda 820-830 cm^{-1} tem sido usado na distinção da carragenana lambda (banda larga), da carragenana ksi (banda estreita e aguda) (McCandless *et al.*, 1983; Correa-Diaz *et al.*, 1990). No entanto, os espectros de FT-Raman apresentam-se mais claramente definidos, possibilitando a separação das diferentes variantes da família lambda: a fracção lambda apresenta picos a 825 e 900 cm^{-1} , a fracção ksi a 815 e 859 cm^{-1} e a fracção theta a 825 cm^{-1} (ver Figura 3.59 e 3.60) (Pereira e Mesquita, 2003; Pereira *et al.*, 2003; Pereira e Mesquita, 2004). Bandas características importantes, tais como as de 825 e 867 cm^{-1} , necessárias à identificação dos precursores biológicos da carragenana kappa e iota, mu e nu, respectivamente, são mais facilmente visíveis nos espectros de FT-Raman do que nos de FTIR (ver Figura 3.70 e 3.71) (Pereira e Mesquita, 2004).

Visto que este tipo de aparelhos (FTIR-ATR e FT-Raman) faz parte do equipamento standard de muitos Departamentos de Química, a aplicação das metodologias descritas neste trabalho vai, com certeza, permitir a substituição dos testes da iridescência e do resorcinol, em estudos de ecologia nas Gigartinaceae (Brown *et al.*, *in press*; Pereira e Mesquita, 2004). Passa, assim, a ser possível a realização de estudos fiáveis ao nível da estrutura das populações de algas carragenófitas, o desenvolvimento e a implementação de estratégias de colheita sustentável de algas com interesse económico, a avaliação da composição natural de algas (carragenófitas, agarófitas e alginófitas) com potencialidades industriais, a avaliação e controlo da qualidade dos diferentes lotes de material algal colhido e/ou cultivado, o incremento do conhecimento da composição polissacarídica das diferentes espécies e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento da quimiotaxonomia dos ficocolóides.

Apesar da grande evolução da técnica espectroscópica vibracional, o FTIR e o FT-Raman são usados somente na determinação qualitativa dos ficocolóides sem, no entanto, os quantificar. Dyrby *et al.* (2004) e Prado-Fernandez *et al.* (2003) desenvolveram técnicas de quimiometria associadas à espectroscopia vibracional para a quantificação “on-line” das diferentes fracções constituintes das carragenanas industriais. No entanto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear do protão (^1H -RMN) é a técnica espectroscópica correntemente usada na quantificação dos componentes das amostras de carragenana (van de Velde *et al.*, 2002a; Pereira e Mesquita, 2004; van de Velde *et al.*, 2004).

4.1.5 – Uso de RMN (^1H e ^{13}C) na caracterização dos ficocolóides

Como foi referido anteriormente (ver capítulo 1, “Introdução”), as carragenanas naturais são misturas de diferentes polissacarídeos sulfatados, havendo diferenças, na sua composição, de amostra para amostra. Assim, a análise quantitativa das diferentes amostras de carragenana é de primordial importância para a indústria fornecedora de ingredientes e aditivos e, também, para a indústria alimentar, de forma a assegurar a qualidade dos seus produtos. Desde os trabalhos pioneiros de Usov e colaboradores (Yarotsky *et al.*, 1977; Usov, 1984), a espectroscopia de RMN é usada como técnica preferencial na determinação e quantificação das diferentes fracções em amostras de carragenana (van de Velde e de Ruiter, 2002; van de Velde *et al.*, 2002a).

Como já referimos, a espectroscopia de ^1H -RMN é usada neste trabalho para quantificar as diferentes fracções constituintes das amostras de carragenana híbrida (ver alínea 2.10). Esta técnica pode ser usada, em geral, com dois propósitos: para a análise

qualitativa rápida de pequenas amostras de carragenana (bastam 5 mg) e para a análise quantitativa das diferentes fracções presentes nas carragenanas híbridas (Pereira e Mesquita, 2004; van de Velde *et al.*, 2004).

A determinação quantitativa da composição de diferentes carragenanas, baseia-se na intensidade da ressonância dos prótons anoméricos (van de Velde *et al.*, 2002a). As ressonâncias da carragenana kappa, iota, nu, mu, beta, lambda, theta e ksi, encontram-se bem definidas na região anomérica dos espectros de ^1H -RMN (ver Figuras de 3.81 a 3.89 e Tabela 3.8). No entanto, existe a possibilidade de haver uma sobreposição de ressonâncias quando estão presentes, na mesma amostra, carragenana-ksi, -theta e -lambda (ver Figura 3.9-B). Nesse caso, é necessário recorrer à espectroscopia de ^{13}C -RMN, para quantificar as diferentes fracções pertencentes à família lambda (ver Figura 3.86) (Pereira e Mesquita, 2004).

4.1.5.a – Revisão dos valores dos deslocamentos químicos das carragenanas de acordo com as recomendações da IUPAC

Os standards internos TSP, DMSO e MeOH (ver alínea 2.10) apresentam deslocamentos químicos insensíveis aos diferentes valores de pH. Pelo contrário, a acetona apresenta um bom sinal a pH 5.5 e 7.2 e um sinal fraco a valores de pH mais elevados. Assim, a acetona não deve ser usada como referência interna em situações de pH elevado.

A dependência dos deslocamentos químicos dos standards internos às variações de temperatura foi observada nos espectros de ^{13}C obtidos com o standard interno DMSO. O deslocamento químico do DMSO foi de 41.29 ppm a 24 °C e de 41.53 ppm a 65 °C. O TSP apresenta um deslocamento químico de $\delta = -0.18$ (^{13}C) e $\alpha = -0.017$ (^1H), o que permite o uso deste sal como alternativa ao DSS. Os deslocamentos químicos do DMSO ($\delta = 41.53$) e do MeOH ($\delta = 51.43$), nos espectros de ^{13}C , são significativamente diferentes dos referidos e usados por Usov *et al.* (1980), respectivamente $\delta = 39.45$ e $\alpha = 50.12$, para o DMSO e MeOH. Esta diferença explica grande parte das discrepâncias observadas por Pereira *et al.* (2003) na análise das carragenanas híbridas extraídas do *C. teedei* var. *lusitanicus*, com deslocamento 2.5 ppm superiores aos reportados por Usov (1984) e Zinoun *et al.* (1993b).

Assim, de acordo com as recomendações da IUPAC, foram registados os espectros de ^{13}C - e ^1H -RMN, das carragenanas mais representativas, contendo as unidades básicas repetitivas mais comuns: kappa, iota, lambda, mu, nu, theta, beta e ksi (ver Tabela 3.8 e 3.9). Os deslocamentos químicos de todos os átomos de carbono e, também, dos prótons anoméricos, foram assim reportados relativamente ao standard interno DSS ($\delta = 0$). A atribuição das ressonâncias dos espectros de RMN dos diferentes tipos de carragenana foi feita com base nos dados sumariados na literatura (van de Velde *et al.*, 2002a). Os valores dos deslocamentos químicos obtidos no nosso estudo, relativamente aos espectros de ^{13}C - e ^1H -RMN, foram obtidos com recurso à análise de amostras de carragenana extraídas de espécies de uso industrial (*Betaphycus gelatinum* – carragenana beta, *Eucheuma denticulatum* – carragenana iota, *Kappaphycus alvarezii* – carragenana kappa, *Gigartina skottsbergii* – carragenana kappa/iota, e de espécies ainda não usadas a nível industrial, como é o caso do *C. teedei* var. *lusitanicus*, alga produtora de carragenana ksi/theta.

Em adição aos principais de tipos de carragenana, foi também analisada uma amostra contendo alguns constituintes menores e os “contaminantes” mais frequentes: *Sarconema scinaoides* – piruvato e amido florídeo. O piruvato é um componente comum de muitas das carragenanas complexas (Falshaw *et al.*, 2003). Este componente

forma um acetal cíclico nas posições 4 e 6 nos resíduos de galactose (3-ligados). Este substituinte pode ser identificado pela presença de sinais característicos dos seus carbonos, juntamente com efeitos de substituição específicos dos átomos de carbono da D-galactose 3-ligada (Falshaw e Furneaux, 1995b; Chiovitti *et al.*, 1998a; van de Velde *et al.*, 2002a). Relativamente ao DSS, os deslocamentos químicos, em ^{13}C -RMN, deste substituinte são: 27.61, 103.55 e 177.96 ppm para, respectivamente, os átomos de carbono do metil, acetal e carboxil. O ácido pirúvico também detectado nos espectros de ^1H -RMN, pela presença da ressonância dos prótons metil, com o valor de 1.44 ppm relativamente ao DSS. Em adição ao sinal do metil, são observados sinais característicos na região dos prótons anoméricos, a 5.30 e 5.49. Pequenas quantidades de resíduos 6-*O*-metil-D-galactose (3-ligados) foram detectados na carragenana kappa extraída do *K. alvarezzi* (Bellion *et al.*, 1983) e em vários outros polissacarídeos (Chiovitti *et al.*, 1998a). O sinal específico para este resíduo é detectado, relativamente ao DSS, a 61.14 ppm, no espectro de ^{13}C -RMN (van de Velde *et al.*, 2004).

O amido florídeo, um glucano ramificado [(1→4, 1→6)- α -D-glucano], relacionado com o amido das plantas superiores e com o glicogénio dos animais, constitui a principal substância de reserva das algas vermelhas. Este polissacarídeo é solúvel em água e pode acompanhar as carragenanas nos processos de extracção e precipitação. A presença do amido florídeo pode ser confirmada pelo bem conhecido conjunto de sinais dos resíduos de α -D-glucanopiranosose (4-ligado), nos espectros de ^{13}C -RMN (Colson *et al.*, 1974; Knutsen e Grasdalen, 1987; van de Velde *et al.*, 2002a). Nos espectros de ^{13}C -RMN, os sinais do amido florídeo são detectados pela presença dos deslocamentos químicos, relativamente ao DSS, em 102.55, 74.34 e 74.04 ppm para, respectivamente, os átomos de carbono C-1, C-2 e C-5. Nos espectros de ^1H -RMN, o amido florídeo é detectado pelo sinal do próton anomérico da metade D-glucanopiranosil [α (1→4) -ligado], a 5.35 ppm. A ressonância do próton anomérico da outra metade do dímero [α (1→6) D-glucanopiranosil], surge com o deslocamento químico de 0.39 ppm (Knutsen e Grasdalen, 1987).

4.1.6 – Revisão do significado quimiotaxonómico de alguns ficocolóides presentes em algas economicamente importantes (Gigartinales, Rhodophyceae)

Como foi referido no capítulo 1, alínea 1.8, as algas pertencentes às famílias Phyllophoraceae, Petrocelidaceae e Gigartinaceae, foram alvo, durante o passado meio século, de inúmeros estudos bioquímicos, morfológicos e taxonómicos, o que permitiu, entre outros aspectos, o estabelecimento e a caracterização dum padrão das carragenanas produzidas (Chopin *et al.*, 1999a). A partir do padrão das carragenanas produzidas pelas diferentes espécies e respectivas gerações foi possível estabelecer arranjos taxonómicos e, assim, contribuir para a compreensão da filogenia das algas vermelhas.

Em jeito de síntese, podemos dizer que: os gametófitos das algas pertencentes às famílias Phyllophoraceae, Gigartinaceae e Petrocelidaceae produzem carragenanas híbridas da família kappa, enquanto que os esporófitos produzem carragenanas da família lambda (ver Tabela 4.1). No entanto, este padrão na distribuição das carragenanas não ocorre de forma tão linear nas outras famílias com espécies carragenófitas.

Como já vimos, a primeira síntese sobre os ficocolóides foi feita por Tseng (Tseng, 1945) e a primeira tentativa para determinar o possível significado taxonómico

dos componentes químicos das paredes celulares das algas foi feita por Stoloff e Silva (1957). Em 1959, Yaphe estudou as relações entre a posição taxonómica e o tipo de polissacarídeos produzidos, em 30 espécies da classe Rhodophyceae, com base na digestão enzimática dos seus polissacarídeos, sugerindo que a presença de carragenana kappa deveria ser usada como característica de valor taxonómico. Stoloff (1962) analisou 78 espécies, pertencentes a 30 géneros, para rentabilizar a utilização industrial das algas, tendo proposto a criação de 3 ordens na subclasse Florideophycidae: Gelidiales, algas produtoras de agar; Gigartinales, algas produtoras de carragenanas; e Hypneales, algas produtoras de gelanas. Nesta organização ressalta o facto de haver sobreposição de algumas famílias nas três ordens.

Frei e Preston (1964) estudaram os polissacarídeos estruturais não-celulósicos em paredes celulares de algas e chamaram a atenção para o uso dos polissacarídeos (que não o agar e as carragenanas) do tipo xilana e manana, como marcadores taxonómicos. Visto que a parede celular é o produto final da cadeia de reacções bioquímicas, esta deverá, certamente, constituir um aspecto fundamental em estudos de filogenia e taxonomia.

Em 1973, McCandless e colaboradores demonstraram que no *C. crispus* (Gigartinaeae), os gametófitos produziam carragenana kappa e os esporófitos (tetrasporófitos) produziam carragenana lambda. Depois da descoberta desta alternância bioquímica nas gerações, percebeu-se que muitas variações sazonais e geográficas na qualidade (razão kappa/lambda), na quantidade (percentagem de peso seco), na distribuição quantitativa das carragenanas em populações naturais de *C. crispus*, anteriormente atribuídas ao habitat, nutrientes presentes na água e idade das plantas, podiam, de facto, ser explicadas pelo rácio gametófitos/esporófitos da amostra. McCandless e Craigie (1974) concluíram que num dado local, tomando em conta as diferentes gerações das algas colhidas, as variações sazonais ficavam reduzidas a um nível mínimo, com um aumento ligeiro do conteúdo em carragenana, nos gametófitos femininos, no final do Verão. Chopin e colaboradores (1995) mostraram, no entanto, que quando as amostras eram cuidadosamente separadas, de forma a reduzir a sua heterogeneidade (devido a diferenças no tamanho, peso e idade), era possível verificar variações sazonais, com valores entre 31.4 e 69.8 % (do peso seco).

Semesi e Mshigeni (1977) usaram o facto do *Sarconema filiforme* produzir carragenana iota, e não agar como tinha sido reportado por Levring *et al.* (1969), para justificar a sua inclusão na família Solieriaceae. McCandless (1978) reconheceu a dificuldade no uso do tipo de galactanas produzidas pelas algas, com fins taxonómicos, sobretudo ao nível da família. No entanto, esta autora reconheceu que era importante usar estes polissacarídeos como carácter taxonómico na classificação das algas vermelhas e que novas técnicas deveriam ser usadas para tornar viável e prática esta possibilidade. Kylin (1956) estimou que a classe Rhodophyceae possuiria cerca de 558 géneros e 3.740 espécies. Entretanto, muitas foram as alterações ocorridas na sistemática das algas vermelhas, enquanto as técnicas de análise química dos ficocolóides progrediam, desde as alegações feitas por McCandless.

DiNinno *et al.* (1979) descobriram a presença de ácido pirúvico (definido como carragenana pi - π), derivado das carragenanas, em *Petrocelis* e em espécies do género *Mastocarpus*. Estes autores sugeriram que a ocorrência de ácido pirúvico, ligado à carragenana, talvez tivesse também significado taxonómico. Stancioff (1981) estabeleceu uma perspectiva industrial da taxonomia das algas, usando como argumento algumas propriedades dos ficocolóides, tais como: a boa filtragem, a obtenção de extractos com boa cor, as propriedades gelificantes, etc. Por exemplo, sob o ponto de vista do utilizador, a *Gigartina volans* (agora *Mazzaella volans*) e a *G. leptorhychos*

(agora *M. leptorhychos*), não deveriam pertencer ao género *Gigartina*, mas sim ao género *Chondrus*.

Miller e Furneaux (1982) ao descobrirem uma série de substituintes e componentes menores no agar, questionam a sua origem: ou estes componentes resultaram de outros sacarídeos ou glicósidos presentes na alga, ou então resultaram de espécies epífitas. Esta dúvida levantou o problema da fiabilidade das técnicas convencionais de extracção, purificação e análise dos polissacarídeos das algas. Essas técnicas não eram simples e requeriam muitos passos, que poderiam ser responsáveis pela degradação dos constituintes dos açúcares e originar outros compostos. Isto levamos, conseqüentemente, a questionar se estas técnicas detectam realmente os componentes naturais ou se poderão, eventualmente, criar artefactos? Para contornar esse problema foram, entretanto, desenvolvidas técnicas espectroscópicas que permitem, como já vimos, analisar directamente alga seca moída (Chopin e Whalen, 1993; Pereira *et al.*, 2004; Pereira e Mesquita, 2004).

McCandless e colaboradores (1982; 1983) estudaram os padrões das carragenanas nas Phyllophoraceae e nas Gigartinaceae. Assim, chegaram à conclusão de que nas Phyllophoraceae, os gametófitos produziam carragenana iota ou carragenana híbrida iota/kapa, enquanto as Gigartinaceae produziam carragenana kappa ou carragenana híbrida kappa/iota. Em ambas as famílias, os esporófitos (tetrasporófitos) produziam carragenana da família lambda. Baseando-se na produção de carragenana iota, a *Besa stipitata* (antes denominada *B. Papillaeformis*) foi transferida das Gigartinaceae para as Phyllophoraceae (Abbott e Hollenberg, 1976). Estes autores caracterizaram as carragenanas dos gametófitos das Gigartinaceae e concluíram que esta família apresentava uma ‘uniformidade monótona’, usando a mesma terminologia de Mikami (1965), quando este descreveu o desenvolvimento sexual desta família. Estes autores apresentaram também explicações para os “tropeções” (falhas) ocorridos ao nível da família, resultantes dos esforços iniciais de Stoloff e Silva (1957) e Yaphe (1959): os primeiros, porque baseavam a suas conclusões só no polissacarídeo dominante, classificando-o sob o ponto de vista das suas propriedades físicas; o segundo, porque se baseava na digestão enzimática dos polissacarídeos, talvez uma técnica demasiado específica para os conhecimentos da época.

Whyte e colaboradores (1984) demonstraram que a galactose metilada, no passado associada em exclusivo aos polímeros agaróides, também estava presente nas Caulacanthaceae e nas Solieriaceae. Os polímeros das Nemastomataceae e Plocamiaceae são referidos como predominantemente constituídos por unidades sulfatadas de 1,3-D-galactose, nas posições 4- e 2-. A família Plocamiaceae foi depois elevada a ordem (Plocamiales), com base em análises do ARN ribossómico (Saunders e Kraft, 1994).

Furneaux e Miller (1986) confirmaram, pela análise de várias algas vermelhas sul-africanas, o significado taxonómico da estrutura dos polissacarídeos presentes. Em relação às famílias melhor estudadas, estes autores concluíram que era possível predizer algumas das características de certas algas relacionadas. Adams e colaboradores (1988) mostraram que, devido ao facto da *Leptsarca simplex* produzir xilanas, esta alga não estava relacionada com o género *Iridaea* (Gigartinales) e, por isso, deveria ser colocada na ordem Palmariales (ou Nemaliales). Desde essa altura, a *L. Simplex* passou a ser sinónimo de *Palmaria decipiens* (Ricker, 1987).

As principais alterações taxonómicas do género *Eucheuma* (género comercialmente muito importante) foram implementadas por Doty (1988), que descreveu o novo género *Kappaphycus*, com base no ficocolóide produzido e na sua

“tendência vegetativa”. Um ano mais tarde, Santos (1989) publica uma revisão sobre as carragenanas produzidas pelas espécies pertencentes aos géneros *Eucheuma* e *Kappaphycus*. O género *Kappaphycus* (algas produtoras de carragenana kappa) e as duas secções, *Eucheuma* e *Anaxiferae*, do género *Eucheuma* (algas produtoras de carragenana iota) são homogéneos, enquanto que a terceira secção, *Gelatiformia*, do género *Eucheuma*, não é homogénea (Santos, 1989). As duas espécies *E. perplexum* e *E. kraftianum* produzem carragenana iota, a *E. odontophorum* e *E. platycladum* produzem carragenana híbrida kappa/iota, enquanto a *E. gelatinae* (agora *Betaphycus gelatinum*) e a *E. speciosum* (agora *B. speciosum*) produzem carragenana híbrida beta/kappa. Santos, no entanto, não tomou a iniciativa de transferir nomenclaturalmente estas espécies de acordo com as análises da composição dos ficocolóides, pois tomou em conta também outros atributos (Santos, 1989). No entanto, pela análise da carragenana extraída da *E. platycladum* por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ (ver Tabela 3.12), confirma-se a presença de uma carragenana híbrida do tipo kappa/iota, mas com um nítido predomínio da fracção kappa (cerca de 80 %mole). Assim, esta carragenófito deveria ser transferida para o género *Kappaphycus*, passando a designar-se *K. platycladum*.

Em 1995, Doty descreve o novo género *Betaphycus*, com base na produção predominante de carragenana beta, tendo estabelecido 3 espécies: *B. philippinensis*, *B. gelatinum* (outrora *E. gelatinae*) e *B. speciosum* (outrora *E. speciosum*). O significado desta segregação genérica entre as algas produtoras de carragenana kappa, iota e beta, mantendo-as integradas numa única família (Solieriaceae) é, provavelmente, discutível, pois a existência de carragenanas naturais (ao nível das paredes celulares), constituídas por unidades repetitivas dissacarídicas perfeitas, é uma situação extremamente rara (van de Velde *et al.*, 2001; van de Velde *et al.*, 2004). A descoberta de estruturas híbridas, presentes num grande número de espécies, põe em causa a ideia das galactanas constituídas por unidades repetitivas dissacarídicas perfeitas (Knutsen *et al.*, 1994). Antes de darmos muita importância filogenética aos diferentes géneros da tribo Eucheumatoideae, como foi descrito por Doty (1988; 1995), é talvez mais apropriado considerar que este autor se baseou em “conveniências taxonómicas”, úteis a nível comercial. Este tipo de “conveniência” também está patente na manutenção do uso dos caracteres gregos (Stortz *et al.*, 1997a) para designar as 15 diferentes carragenanas, até agora identificadas. Visto que, como foi referido anteriormente, a existência de carragenanas puras é um fenómeno extremamente raro, a identificação dos diferentes polímeros deveria ser feita, predominantemente, pelo código de letras proposto por Knutsen *et al.* (1994).

Craigie (1990), considera no seu trabalho que, quanto maior for o número de *taxa* de algas agrupadas, como reflexo das suas relações evolutivas, maiores serão as probabilidades das evidências bioquímicas e químicas assumirem uma importância crescente. No mesmo capítulo, Craigie questiona o significado quimiotaxonómico das xilanas, comuns nas Nemaliales e Palmariales. As xilanas são, também, produtos resultantes da hidrólise ácida das paredes celulares. De forma similar, Chopin *et al.* (1990b) discutiram o valor dos resíduos metil galactosil como indicadores quimiotaxonómicos. Estes resíduos são comuns nas agarófitas, mas estão também presentes em polissacarídeos das Solieriaceae, Caulacanthaceae e Halymeniaceae (outrora Grateloupiaceae). Desde então, estes resíduos foram detectados em várias espécies da família Gigartinaceae e Phyllophoraceae. Chopin e colaboradores também discutiram a possibilidade da carragenana iota desviante (ou, mais correctamente, carragenana-o, de acordo com Craigie, 1990) ser usada como indicador

quimiotaxonómico. Esta carragenana encontra-se nalgumas Solieriaceae e Phyllophoraceae.

Usov e Klochkova (1992) estudaram 40 espécies de algas vermelhas de Kamchatka (Pacífico noroeste) por hidrólise reductiva da biomassa e confirmaram algumas relações entre a composição polissacarídica e o estatuto taxonómico. Os membros das Bangiales são produtores de agar/porfirana, os membros das Cryptonemiales produzem diversos tipos especiais de polissacrídeos, pertencentes simultaneamente ao grupo do agar e das carragenanas: o agarobitol e o carrabitol foram ambos detectados em *Callophilis cristata* e *Cirrulicarpus gmelini*. Só o carobitol foi detectado em membros das Gigartinales, enquanto que o agarobitol foi encontrado nas Rhodymeniales e Ceramiales. Membros das Palmariales produzem, em pequenas quantidades, xilana e galactanas do grupo do agar. Setevenson e Furneaux (1991) e Usov (1993) advogaram o uso, como ferramenta de pesquisa quimiotaxonómica, da hidrólise redutora parcial, coadjuvada pela cromatografia gás-líquido e espectroscopia de massa (GLC-MS).

Liao *et al.* (1993) consideravam que, apesar da carragenana beta ter sido identificada previamente só em 5 espécies de algas vermelhas de famílias relativamente pouco relacionadas (*Endocladia muricata* – Endocladiaceae, *Tichocarpus crinitus* – Tichocarpaceae, *Betaphycus gelatinum* e *B. speciosum* – Solieriaceae e *Furcellaria lumbricalis* – Furcellariaceae), a sua ocorrência uniforme em todas as seis espécies da família Dicranemataceae tem um significado filogenético importante. O facto de todas as 6 espécies serem produtoras de carragenanas híbridas beta/kappa (em gametófitos e esporófitos), é considerado, por estes autores, como uma evidência que justifica a separação das famílias Dicranemataceae e Sarcodiaceae (Gigartinales), contrariamente ao proposto por Norris (1987), que sugeriu a incorporação das Dicranemataceae na família Sarcodiaceae (o género *Sarcodia* produz carragenana lambda, em ambas gerações).

Chopin *et al.* (1994) realçaram o potencial significado quimiotaxonómico dos derivados do ácido pirúvico e das galactoses metiladas, mas duvidaram do valor atribuído à presença da xilose, pois esta encontra-se largamente distribuída em várias ordens (Bangiales, Nemaliales, Palmariales e Batrachospermales).

O primeiro artigo a integrar informação ao nível da caracterização química dos polissacarídeos, características anatómicas e sequência de nucleótidos, foi publicado por Chiovitti *et al.* (1995a). Estes autores demonstraram que a afinidade da *Stenocladia australis* com a *Nizymania australis*, relativamente aos polissacarídeos, é maior do que com a *Stenocladia furcata*, estando de acordo com as suas características anatómicas vegetativas. Estes autores sugeriram que estas três espécies deveriam ser consolidadas num único género, denominado *Nizymania*.

Em 1996, Fredericq *et al.* formularam uma relação filogenética hipotética entre 57 espécies produtoras de agar e carragenana, com base na análise da sequência de rbcL. A ordem Ahnfeltiales (Maggs e Pueschel, 1989) contém agarófitas, enquanto o género *Ahnfeltiopsis* (incluído na família Phyllophoraceae) produz carragenanas (Maggs *et al.*, 1989; Pereira e Mesquita, 2003).

As carragenófitas produtoras de carragenanas kappa, beta e lambda, foram divididas em três agrupamentos: 1 – um agrupamento complexo, contendo as Solieriaceae, Cystocloniaceae, Hyneaceae, Caulacanthaceae, Tichocarpaceae, Furcellariaceae e os géneros *Turnerella* e *Opuntiella*; 2 – agrupamento contendo as Gigartinaceae e as Phyllophoraceae; 3 – o agrupamento contendo as Endocladiaceae,

Gloiosiphoniaceae e as Phacelocarpaceae. Com exceção das Tichocarpaceae, Endocladaceae e Gloiosiphoniaceae, todas as famílias atrás referidas estão incluídas na ordem Gigartinales (Kyllin, 1956).

De acordo com Fredericq *et al.* (1996), as Gelidiales, Gracilariales e Ceramiales, são ordens geralmente consideradas agarófitas. No entanto, as Gracilariales estão incluídas num agrupamento que contém famílias pertencentes às Rhodymeniales. As famílias pertencentes a esta ordem não contêm só agarófitas, mas também algas carragenófitas (Adams *et al.*, 1988), algas produtoras de polissacarídeos híbridos (agar/carragenana), informalmente denominados carragares, polímeros agaróides altamente sulfatados (Takano *et al.*, 1994) e algas produtoras de galactanas complexas (Miller *et al.*, 1996). Finalmente, as Plocamiales e as Sarcodiaceae (presentemente nas Gigartinales) estão incluídas em diferentes agrupamentos (Chopin *et al.*, 1999a).

4.1.6.a – Desenvolvimentos recentes

Durante meio século de trabalhos de investigação em quimiotaxonomia dos ficocolóides, muito conhecimento foi sendo acumulado (ver Tabela 4.1), conforme ia crescendo o número de espécies analisadas. Houve então um progresso considerável desde as estimativas apresentadas por Stoloff e Silva (1957), com 3.4 % dos géneros e 1.6 % das espécies analisados até 1957 (ver “Introdução”, alínea 1.8). Tomando em conta só a ordem Gigartinales, que contém a maioria das algas com interesse económico, podemos dizer que os progressos foram muito significativos. Esta ordem contém cerca de 41 famílias, 100 géneros e 700 espécies (Kraft, 1981). Com a criação das ordens Gracilariales (Fredericq e Hommersand, 1989), Ahnfeltiales (Maggs e Pueschel, 1989) e Halymeniales (Saunders e Kraft, 1996), foram removidos da ordem Gigartinales (Kyllin, 1956) aproximadamente 10 géneros e 172 espécies. As famílias Corallinaceae e Halymeniaceae foram elevadas à categoria de Ordem, respectivamente, Corallinales e Halymeniales (Silva e Johansen, 1986; Saunders e Kraft, 1996). A introdução das Peyssonneliaceae, Kallymeniaceae, Dumontiaceae, Corynomorphaceae, Gloiosiphoniaceae, Choreocolacaceae, Tichocarpaceae, Endocladaceae e Gainiaceae na ordem Gigartinales (Kraft e Robins, 1985), adicionou aproximadamente 84 géneros e 274 espécies. Assim, esta ordem agrupa cerca de 174 géneros e 80 espécies. Representantes de 68.3 % das famílias, 50.6 % dos géneros e 27.9 % das espécies foram já analisados ao nível da sua composição polissacarídica (Chopin *et al.*, 1999a).

Alguns *taxa* têm revelado singularidades óbvias no que diz respeito ao tipo de ficocolóide produzido. Desse ponto de vista, a sua posição taxonómica deveria ser reavaliada (Chopin *et al.*, 1999a). Alguns exemplos disso são as espécies do género *Yatabella* (Gelidiaceae, Gelidiales) produzem carragenana kappa em vez de agar (Yaphe, 1959), a *Anatheca dentata* (Solieriaceae, Gigartinales) produz carragar em vez de carragenana (Nunn *et al.*, 1981), algumas espécies pertencentes ao género *Phyllophora* (Phyllophoraceae, Gigartinales) produzem carragenanas beta/kappa em vez de carragenanas híbridas kappa/iota (geração gametófito) (Mollion *et al.*, 1986; Craigie, 1990). Ambas as gerações (gametófito e tetrasporófito) do *Chondrus canaliculatus* (Gigartinaceae, Gigartinales) produzem o mesmo tipo de carragenana, enquanto o normal seria os gametófitos produzirem carragenana kappa (ou kappa/iota) e os esporófitos produzirem carragenana do tipo lambda (Ayal e Matsushiro, 1986; Craigie, 1990).

Chiovitti *et al.* (1998b), ao analisarem a composição dos polissacarídeos produzidos pelo género *Austroclonium* (Solieriaceae), principalmente constituídos por carragenana iota e alfa e pelas respectivas variantes metiladas, propuseram o restabelecimento da família Rhabdoniaceae (antes denominada Areschougiaceae), na qual seriam incluídos os géneros *Rhabdonia*, *Areschougia*, *Erythroclonium* e, naturalmente, o género *Austroclonium*.

Miller (2003a), no seu trabalho sobre a estrutura química das galactanas do género *Sarcodia* (Sarcodiaceae), confirma a suspeita de Chopin *et al.* (1999a), de que os relatórios anteriores sobre a presença de carragenana do tipo lambda no género *Sarcodia* estavam errados (Liao *et al.*, 1993). Como Chopin e colaboradores (1999) já tinham referido, as espécies do género *Sarcodia* produzem polímeros do tipo carragar, semelhantes aos produzidos pelo género *Trematocarpus* (Sarcodiaceae) (Miller, 2002, 2003a). Pela análise da sequência do *rbcL* chegou-se à conclusão de que os géneros *Trematocarpus* e *Sarcodia* estavam relacionados e encontravam-se próximos da ordem Plocamiales (Fredericq *et al.*, 1996; Miller, 2002, 2003a). Entretanto, um trabalho de revisão sobre as algas produtoras de carragar foi feito por Takano *et al.* (2003).

Alguns trabalhos publicados recentemente confirmam que os géneros *Gymnogongrus* e *Ahnfeltiopsis*, pertencentes à família Phyllophoraceae, produzem carragenana iota ou carragenana híbrida iota/kappa (Estevez *et al.*, 2001, 2002; Miller, 2003b; Pereira e Mesquita, 2003). Contudo, os nossos resultados, obtidos com recurso à espectroscopia vibracional (FTIR-ATR) e ¹H-RMN (ver Figuras 3.64, 3.81 e Tabela 3.10) (Pereira e Mesquita, 2003; van de Velde *et al.*, *in press*) vieram revelar grandes variações na composição (no rácio kappa/iota) das carragenanas produzidas pelo *Gymnogongrus crenulatus* e pelo *Ahnfeltiopsis devoniensis*. Grande parte dos gametófitos das espécies pertencentes à família Gigartinaceae produz carragenanas híbridas kappa/iota com rácios específicos entre as unidades kappa e as unidades iota, independentes de variações sazonais; no entanto, parece que os talos gametofíticos de algumas espécies da família Phyllophoraceae, como por exemplo o *G. crenulatus* e o *A. devoniensis*, produzem uma grande diversidade de híbridos com diferentes rácios kappa/iota, dependentes de variações sazonais (ver Figuras 3.64 e 3.65 e Tabela 3.11). Esta variabilidade apresentada pelas carragenanas híbridas produzidas pelo *A. devoniensis* despertou o interesse de inúmeros investigadores ligados a instituições de investigação na área alimentar (Wageningen Centre for Food Sciences, Holanda) e empresas do ramo dos colóides alimentares (NIZO food research, Holanda e CP Kelco Aps, Dinamarca), que procuram um modelo para realizar estudos sobre a variabilidade das carragenanas híbridas kappa/iota na natureza. Visto que esta espécie possui uma reduzida cobertura e biomassa (ver alínea 3.2.8 e 3.3.9), não nos foi possível determinar se os diferentes rácios kappa/iota estão somente relacionados com variações sazonais, ou com diferenças entre as carragenanas produzidas pelos gametófitos femininos e pelos talos não-frutificados, ou pelas diferentes partes do talo. Com vista a esclarecer estas dúvidas foi estabelecido um protocolo entre a Universidade de Coimbra e a CP Kelco Aps, com vista ao desenvolvimento de estudos relacionados com as variações da composição das carragenanas produzidas por esta alga.

Tendo em conta a semelhança entre a composição química das carragenanas produzidas pelas espécies do género *Mastocarpus* e do género *Gymnogongrus* (carragenana híbrida kappa/iota), a presença de piruvato em ambos os géneros (ver Tabela 3.11 e 4.1), um ciclo biológico semelhante ao de algumas espécies do género *Ahnfeltiopsis* (Maggs, 1990; Maggs *et al.*, 1992), leva-nos a concordar com a proposta de Guiry e colaboradores (Guiry e Dhonncha, 2004) de transferir as espécies

monogénicas (género *Mastocarpus*), pertencentes à família Petrocelidaceae, para a família Phyllophoraceae.

A análise da estrutura química das carragenanas produzidas pelas algas, e respectivas variedades, cultivadas nas Filipinas (o maior produtor mundial de algas carragenófitas), tem sido o tema de várias publicações recentes (Mendoza *et al.*, 2002; Aguilan *et al.*, 2003; Villanueva e Montano, 2003; Villanueva *et al.*, 2004), incluindo dissertações (Ragasa, 2003). O tema em debate, em grande parte destas publicações, está relacionado com a crescente importância comercial das carragenanas híbridas kappa/iota. Por um lado, van de Velde e colaboradores e Falshaw e colaboradores (Falshaw *et al.*, 2001; van de Velde *et al.*, 2001; van de Velde *et al.*, 2002c; Falshaw *et al.*, 2003; van de Velde *et al.*, *in press*) defendem que a estrutura química e o respectivo comportamento reológico (transições cadeia/hélice) dos copolímeros de carragenana kappa/iota (produzidos pelos gametófitos da família Gigartinaceae) é completamente distinto do comportamento das misturas feitas com carragenanas kappa e iota puras (obtidas a partir das espécies pertencentes à família Solieriaceae). Essa diferença constitui, segundo diversos autores (Bixler *et al.*, 2001; van de Velde *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2003; van de Velde *et al.*, *in press*), uma mais valia comercial das algas pertencentes à família Gigartinaceae, sobretudo devido à sua grande reactividade com o leite, útil no desenvolvimento de uma série de novos produtos alimentares, na área da indústria dos derivados lácteos. Por outro lado, a equipa de Villanueva, Mendoza e Montaña (investigadores de universidades das Filipinas) defendem a ideia de que a mistura de carragenana kappa e carragenana iota, extraídas de espécies da família Solieriaceae (*Kappaphycus* e *Eucheuma*, respectivamente), possui as mesmas características reológicas dos copolímeros de carragenana kappa/iota (Villanueva *et al.*, 2004).

Uma outra ideia, defendida por alguns investigadores, é de que as espécies da família Solieriaceae, cultivadas em águas tropicais da Ásia (Indonésia, Filipinas, etc.), produzem carragenanas quantitativa e qualitativamente independentes de factores geográficos e/ou sazonais (McCandless e Craigie, 1979). No entanto, os nossos resultados contradizem tal ideia (ver Tabela 3.7). Tal como é referido por Alan Critchley (*com. pessoal*), a unidade de extracção de carragenanas da Degussa (Baupre, França) usa, por exemplo, dois tipos diferentes de tratamento/processamento para o *K. alvarezii* vindo das Filipinas e o vindo da Indonésia, pois este último material algal possui uma elevada percentagem da fracção iota (ver Tabela 3.12, *K. alvarezii* da Degussa) e uma grande quantidade de precursores (nu). A variabilidade da composição das carragenanas extraídas da mesma espécie fica bem patente na análise da Tabela 3.7, onde é possível verificar que o rácio kappa/iota, das carragenanas obtidas das espécies do género *kappaphycus* e *Eucheuma*, varia consoante a origem geográfica das algas. A variação do rácio kappa/iota e a maior ou menor quantidade de precursores biológicos presentes nas carragenanas extraídas do *K. alvarezii* não depende só da sua origem geográfica, mas também da fase do crescimento em que se encontram as algas (ver Figura 3.74 e Tabela 3.7).

Relativamente à natureza dos ficocolóides produzidos pela *C. teedei* var. *lusitanicus*, as nossas análises espectroscópicas mostram que as duas fases do ciclo de vida desta carragenófito apresentam uma variação similar à existente noutras espécies do género *Chondracanthus* (ver Chopin *et al.* 1999a): a geração gametófito produz carragenanas da família kappa (carragenana híbrida kappa/iota/um/nu), enquanto que a geração tetrasporófito produz carragenanas da família lambda (carragenana híbrida ksi/theta) (Pereira e Mesquita, 2004). A carragenana extraída alcalinamente a partir dos

gametófitos femininos apresenta um baixo conteúdo em sulfato e uma redução na galactose em benefício da 3,6-anidrogactose. Alguma galactose-6-sulfato 4-ligada, presente nas amostras de carragenana nativa, é convertida em anidro-galactose durante o tratamento alcalino, em consequência da conversão dos precursores biológicos (mu e nu) em carragenana kappa e iota. Dentro do erro experimental da análise em ^1H -RMN, as unidades precursoras são transformadas estequiometricamente nas carragenanas gelificantes (ver Tabela 3.11).

Os talos não-frutificados de *C. teedei* var. *lusitanicus* possuem, aparentemente, um ficocolóide similar ao produzido pelos gametófitos femininos. Com base na análise por FTIR-ATR, FT-Raman, ^1H - e ^{13}C -RMN, podemos constatar que as duas amostras de carragenana são idênticas (ver Tabela 3.11). No entanto, apesar de os dois tipos de talo produzirem carragenanas híbridas kappa/iota/mu/nu, os talos não frutificados possuem quantidades idênticas da fracção kappa e iota, enquanto que nos gametófitos femininos a fracção kappa é ligeiramente dominante (amostra extraída alcalinamente) (ver Tabela 3.11).

Os nossos resultados, relativamente à caracterização das carragenanas extraídas alcalinamente dos talos não-frutificados e dos gametófitos femininos estão, em geral, de acordo com os resultados apresentados por Zinoun (Zinoun, 1993) e Zinoun *et al.* (Zinoun *et al.*, 1993b). No entanto, estes autores referem que as carragenanas híbridas kappa/iota produzidas pelo *C. teedei* contêm, nos estratos nativos, um único precursor biológico, a carragenana nu. A análise dos espectros FTIR-ATR, FT-Raman e ^1H -RMN permitem-nos concluir que a carragenana nativa dos gametófitos de *C. teedei* var. *lusitanicus* possui os dois precursores: mu e nu. Visto que a carragenana mu corresponde a 0.7 - 4.6 %mole (ver Tabela 3.10) e concentrações inferiores a 5 %mole não são detectáveis por ^{13}C -RMN (van de Velde *et al.*, 2002a), é provável que a presença do precursor mu, nas amostras de carragenana analisadas por Zinoun e colaboradores, não tenha sido detectada nos espectros de ^{13}C -RMN. Mas para confirmar tal hipótese é necessário analisar, por espectroscopia vibracional e de ressonância do próton, amostras de *C. teedei* colhidas em Roscoff (França).

Situações ambíguas, como as reportadas por Zinoun e colaboradores (na análise das carragenanas extraídas de *C. teedei*) e por Amimi e colaboradores (Amimi *et al.*, 2001) (na análise de carragenanas dos gametófitos de *G. pistillata*), nas quais é referida a possibilidade da origem biogénica da carragenana kappa ser a mesma da carragenana iota, têm origem nas limitações da metodologia espectroscópica usada: ^{13}C -RMN. Como vimos, a não detecção de unidades de carragenana presentes em quantidades inferiores a 5 %mole é uma das principais limitações da ressonância do carbono 13. Limitação essa que tem induzido em erro diversos investigadores relativamente à biogénese das carragenanas gelificantes. Essa limitação deixará de existir com o recurso à ressonância do próton (na análise de amostras de carragenana) ou à análise directa do pó de alga seca por FTIR-ATR e FT-Raman.

No estudo das carragenanas de *Gigartina pistillata* (Gigartinacea), feita por Amimi *et al.* (2001), é confirmada a análise feita por Peat (1981) e McCandless *et al.* (1983), nos quais é referida a presença de carragenana ksi nos talos tetraspóricos. No entanto, amostras portuguesas analisadas por Anderson e colaboradores (1968a) e por Pereira e Mesquita (2003) possuíam, aparentemente, carragenana lambda. De acordo com os nossos dados espectroscópicos (FT-Raman), podemos concluir que ambos os autores têm razão, ou seja, os tetrasporófitos de *G. pistillata* produzem uma carragenana híbrida, apresentando simultaneamente fracções ksi e lambda (ver Figuras 3.71 e 3.87-B e Tabela 3.6). As análises feitas às amostras portuguesas (Anderson *et al.*, 1968a; Pereira e Mesquita, 2003) foram executadas com recurso a FTIR, técnica

espectroscópica que, como já vimos, tem algumas limitações na identificação de carragenanas híbridas da família lambda (ver alínea 4.1.4 da “Discussão”). Ou seja, da análise de uma amostra de carragenana híbrida lambda/ksi por FTIR resulta um espectro, em que a presença de uma banda larga a $815\text{-}830\text{ cm}^{-1}$, típica da carragenana lambda, mascara a presença da fracção ksi. Só através da análise por FT-Raman (ver Figura 3.71) e de ^1H -RMN (ver Figura 3.87) é possível detectar a presença simultânea das duas fracções (ver Tabelas 3.5, 3.8 e 3.9). A produção de uma carragenana híbrida lambda/ksi pelos tetrasporófitos de *G. pistillata* fica assim confirmada neste trabalho, estando de acordo com as análises feitas por Amimi e colaboradores (2001), com base num espectro de ^{13}C -RMN.

O estudo da variação sazonal e geográfica da *G. pistillata*, feito neste trabalho, veio mostrar que a presença de frondes com características híbridas (ver Figura 3.98), ou seja, com a presença simultânea de estruturas reprodutoras características dos gametófitos femininos (cistocarpos) e de estruturas típicas do tetrasporófitos (soros de tetrasporocistos), é um fenómeno frequente, tanto a nível sazonal (em Buarcos) como geográfico (ver Figura 3.10 e 3.31). O estudo da morfologia, anatomia e ultrastrutura dos talos heterospóricos (ver alínea 3.8.2 e Figuras 3.98 a 3.101) e a análise das carragenanas produzidas por cada uma das diferentes partes da fronde (ver Figura 3.71, 3.72 e 3.87-B), leva-nos a concluir que as frondes heterospóricas de *G. pistillata* possuem, simultaneamente, duas gerações distintas no mesmo talo: uma parte do talo corresponde à geração gametófita feminina (lado esquerdo da Figura 3.98-A), a outra parte corresponde à geração tetrasporófita (lado direito da Figura 3.98-A). A explicação para a existência destes talos heterospóricos passa pelo fenómeno de coalescência de esporos (carpósporos com tetrásporos), durante a fase de germinação, fenómeno bem documentado em várias ordens de algas vermelhas e, em particular, no *Chondrus crispus* (Tvetter e Mathieson, 1976), em *Mazzaella laminarioides* e em *Sarcothalia crispata* (Santelices *et al.*, 2003).

Tabela 4.1 – Ficolóides presentes nas espécies pertencentes às famílias, economicamente importantes, da ordem Gigartinales (as letras gregas designam as carragenanas).

Taxon	Tipo de ficolóide				Ácido pirúvico	Ref ^a
	ND	G	E	G+E		
GIGARTINACEAE						
<i>Gigartina alveata</i>		κ	λ ξ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977) (Falshaw e Furneaux, 1995a)
<i>G. asperifolia</i>	Carrag					(Stoloff, 1959)
<i>G. brahiata</i>		κ	λ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>G. 'Charleston'</i>		κ	λ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>G. chauvini</i>	Carrag					(Selby e Wynne, 1973)
<i>G. clavifera</i>		κ	λ ξ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977) (Falshaw e Furneaux, 1995a)
<i>G. cranwellae</i>		κ	λ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>G. macrocarpa</i>		κ	λ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>G. pectinata</i>		κ/ι	ξ			Zertuche-Gonzalez, 1998 (não publicado)
<i>G. pistillata</i>		κ/ι ou κ/ι/ν κ/ι/μ/ν	ξ ou λ/ξ/π λ/ξ		+	(Peat, 1981; McCandless <i>et al.</i> , 1983; Amimi <i>et al.</i> , 2001) Presente estudo
<i>G. polycarpa</i>		κ/ι/μ/ν	λ/θ/α			(Chopin <i>et al.</i> , 1999a)
<i>G. radula</i>		κ	λ			(Stanley, 1990)
<i>G. skottsbergii</i>		κ/ι/μ/ν	λ			(Ciancia <i>et al.</i> , 1993a; Ciancia <i>et al.</i> , 1995, 1997a; Estevez <i>et al.</i> , 2002)
		59%κ 41%ι				Presente estudo
<i>Chondrus canaliculatus</i>		κ	λ/α/θ			(Craigie, 1990; Chopin <i>et al.</i> , 1999a)
<i>C. crispus</i>		κ/ι/μ κ/ι/μ/ν	λ/θ/α λ			(Bellion <i>et al.</i> , 1983) (Craigie e Rivero-Carro, 1992; Chopin <i>et al.</i> , 1999a) Presente estudo
<i>C. ocellatus</i>		κ/ι	λ			(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>C. verrucosus</i>		κ/ι	λ			(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>Chondracanthus acicularis</i>		κ/ι	ξ ξ/θ		+	(McCandless <i>et al.</i> , 1983) Presente estudo
<i>C. caniculatus</i>		κ/ι	ξ		+	(Correa-Díaz <i>et al.</i> , 1990; Craigie e Rivero-Carro, 1992)
<i>C. chamissoi</i>		κ/ι κ/ι/μ/ν	ξ/θ/α ξ/θ			(Lawson <i>et al.</i> , 1973; Penman e Rees, 1973; Chopin <i>et al.</i> , 1999a) Presente estudo
<i>C. corymbiferus</i>		κ/ι	ξ		+	(McCandless <i>et al.</i> , 1983; Whyte <i>et al.</i> , 1984)
<i>C. exasperatus</i>		κ/ι	ξ		+	(McCandless <i>et al.</i> , 1983; Correa-Díaz <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. harveyanus</i>		κ/ι	ξ			(Correa-Díaz <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. intermedius</i>		κ/ι				(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>C. johnstonii</i>		κ/ι				(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>C. spinosus</i>		κ/ι	ξ			(Correa-Díaz <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. teedei</i>		κ/ι/ν				(Zinoun, 1993; Zinoun <i>et al.</i> , 1993b; Chopin <i>et al.</i> , 1999a)
<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>		κ/ι/μ/ν	ξ/θ			(Pereira e Mesquita, 2004) Presente estudo
<i>C. tenellus</i>	?/π				+	(Hirase e Watanabe, 1972)
<i>C. tepidus</i>		κ/ι	ξ/θ			(Correa-Díaz <i>et al.</i> , 1990)
<i>Sarcothalia atropurpurea</i>		κ/μ	ξ ou λ			(Penman e Rees, 1973; Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>S. circumcincta</i>		κ	λ			(Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>S. crispata</i>		κ/ι/μ/ν	λ/θ/α			(Stortz <i>et al.</i> , 1994; Stortz <i>et al.</i> , 1997b, a; Chopin <i>et al.</i> , 1999a)

<i>S. crispata</i> (cont.)	κ/ι/μ/ν			Presente estudo
<i>S. decipiens</i>	κ/μ	λ		(Penman e Rees, 1973; Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>S. lanceata</i>	κ	λ		(Penman e Rees, 1973)
<i>S. livida</i>	κ/μ	λ		(Penman e Rees, 1973; Parsons <i>et al.</i> , 1977)
<i>S. papillosa</i>	ι/κ			(Chopin <i>et al.</i> , 1999a)
<i>S. scutellata</i>	κ/ι/μ/	λ/θ/α		(Chopin <i>et al.</i> , 1999a)
<i>S. stiriata</i>	κ/ι/μ/ν			(Furneaux e Miller, 1986)
PETROCELIDACEAE				
<i>Mastocarpus jardinii</i>	κ/ι	λ/ξ/ π	+	(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>M. pacificus</i>	κ/ι			(McCandless <i>et al.</i> , 1983)
<i>M. papillatus</i>	κ/ι	λ/ξ/ π	+	(Whyte <i>et al.</i> , 1984; Correa-Diaz <i>et al.</i> , 1990)
<i>M. stellatus</i>	κ/ι/μ/ν	λ/π	+	(Bellion <i>et al.</i> , 1983; Craigie e Rivero-Carro, 1992)
	κ/ι/μ/ν		+	Presente estudo
PHYLLOPHORACEAE				
<i>Ahnfeltiopsis devoniensis</i>	ι/κ	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
	ι/κ/ν			Presente estudo
<i>A. flabelliformis</i>	ι/κ	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>A. gigartinoides</i>	κ/ι/ν	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982; Bellion <i>et al.</i> , 1983; Whyte <i>et al.</i> , 1984)
<i>A. leptophyllus</i>	ι	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>A. linearis</i>	κ/ι	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982; Whyte <i>et al.</i> , 1984)
<i>Gymnogongrus chiton</i>	κ/ι	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>G. crenulatus</i>	ι/κ	λ	+	(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
	κ/ι/μ			Presente estudo
<i>G. crustiforme</i>	ι/κ	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>G. furcellatus</i>	ι/ο	λ		(Lawson <i>et al.</i> , 1973; McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>G. griffithsae</i>	ι/κ	λ		(McCandless <i>et al.</i> , 1982)
<i>G. humilis</i>	70% κ 30% ι			(Furneaux e Miller, 1985)
<i>G. nodiferus</i>	ι			(Furneaux e Miller, 1985)
<i>G. norrisii</i>	ι			(McCandless e Gretz, 1984)
<i>G. patens</i>	Carrag			(Stoloff, 1959)
<i>G. torulosus</i>	κ/ι/μ/ν DL- híbrido			(Estevez <i>et al.</i> , 2001)
CYSTOCLONACEAE				
<i>Calliblepharis celatospora</i>	ι			(Chiovitti <i>et al.</i> , 1998b)
<i>C. ciliata</i>	90% ι/ν (κ)			(Deslandes <i>et al.</i> , 1985)
<i>C. jubata</i>	90% ι/ν (κ) ι/ν	ι/ν		(Deslandes <i>et al.</i> , 1985; Zinoun, 1993; Zinoun e Cosson, 1996)
				Presente estudo
<i>C. planicaulis</i>	ι			(Chiovitti <i>et al.</i> , 1998b)
SOLIERIACEAE				
<i>Betaphycus gelatinum</i>	β/ κ/γ β/κ/μ/γ			(Greer e Yaphe, 1984a)
				Presente estudo
<i>B. philippinensis</i>	β/κ/γ β/κ			(Doty, 1995)
				(Ragasa, 2003)
<i>B. speciosum</i>	β/ κ			(Santos, 1989)
<i>Eucheuma denticulatum</i>	ι/ν/κ ou ι/ν ι/ν/κ		+	(Anderson <i>et al.</i> , 1973; Bellion <i>et al.</i> , 1983; Mollion <i>et al.</i> , 1990; Aguilan <i>et al.</i> , 2003)
				Presente estudo

(continuação)		l/o	(Dawes <i>et al.</i> , 1974; Dawes <i>et al.</i> , 1977)
<i>E. isiforme</i>	$\kappa/l/\mu$		Presente estudo
<i>E. platycladum</i>			(van de Velde <i>et al.</i> , <i>in press</i>)
	$\kappa/l/\mu/v$		Presente estudo
<i>E. spinosum</i>	$l/v/\kappa$		(Anderson <i>et al.</i> , 1973; Lawson <i>et al.</i> , 1973; Bellion <i>et al.</i> , 1982; Fostier <i>et al.</i> , 1992)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>		$\kappa/v/l$	(Bellion <i>et al.</i> , 1983; Aguilan <i>et al.</i> , 2003)
		$\kappa/\mu/l$	
<i>K. cottonii</i>	κ	$\kappa/\mu/l$	(Santos, 1989; Aguilan <i>et al.</i> , 2003)
<i>K. striatum</i>	κ/l		(Santos, 1989; Chopin <i>et al.</i> , 1999a; Villanueva e Montano, 2003)
	$\kappa/l/\mu$		Presente estudo

ND, geração não discriminada; G, gametófitos; E, esporófitos; G+E, ambas as gerações.

4.2 – Biogeografia das carragenófitas

A costa Atlântica (Centro e Norte) de Portugal é uma área extremamente rica em biodiversidade algal, resultante da diversidade de influências climáticas existentes nesta zona da Península Ibérica (Braun-Blanquet *et al.*, 1972; Honrado *et al.*, 2002). Assim, o gradiente da flora algal presente ao longo da costa portuguesa é uma consequência dessa diversidade de influências climáticas. A flora encontrada na zona Centro e Norte da nossa costa é muito semelhante à encontrada na Europa central (Ilhas Britânicas e França), enquanto que na zona Sul é nítida a influência da flora Mediterrânica e do Norte de África (Sousa-Pinto, 1998).

4.2.1 – Flora algal da área geográfica estudada

Como foi referido no capítulo 1 (Introdução), a costa portuguesa constitui o limite Sul da distribuição europeia de algumas espécies de águas frias/temperadas, como é o caso do *Ascophyllum nodosum* e da *Pelvetia caniculata* (algas castanhas), reportadas nas colheitas feitas na Praia do Norte (Viana do Castelo) (ver alínea 3.1.12). Outras espécies de águas frias/temperadas têm, na costa Norte de Portugal, o seu limite mais a Sul, como é o caso da *Laminaria saccharina*, presente em Moledo, e da *Laminaria hyperborea*, presente em várias estações do Norte de Portugal até Valadares (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2003).

O fenómeno sazonal de “upwelling” (Afonso *et al.*, 2000) também favorece o aparecimento de espécies não nativas como o caso do *Sargassum muticum*, que se encontra presente nas seguintes estações costeiras (de Sul para Norte): Odeceixe, Almogrove, Furnas, S. Torpes, Peniche, Polvoeira, Buarcos, Aguda, Lavadores, A-Ver-o-Mar, Aguçadoura e Apúlia (Gaspar, 2002; Coelho, 2003; Sousa, 2003) (consultar www.uc.pt/seaweeds).

Outras macroalgas de águas temperadas têm, também elas, a sua distribuição mais a Sul, na costa Portuguesa. Alguns exemplos são a *Ahnfeltia plicata* e a *Palmaria palmata* (algas vermelhas). Por outro lado, Portugal constitui o limite Norte de espécies de águas quentes, como é o caso das algas castanhas: *Bifurcaria bifurcata* (frequente em S. Martinho do Porto e mais rara em Buarcos, ver alínea 3.1), *Padina pavonia* (reportada no Baleal), *Dyctiota dichotoma* (presente nas diversas estações de colheita, referidas neste estudo, até Afife, no Norte) e o *Dyctiopteris polypodioides* (presente nas estações costeiras de Buarcos, A-Ver-o-Mar e Aguçadoura).

Como foi referido por vários autores (Palminha, 1951; Mesquita Rodrigues, 1963; Ardré, 1970; Sousa-Pinto, 1998) e confirmado neste nosso estudo, existe um incremento do número de espécies de algas da classe Rhodophyceae e uma redução do número de espécies da classe Phaeophyceae, na sua distribuição de Norte para Sul.

A zona Norte da nossa costa é dominada por espécimes de *M. stellatus*, *C. jubata*, *G. pistillata*, *C. acicularis*, *C. teedei* var. *lusitanicus*, *Osmundea pinnatifida*, *Gelidium pusillum* e *Pterosiphonia complanata* (Ardré, 1970; Sousa-Pinto, 1998). O patamar médiolitoral da zona centro (de Aveiro a Peniche) é dominado por espécimes de *M. stellatus*, *C. teedei* var. *lusitanicus*, *C. crispus*, *O. pinnatifida*, *Corallina elongata*, *P. complanata*, *Ulva* sps., *Codium* sps. e *Saccorhiza polychides*. Relativamente às espécies dominantes, destacamos a presença de quatro carragenófitas entre as dez espécies com maior cobertura (ver Figura 3.26). Na zona de Peniche e São Martinho do Porto é de referir a presença de quantidades significativas de *Gelidium corneum* e *Pterocladia capillacea* no patamar sublitoral, colhidas para fins comerciais (extração de Agar) (Santos e Duarte, 1991; Sousa-Pinto, 1998).

4.2.2 – Amostragem das carragenófitas

Para o estudo da estrutura das populações das oito carragenófitas seleccionadas (percentagem de cada geração) foram colhidas, mensalmente (estudo da variação sazonal), de forma aleatória, 100 frondes com mais de 3 cm de comprimento, de cada espécie (Scrosati *et al.*, 1994; Zinoun e Cosson, 1996). Para o estudo da variação geográfica foram colhidas 100 frondes, também aleatoriamente, em cada uma das estações costeiras, de Peniche a Moledo (ver metodologia de amostragem na alínea 2.3). Relativamente ao *C. teedei* var. *lusitanicus* foi adoptada uma metodologia ligeiramente diferente, para que o estudo pudesse ser comparável com outros feitos com a mesma espécie (Braga, 1985, 1990; Pereira, 1996b). Assim, no âmbito do estudo de uma população de *C. teedei* var. *lusitanicus*, feito de Junho de 1993 a Outubro de 1994, em Buarcos (Pereira e Mesquita, 1994; Pereira, 1996b), foi usado o método dos quadrados, tendo sido usado na amostragem de biomassa e da percentagem de cada geração (estrutura da população). A mesma metodologia foi depois usada no presente estudo, na amostragem de uma população da mesma espécie, no mesmo local, de Junho de 2000 a Outubro de 2001 (ver alínea 3.3 e 3.4). Em ambas as situações é óbvia a existência de padrões regulares, nos dois períodos, na maior parte dos parâmetros estudados. A biomassa e o comprimento dos talos mostram um padrão sazonal, com valores elevados no início do Verão e valores reduzidos no final do Verão, Outono e Inverno. Uma excepção a este padrão sazonal foi registada em Agosto de 2000, com um decréscimo acentuado da biomassa, que coincidiu com um período anormal de temperaturas muito elevadas e baixo pH (ver linha a tracejado na Figura 3.3). O baixo valor de pH registado em Agosto de 2000 esteve, aparentemente, relacionado com a decomposição de uma grande quantidade de algas acumuladas no limite das marés (sobretudo *Gracilaria gracilis* e *Saccorhiza polyschides*).

Na população de *C. teedei* var. *lusitanicus* de Buarcos existe uma predominância de talos não frutificados (com uma média de 69.4 %). Relativamente aos talos frutificados, há um nítido predomínio dos talos tetraspóricos (média = 21.0 %), quando comparados com os gametófitos femininos (média = 9.6 %). Este resultado é, em certa medida, surpreendente, se atendermos a que noutras regiões do globo, onde têm sido estudadas populações de *C. teedei*, a situação apresenta-se invertida, isto é, os tetraspóricos são muito raros (0.5 % - 2 %, no Brasil) (Braga, 1985, 1990), surgem somente na época estival (Ilhas Britânicas) (McLachlan, 1968; Dixon e Irvine, 1977)

ou, aparentemente, nem sequer existem (Roscoff, França) (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993a, b).

No nosso estudo, a presença de gametófitos femininos na Primavera/Verão e de tetrasporófitos no Outono/Inverno, está relacionada com a temperatura e com o fotoperíodo (Pereira e Mesquita, 2004). Em contraste com a descrição de Braga (1990), o desenvolvimento de cistocarpos está, provavelmente, condicionado pela existência de temperaturas elevadas e por longos períodos de luminosidade, havendo uma correlação oposta no desenvolvimento dos soros de tetrasporocistos, ou seja, a existência de temperaturas baixas e de curtos períodos de luminosidade (Pereira e Mesquita, 2004).

Relativamente ao *C. teedei* var. *lusitanicus*, verificou-se a existência de uma discrepância entre os resultados do estudo feito em Buarcos (variação sazonal) e o estudo da variação geográfica. No primeiro caso é de notar a dominância de talos não-frutificados, enquanto que no segundo caso, a única estação em que os referidos talos foram dominantes, foi Buarcos. No entanto, mesmo em Buarcos, a percentagem de talos não-frutificados (47.5 %) é significativamente inferior à média determinada no estudo de variação sazonal (69.4 %). A explicação para esta diferença passa pelos distintos métodos usados em cada uma das situações (ver alínea 2.3):

a) Na amostragem pelo método dos quadrados, o conjunto de talos designado por “não-frutificados” inclui gametófitos masculinos, gametófitos femininos e tetrasporófitos, pois as frondes colhidas incluem exemplares com dimensões inferiores a 3 cm, muitas delas ainda sem estruturas reprodutoras diferenciadas.

b) Na colheita aleatória de 100 frondes (com dimensões superiores a 3 cm - comprimento mínimo para o qual todas as frondes apresentam já estruturas reprodutoras diferenciadas) é possível a separação dos talos em três grupos distintos: gametófitos femininos, tetrasporófitos e talos não-frutificados = gametófitos masculinos. De notar que esta metodologia foi aferida por técnicas de análise espectrocópica (Brown *et al.*, *in press*) (ver alínea 2.3.2).

Os padrões sazonais da variação da percentagem de cada geração (talos frutificados), verificados nas outras carragenófitas estudadas, são semelhantes aos de *C. teedei* var. *lusitanicus*. Ou seja, os talos cistocárpicos são geralmente predominantes nas amostras da Primavera/Verão (ver Figuras 3.7 – *C. crispus*, 3.10 – *G. pistillata*) e os talos tetraspóricos estão sobretudo presentes nas amostras do Outono/Inverno. A predominância de gametófitos femininos, no período da Primavera/Verão, nas amostras de *C. jubata* e *M. stellatus*, contrasta com a predominância de talos não frutificados nas amostras colhidas no período de Outono/Inverno. No caso do *C. jubata*, a percentagem de talos tetraspóricos (11.3 %) é bastante inferior há dos talos não frutificados (20.8 %) e há de gametófitos femininos (20.3 %), estando presentes nas amostras do final da Primavera e do Inverno (ver Figura 3.21).

Os dados relativos ao padrão sazonal da variação da percentagem de cada geração, estão em concordância com os apresentados nos estudos feitos por Ardré (1970; Ardré, 1971) e por Mesquita Rodrigues (Rodrigues, 1957). A variação sazonal da percentagem de cada geração no *C. crispus* é concordante com a verificada nos estudos feitos por Kopp e colaboradores (Kopp, 1975; Kopp e Perez, 1979), em populações da costa francesa.

Relativamente ao estudo das variações geográficas, é de notar a existência de padrões, na variação da percentagem de cada geração, concordantes com os verificados no estudo das variações sazonais, ou seja, os gametófitos femininos estão presentes em

estações costeiras de águas mais quentes (situadas mais a Sul) e os talos tetraspóricos estão presentes sobretudo nas estações costeiras de águas mais frias (situadas mais a Norte) (ver Tabela 3.3). Um exemplo deste padrão pode ser constatado pela análise dos resultados referentes à estrutura das populações de *C. crispus*, nas diferentes estações costeiras estudadas (ver Figura 3.28). Assim, os talos cistocárpicos estão presentes (e são predominantes nalguns casos) sobretudo nas estações costeiras situadas mais a Sul (Miramar, Buarcos e S. M. do Porto), enquanto que os talos tetraspóricos estão presentes nas amostras colhidas nas estações mais a Norte (Lavadores, Valadares, A-Ver-o-Mar, Apúlia, Aguçadoura, V. do Castelo, Afife, V. P. de Âncora e Moledo). Uma situação idêntica é verificada no estudo referente à estrutura das populações de *G. pistillata* (ver Figura 3.31) e de *C. teedei* var. *lusitanicus* (ver Figura 3.34), onde se verifica um predomínio de talos não frutificados nas estações de águas frias (de Lavadores até Moledo) e a presença de gametófitos femininos nas estações de águas mais quentes, sobretudo a sul de Buarcos.

4.2.3 – Estudo da cobertura, biomassa e dominância quantitativa das principais espécies algais da baía de Buarcos

Para a determinação da cobertura, biomassa e dominância quantitativa das macroalgas presentes no patamar médiolitoral em Buarcos foram testados dois métodos distintos:

- a) O método da “área mínima”, proposto por Goldsmith e Harrison (1976), adaptado para o estudo de populações algais por Cosson e Thouin (1981) e testado na baía de Buarcos por Pereira *et al.* (2000).
- b) Amostragem em contínuo sobre um transepto (Cosson e Thouin, 1981; Chopin, 1997; Pereira *et al.*, 2001).

Assim, foram ensaiados quadrados de diferentes dimensões (ver Figura 2.3-D), tendo-se chegado à conclusão de que para a amostragem abranger todas as espécies presentes em Buarcos, incluindo as mais raras e, descrever o mais fielmente possível a população algal, era necessário usar o método da “amostragem em contínuo sobre um transepto”. Uma das razões para o método da área mínima não ser aplicável em Buarcos (em estudos fitossociológicos), deve-se ao facto do local de estudo se encontrar num único horizonte (horizonte inferior) do patamar médiolitoral (ver Figura 3.2) e, conseqüentemente, as algas aí presentes não apresentarem uma zonação vertical nítida (Pereira *et al.*, 2001; Gaspar, 2002).

4.2.4 – Distribuição das carragenófitas pelas diferentes estações costeiras

As carragenófitas estudadas são espécies comuns na zona Centro/Norte da Costa Portuguesa. Algumas delas são, inclusivamente, espécies dominantes da flora algal no patamar médiolitoral (ver Figura 3.26 e Tabela 3.1 e 3.2). Relativamente à distribuição pelas estações costeiras, o *C. crispus* e o *M. stellatus* são espécies amplamente distribuídas, estando presentes em 13, num total de 15 estações costeiras analisadas (ver Tabela 3.4). Uma ampla distribuição tem também o *C. teedei* (presente em 12 estações) e a *G. pistillata* (presente em 11 estações).

O *G. crenulatus*, apesar de ter uma cobertura reduzida (ver Figura 3.25), é a única carragenófita estudada presente em todas as estações costeiras analisadas. O *C. acicularis*, apesar de apresentar a segunda maior cobertura do estudo (ver Figura 3.25) e ser considerada uma espécie comum na nossa costa, formando tapetes densos (Ardre, 1970; Sousa-Pinto, 1998), só foi localizado em 6 estações de colheita. Uma possível explicação par este facto poderá estar relacionada com a reduzida cobertura registada no período Primavera/Verão (2.51 %), inferior à sua cobertura de Outono/Inverno (3.45 %). Assim, visto que as amostragens para a localização geográfica das carragenófitas foram feitas no Verão, a “ausência” do *C. acicularis*, nalgumas das estações costeiras, poderá estar relacionada com a sua menor cobertura e biomassa nesta época do ano.

4.3 – Aspectos ecológicos e ecofisiológicos das espécies estudadas

O peso seco e o conteúdo em carragenana do *C. teedei* var. *lusitanicus* em Buarcos, nos tetrasporófitos, gametófitos femininos e talos não-frutificados (ver Figura 3.5), apresentam ligeiras diferenças. Os talos cistocárpicos possuem a maior percentagem média de carragenana (37.9 %), enquanto que os talos não frutificados apresentam a menor percentagem (31.4 %). O máximo conteúdo em carragenana (Figura 3.5 – B) foi encontrado numa amostra tetraspórica (58.0 % do peso seco) colhida em Julho de 2001. O conteúdo global médio foi de 34.9 %. Relativamente às variações geográficas do conteúdo em carragenana, o seu conteúdo máximo foi encontrado numa amostra colhida na praia da Aguda, também pertencente à geração tetrasporófito, com 68.0 % do peso seco (ver Figura – C). Em ambos os estudos (variação sazonal e variação geográfica) a evolução do conteúdo em carragenana está negativamente correlacionado com a variação do peso seco.

Estes valores, embora elevados, estão abaixo dos reportados para amostras de *C. teedei* colhidas no Brasil [76.0 %, (Saito e Oliveira, 1990)] e na França [70.0 %, (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993b)]. Uma possível explicação para estas diferenças, poderá passar pelo facto das nossas amostras serem var. *lusitanicus*, que poderão, eventualmente, apresentar um conteúdo de carragenana inferior ao da espécie. Mas ensaios de extracção feitos com amostras de *C. teedei* vindas de França (Roscoff) e do Baleal (Peniche) com, respectivamente, 40 e 45 % do peso seco, levam-nos a pensar que as diferenças encontradas entre os nossos resultados e os reportados noutros trabalhos poderão estar relacionadas com os diferentes métodos de extracção usados. Assim, as carragenanas referidas nos trabalhos de Zinoun (1993) foram obtidas por processos de extracção mais longos (3.5 a 4 h) e temperaturas mais altas (85 a 90 °C), do que os usados no nosso estudo. Como é relatado noutros trabalhos (Ragasa, 2003), a temperatura e o tempo de extracção influenciam grandemente a rentabilidade dos processos extractivos. Como vimos anteriormente (ver alínea 4.1.3), para potenciar a rentabilidade dos métodos industriais, são usados períodos de extracção longos (30 a 48 h), soluções muito alcalinas e temperaturas de extracção elevadas (≥ 110 °C) (McHugh, 2003). É surpreendente que, entre as carragenófitas portuguesas, o *C. teedei* var. *lusitanicus* é uma das que tem maior teor em carragenana (ver figura 3.50), cobertura (Tabela 3.1 e 3.2, Figura 3.25 e 3.26) e biomassa (Tabela 3.1 e 3.2) e, apesar disso, não é colhida para fins industriais.

O *C. crispus* é a carragenófita dominante na baía de Buarcos, no que respeita à cobertura (3.75 % no Outono/Inverno e 3.5 % na Primavera/Verão) e biomassa (570 g

m⁻² na Primavera/Verão). Relativamente a esta espécie, em Buarcos, os maiores valores de biomassa (ver Tabela 3.2) e conteúdo em carragenana foram registados no Verão (ver Figura 3.8-C). Tal como acontece no *C. teedei* var. *lusitanicus*, as diferentes gerações de *C. crispus* apresentam uma variação sazonal do peso seco e conteúdo em carragenana idêntica. No entanto, os talos tetraspóricos exibem o maior conteúdo em carragenana (34.6 % do peso seco), valor bastante superior à média apresentada por esta espécie (28.7 %). Em termos absolutos, o máximo teor em carragenana foi encontrado numa amostra de talos tetraspóricos (em Buarcos), com 53.2 % do peso seco, em Julho de 2001. O estudo da variação geográfica do conteúdo em carragenana confirma o superior teor apresentado pelos tetrasporófitos (média = 24.5 %) (ver Figura 3.29-B).

O teor médio em carragenana (28.7 % em Buarcos e 20.4 % no estudo da variação geográfica) é inferior ao reportado em trabalhos feitos com algas cultivadas (aquacultura em “open-water” junto à ilha no Príncipe Eduardo, no Canadá) (71.0 %) (Chopin *et al.*, 1999b), mas mais próximos aos reportados em estudos feitos com *C. crispus* colhidos em populações selvagens do Canadá, com 31.4 a 50 % (Chopin, 1986; Chopin *et al.*, 1999b) e de França, com 40.0 a 42.0 % (Kopp, 1975). Tal como aconteceu com exemplares de *C. teedei* vindos de França, ensaios de extracção feitos com amostras de *C. crispus* vindos do Canadá, com 33.8 % do peso seco (ver Tabela 3.7), levam-nos a concluir que, de facto, muitas das diferenças encontradas nos teores em carragenana estão relacionadas com os diferentes métodos de extracção usados.

O *M. stellatus* apresenta um ciclo biológico trigenético heteromórfico, com a geração tetrasporófito incrustante (outrora denominada *Petrocelis cruenta*) (Guiry *et al.*, 1984). Neste trabalho só foram estudados os talos gametófitos (gametófitos femininos e talos não-frutificados). Apesar desta espécie ser somente a quarta carragenófito em termos de cobertura (2.02 % na Primavera/Verão e 0.88 % no Outono/Inverno), O *M. stellatus* apresenta uma elevada biomassa, sobretudo no período da Primavera/Verão (529 g m⁻²). Como foi referido anteriormente, a população de *M. stellatus* em Buarcos é composta por cerca de 50 % de gametófitos femininos e 50 % de talos não frutificados e ambos têm um teor em carragenana similar, com valores máximos em Setembro (com cerca de 40.0 % do peso seco). A presença destas amostras, com elevado conteúdo em ficocolóide (ver Figura 3.15), é responsável pela grande diferença registada entre a média referente a Buarcos e a referente ao estudo da variação sazonal (ver Figura 3.50). Apesar da média registada em Buarcos ser superior à do estudo da variação geográfica, o conteúdo em carragenana (aproximadamente 20.0 %) é relativamente baixo, quando comparado com outras carragenófitas de Buarcos. Estes baixos valores são também verificados no estudo da variação geográfica, no qual o maior teor verificado não ultrapassa os 15.0 % do peso seco (amostra de Moledo). Este baixo conteúdo em carragenana é comum a outras espécies do género *Mastocarpus*, como é o caso do *M. papillatus*, alga que acompanha a *Sarchotalia crispata* nas amostras industriais vindas do Chile, com 5.4 % do peso seco (ver Tabela 3.7). Apesar do baixo conteúdo em carragenana, o *M. stellatus* é colhido para fins industriais juntamente com o *C. crispus* (Santos e Duarte, 1991; Sousa-Pinto, 1998), pois ocupa o mesmo habitat deste, no horizonte inferior do patamar médiolitoral (ver Figura 3.26).

Um dos maiores rendimentos em carragenana deste estudo foi encontrado na *Gigartina pistillata*, com uma média global de 38.7 % (estudo da variação sazonal) e de 38.2 % (estudo da variação geográfica) (Figura 3.50). O seu peso seco tem uma reduzida variação sazonal, ao contrário da variação da produtividade em carragenana,

que apresenta grandes oscilações entre os períodos de Outono/Inverno e de Primavera/Verão (ver Figura 3.11).

O *Chondracanthus acicularis* possui a segunda maior cobertura deste estudo (ver Figuras 3.25, 3.26 e Tabelas 3.1, 3.2); apesar disso, esta alga apresenta uma biomassa relativamente reduzida, sobretudo no período de Primavera/Verão (Tabela 3.2). Esta espécie apresenta, também, o maior teor absoluto em carragenana deste estudo, com 61.1 % do peso seco, numa amostra de talos NF colhidos em Julho de 2001, em Buarcos (Figura 3.12-B). Assim, o *C. acicularis* apresenta, em qualquer dos estudos, sazonal e geográfico, o maior conteúdo médio em carragenana (ver Figura 3.50).

As carragenófitas anteriormente referidas apresentam, todas elas, carragenanas com predominância da fracção kappa (ver Tabela 3.11). Todas as três espécies restantes (*Ahnfeltiopsis devoniensis*, *Gymnogongrus crenulatus* e o *Challiblepharis jubata*) são produtoras de carragenanas com uma grande percentagem da fracção iota, pelo menos nalguns períodos do ano. Algumas destas carragenófitas já foram estudadas noutros países, nomeadamente na América do Norte (Mathieson *et al.*, 1984) e na França (Cosson *et al.*, 1990; Zinoun, 1993; Zinoun e Cosson, 1996). Como já foi referido na “Introdução”, o *A. devoniensis* possui um ciclo biológico trigenético heteromórfico, com tetrasporófitos incrustantes (Maggs *et al.*, 1992). De todas as carragenófitas estudadas, esta espécie foi a que apresentou o menor teor em carragenana (com uma média de 10.4 % em Buarcos e 7.4 % no estudo da variação geográfica), a menor cobertura (0.1 %) e as menores dimensões (em média 4.5 cm).

A variação sazonal do comprimento do *Calliblepharis jubata* é semelhante à descrita por Zinoun (1993). Os primeiros talos observados no ciclo anual de crescimento, foram colhidos em Outubro, tendo estes cerca de 6 cm de comprimento e 1 a 2 mm de largura. Devido às suas reduzidas dimensões, nesta altura do ano, é por vezes difícil de distinguir esta espécie de outras algas carragenófitas, como por exemplo o *C. acicularis*, presente no mesmo habitat. Uma fase de crescimento activo é registado de Janeiro a Junho, no qual se verificam alterações significativas no comprimento, que passa de aproximadamente 10 cm em Janeiro, para cerca de 20 cm em Junho. Durante esta fase de crescimento, o *C. jubata* passa por uma fase cuja morfologia é muito idêntica à do *C. teedei* var. *lusitanicus*. Apesar das semelhanças, as duas espécies distinguem-se facilmente pois o *C. jubata* apresenta uma consistência mais cartilaginosa.

Durante o Verão o crescimento do *C. jubata* tem um rápido declínio, apresentando-se muito despigmentada, em resultado da exposição solar, acabando por desaparecer no mês de Setembro. O teor em carragenana, quase sempre reduzido, comparativamente às outras espécies estudadas, apresenta o seu máximo em Maio (ver Figura 3.22-C). A média global do conteúdo em carragenana é significativamente mais baixo (13.7 %) do que os valores determinados no final da Primavera (28.8 % em Maio) e no princípio do Verão (aproximadamente 20 % do peso seco).

Os baixos valores da média global da produtividade em carragenana, explicam a grande diferença existente entre o conteúdo médio em carragenana do estudo da variação sazonal e o determinado no estudo da variação geográfica (ver Figura 3.50). Isto porque, no segundo caso, as algas ao serem colhidas no Verão, período de maior produtividade, o teor médio em carragenana é, obrigatoriamente, superior à média verificada nos talos colhidos em Buarcos.

As flutuações das características físico-químicas do meio, durante as diferentes estações do ano, têm uma marcada influência no crescimento e composição química dos talos das algas, nomeadamente nas carragenófitas (Mathieson *et al.*, 1984; Cosson *et al.*, 1990; Zinoun e Cosson, 1996; Chopin e Wagey, 1999; Pereira e Mesquita, 2004). Os factores responsáveis pelos padrões sazonais do conteúdo em ficocolóides incluem: o fotoperíodo, a fase do ciclo de vida, o nível de crescimento, a temperatura (do ar e da água do mar), o pH e a salinidade da água e os nutrientes (níveis de fósforo e azoto). Visto que todos eles estão interrelacionados, é difícil separar o efeito de cada um deles (Chopin, 1986; Bolton e Joska, 1993). No entanto, alguns dos efeitos relacionados com os níveis de nutrientes e de temperatura da água do mar foram descritos em diversos trabalhos sobre a ecofisiologia das algas economicamente importantes. Como exemplo podemos referir os diversos estudos efectuados com *C. crispus* (primeira alga a ser usada na extracção industrial de carragenanas), onde é referido, como principal factor na variação sazonal do teor em carragenana, os níveis de nutrientes na água (Kopp, 1975; Kopp e Perez, 1979; Chopin *et al.*, 1990b; Chopin *et al.*, 1995; Chopin *et al.*, 1999b). A correlação negativa entre os níveis de nutrientes e o conteúdo em carragenana foi também referida em estudos com outras algas carragenófitas: *C. jubata* (Zinoun, 1993; Zinoun e Cosson, 1996); *G. crenulatus* (Mathieson *et al.*, 1984; Cosson *et al.*, 1990), *M. stellatus* (Mathieson e Tvetter, 1975, 1976); *C. teedei* e *C. teedei* var. *lusitanicus* (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993a; Pereira e Mesquita, 2004).

Apesar das variações do conteúdo em carragenana estarem relacionadas com interacções complexas de diversos factores, parece que dois deles, a temperatura e o nível de nutrientes na água, jogam um papel chave nas flutuações do teor deste ficocolóide. Os denominados “efeito Neish” (Neish *et al.*, 1977) e “efeito Chopin” (Chopin *et al.*, 1990a; Chopin *et al.*, 1995) relacionados, respectivamente, com o impacto dos níveis de azoto (N) e de fósforo (P), na produção de carragenana, encontram-se bem documentados (ver referências bibliográficas anteriormente citadas). No nosso estudo, as variações sazonais do teor em carragenana apresentam uma correlação negativa com os níveis de nutrientes da água (Pereira e Mesquita, 2004). A baía de Buarcos está sujeita a uma considerável variação sazonal no nível de nutrientes presentes na água. Essa variação está directamente relacionada com a proximidade da foz do rio Mondego e da permanente descarga de água na baía. O rio Mondego descarrega anualmente $8.5 \times 10^3 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$ de água, 120 toneladas de azoto (N) e 15 toneladas de fósforo (P) (Flindt *et al.*, 1997). No entanto, grandes variações nos níveis de azoto inorgânico dissolvido (com elevados valores registados no Inverno e baixos valores no Verão), caracterizam as águas despejadas na baía de Buarcos (Flindt *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2001), sendo responsáveis pelos padrões sazonais do conteúdo em ficocolóides das carragenófitas presentes nesta baía.

Para além das variações no conteúdo em carragenana, as variações de nutrientes e de temperatura da água estão relacionadas com as variações do crescimento dos talos, ou seja, com as variações do comprimento e biomassa das algas. De acordo com os estudos feitos por Zinoun e Cosson (1996), o teor em carragenanas decresce durante o crescimento activo dos talos, que tem início no final do Inverno e continua durante a Primavera. Nesse período, caracterizado pelos elevados níveis de nutrientes na água e temperaturas baixas, há uma acumulação preferencial de amido florídeo, sobretudo no princípio da Primavera. No período seguinte, de Maio a Agosto, o nível de nutrientes decresce e a irradiação solar aumenta e, conseqüentemente, o ritmo de crescimento dos talos diminui. A redução da concentração de nitratos na Primavera/Verão e o aumento dos períodos de exposição solar são, provavelmente, os principais factores responsáveis pelo aumento da despigmentação das algas, sobretudo daquelas situadas no patamar

médiolitoral, como é o caso das carragenófitas por nós estudadas. Os mesmos factores são também, possivelmente, responsáveis pelo redireccionamento do metabolismo celular, passando a haver uma síntese preferencial de produtos parietais, como a carragenana, em detrimento do amido florídeo (Zinoun, 1993; Zinoun e Cosson, 1996; Fournet *et al.*, 1999).

Assim, no estudo das variações sazonais feito em Buarcos, parece haver dois períodos distintos no desenvolvimento das carragenófitas. O primeiro, de Dezembro a Abril, é caracterizado pela existência de temperaturas baixas, progressivamente crescentes (sobretudo na Primavera), intensidade luminosa moderada e uma grande disponibilidade de N. A estes factores ambientais corresponde um crescimento moderado das algas e a síntese preferencial de amido florídeo (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993a). O segundo é caracterizado pela existência de elevadas temperaturas, forte irradiação solar e uma diminuição do azoto (N) disponível, ao qual corresponde um período de rápido crescimento das algas e da síntese preferencial de carragenana. De notar que, no início do Outono (final de Setembro, princípio de Outubro), ocorre um declínio (e até regressão, em muitas das algas) no crescimento das carragenófitas (ver Figuras 3.6, 3.9, 3.13, 3.16 e 3.18). O *C. jubata* tem, no entanto, um comportamento ligeiramente distinto deste pois, tal como acontece com as populações estudadas no Canal da Mancha (Normandia, França), o período de crescimento tem início em Dezembro, aumenta significativamente de Maio a Julho e ocorre um declínio acentuado de Julho até Agosto (Zinoun e Cosson, 1996). De referir que, entre o final do mês de Agosto e o final do mês de Setembro, a população de *C. jubata* praticamente desaparece.

De referir ainda que, dado o elevado coeficiente de correlação existente entre o comprimento dos talos das carragenófitas e a respectiva biomassa (ver alínea 3.2.3.a), os dados referentes à variação sazonal e variação geográfica do comprimento constituem um bom indicador das respectivas variações de biomassa.

A correlação inversa entre a produtividade em carragenana e a concentração de N na água foi demonstrada em diversos ensaios de cultura de algas carragenófitas, entre os quais destacamos as experiências feitas com o *C. teedei* (Zinoun, 1993; Zinoun *et al.*, 1993a), *C. crispus* (Neish e Fox, 1971; Shacklock *et al.*, 1973; Shacklock *et al.*, 1974; Chopin, 1986; Craigie e Shacklock, 1989; Cosson *et al.*, 1990), *C. jubata* (Zinoun, 1993; Zinoun e Cosson, 1996); *Hypnea musciformis* (Guist *et al.*, 1982). Os ensaios de cultura laboratorial de *M. stellatus* e *G. pistillata*, realizados no presente estudo (ver alínea 3.4), permitem-nos concluir que também nestas espécies existe uma correlação negativa entre o conteúdo em carragenana nos talos e a quantidade de nutrientes presente no meio de cultura. A produtividade em carragenana nos talos cultivados em meio enriquecido com PES, cada cinco dias, é significativamente inferior à produtividade dos talos selvagens e dos talos cultivados num meio pobre em nutrientes (meio de cultura enriquecido cada quinze dias) (ver Figuras 3.53 e 3.54).

Segundo Zinoun (1993), o conteúdo em amido florídeo varia, sazonalmente, na razão inversa à do conteúdo em carragenana. Assim, os elevados conteúdos de amido florídeo registados na Primavera sugerem que os talos com crescimento activo sintetizam predominantemente este polímero de reserva citoplasmático. Durante o período de Verão, as quantidades de amido florídeo decrescem e os de carragenana aumentam. Assim, tal como Zinoun sugere (ver (Zinoun, 1993; Fournet *et al.*, 1999)), o amido florídeo é provavelmente usado na síntese de carragenana, durante a formação das paredes celulares. Pela análise (por $^1\text{H-RMN}$) dos ficocolóides produzidas pelas carragenófitas portuguesas, é possível confirmar que o conteúdo em amido florídeo varia sazonalmente, estando presente em quantidades significativas (7.4 a 25 % mole)

nas amostras de algas colhidas no Inverno e no princípio da Primavera (ver Anexo I): *C. jubata* NF (amostra 231 de Fevereiro de 2002); *C. teedei* var. *lusitanicus* GF (amostra 211 de Dezembro de 2001); *G. crenulatus* T (amostra 215 de Dezembro de 2001 e amostra 243 de Março de 2002); *M. stellatus* GF (amostra 234 de Março de 2002).

Tanto no estudo da variação sazonal (alínea 3.2) como geográfica (alínea 3.3), as carragenófitas com elevado teor em carragenana (*C. acicularis*, *C. crispus*, *C. teedei* var. *lusitanicus* e *G. pistillata*), apresentam uma elevada correlação negativa entre a variação do peso seco e a produtividade em ficocolóide; ou seja, quanto menor é o peso seco da alga (em percentagem do peso fresco da alga), maior é o conteúdo em carragenana. Esta correlação negativa entre o conteúdo em carragenana e o respectivo peso seco, está relacionado com as propriedades higroscópicas da carragenana que, ao absorver água permite, à alga, resistir à dessecação durante a baixa-mar, nos períodos de maior intensidade luminosa e temperaturas mais elevadas, típicos do Verão (Perez *et al.*, 1992), fazendo diminuir o seu peso seco.

4.4. – Potencialidades industriais das carragenófitas portuguesas

Em jeito de conclusão, a combinação de uma grande cobertura e elevada biomassa disponível (ver Figura 3.25, 3.26 e Tabelas 3.1 e 3.2), um elevado teor em carragenana (ver Figura 3.50) e a presença quase generalizada nas estações costeiras desde Buarcos até Moledo, em Portugal e na Galiza, até A Coruña (Barbara e Cremades, 1996), permite-nos considerar que o *C. teedei* var. *lusitanicus* constitui uma potencial fonte industrial de copolímeros de carragenana kappa/iota e ksi/theta (ver Tabela 3.10 e 3.11), em adição às carragenófitas tradicionalmente colhidas no Noroeste da Península Ibérica (costa Norte de Portugal e Galiza) (Santos e Duarte, 1991; Sousa-Pinto, 1998; Pereira e Mesquita, 2003). Outras das algas estudadas, como por exemplo a *G. pistillata* e o *C. acicularis*, devido ao seu elevado conteúdo em carragenana, poderão também elas constituir uma fonte de copolímeros, tanto de carragenana kappa/iota, como de lambda/theta/ksi (ver Tabela 3.10 e 3.11) e, por isso, serem colhidas em conjunto com o *C. teedei*, tal como é feito em Marrocos (Thierry Givernaud, *com. pessoal*).

No entanto, na actividade de apanha de algas marinhas, em populações selvagens existentes no patamar médiolitoral, existe o risco de sobre-colheita e subsequente perda económica, para além da redução ou até destruição da biodiversidade algal. Numa altura em que a indústria de ficocolóides tem por base espécies de águas tropicais (ou subtropicais) (cerca de 88.3 %), em particular de espécies cultivadas na Indonésia e nas Filipinas (ver Tabela 1.7), em detrimento das espécies selvagens de águas frias, a procura de carragenófitas produtoras de copolímeros de carragenana kappa/iota veio renovar o interesse dos colectores e das grandes companhias de aditivos alimentares nas espécies de água fria, sobretudo das carragenófitas produtoras de copolímeros de carragenana kappa/iota (Bixler *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003) (Alan Critchley, *com. pessoal*). Nesta perspectiva há, actualmente, um renovado interesse na cultura (em tanques e em “open-water”) de carragenófitas de água fria, como é o caso de experiências feitas com *C. crispus* (Chopin e Yarish, 1998; Chopin *et al.*, 1999b) e com outras algas potencialmente interessantes a nível económico (ver projecto “Seapura” em www.seapura.com).

Um dos factores responsáveis pelo grande sucesso das carragenófitas do género *Kappaphycus* (produtoras de carragenana kappa), *Euclidean* (produtoras de carragenana iota) e *Betaphycus* (produtoras de carragenana beta), está relacionado com a mono-

especificidade das carragenanas produzidas, característica que permite uma substancial poupança nos custos de extracção industrial, pois não implica o uso de técnicas de fraccionamento por KCl. Entretanto, a necessidade do uso da técnica de fraccionamento nas extracções feitas com material algal da família Gigartinaceae (com misturas de carragenana da família kappa e da família lambda) (Chopin *et al.*, 1999b), poderá, num futuro breve, deixar de acontecer. Com o incremento do número de trabalhos publicados sobre experiências laboratoriais e industriais de pequena escala, na cultura de carragenófitas, é agora possível desenvolver projectos de co-cultura integrada de algas, bivalves, mariscos e peixes. A cultura integrada de algas constitui uma alternativa ao declínio da colheita tradicional de carragenófitas (Chopin, 1998; Chopin e Yarish, 1998; Sousa-Pinto, 1998), na qual é possível obter fontes de carragenana pura da família kappa e/ou lambda, de elevada qualidade, em vez de misturas de carragenana kappa/lambda, que resultavam do material algal colhido em populações naturais (Chopin *et al.*, 1999b). Passa também a ser possível obter, simultaneamente, um método natural da descontaminação das águas residuais (biorremediação) resultantes dos processos de aquacultura piscícola intensiva (ver www.seapura.com).

No que respeita à possibilidade de cultura ou co-cultura de algumas das espécies por nós estudadas, diversos estudos mostram que o metabolismo de *C. teedei*, segundo Zinoun (1993) e Zinoun e colaboradores (1993a), pode ser manipulado de forma a produzir elevadas quantidades de carragenana. O mesmo tipo de manipulação poderá ser feito com a *G. pistillata* e *M. stellatus*, espécies usadas nas nossas experiências de cultura laboratorial (ver alínea 3.4). Por outro lado, devido à reduzida cobertura e biomassa das espécies pertencentes à família Phyllophoraceae na costa portuguesa (*G. crenulatus* e *A. devoniensis*), estas carragenófitas deverão, no futuro, ser objecto de ensaios de cultura no sentido de avaliar as suas potencialidades como fonte de carragenanas híbridas de grande inter-variabilidade (ver rácios kappa/iota na Figura 3.64 e composição na Tabela 3.11) e de integração em sistemas de co-cultura.

Relativamente ao estudo comparativo, por nós realizado, da produtividade em carragenanas, das espécies portuguesas (ver Figura 3.50) e das espécies usadas a nível industrial (ver Tabela 3.7), é interessante verificar que as carragenófitas colhidas na costa Centro/Norte de Portugal têm valores médios de carragenana idênticos e, até, superiores aos das algas actualmente utilizadas pela Degussa (empresa que nos forneceu grande parte das amostras industriais).

Em jeito de resumo, podemos referir que o *Betaphycus gelatinum*, o *Kappaphycus alvarezii* (oriundo das Filipinas) e o *K. striantum* (vindo de Madagáscar) são as carragenófitas com maior produtividade em carragenana, com valores que ultrapassam os 70 % do peso seco. Todas as outras espécies apresentam valores na ordem dos 30 %, como é o caso da *Eucheuma denticulatum* (de Madagáscar, Filipinas e Tanzânia - produtora de carragenana predominantemente iota), do *K. alvarezii* (da Indonésia - produtora de carragenana predominantemente kappa) e do *C. crispus* (do Canadá). As carragenófitas restantes apresentam conteúdos relativamente baixos, com valores a variar entre os 5.4 % da *Sarcothalia crispata* GF e do *M. papillatus* GF (do Chile) e os 24.6 % do *Chondracanthus chamissoi* (também do Chile). De referir que todos os possíveis “concorrentes” das algas carragenófitas portuguesas, apresentam um teor inferior em carragenana: 33.8 % do *C. crispus* do Canadá, contra os 38 % de valor médio nas amostras colhidas em Buarcos no Verão; 24.6 % do *C. chamissoi* NF e 14.6 % da *S. crispata* NF do Chile, contra os 45.6 % de média nos talos de *C. teedei* var. *lusitanicus* colhidos em Buarcos no Verão.

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

5 – Conclusões e Perspectivas Futuras

O litoral português evidencia-se pela riqueza da sua flora algal, resultado da diversidade de influências climáticas, em consequência da sua situação geográfica peculiar. A faixa costeira estudada, situada entre a baía de Buarcos e o seu limite Norte, junto à fronteira com Espanha, inclui inúmeras estações de colheita nas quais, a presença frequente de oito das principais espécies carragenófitas portuguesas, permitiu o estudo das variações sazonais e geográficas dos principais parâmetros ecológicos deste conjunto, economicamente importante, de algas.

Em trabalhos futuros seria interessante estender este tipo de estudo a outras zonas da costa portuguesa, nomeadamente de Peniche até ao Algarve, de forma a localizar outras populações de carragenófitas como, por exemplo, populações de *Caulacanthus ustulatus* (Caulacanthaceae) que, segundo Sousa-Pinto (1998), surgem sob a forma de densos “tapetes”, em conjunto com outras algas vermelhas, nas estações costeiras a Sul de Lisboa. Para além do *C. ustulatus*, outras carragenófitas (da ordem Gigartinales) presentes na costa portuguesa, como a *Dumontia contorta* (Dumontaceae), *Gymnogongrus griffithisae*, *Phyllophora* sps., *Stenogramme* sps. (Phylloporaceae), *Calliblepharis ciliata* (Solieriaceae) e *Grateloupia filicina* e *G. doryphora* (Halymeniaceae), *Calliblepharis* poderão ser alvo da caracterização bioquímica dos seus ficocolóides, com recurso às técnicas espectroscópicas desenvolvidas neste trabalho.

A baía de Buarcos constitui um excelente local de estudo pois, para além da presença de uma grande diversidade de macroalgas, a sua flora algal inclui todas as principais carragenófitas portuguesas, estando presentes em grande quantidade e durante todo o ciclo anual. As variações sazonais, dependentes da alternância das estações do ano, encontram-se aqui bem marcadas, com a presença de Invernos frios e Verões quentes, associados a longos períodos de insolação. Para além dessa alternância das condições climáticas, as águas presentes na baía de Buarcos apresentam uma grande variação nos níveis de nutrientes dissolvidos, em resultado da proximidade da foz do rio Mondego, o que possibilita estudos de correlação entre os níveis de azoto e fósforo e o teor em carragenana das espécies carragenófitas.

Podemos também concluir que os factores responsáveis pela variação sazonal do conteúdo em ficocolóide incluem o fotoperíodo, a temperatura do ar e da água, o pH e a salinidade, o nível dos nutrientes, a fase do ciclo de vida da alga e o nível de crescimento. No entanto, apesar das variações do conteúdo em carragenana estarem relacionadas com interações complexas destes diversos factores, parece que dois deles, a temperatura e o nível de nutrientes na água, jogam um papel chave nas flutuações do teor em carragenana. Os ensaios de cultura laboratorial, realizados com duas carragenófitas (*M. stellatus* e *G. pistillata*), permitiram-nos confirmar a existência de uma correlação negativa entre a variação do conteúdo em carragenana nas algas e a quantidade de nutrientes presentes no meio de cultura.

Para além das variações no conteúdo em carragenana, as variações de nutrientes e de temperatura da água estão relacionadas com as variações do crescimento dos talos, ou seja com as variações do comprimento e biomassa das algas. O teor em carragenana decresce durante o crescimento activo dos talos, que tem início no final do Inverno e continua durante a Primavera. Nesse período, caracterizado pelos elevados níveis de nutrientes na água e temperaturas baixas, há uma acumulação preferencial de amido florídeo, sobretudo no princípio da Primavera. No período seguinte, de Maio a Agosto,

o nível de nutrientes decresce e a irradiação solar aumenta e, conseqüentemente, o ritmo de crescimento dos talos diminui. Uma menor quantidade de azoto (N) e uma maior exposição solar na Primavera/Verão são, possivelmente, os responsáveis pelo redirecionamento do metabolismo celular, no qual passa a haver a síntese preferencial de carragenana, em detrimento do amido florídeo. Podemos assim concluir que o conteúdo em amido florídeo varia sazonalmente na razão inversa à do conteúdo em carragenana.

A elevada correlação negativa existente entre a variação do peso seco, de algumas das espécies estudadas (*C. acicularis*, *C. crispus*, *C. teeddei* var. *lusitanicus* e *G. pistillata*), e o respectivo conteúdo em carragenana, sugere que este ficocolóide (devido às suas propriedades higroscópicas), ao promover a absorção de água, permite às algas resistirem à dessecação durante os períodos de maior intensidade luminosa e de elevadas temperaturas, típicos do Verão, e a redução do seu peso seco.

Relativamente às diferentes metodologias de amostragem usadas, chegou-se à conclusão que o método da “área mínima” não era aplicável em todos os estudos de fitossociologia, sobretudo naqueles feitos em estações costeiras sem uma zonação vertical nítida, como é o caso do local de estudo em Buarcos. Nesta situação, a “amostragem em contínuo sobre um transepto” revelou ser o método mais adequado. O método da “área mínima” adequa-se ao estudo de populações algais com uma distribuição uniforme e/ou em estudos fitossociológicos feitos em áreas costeiras com uma zonação vertical bem marcada. No estudo da variação sazonal e geográfica do conteúdo em carragenanas, do comprimento do talo e da estrutura da população algal, a colheita aleatória de 100 frondes de cada espécie, revelou ser o método mais adequado.

O *C. crispus* e o *M. stellatus* são as carragenófitas com a maior cobertura e biomassa, tendo simultaneamente uma distribuição geográfica ampla, estando presentes em 13 das 15 estações de colheita analisadas. O *G. crenulatus* é a única carragenófitas estudada, presente em todas as estações de colheita; no entanto, a sua cobertura, biomassa e teor em carragenana são dos mais reduzidos. De todas as carragenófitas estudadas, o *A. devoniensis* é a espécie que apresenta o menor conteúdo em carragenana, a menor cobertura, a menor biomassa e as menores dimensões.

O *C. teeddei* var. *lusitanicus*, apesar de não ser uma alga colhida para fins industriais, é surpreendente que, entre todas as carragenófitas estudadas, é uma das que tem maior teor em carragenana, maior cobertura e biomassa, estando presente em 12 estações costeiras. A combinação destas características e a presença quase generalizada nas estações costeiras, desde Buarcos até Moledo, em Portugal, e na Galiza, até A Coruña, permite-nos considerar que o *C. teeddei* var. *lusitanicus* é uma potencial fonte industrial de copolímeros de carragenana kappa/iota, em adição às carragenófitas tradicionalmente colhidas no Norte de Portugal (*C. crispus* e *M. stellatus*). Outras algas estudadas, como por exemplo a *G. pistillata* e o *C. acicularis*, devido ao seu elevado conteúdo em carragenana, poderão também constituir uma fonte de copolímeros, tanto de carragenana kappa/iota, como de lambda/tetha/ksi e, por isso, serem colhidas em conjunto com a *C. teeddei*, tal como é feito em Marrocos.

Apesar da cobertura e biomassa de algumas das carragenófitas estudadas permitir a sua apanha para fins industriais, a colheita de algas a partir de populações naturais tem as suas limitações, havendo sempre o risco de sobre-colheita e subsequente

destruição das populações de carragenófitas e consequentes perdas económicas e de biodiversidade. A cultura integrada de algas constitui uma alternativa ao risco da colheita tradicional de carragenófitas, passando também a ser possível obter, simultaneamente, um método natural da descontaminação das águas residuais (biorremediação) resultantes dos processos de aquacultura piscícola intensiva. No que respeita à possibilidade de cultura ou co-cultura de algumas das espécies por nós estudadas, diversos estudos mostraram que o metabolismo de *C. teedei* pode ser manipulado de forma a produzir elevadas quantidades de carragenana; o mesmo tipo de manipulação poderá ser feito com a *G. pistillata* e *M. stellatus*. Por outro lado, devido à reduzida cobertura e biomassa das espécies pertencentes à família Phyllophoraceae na costa portuguesa (*G. crenulatus* e *A. devoniensis*), estas carragenófitas deverão, no futuro, ser objecto de ensaios de cultura no sentido de avaliar as suas potencialidades como fonte de carragenanas híbridas de grande inter-variabilidade e da sua possível integração em sistemas de co-cultura.

A presença de frondes híbridas de *G. pistillata*, ou seja, talos apresentando, simultaneamente, estruturas reprodutoras características dos gametófitos femininos (cistocarpos) e estruturas típicas dos tetrasporófitos (soros de tetrasporocistos) é um fenómeno frequente, tanto a nível sazonal como geográfico. Pelo estudo da morfologia, anatomia e ultraestrutura dos talos heterospóricos e pela análise das carragenanas produzidas por cada uma das diferentes partes (os ramos portadores de cistocarpos produzem carragenana híbrida kappa/iota, enquanto que os ramos portadores de soros de tetrasporocistos produzem carragenana híbrida ksi/lambda), fomos levados a concluir que as frondes heterospóricas de *G. pistillata* possuem, simultaneamente, duas gerações distintas no mesmo talo: uma parte do talo corresponde à geração gametófito feminina; a outra parte corresponde à geração tetrasporófito.

Relativamente aos estudos citoquímicos, as principais conclusões a reter são as seguintes: os dois principais componentes da parede celular e da matriz intercelular das carragenófitas analisadas são a celulose e os polímeros de galactana sulfatada (carragenanas); ao nível dos talos, os polissacarídeos sulfatados apresentam uma maior concentração na zona cortical e uma menor concentração na zona medular, havendo um gradiente oposto na concentração da celulose; a nível celular e tal como acontece com as carragenófitas de elevado valor comercial (*K. alvarezzi*), a celulose constitui o principal componente polissacarídico fibrilar das paredes celulares das carragenófitas estudadas (*G. pistillata*, *G. crenulatus* e *A. devoniensis*), variando o seu nível de organização (cristalinidade) com o tamanho das células; os resultados da análise por EDX evidenciam a existência de um gradiente crescente de concentração de carragenana, da parte mais interna da parede celular para a zona da matriz intercelular.

A localização citológica *in situ* dos polímeros da matriz extracelular constitui um complemento valioso à caracterização química e física dos ficocolóides extraídos. Futuramente é nossa intenção desenvolver estudos com vista ao esclarecimento dos mecanismos de biossíntese celular, transporte e deposição das carragenanas, com recurso a técnicas de imunocitoquímica. A distribuição das carragenanas nas diferentes partes do talo poderá ser averiguada com recurso a microscópios associados a espectrómetros de FTIR e FT-Raman.

O método de extracção laboratorial alcalino, usado neste trabalho, possibilita a extracção de carragenanas com baixo índice de degradação e elevado peso molecular,

vindo confirmar a ideia de que a extracção de ficocolóides, mesmo em condições “suaves”, possibilita a ciclização das suas unidades constituintes. Comparativamente às carragenanas obtidas a nível industrial, as carragenanas extraídas das algas portuguesas apresentam elevados pesos moleculares e possuem as características físico-químicas necessárias para serem classificadas pela FDA e SCF como carragenanas comerciais, utilizáveis a nível alimentar (ver alínea 1.4.1.a).

A combinação das duas técnicas espectroscópicas desenvolvidas neste trabalho (FTIR-ATR e FT-Raman) permite, de uma forma rápida e fiável, a identificação dos diferentes tipos de ficocolóides (ácido algínico, agar e carragenanas), tanto a partir de amostras extraídas como a partir da análise directa de alga seca moída. Assim, e visto que as algas são sujeitas a um processo de manipulação e tratamento mínimos, a composição determinada representa, o mais fielmente possível, a composição natural dos ficocolóides. Visto que os aparelhos de FTIR e FT-Raman fazem parte do equipamento standard de muitos laboratórios, a aplicação desta técnica poderá substituir, vantajosamente, o teste do resorcinol na determinação da percentagem de cada geração (estrutura das populações algais), em estudos de ecologia e ecofisiologia das macroalgas possibilitando, por exemplo, o desenvolvimento e a implementação de estratégias de colheita sustentável de espécies com interesse económico. Para além disso vai permitir, aos laboratórios da indústria de extracção de ficocolóides, a avaliação e o controle da qualidade dos diferentes lotes de material algal, de uma forma simples e eficaz. Para além destas utilizações, a análise rápida e eficaz dos polissacarídeos produzidos pelas algas, vai permitir o incremento do número de espécies analisadas e o incremento de estudos em quimiotaxonomia.

A espectroscopia de ^1H -RMN é útil na identificação e quantificação das diferentes fracções constituintes das amostras de carragenana (extraídas laboratorialmente ou industrialmente). A espectroscopia de ressonância do protão pode ser usada em análises qualitativas rápidas de pequenas amostras (5 mg) e na análise quantitativa dos diferentes constituintes de amostras híbridas ou de misturas de carragenana.

Situações ambíguas, como as reportadas por diversos autores (ver alínea 4.1.6.b), os quais referem a possibilidade da origem biogénica da carragenana kappa ser a mesma da carragenana iota, têm origem nas limitações da espectroscopia de ^{13}C -RMN, incapaz de detectar unidades de carragenana presentes em quantidades inferiores a 5 %mole. Essa limitação tem induzido em erro diversos investigadores, relativamente à biogénese das carragenanas gelificantes (ver Zinoune, 1993 e Amimi *et al.* 2003). Com base nos nossos resultados, baseados em FTIR-ATR, FT-Raman e ^1H -RMN, muito mais sensíveis do que a ^{13}C -RMN, podemos concluir que a carragenana kappa e iota têm precursores biológicos distintos, respectivamente mu e nu.

A espectroscopia de laser Raman é, normalmente, considerada uma técnica espectroscópica complementar à de IR, apresentando espectros similares aos de infravermelho. No entanto, certas bandas de fraca intensidade em IR surgem bem definidas em Raman, permitindo a correcta interpretação dos espectros vibracionais. Em estudos comparativos dos diferentes tipos de carragenana, os espectros de FTIR-ATR fornecem informação suficiente. No entanto, os espectros de FT-Raman possibilitam uma correcta identificação dos diversos ficocolóides, em particular as variantes da família lambda (carragenana ksi e theta) e os precursores biológicos (mu e nu) das carragenanas gelificantes (kappa e iota, respectivamente).

Relativamente à natureza dos ficocolóides produzidos pelas carragenófitas estudadas, as nossas análises espectroscópicas permitiram determinar a composição das carragenanas híbridas nas espécies: *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*, *Chondracanthus acicularis*, *Chondracanthus chamissoi*, *Chondrus crispus* e *Sarcothalia crispata* (Gigartinaceae), *Mastocarpus stellatus* e *Mastocarpus papillatus* (Petrocelidaceae), *Gymnogongrus crenulatus* e *Ahnfeltiopsis devoniensis* (Phyllophoraceae), *Calliblepharis jubata* (Cystocloniaceae), *Hypnea musciformis* (Hypneaceae), *Kappaphycus alvarezzi*, *Kappaphycus striatum*, *Eucheuma denticulatum*, *Eucheuma platycladum*, *Eucheuma isiforme* e *Betaphycus gelatinum* (Solieriaceae).

Tendo em conta a semelhança entre a composição química das carragenanas produzidas pelas espécies do género *Mastocarpus* e do género *Gymnogongrus* (carragenana híbrida kappa/iota), a presença de piruvato em ambos os géneros e um ciclo biológico semelhante ao de algumas espécies do género *Ahnfeltiopsis*, fomos levados a concordar com a proposta de Guiry e Dhonncha (2004) de transferir as espécies do género *Mastocarpus*, pertencentes à família Petrocelidaceae, para a família Phyllophoraceae.

Pela análise da carragenana extraída da *E. platycladum* por espectroscopia de ^1H -RMN, confirma-se a presença de uma carragenana híbrida do tipo kappa/iota, mas com um nítido predomínio da fracção kappa (cerca de 80 %mole). Assim, esta carragenófito deveria ser transferida para o género *Kappaphycus*, passando a designar-se *K. platycladum*.

Grande parte dos gametófitos das espécies pertencentes à família Gigartinaceae produz carragenanas híbridas kappa/iota com rácios específicos entre as unidades kappa e as unidades iota, independentes de variações sazonais; no entanto, parece que os talos gametofíticos de algumas espécies da família Phyllophoraceae, como por exemplo o *G. crenulatus* e o *A. devoniensis*, produzem uma grande diversidade de híbridos com diferentes rácios kappa/iota, dependentes de variações sazonais. Esta variabilidade apresentada pelas carragenanas híbridas produzidas pelo *A. devoniensis* despertou o interesse de inúmeros investigadores ligados a instituições de investigação na área alimentar (Wageningen Centre for Food Sciences, Holanda) e empresas do ramo dos colóides alimentares (NIZO food research, Holanda e CP Kelco Aps, Dinamarca), que procuram um modelo para realizar estudos sobre a variabilidade das carragenanas híbridas kappa/iota na natureza. Assim, foi estabelecido um protocolo entre a Universidade de Coimbra e a CP Kelco Aps, com vista ao desenvolvimento de estudos relacionados com as variações da composição das carragenanas produzidas por esta alga.

Os nossos resultados (análises espectroscópicas) contradizem a ideia, defendida por alguns investigadores, de que as espécies da família Solieriaceae, cultivadas em águas tropicais da Ásia (Indonésia, Filipinas, etc.), produzem carragenanas quantitativa e qualitativamente independentes de factores geográficos e/ou sazonais. No entanto, a unidade de extracção de carragenanas da Degussa (Bauppte, França) usa, por exemplo, dois tipos diferentes de tratamento/processamento para o *K. alvarezii* vindo das Filipinas e o vindo da Indonésia, pois este último material algal possui uma elevada percentagem da fracção iota e uma grande quantidade de precursores (nu). A variabilidade da composição das carragenanas, extraídas da mesma espécie, ficou bem patente nos resultados das nossas análises, sendo possível constatar que o rácio kappa/iota das carragenanas obtidas das espécies do género *kappaphycus* e *Eucheuma* varia consoante a origem geográfica das algas.

Relativamente à evolução futura da procura mundial de carragenanas, em mercados desenvolvidos como os dos EUA, Europa e Japão, todas as principais aplicações destes ficocolóides já foram exaustivamente exploradas. No entanto, uma possível expansão do seu consumo poderá advir da substituição da gelatina de origem animal por carragenana, devido quer à “doença das vacas loucas” quer ao desenvolvimento de produtos destinados a um nicho de mercado alimentar constituído pelos consumidores vegetarianos. Outra possibilidade na expansão do consumo de carragenanas reside na crescente utilização de copolímeros de carragenana kappa/iota na indústria dos derivados lácteos (ver Anexo II).

No que respeita à evolução das aplicações biotecnológicas das carragenanas, este tipo de colóide poderá, num futuro próximo, complementar ou substituir, o ácido algínico, como material de suporte em técnicas de imobilização. Pelo facto das carragenanas serem consideradas um aditivo alimentar, é possível que este ficocolóide possa ser usado em processos de imobilização de células, enzimas ou biocompostos, na indústria alimentar e farmacêutica (ver van de Velde, 2002). Alguns ensaios preliminares de imobilização executados com copolímeros extraídos do *C. teedei* var. *lusitanicus* (resultados não apresentados), permitem-nos considerar a possibilidade do seu uso em métodos de criopreservação de microrganismos (microalgas, etc.) e em processos de biorremediação marinha, como suporte de enzimas adequadas à decomposição dos contaminantes existentes em zonas costeiras.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABBOTT, I.A. e HOLLENBERG, G.J. (1976) Marine algae of California. Stanford University Press, Stanford, Calif., xii, 827 pp.

ADAMS, N.M.; FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. e WHITEHOUSE, L.A. (1988) Xylan from *Leptosarca-Simplex* and Carrageenans from *Iridea*, *Cenacrum* and *Nemastoma* Species from the Sub-Antarctic Islands of New-Zealand. *Bot Mar* 31(1): 9-14.

AFONSO, E.; ARNAL, I.; ARRONTES, J. e AL, E. (2000). Biology. In: O. COMISSION (Ed.) *Quality status report 2000: Region IV - Bay of Biscay and Iberian Coast* 4. OSPAR Comission, London: 82-113.

AGUILAN, J.T.; BROOM, J.E.; HEMMINGSON, J.A.; DAYRIT, F.M.; MONTANO, M.N.E.; DANCEL, M.C.A.; NINONUEVO, M.R. e FURNEAUX, R.H. (2003) Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. *Bot Mar* 46(2): 179-192.

AMIMI, A.; MOURADI, A.; GIVERNAUD, T.; CHIADMI, N. e LAHAYE, M. (2001) Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohyd Res* 333(4): 271-279.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; LAWSON, C.J.; PENMAN, A. e REES, D.A. (1968a) Carrageenans. V. Masked repeating structures of lambda- and mu-carrageenans. *Carbohyd Res* 7(4): 468.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; PENMAN, A.; REES, D.A.; MUELLER, G.P.; J., S.D. e STANLEY, N.F. (1968b) Carrageenans. 4. Variations in Structure and Gel Properties of Kappa-Carrageenan and Characterisation of Sulphate Esters by Infrared Spectroscopy. *J Chem Soc C* (5): 602-606.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S. e REES, D.A. (1965) Evidence for a common structural pattern in polysaccharide sulphates of Rhodophyceae. *Nature* 205(4976): 1060-1068.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S. e REES, D.A. (1973) Carrageenans. 7. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* - Covalent structure of iota-carrageenan. *J Chem Soc Perk T* 1(19): 2173-2176.

ARDRÉ, F. (1970) Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. I. La flore. *Port. Act. Biol.* 10(1-4): 1-423.

ARDRÉ, F. (1971) Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. II. Ecologie et chorologie. *Bull. Cent. Etude. Rech. Sci. Biarritz* 8(3): 359-574.

ARDRÉ, F. (1977) Morphological cycle of *Gymnogongrus crenulatus* (Turn) J Ag (Gigartinales-Rhodophyta) in culture. *Cr Acad Sci D Nat* 285(5): 513-514.

- ASK, E.I. e AZANZA, R.V. (2002) Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206(3-4): 257-277.
- AYAL, H.A. e MATSUHIRO, B. (1986) Carrageenans from Tetrasporic and Cystocarpic *Chondrus canaliculatus*. *Phytochemistry* 25(8): 1895-1897.
- BARBARA, I. e CREMADES, J. (1996) Seaweeds of the Ria de A Coruna (NW Iberian Peninsula, Spain). *Bot Mar* 39(4): 371-388.
- BARBEYRON, T.; FLAMENT, D.; MICHEL, G.; POTIN, P. e KLOAREG, B. (2001) The sulphated-galactan hydrolases, agarases and carrageenases: structural biology and molecular evolution. *Cah Biol Mar* 42(1-2): 169-183.
- BARBEYRON, T.; HENRISSAT, B. e KLOAREG, B. (1994) The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to beta-1,3-1,4-glucanases. *Gene* 139(1): 105-109.
- BARBEYRON, T.; HENRISSAT, B.; KLOAREG, B.; POTIN, P.; RICHARD, C. e YVIN, J.C. (1998). Glycosylhydrolase genes and their use for producing enzymes for the biodegradation of carrageenans. *World patent applications*. **WO9815617**.
- BARBEYRON, T.; MICHEL, G.; POTIN, P.; HENRISSAT, B. e KLOAREG, B. (2000) Iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *Journal of Biological Chemistry* 275(45): 35499-35505.
- BARBEYRON, T.; POTIN, P.; RICHARD, C.; COLLIN, O. e KLOAREG, B. (1995) Arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiol-Uk* 141: 2897-2904.
- BELDMAN, G. e AL., E. (1996). New enzymes active towards pectic structures. In: J. VISSER e A.G.J. VORAGEN (Eds.) *Pectines and pectinase. Progress in biotechnology; 14*. Elsevier, Amsterdam: 231-245.
- BELLION, C. (1982). Utilisation d'enzymes et de la spectroscopie de RMN du carbone 13 pour la caractérisation des carraghénanes. Tese de Doutorado, Université Paul Sabatier, 196 pp.
- BELLION, C.; BRIGAND, G.; PROMÉ, J.C.; WELTI, D. e BOCIEK, S. (1983) Identification and characterization of biological precursors of carrageenans by C-13 NMR-spectroscopy. *Carbohydr Res* 119(AUG): 31-48.
- BELLION, C.; HAMER, G.K. e YAPHE, W. (1981) Analysis of kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenase, iota-carrageenase and ¹³C NMR. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 379-384.
- BELLION, C.; HAMER, G.K. e YAPHE, W. (1982) The degradation of *Euचेuma spinosum* and *Euचेuma cottonii* carrageenans by iota-carrageenases and kappa-carrageenases from Marine-Bacteria. *Can J Microbiol* 28(7): 874-880.
- BERCHEZ, F.A.S.; PEREIRA, R.T.L. e KAMIYA, N.F. (1993) Culture of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) on artificial substrates attached to linear ropes. *Hydrobiologia* 261: 415-420.

- BHATTACHARJEE, S.S.; YAPHE, W. e HAMER, G.K. (1978) C-13-Nmr Spectroscopic Analysis of Agar, K-Carrageenan and L-Carrageenan. *Carbohydr Res* 60(1): C1-C3.
- BIRD, C.J.; SOSA, P.A. e MACKAY, R.M. (1994) Molecular evidence confirms the relationship of *Petrocelis* in the Western Atlantic to *Mastocarpus stellatus* (Rhodophyta, Petrocelidaceae). *Phycologia* 33(2): 134-137.
- BIXLER, H.J. (1996) Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia* 327: 35-57.
- BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. e FALSHAW, R. (2001) Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloid* 15(4-6): 619-630.
- BLACK, W.A.P.; BLAKEMORE, W.R.; COLQUHOUN, J.A. e DEWAR, E.T. (1965) Evaluation of Some Red Marine Algae as a Source of Carrageenan and of Its Kappa- and Lambda-Components. *J Sci Food Agr* 16(10): 573-585.
- BOLTON, J.J. e JOSKA, M.A.P. (1993) Population Studies on a South-African Carrageenophyte – *Iridaea capensis* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 261: 191-195.
- BOUARAB, K.; POTIN, P.; CORREA, J. e KLOAREG, B. (1999) Sulfated Oligosaccharides Mediate the Interaction between a Marine Red Alga and Its Green Algal Pathogenic Endophyte. *Plant Cell* 11(9): 1635-1650.
- BOYEN, C.; KLOAREG, B. e VREELAND, V. (1988) Comparison of protoplast wall regeneration and native wall deposition in zygotes of *Fucus distichus* by cell-Wall labeling with monoclonal-antibodies. *Plant Physiol Bioch* 26(5): 653-659.
- BRAGA, M.R.A. (1985). Taxonomia e biologia da *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral do estado de São Paulo. MSc. Thesis, Univ. São Paulo, 161 pp.
- BRAGA, M.R.A. (1990) Reproductive characteristics of *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales), a turf-forming species - Field and laboratory culture studies. *Bot Mar* 33(5): 401-409.
- BRAUN-BLANQUET, J.; BRAUN-BLANQUET, G.; ROZEIRA, A. e PINTO DA SILVA, A.R. (1972) Résultats de trois excursions géobotaniques à travers le Portugal septentrional et moyen. IV. Esquisse sur la végétation dunale. *Agron. Lusit.* 33: 217-234.
- BRONNER, R. (1975) Simultaneous Demonstration of Lipids and Starch in Plant-Tissues. *Stain Technol* 50(1): 1-4.
- BROWN, M.T.; NEISH, A.C. e HARWOOD, D. (in press) Comparison of three techniques for identifying isomorphic phases of *Chondrus crispus* (Gigartinaceae). *J Appl Phycol*.

BUSCHMANN, A.H.; CORREA, J.A.; WESTERMEIER, R.; PAREDES, M.A.; AEDO, D.; POTIN, P.; AROCA, G.; BELTRAN, J. e HERNANDEZ-GONZALEZ, M.C. (2001) Cultivation of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta): Recent advances and challenges for the future. *J Appl Phycol* 13(3): 255-266.

CABIOCH, J.; FLOC'H, J.Y.; TOQUIN, A.; BOUDOURESQUE, C.F.; MEINESZ, A. e VERLAQUE, M. (1995). Guías de las algas de los mares de Europa: Atlántico e Mediterráneo. In, Barcelona, Ediciones Omega, SA: 82-145.

CÁCERES, P.J.; FAÚNDEZ, C.A.; MATSUHIRO, B. e VASQUEZ, J.A. (1997) Carrageenophyte identification by second-derivative Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Phycol* 8(6): 523-527.

CARPITA, N.C. e GIBEAUT, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.

CHAMBERLAIN, A.H.L. e EVANS, L.V. (1973) Aspects of Spore Production in Red Alga *Ceramium*. *Protoplasma* 76(2): 139-159.

CHANZY, H.; HENRISSAT, B. e VUONG, R. (1984) Colloidal Gold Labeling of 1,4-Beta-D-Glucan Cellobiohydrolase Adsorbed on Cellulose Substrates. *Febs Lett* 172(2): 193-197.

CHAPLIN, M. (2003) Water structure and behavior - carrageenan.
<http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html>

CHEN, L.C.M. e MCLACHLAN, J. (1971) The life history of *Chondrus crispus* in culture. *Can. J. Bot.* 50: 1055-1060.

CHEN, L.C.M. e TAYLOR, A.R.A. (1976) Scanning electron microscopy of early sporeling ontogeny of *Chondrus crispus*. *Can J Bot* 54(8): 672-678.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; LIAO, M.L.; FALSHAW, R. e FURNEAUX, R.H. (1998a) A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme*. *Carbohyd Res* 310(1-2): 77-83.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; KRAFT, G.T. e LIAO, M.L. (1997) Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. *Carbohyd Res* 299(4): 229-243.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; KRAFT, G.T.; CRAIK, D.J. e LIAO, M.L. (1999) Pyruvated carrageenans from *Solieria robusta* and its adelphoparasite *Tikvahielli candida*. *Hydrobiologia* 399: 401-409.

CHIOVITTI, A.; KRAFT, G.T.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A. e LIAO, M.L. (1998b) Carrageenans from Australian representatives of the family Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), with description of *Calliblepharis celatospora* sp. nov., and transfer of *Austroclonium* to the family Areschougiaceae. *J Phycol* 34(3): 515-535.

- CHIOVITTI, A.; KRAFT, G.T.; SAUNDERS, G.W.; LIAO, M.L. e BACIC, A. (1995a) A Revision of the Systematics of the Nizymeniaceae (Gigartinales, Rhodophyta) Based on Polysaccharides, Anatomy, and Nucleotide-Sequences. *J Phycol* 31(1): 153-166.
- CHIOVITTI, A.; LIAO, M.L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J. e BACIC, A. (1995b) Cell wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Iota/kappa/beta-carrageenans from *Melanema dumosum*. *Phycologia* 34(6): 522-527.
- CHIOVITTI, A.; LIAO, M.L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J. e BACIC, A. (1996) Cell wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Highly methylated carrageenans from the genus *Rhabdonia*. *Bot Mar* 39(1): 47-59.
- CHOPIN, T. (1986) The red alga *Chondrus crispus* Stackhouse (Irish moss) and carrageenans - a review. *Can. Tech. Fish. Aquat. Sci.* 1514: 69pp.
- CHOPIN, T. (1997) Marine biodiversity monitoring. Protocol for monitoring of seaweeds. Environment Canada, Ecological Monitoring and Assessment Network, Ottawa, 40 pp.
- CHOPIN, T. (1998). The seaweed resources of Eastern Canadá. In: A.T. CRITCHLEY e M. OHNO (Eds.) *Seaweed Resources of the World*. Japan Int. Cooperation Agency, Yokosuka: 273-302.
- CHOPIN, T. e FLOCH, J.Y. (1992) Ecophysiological and biochemical-study of 2 of the most contrasting forms of *Chondrus crispus* (Rhodophyta, Gigartinales). *Mar Ecol-Prog Ser* 81(2): 185-195.
- CHOPIN, T.; GALLANT, T. e DAVISON, I. (1995) Phosphorus and Nitrogen Nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta) - Effects on Total Phosphorus and Nitrogen-Content, Carrageenan Production, and Photosynthetic Pigments and Metabolism. *J Phycol* 31(2): 283-293.
- CHOPIN, T.; HANISAK, M.D. e CRAIGIE, J.S. (1994) Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a Review of the Phycocolloids Produced by the Cryptonemiales. *Bot Mar* 37(5): 433-444.
- CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; KOEHN, F.E.; MOLLION, J. e MOREAU, S. (1990a) Studies on carrageenans and effects of seawater phosphorus concentration on carrageenan content and growth of *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft and Wynne (Rhodophyceae Solieriaceae). *J Appl Phycol* 2: 3-16.
- CHOPIN, T.; HOURMANT, A.; FLOCH, J.Y. e PENOT, M. (1990b) Seasonal-Variations of Growth in the Red Alga *Chondrus crispus* on the Atlantic French Coasts .2. Relations with Phosphorus Concentration in Seawater and Internal Phosphorylated Fractions. *Can J Bot* 68(3): 512-517.
- CHOPIN, T.; KERIN, B.F. e MAZEROLLE, R. (1999a) Phycocolloid chemistry as taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research* 47: 167-188.
- CHOPIN, T.; LEHMAL, H. e HALCROW, K. (1997) Polyphosphates in the red macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *New Phytol* 135(4): 587-594.

CHOPIN, T.; SHARP, G.; BELYEA, E.; SEMPLE, R. e JONES, D. (1999b) Open-water aquaculture of the red alga *Chondrus crispus* in Prince Edward Island, Canada. *Hydrobiologia* 399: 417-425.

CHOPIN, T. e WAGEY, B.T. (1999) Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. *Bot Mar* 42(1): 23-31.

CHOPIN, T. e WHALEN, E. (1993) A New and Rapid Method for Carrageenan Identification by Ft Ir Diffuse-Reflectance Spectroscopy Directly on Dried, Ground Algal Material. *Carbohyd Res* 246: 51-59.

CHOPIN, T. e YARISH, C. (1998) Nutrients or not nutrients? That is the question in seaweed aquaculture...and the answer depends on the ty and purpose of the aquaculture system. *World Aquaculture* 29: 31-33 e 60-61.

CHRISTIAEN, D. e BODARD, M. (1983) Infrared-Spectroscopy of Agar Films from *Gracilaria verrucosa* (Huds) Papenfuss. *Bot Mar* 26(9): 425-427.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C. e CEREZO, A.S. (1995) The reproducibility of the alkaline treatment and potassium-chloride fractionation of a partially cyclized Mu/Nu-carrageenan. *An Asoc Quim Argent* 83(1-2): 103-108.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C. e CEREZO, A.S. (1997a) A L-galactose-containing carrageenan from cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry* 45(5): 1009-1013.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; FINCH, P. e CEREZO, A.S. (1993a) Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR-spectroscopy. *Carbohyd Res* 238: 241-248.

CIANCIA, M.; MILAS, M. e RINAUDO, M. (1997b) On the specific role of coions and counterions on kappa-carrageenan conformation. *Int J Biol Macromol* 20(1): 35-41.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C. e CEREZO, A.S. (1993b) Alkali-Modification of Carrageenans - Mechanism and Kinetics in the Kappa-Iota-Series, Mu-Nu-Series and Lambda-Series. *Carbohyd Polym* 20(2): 95-98.

COELHO, H. (2003). Usos e potencialidades das macroalgas da costa Alentejana. Relatório de estágio científico, Universidade de Coimbra, 64 pp.

COLE, K.M. e SHEATH, R.G. (1990) Biology of the red algae. Cambridge University Press, Cambridge England ; New York, ix, 517 pp.

COLSON, P.; JENNINGS, H.J. e SMITH, J.C.P. (1974) 96: 8081-8087.

CONDE, F. e GALLARDO, T. (2002) Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XIV. *Calliblepharis* (Cystocloniaceae, Gigartinales, Rhodophyceae). *Botanica Complutensis* 26: 137-146.

- CORREA DA SERRA, J. (1796) Sobre a fructificação das algas submersas. *Philosophical Trans. of the Royal Part II*: 494-505.
- CORREA-DIAZ, F.; AGUILAR-ROSAS, R. e AGUILAR-ROSAS, L.E. (1990) Infrared-Analysis of 11 Carrageenophytes from Baja-California, Mexico. *Hydrobiologia* 204: 609-614.
- COSSON, J.; DESLANDES, E. e BRAUD, J.P. (1990) Preliminary Approach to the Characterization and Seasonal-Variation of Carrageenans from 4 Rhodophyceae on the Normandy Coast (France). *Hydrobiologia* 204: 539-544.
- COSSON, J. e THOUIN, F. (1981) Étude du Macrophytobenthos en Baie de Siene: Problèmes Méthodologiques. *Vie et Milieu* 31(2): 113-118.
- CRAIGIE, J.S. (1990). Cell walls. In: K.M. COLE e R.G. SHEATH (Eds.) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge: 221-257.
- CRAIGIE, J.S.; CORREA, J.A. e GORDON, M.E. (1992) Cuticles from *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J Phycol* 28(6): 777-786.
- CRAIGIE, J.S. e RIVERO-CARRO (1992). Agarocolloids from carrageenophytes. In: *14th International Seaweed Symposium*, Brest, St Malo, Book of Abstracts, 71 pp.
- CRAIGIE, J.S. e SHACKLOC, P.F. (1989). Culture of Irish moss. In: A.D. BOGHEN (Ed.) *Cold water aquaculture in Atlantic Canada*. Univ. of Moncton, New Brunswick: 243-270.
- CRAIGIE, J.S. e WONG, K. (1977) Carrageenan Biosynthesis. *J Phycol* 13: 15-15.
- CRITCHLEY, A.T. e OHNO, M. (1998a). Cultivation and farming of marine plants. Amsterdam, Expert Centre for Taxonomic Identification (ETI). World Biodiversity Database CD-ROM Series.
- CRITCHLEY, A.T. e OHNO, M., Eds. (1998b). *Seaweed resources of the world*. Yokosuka, Japan International Cooperation Agency, 431 pp.
- CUTLER, D.J. (1990) The Development of Fourier-Transform Raman-Spectroscopy. *Spectrochim Acta A* 46(2): 123-129.
- DAWES, C.J. (1998) Marine botany. John Wiley, New York, xiv, 480 pp.
- DAWES, C.J.; MATHIESO.AC e CHENEY, D.P. (1974) Ecological studies of Floridian-*Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales) .1. Seasonal growth and reproduction. *B Mar Sci* 24(2): 235-273.
- DAWES, C.J.; STANLEY, N.F. e MOON, R.E. (1977) Physiological and biochemical studies on iota-carrageenanproducing Red Alga *Eucheuma uncinatum* Setchell and Gardner from Gulf of California. *Bot Mar* 20(7): 437-442.

DE RUITER, G.A.; RICHARD, O.; RUDOLPH, B.; GENICOT, S.; KLOAREG, B.; PENNINKHOF, B. e POTIN, P. (2000). Sulfohydrolases, corresponding amino acid and nucleotide sequences, sulfohydrolases preparations, processes, and products theorof. *World patent application*. **WO0068395**.

DE RUITER, G.A. e RUDOLPH, B. (1997) Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Tech* 8(12): 389-395.

DEA, I.C.M. e MORRISON (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. In: R.S. TIPSON e D. HORTON (Eds.) *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press, New York: 241-312.

DELIVOPOULOS, S.G. (2003) Ultrastructure of post-fertilization development in the red alga *Scinaia articulata* (Galaxauraceae, Nemaliales, Rhodophyta). *Biol Cell* 95(1): 27-38.

DELIVOPOULOS, S.G. e DIANNELIDIS, B.E. (1990a) Ultrastructure of carposporogenesis in the Red Alga *Caulacanthus ustulatus* (Gigartinales, Caulacanthaceae). *Ann Bot-London* 66(4): 387-395.

DELIVOPOULOS, S.G. e DIANNELIDIS, B.E. (1990b) Ultrastructure of Carposporophyte Development in the Red Alga *Caulacanthus ustulatus* (Gigartinales, Caulacanthaceae). *Mar Biol* 106(1): 145-152.

DELIVOPOULOS, S.G. e TSEKOS, I. (1985a) Nuclear-Envelope Activity in Gonimoblast Generative Cells of the Red Alga *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Gigartinales). *Flora* 177(5-6): 309-315.

DELIVOPOULOS, S.G. e TSEKOS, I. (1985b) Ultrastructure of the Fusion Cell in *Gracilaria verrucosa* (Huds) Papenfuss (Rhodophyta, Gigartinales). *New Phytol* 101(4): 605-612.

DELIVOPOULOS, S.G. e TSEKOS, I. (1986) Ultrastructure of Carposporogenesis in the Red Alga *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Gracilariaceae). *Bot Mar* 29(1): 27-35.

DESLANDES, E.; FLOCH, J.Y.; BODEAUBELLION, C.; BRAULT, D. e BRAUD, J.P. (1985) Evidence for iota-carrageenans in *Solieria chordalis* (Solieriaceae) and *Calliblepharis jubata*, *Calliblepharis ciliata*, *Cystoclonium purpureum* (Rhodophyllidaceae). *Bot Mar* 28(7): 317-318.

DESLANDES, E.; POTIN, P.; ZINOUN, M. e FLOCH, J.Y. (1990) Contribution on the Content and Nature of the Phycocolloid from *Kallymenia-Reniformis* (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204: 603-608.

DIAS, N.G. (2003a). Base de dados de macroalgas da costa portuguesa e interface na Internet para consultat e gestão. Seminário interdisciplinar, Universidade de Coimbra, 59 pp.

DIAS, N.G. (2003b). Ensaio de cultura *in vitro* de macroalgas. Relatório de estágio científico, Universidade de Coimbra, 44 pp.

DININNO, V.; MCCANDLESS, E.L. e BELL, R.A. (1979) Pyruvic acid derivative of carrageenan from marine red alga (*Petrocelis* species). *Carbohydr Res* 71: C1-4.

- DIXON, P.S. e IRVINE, L.M. (1977) Seaweeds of the British Isles - Rhodophyta: Introduction, Nemaliaes, Gigartinales. British Museum, London, 264 pp.
- DIXON, P.S. e IRVINE, L.M. (1995) Seaweeds of the British Isles : Volume I - Rodophyta, Part 1 - Introduction, Nemaliales, Gigartinales. The Natural History Museum, London, 167-251 pp.
- DOTY, M.S. (1988). Prodrômus ad systematica Eucheumatoideorum: A tribe of commercial seaweeds related to *Eucheuma* (Solieriaceae, Gigartinales). In: I.A. ABBOTT (Ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean Species* II. University of California, La Jolla: 159-207.
- DOTY, M.S. (1995). *Betaphycus philippinensis* gen. et sp. nov. and related species (Solieriaceae, Gigartinales). In: I.A. ABBOTT (Ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds with reference to some Pacific Species*. University of California, La Jolla: 237-245.
- DOTY, M.S. e SANTOS, G.A. (1978) Carrageenans from Tetrasporic and Cystocarpic *Eucheuma* Species. *Aquat Bot* 4(2): 143-149.
- DYCK, L.J. e DE WREEDE, R.E. (1995) Patterns os seasonal demographic change in the alternate isomorphic stages of *Mazzaella splendens* (Gigartinales, Rhodophyta). *Phycologia* 34: 390-395.
- DYCK, L.J.; DE WREEDE, R.E. e GARBARY, D.J. (1985) Life history phases in *Iridaea cordata* (Gigartinales): Relative abundance and distribution from British Columbia to California. *Jap. J. Phycology* 33: 225-232.
- DYRBY, M.; PETERSEN, R.V.; LARSEN, B.; RUDOLPH, B.; NORGAARD, L. e ENGELSEN, S.B. (2004) Towards on-line monitoring of the composition of commercial carrageenan powders. *Carbohydr Polym* 57: 337-348.
- EDWARDS, M.S. (1999) Using in situ substratum sterilization and fluorescence microscopy in studies of microscopic stages of marine macroalgae. *Hydrobiologia* 399: 253-259.
- ESTEVEZ, J.M. e CACERES, E.J. (2003) Fine structural study of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phylloporaceae, Rhodophyta). *Biocell* 27(2): 181-187.
- ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M. e CEREZO, A.S. (2000) The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydr Res* 325(4): 287-299.
- ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M. e CEREZO, A.S. (2001) DL-galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. *Carbohydr Res* 331(1): 27-41.
- ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M. e CEREZO, A.S. (2002) Carrageenans biosynthesized by carposporophytes of red seaweeds *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales) and *Gymnogongrus torulosus* (Phylloporaceae). *J Phycol* 38(2): 344-350.

- EVANS, L.V.; CALLOW, M.E.; PERCIVAL, E. e FAREED, V. (1974) Studies on synthesis and composition of extracellular mucilage in unicellular Red Alga *Rhodella*. *J Cell Sci* 16(1): 1-21.
- FALSHAW, R.; BIXLER, H.J. e JOHNDRO, K. (2001) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. *Food Hydrocolloid* 15(4-6): 441-452.
- FALSHAW, R.; BIXLER, H.J. e JOHNDRO, K. (2003) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. *Food Hydrocolloid* 17(2): 129-139.
- FALSHAW, R. e FURNEAUX, R.H. (1995a) Carrageenans from the tetrasporic stages of *Gigartina glavifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohyd Res* 276(1): 155-165.
- FALSHAW, R. e FURNEAUX, R.H. (1995b) The Structural-Analysis of Disaccharides from Red Algal Galactans by Methylation and Reductive Partial-Hydrolysis. *Carbohyd Res* 269(1): 183-189.
- FAO (1992) Compendium of food additive specifications. 9251032149, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 141 pp.
- FAO/WHO (2001) Evaluation of certain food additives and contaminants (WHO - Technical Report Series - N° 909). Joint FAO/WHO expert committee on food additives, Rome, 186 pp.
- FELDMAN, S.C.; REYNALDI, S.; STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. e DAMONTE, E.B. (1999) Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. *Phytomedicine* 6(5): 335-340.
- FERNANDEZ, C. e MENENDEZ, M.P. (1991) Ecology of *Chondrus crispus* Stackhouse on the Northern Coast of Spain. 2. Reproduction. *Bot Mar* 34(4): 303-310.
- FLETCHER, R.L. e CALLOW, M.E. (1992) The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Brit Phycol J* 27(3): 303-329.
- FLINDT, M.R.; KAMP-NIELSEN, L.; MARQUES, J.C.; PARDAL, M.A.; BOCCI, M.; BENDORICCHIO, G.; SALOMONSEN, J.; NIELSEN, S.N. e JORGENSEN, S.E. (1997) Description of the three shallow estuaries: Mondego River (Portugal), Roskilde Fjord (Denmark) and the Lagoon of Venice (Italy). *Ecol Model* 102(1): 17-31.
- FLORES, M.L.; STORTZ, C.A.; RODRIGUEZ, M.C. e CEREZO, A.S. (1997) Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. *Bot Mar* 40(5): 411-419.
- FOSCARINI, R. e PRAKASH, J. (1990) Handbook on *Eucheuma* seaweed cultivation in Fiji. Ministry of Primary Industries Fisheries Division and South Pacific Aquaculture Development Project Food and Agriculture Organization of the United Nations, Suva, Fiji, ii, 42 pp.
- FOSTIER, A.H.; KORNPROBST, J.M. e COMBAUT, G. (1992) Chemical-Composition and Rheological Properties of Carrageenans from 2 Senegalese Soleriacae *Anatheca montagnei* Schmitz and *Meristotheca senegalensis* Feldmann. *Bot Mar* 35(4): 351-355.

- FOURNET, I.; DESLANDES, E. e FLOC'H, J.Y. (1993) iridescence: A useful criterion to sort gametophytes from sporophytes in the red alga *Chondrus crispus*. *J Appl Phycol* 5: 535-537.
- FOURNET, I.; ZINOUN, M.; DESLANDES, E.; DIOURIS, M. e FLOC'H, J.Y. (1999) Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions. *Eur J Phycol* 34(2): 125-130.
- FREDERICQ, S.; ANDERSON, R.J. e LOPEZ-BAUTISTA, J.M. (2002) Systematics of some Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) from the Cape region, South Africa, based on molecular evidence. *Proceedings of International Seaweed Symposium*: 263-274.
- FREDERICQ, S.; BRODIE, J. e HOMMERSAND, M.H. (1992) Developmental morphology of *Chondrus crispus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 31(6): 542-563.
- FREDERICQ, S.; FRESHWATER, D.W. e HOMMERSAND, M. (1999) Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Soliriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398/399: 25-38.
- FREDERICQ, S. e HOMMERSAND, M.H. (1989) Proposal of the Gracilariales Ord-Nov (Rhodophyta) Based on an Analysis of the Reproductive Development of *Gracilaria verrucosa*. *J Phycol* 25(2): 213-227.
- FREDERICQ, S.; HOMMERSAND, M.H. e FRESHWATER, D.W. (1996) The molecular systematics of some agar- and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. *Hydrobiologia* 327: 125-135.
- FREDERICQ, S. e RAMIREZ, M.L. (1996) Systematic studies of the antarctic species of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327: 137-143.
- FREI, E. e PRESTON, R.D. (1964) Non-Cellulosic Structural Polysaccharides in Algal Cell Walls. 2. Association of Xylan + Mannan in *Porphyra umbilicalis*. *P Roy Soc Lond B Bio* 160(980): 314-317.
- FRESHWATER, D.W.; FREDERICQ, S.; BUTLER, B.S. e HOMMERSAND, M. (1994) A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7281-7285.
- FURNEAUX, R.H. e MILLER, I.J. (1985) Water-Soluble Polysaccharides from the New-Zealand Red Algae in the Family Phylloporaceae. *Bot Mar* 28(10): 419-425.
- FURNEAUX, R.H. e MILLER, I.J. (1986) Isolation and C-13-Nmr Spectral Study of the Water-Soluble Polysaccharides from 4 South-African Red Algae. *Bot Mar* 29(1): 3-10.
- FURTADO, M.R. (1999) Alta lucratividade atrai investidores em hidrocolóides. *Química e Derivados* 377: 20-29.

GALLARDO, T. e CASADO, M. (2000) Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XIII. *Mastocarpus stellatus* (Stackh.) Guiry (Petrocelidaceae, Rhodophyceae). *Botanica Complutensis* 24: 107-111.

GASPAR, R. (2002). Estudo fitossociológico da baía de Buarcos. Relatório de estágio científico, Universidade de Coimbra, 103 pp.

GAYRAL, P. (1982). Les algues de côtes Françaises (Manche & Atlantique). Éditions Doin: 21-29.

GAYRAL, P. e COSSON, J. (1986) Connaitre et reconnaître les algues marines. Ouest-France, 220 pp.

GENICOT, S.; RICHARD, O.; CRÉPINEAU, F.; BOYEN, C.; PENNINKHOF, B.; POTIN, P.; ROUSVOAL, S.; RUDOLPH, B. e KLOAREG, B. (2000). Purification and cloning of polysaccharde-modifying enzymes from marine algae. In: R. CONANEC (Ed.) *Polymerix 2000*. Centre de Biotechnologies em Bretagne: 157-163.

GIVERNAUD-MOURADI, A. (1992). Recherches biologiques et biochimiques pour la production d'agarose chez *Gelidium latifolium* (Rhodophycées, Gálidiales). These de Doctorat D'État, Sciences, University de Caen, 351 pp.

GLICKSMAN, M. (1983) Food Hydrocolloids, Vol. 2: Seaweed Extracts. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 89 pp.

GOLDSMITH, F.B. e HARRISON, C.M. (1976). Description and Analysis of Vegetation. In: S.B. CHAPMAN (Ed.) *Methods in Plant Biology*. Blackwell Scientific Publ., Oxford: 85-155.

GORDON, M.E. e MCCANDLESS, E.L. (1973) *Proc. Nova Scot. Inst. Sci* 27: 111-113.

GORDON-MILLS, E.M. e MCCANDLESS, E.L. (1975) Carrageenans in the cell wals of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophycaea, Gigartinales). I. Localization with fluorescent antibody. *Phycologia* 14: 275-281.

GORDON-MILLS, E.M.; TAS, J. e MCCANDLESS, E.L. (1978) Carrageenans in cell-walls of *Chondrus crispus* Stack (Rhodophyceae Gigartinales). 3. Metachromasia and topooptical reaction. *Phycologia* 17(1): 95-104.

GRAHAM, L.E. e WILCOX, L.W. (2000). Red Algae (Chap. 16). *Algae*. Prentice Hall: 343-396.

GREER, C.W.; SHOMER, I.; GOLDSTEIN, M.E. e YAPHE, W. (1984) Analysis of Carrageenan from *Hypnea musciformis* by Using Kappa-Carrageenanase and Iota-Carrageenanase and C-13-Nmr Spectroscopy. *Carbohyd Res* 129(Jul): 189-196.

GREER, C.W. e YAPHE, W. (1984a) Characterization of Hybrid (Beta-Kappa-Gamma) Carrageenan from *Eucheuma gelatinae* Agardh, J. (Rhodophyta, Solieriaceae) Using Carrageenases, Infrared and C-13-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Bot Mar* 27(10): 473-478.

- GREER, C.W. e YAPHE, W. (1984b) Hybrid (Iota-Nu-Kappa) Carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), Identified Using Iota-Carrageenases and Kappa-Carrageenases and C-13-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Bot Mar* 27(10): 479-484.
- GRETZ, M.R.; ARONSON, J.M. e SOMMERFELD, M.R. (1980) Cellulose in the Cell-Walls of the Bangiophyceae (Rhodophyta). *Science* 207(4432): 779-781.
- GRETZ, M.R.; MOLLET, J.C. e FALSHAW, R. (1997). Analysis of red algal extracellular matrix polysaccharides - cellulose and carrageenan. In: R.R. TOWNSEND e A.T. HOTCHKISS (Eds.) *Techniques in glycobiology*. M. Dekker, New York: 613-628.
- GRETZ, M.R.; SOMMERFELD, M.R.; ATHEY, P.V. e ARONSON, J.M. (1991a) Chemical-composition of the cell-walls of the fresh-water Red Alga *Lemanea annulata* (Batrachospermales). *J Phycol* 27(2): 232-240.
- GRETZ, M.R. e VOLLMER, C. (1989). Cell walls of red algae. In: C. SCHUERCH e A. SARKO (Eds.) *Cellulose and wood-chemistry and technology*. Wiley, New York: 623-637.
- GRETZ, M.R.; WU, Y.; SCOTT, J.L. e VREELAND, V. (1991b) Ultrastructural immunogold localization of carrageenan in the Golgi complex of *Agardhiella subulata*. *J Phycol* 27(Suppl): abstract 134.
- GRETZ, M.R.; WU, Y.; VREELAND, V. e SCOTT, J.L. (1990) Iota-carrageenan biogenesis in the red alga *Agardhiella subulata* is golgi-mediated. *J. Phycol.* 26(2 Suppl.): 14.
- GRIFFITHS, P. e DE HASETH, J.A. (1986) *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. John Wiley, New York, 656 pp.
- GROSS, W. (1990) Preparation of protoplasts from the carrageenophyte *Gigartina corymbifera* (Kütz.) J Ag (Rhodophyta). *J Microbiol Meth* 12(3-4): 217-223.
- GUIRY, M.D. (1981) *Chondrus crispus* Stackh. "T4" is a male clone (Rhodophyta). *Phycologia* 20: 439-449.
- GUIRY, M.D. (1984) Structure, life-history and hybridization of Atlantic *Gigartina teedii* (Rhodophyta) in culture. *Brit Phycol J* 19(1): 37-55.
- GUIRY, M.D. (1987) The evolution of life history types in the Rhodophyta: an appraisal. *Cryptogamie Algol* 8: 1-12.
- GUIRY, M.D. e CUNNINGHAM, E.M. (1984) Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of Northeastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Phycologia* 23(3): 357-367.
- GUIRY, M.D. e DHONNCHA, E. (2004) *AlgaeBase* version 2.1 - www electronic publication. Nat. Univ. of Ireland, Galway; <http://www.algaebase.org>

GUIRY, M.D.; TRIPODI, G. e LUNING, K. (1987) Biosystematics, genetics and upper temperature tolerance of *Gigartina teedii* (Rhodophyta) from the Atlantic and Mediterranean. *Helgolander Meeresun* 41(3): 283-295.

GUIRY, M.D.; WEST, J.A.; KIM, D.H. e MASUDA, M. (1984) Reinstatement of the Genus *Mastocarpus* Kutzing (Rhodophyta). *Taxon* 33(1): 53-63.

GUISELEY, K.B.; STANLEY, N.F. e WHITEHOUSE, P.A. (1980). Carrageenan. In: R.L. DAVIDSON (Ed.) *Handbook of water-soluble gums and resins* Chapter 5. McGraw-Hill, New York.

GUIST, G.C.; DAWES, C.J. e CASTLE, J.R. (1982) Mariculture of red seaweed *Hypnea musciformis*. *Aquaculture* 28: 375-384.

GUZMAN-MALDONADO, H. e PAREDES-LOPEZ, O. (1995) Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch - a Review. *Crit Rev Food Sci* 35(5): 373-403.

HARRIS, R.K.; BECKER, E.D.; CABRALDEMENEZES, S.M.; GOODFELLOW, R. e GRANGER, P. (2001) NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry* 73(11): 1795-1818.

HASLIN, C.; LAHAYE, M.; PELLEGRINI, M. e CHERMANN, J.C. (2001) In vitro anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*. *Planta Med* 67(4): 301-305.

HERMANSSON, A.M.; ERIKSSON, E. e JORDANSSON, E. (1991) Effects of Potassium, Sodium and Calcium on the Microstructure and Rheological Behavior of Kappa-Carrageenan Gels. *Carbohyd Polym* 16(3): 297-320.

HIRASE, S. e WATANABE, K. (1972) Structure of K-carrageenan from *Gigartina tenella*. *B Chem Soc Jpn* 45(6): 1839-1348.

HJERDE, T.; KRISTIANSEN, T.S.; STOKKE, B.T.; SMIDSRØD, O. e CHRISTENSEN, B.E. (1994) Conformation-Dependent Depolymerization Kinetics of Polysaccharides Studied by Viscosity Measurements. *Carbohyd Polym* 24(4): 265-275.

HOFFMANN, R.A.; GIDLEY, M.J.; COOKE, D. e FRITH, W.J. (1995) Effect of isolation procedures on molecular composition and physical properties of *Eucheuma cottonii* carrageenan. *Food Hydrocolloid* 9: 281-289.

HOFFMANN, R.A.; RUSSEL, A.R. e GIDLEY, M.J. (1996). Molecular weight distribution of carrageenans: characterisation of commercial stabilisers and effect of cation depletion on depolymerisation. In: G.O. PHILLIPS; P.A. WILLIAMS e D.J. WEDLOCK (Eds.) *Gums and stabilisers for the food industry* 8. IRL Press at Oxford University Press, Oxford: 137-148.

HOMMERSAND, M.; FREDERICQ, S. e CABIOCH, J. (1992) Developmental morphology of *Gigartina pistillata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 31(3-4): 300-325.

- HOMMERSAND, M.; FREDERICQ, S. e FRESHWATER, D.W. (1994) Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on sequence analysis of rbcL. *Bot Mar* 37: 193-203.
- HOMMERSAND, M.H.; FREDERICQ, S.; FRESHWATER, D.W. e HUGHEY, J. (1999) Recent developments in the systematics of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on rbcL sequence analysis and morphological evidence. *Phycological Research* 47: 139-151.
- HOMMERSAND, M.H.; GUIRY, M.D.; FREDERICQ, S. e LEISTER, G.L. (1993) New perspectives in the taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 261: 105-120.
- HONRADO, J.; PEREIRA, R.; ARAÚJO, R.; SANTOS, G.; MATOS, J.; ALVES, P.; NEPOMUCENO-ALVES, H.; SOUSA-PINTO, I. e BARRETO-CALDAS, F. (2002). Classification and mapping of terrestrial and intertidal vegetation in the Atlantic coast of Northern Portugal. In: *Littoral 2002. The Changing Coast.*, Porto, EUROCOAST: 211-215.
- IBERAGAR (2004) Sociedade Luso-Espanhola de Colóides Marinhos, S.A. <http://inicon.net/iberagar.htm>
- IBORRA, J.L.; MANJÓN, A. e CÁNOVAS, M. (1997). Immobilization in carrageenans. In: G.F. BICKERSTAFF (Ed.) *Methods in biotechnology ; 1*. Humana Press, Totowa, N.J.: 53-60.
- IMESON, A.P. (2000). Carrageenan. In: G.O. PHILLIPS e P.A. WILLIAMS (Eds.) *Handbook of hydrocolloids*. CRC Press, Boca Raton, FL: 87-102.
- ISAAC, W.E. e SIMONS, S.M. (1954) Some observations on *Gigartina pistillata* (Gmel.) Stackh. from Port Alfred with a record of plants bearing both tetraspores and carpospores. *J. S. Afr. Bot.* 20(1): 117-125.
- JOL, C.N.; NEISS, T.G.; PENNINKHOF, B.; RUDOLPH, B. e DE RUITER', G.A. (1999) A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Anal Biochem* 268(2): 213-222.
- KAAS, R. (1998). The seaweed resources of France. In: A.T. CRITCHLEY e M. OHNO (Eds.) *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka: 233-244.
- KAPRAUN, D.F. (1999) Red algal polysaccharide industry: economics and research status at the turn of the century. *Hydrobiologia* 399: 7-14.
- KIM, D.H. (1976) A study of the development of cystocarps and tetrasporangial sori in Gigartinaceae (Rhodophyceae, Gigartinales). *Nova Hedwigia* 27: 1-146.
- KLEPACKI, K.J.; SCOTT, J.L. e BROADWATER, S.T. (1995) Ultrastructure of Cell-Division in *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Eur J Phycol* 30(3): 159-167.
- KLOAREG, B. e QUATRANO, R.S. (1988) Structure of the Cell-Walls of Marine-Algae and Ecophysiological Functions of the Matrix Polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology* 26: 259-315.

- KNUTSEN, S.H. e GRASDALEN, H. (1987) Characterization of Water-Extractable Polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds) Lamour (Gigartinales, Rhodophyceae) by Ir and Nmr-Spectroscopy. *Bot Mar* 30(6): 497-505.
- KNUTSEN, S.H. e GRASDALEN, H. (1992a) Analysis of Carrageenans by Enzymatic Degradation, Gel-Filtration and H-1-Nmr Spectroscopy. *Carbohyd Polym* 19(3): 199-210.
- KNUTSEN, S.H. e GRASDALEN, H. (1992b) The Use of Neocarrabiose Oligosaccharides with Different Length and Sulfate Substitution as Model Compounds for H-1-Nmr Spectroscopy. *Carbohyd Res* 229(2): 233-244.
- KNUTSEN, S.H.; MYSLABODSKI, D.E.; LARSEN, B. e USOV, A.I. (1994) A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. *Bot Mar* 37(2): 163-169.
- KNUTSEN, S.H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B. e POTIN, P. (2001) A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase. *Carbohyd Res* 331(1): 101-106.
- KOPP, J. (1975). Contribution à l'étude de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackh. Biochimie des carraghénanes. Tese de Doutorado, Université Bretagne Occidentale, 93 pp.
- KOPP, J. e PEREZ, J. (1979) Contribution à l'étude de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackh. Relation entre la croissance, la potentialité sexuelle, la quantité e la composition de carraghénanes. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 42: 291-324.
- KRAFT, G.T. (1981). Rhodophyta: Morphology an Classification. In: C.S. LOBBAN e M.J. WYNNE (Eds.) *The Biology of Seaweeds. Botanical monographs; v. 17.* University of California Press, Berkeley: 6-51.
- KRAFT, G.T. e ROBINS, P.A. (1985) Is the Order Cryptonemiales (Rhodophyta) Defensible. *Phycologia* 24(1): 67-77.
- KUGRENS, P. e DELIVOPOULOS, S.G. (1986) Ultrastructure of the Carposporophyte and Carposporogenesis in the Parasitic Red Alga *Plocamiocolax pulvinata* Setch (Gigartinales, Plocamiaceae). *J Phycol* 22(1): 8-21.
- KYLIN, H. (1956) Die Gattungen der Rhodophyceen. C.W.K. Gleerup, Lund, 673 pp.
- LACLAIRE, J.W. e DAWES, C.J. (1975) Ultrastructural and histochemical localization of sulfated polysaccharides in *Eucheuma nudum* Agardh. *J. J Phycol* 11: 8-8.
- LAHAYE, M. (2001a) Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. *Cah Biol Mar* 42(1-2): 137-157.

- LAHAYE, M. (2001b) Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J Appl Phycol* 13(2): 173-184.
- LAHAYE, M.; YAPHE, W. e ROCHAS, C. (1985) C-13-Nmr-Spectral Analysis of Sulfated and Desulfated Polysaccharides of the Agar Type. *Carbohydr Res* 143(NOV): 240-245.
- LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A. e DE KRUIF, C.G. (2000) Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloid* 14(4): 273-280.
- LARSEN, B.; VREELAND, V. e LAETSCH, W.M. (1985) Assay-Dependent Specificity of a Monoclonal-Antibody with Alginate. *Carbohydr Res* 143(Nov): 221-227.
- LAWSON, C.J.; REES, D.A.; STANCIOF, D.J. e STANLEY, N.F. (1973) Carrageenans. 8. Repeating structures of galactan sulfates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatuse*, *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicorniso*. *J Chem Soc Perk T 1*(19): 2177-2182.
- LAXE-MUROS, C. (1990) Prospeccion, analisis y cartografia de macroalgas y erizo de mar en el litoral de Galicia. Xunta de Galicia. Consellheiria de Pesca. Direccion Xeral de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, 69 pp.
- LAZO, M.L.; GREENWELL, M. e MCLACHLAN, J. (1981) Population structure of *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinales, Rhodophyta) along the coast of Prince Edward Island, Canada: Distribution of gametophytic and sporophytic fronds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 126: 45-58.
- LECHAT, H.; AMAT, M.; MAZOYER, J.; BULEON, A. e LAHAYE, M. (2000) Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (gigartinales, rhodophyta). *J Phycol* 36(5): 891-902.
- LECHAT, H.; AMAT, M.; MAZOYER, J.; GALLANT, T.; BULEON, A. e LAHAYE, M. (1997) Cell wall composition of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales Rhodophyta) partitioned by wet sieving. *J Appl Phycol* 9(565-572).
- LEGALL, Y.; BRAUD, J.P. e KLOAREG, B. (1990) Protoplast production in *Chondrus crispus* gametophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *Plant Cell Rep* 8(10): 582-585.
- LEVRING, T.; HOPPE, H.A. e SCHMID, O.J. (1969) Marine algae; a survey of research and utilization. Cram de Gruyter, Hamburg, 421 pp.
- LEWIN, R. (1966) Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6(1): 1-12.
- LEWIS, J.R. (1964) The ecology of rocky shores. English Universities Press Ltd., London, 300 pp.

- LIAO, M.L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J. e BACIC, A. (1993) Beta-Kappa-Carrageenans as Evidence for Continued Separation of the Families Dicranemataceae and Sarcodiaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *J Phycol* 29(6): 833-844.
- LINDGREN, A. e ALBERG, P. (1996) Proportion of life cycle stages of *Chondrus crispus* and its population structure: A comparison between a marine and an estuarine environment. *Bot Mar* 39: 263-268.
- LLOYD, A.G.; ROSE, F.A.; DODGSON, K.S. e PRICE, R.G. (1961) Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. *Biochim Biophys Acta* 46(1): 108-115.
- LOBBAN, C.S. e HARRISON, P.J. (1994) Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, New York, ix, 366 pp.
- LUNING, K. (1990) Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley and Sons, New York, 527 pp.
- MACFARLANE, C.I. (1968) *Chondrus crispus* Stackh. A synopsis. Nova Scotia Res. Fdn. Seaweeds Division, 47 pp.
- MACMANUS, J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of oeriodic acid. *Stain Technol.* 23: 99-108.
- MAGGS, C.A. (1988) Intraspecific life history variability in the Florideophycidae (Rhodophyta). *Bot Mar* 31: 465-490.
- MAGGS, C.A. (1990) Taxonomy of phylloporoid algae: the implications of life history. *Hydrobiologia* 204/205: 119-124.
- MAGGS, C.A.; DOUGLAS, S.E.; FENETY, J. e BIRD, C.J. (1992) A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J Phycol* 28: 241-232.
- MAGGS, C.A.; MCLACHLAN, J.L. e SAUNDERS, G.W. (1989) Infrageneric taxonomy of *Ahnfeltia* (Ahnfeltiales, Rhodophyta). *J Phycol* 25(2): 351-368.
- MAGGS, C.A. e PUESCHEL, C.M. (1989) Morphology and development of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta) - Proposal of Ahnfeltiales ord-nov. *J Phycol* 25(2): 333-351.
- MARTINS, C.G. (1993) Oceanus 2.0. Dep. Gestão Financeira do Min. de Educação, Lisboa, 41 pp.
- MARTINS, I.; PARDAL, M.A.; LILLEBO, A.I.; FLINDT, M.R. e MARQUES, J.C. (2001) Hydrodynamics as a major factor controlling the occurrence of green macroalgal blooms in a eutrophic estuary: A case study on the influence of precipitation and river management. *Estuar Coast Shelf S* 52(2): 165-177.

- MASUDA, M. (1996) Life history of *Gymnogongrus griffithsiae* (Phylloporaceae, Gigartinales) from Ireland: implications for life history in the Rhodophyta. *Phycologia* 35: 421-434.
- MASUDA, M. e NORRIS, R.E. (1994). Introduction to section IV. *Ahnfeltiopsis* (Rhodophyta, Phylloporaceae). In: I.A. ABBOTT (Ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds* Vol. IV. Calif. Sea Grant Program, La Jolla: 149-158.
- MATHIESON, A.C.; PENNIMAN, C.E. e TVETER-GALLAGHER, E. (1984) Phycocolloid ecology of underutilized economic Red Algae. *Hydrobiologia* 116(Sep): 542-546.
- MATSUHIRO, B. (1996) Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia* 327: 481-489.
- MATSUHIRO, B. e URZUA, C.C. (1992) Heterogeneity of carrageenans from *Chondrus crispus*. *Phytochemistry* 31(2): 531-534.
- MCCANDLESS, E.L. (1978) The importance of cell wall constituents in algal taxonomy. Academic Press for the Systematics Association, London: 63-85.
- MCCANDLESS, E.L. e CRAIGIE, J.S. (1974) Re-Evaluation of Seasonal Factors Involved in Carrageenan Production by *Chondrus crispus* - Carrageenans of Carposporic Plants. *Bot Mar* 17(3): 125-129.
- MCCANDLESS, E.L. e CRAIGIE, J.S. (1979) Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Ann. Rev. Planta Physiol.* 30: 41-53.
- MCCANDLESS, E.L.; CRAIGIE, J.S. e WALTER, J.A. (1973) Carrageenans in Gametophytic and Sporophytic Stages of *Chondrus-Crispus*. *Planta* 112(3): 201-212.
- MCCANDLESS, E.L. e GRETZ, M.R. (1984) Biochemical and Immunochemical Analysis of Carrageenans of the Gigartinaceae and Phylloporaceae. *Hydrobiologia* 116(Sep): 175-178.
- MCCANDLESS, E.L.; OKADA, W.T.; LOTT, J.N.A.; VOLLMER, C.M. e GORDON-MILLS, E.M. (1977) Structural studies of *Chondrus crispus*: the effect of extraction of carrageenan. *Can. J. Bot.* 55: 2053-2064.
- MCCANDLESS, E.L.; WEST, J.A. e GUIRY, M.D. (1982) Carrageenan Patterns in the Phylloporaceae. *Biochem Syst Ecol* 10(4): 275-284.
- MCCANDLESS, E.L.; WEST, J.A. e GUIRY, M.D. (1983) Carrageenan Patterns in the Gigartinaceae. *Biochem Syst Ecol* 11(3): 175-182.
- MCHUGH, D.J. (2003) A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper* 441: 52-72.
- MCLACHLAN, J. (1968) Cystocarpic plants of *G. teedii*: a new record for British Isles. *Br. Phycol. Bull.* 3(3): 575-577.

- MENDOZA, W.G.; MONTANO, N.E.; GANZON-FORTES, E.T. e VILLANUEVA, R.D. (2002) Chemical and gelling profile of ice-ice infected carrageenan from *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty "sacol" strain (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 14(5): 409-418.
- MESQUITA RODRIGUES, J.E. (1963) Contribuição para o conhecimento das Phaeophyceae da costa portuguesa. *Bol. Soc. Brot.* 16: 1-124.
- MICHEL, G.; CHANTALAT, L.; DUEE, E.; BARBEYRON, T.; HENRISSAT, B.; KLOAREG, B. e DIDEBERG, O. (2001) The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: A novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases. *Structure* 9(6): 513-525.
- MIKAMI, H. (1965) A systematic study of the Phylloporaceae and Gigartinaceae from Japan and its vicinity. *Scient. Paps. Inst. Algol. Res. Hokkaido Univ.* 5: 181-185.
- MILLER, I.J. (2002) New (13)C- NMR methods for determining the structures of algal polysaccharides. Part 1. The effect of substitution on the chemical shifts of simple diad galactans. *Bot Mar* 43: 239-250.
- MILLER, I.J. (2003a) The chemical structure of galactans from *Sarcodia montagneana* and from *Sarcodia flabellata*. *Bot Mar* 46(4): 392-399.
- MILLER, I.J. (2003b) The chemical structure of galactans from some New Zealand red algae. *Bot Mar* 46(6): 572-577.
- MILLER, I.J.; FALSHAW, R. e FURNEAUX, R.H. (1996) A polysaccharide fraction from the red seaweed *Champia novae-zealandiae* Rhodymeniales, Rhodophyta. *Hydrobiologia* 327: 505-509.
- MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. e HEMMINGSON, J.A. (1997) Variations in the constituent sugars of the polysaccharides from New Zealand species of *Pachymenia* (Halymeniaceae). *Bot Mar* 40(2): 119-127.
- MILLER, I.J. e FURNEAUX, R.H. (1982) Agars from New-Zealand Red Algae in the Family Gelidiaceae - a Structural Study. *New Zeal J Sci* 25(1): 15-18.
- MOLLION, J. (1977) Seasonal variations in carrageenan from *Hypnea musciformis* in Senegal. *J Phycol* 13: 46-46.
- MOLLION, J.; ANDRIANTSIFERANA, M. e SEKKAL, M. (1990) A Study of the Phycocolloids from *Gelidium madagascariense* and *Euचेuma denticulatum* (Rhodophyta) Collected on the South Coasts of Madagascar. *Hydrobiologia* 204: 655-659.
- MOLLION, J.; MOREAU, S. e CHRISTIAEN, D. (1986) Isolation of a New Type of Carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert) J Ag (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot Mar* 29(6): 549-552.
- MORI, T. (1943) The enzyme catalyzing the decomposition of mucilage of *Chondrus ocellatus* III. Purification, unit determination, and distribution of the enzymes. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 19: 740-742.

- MORRIS, E.R.; REES, D.A. e ROBINSON, G. (1980) Cation-Specific Aggregation of Carrageenan Helices - Domain Model of Polymer Gel Structure. *Journal of Molecular Biology* 138(2): 349-362.
- MUKAI, L.S. e CRAIGIE, J.S. (1981) Chemical-Composition and Structure of the Cell-Walls of the *Conchocelis* and Thallus Phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). *J Phycol* 17(2): 192-198.
- MÚRIAS, A. (1994). Estudo e caracterização dos povoamentos bentónicos intertidais de substrato rochoso do Norte de Portugal. Tese de Mestrado, Universidade do Porto.
- NACHIMUTHU, K.; MASILLAMONY, P.R. e PADMANABAN, V.D. (1991) Effect of Carrageenan on Humoral and Protective Immune-Responses of Chicks Vaccinated with Newcastle-Disease Virus. *Vet Immunol Immunop* 28(1): 81-87.
- NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M. e YAMAMOTO, N. (1987) Purification and Characterization of an Avian-Myeloblastosis and Human-Immunodeficiency-Virus Reverse-Transcriptase Inhibitor, Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31(10): 1524-1528.
- NANG, H.Q. e DINH, N.H. (1998). The seaweed resources of Vietnam. In: A.T. CRITCHLEY e M. OHNO (Eds.) *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka: 62-69.
- NEELY, W.B. (1957) Infrared Spectra of Carbohydrates. *Adv Carbohyd Chem* 12: 13-33.
- NEISH, A.C.; F., S.P.; FOX, C.H. e SIMPSON, F.J. (1977) The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.* 55: 2263-2271.
- NEISH, A.C. e FOX, C.H. (1971) Greenhouse experiments on vegetative propagation *Chondrus crispus* (Irish moss). *Natl. Res. Counc. Can., Atl. Reg. Lab., Tech. Rep.* 11: 32 pp.
- NEMOTO, N. (2002) Rheology of polymer networks. *J Soc Rheol Jpn* 30(5): 231-235.
- NEUSHUL, M. (1990) Antiviral Carbohydrates from Marine Red Algae. *Hydrobiologia* 204: 99-104.
- NEVES, J.B. e RODRIGUES, J.E.M. (1957) Instruções para a colheita, preparação e conservação de colecções vegetais. *Separata do Anuário da Sociedade Broteriana* Ano XXIII.
- NEWROTH, P.R. (1971) Studies on the life histories in the Phylloporaceae. I. *Phyllophora truncata* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Phycologia* 10: 345-354.
- NORRIS, R.E. (1987) Reproduction in *Sarcodia-Dentata* (Suhr) Comb-Nov (Gigartinales, Rhodophyceae), with Comments on the Sarcodiaceae. *Brit Phycol J* 22(2): 147-155.
- NOSEDA, M.D. e CEREZO, A.S. (1995) Alkali modification of carrageenans - II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated beta-D-galactose units. *Carbohyd Polym* 26: 1-3.

NUNES, M.C.; BATISTA, P.; RAYMUNDO, A.; ALVES, M.M. e SOUSA, I. (2003) Vegetable proteins and milk puddings. *Colloid Surface B* 31(1-4): 21-29.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H. e RUSSELL, I. (1981) Sulfated Polysaccharides of the Solieriaceae Family. 3 The Desulfated Polysaccharide of *Anatheca dentata*. *Carbohydr Res* 95(2): 219-226.

ONEILL, A.N. (1955a) 3,6-Anhydro-D-Galactose as a Constituent of K-Carrageenin. *Journal of the American Chemical Society* 77(10): 2837-2839.

ONEILL, A.N. (1955b) Derivatives of 4-O-Beta-D-Galactopyranosyl-3,6-Anhydro-D-Galactose from K-Carrageenin. *Journal of the American Chemical Society* 77(23): 6324-6326.

ORFANIDIS, S. (1993) Temperature responses and distribution of several Mediterranean macroalgae belonging to different distribution groups. *Bot Mar* 36(4): 359-370.

OTAIZA, R.D.; ABADES, S.R. e BRANTE, A.J. (2001) Seasonal changes in abundance and shifts in dominance of life history stages of the carrageenophyte *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) in south central Chile. *J Appl Phycol* 13(2): 161-171.

OURIQUES, L.C. e BOUZON, Z.L. (2003) Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Plant Biosyst* 137(2): 193-201.

PAINTER, T. (1983) The Polysaccharides. Vol. 2. Academic Press, London, 213 pp.

PALMINHA, F.P. (1951) Contribuição para estudo das algas marinhas portuguesas. I. *Bol. Port. Ciênc. Nat.* 2(3): 226-250.

PALMINHA, F.P. (1957) Contribuição para estudo das algas marinhas portuguesas. II (Litoral Algarvio). *Bol. Port. Ciênc. Nat.*, 7(2-22): 68-74.

PANLASIGUI, L.N.; BAELO, O.Q.; DIMATANGAL, J.M. e DUMELOD, B.D. (2003) Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia Pac J Clin Nutr* 12(2): 209-214.

PAOLETTI, S.; SMIDSRØD, O. e GRASDALEN, H. (1984) Thermodynamic stability of the ordered conformation of carrageenan polyelectrolytes. *Biopolymers* 23: 1771-1794.

PARSONS, M.J.; PICKMERE, S.E. e BAILEY, R.W. (1977) Carrageenan Composition in New-Zealand Species of *Gigartina* (Rhodophyta) - Geographic Variation and Interspecific Differences. *New Zeal J Bot* 15(3): 589-595.

PATEIRA, L. (1993) Macroalgas marinhas da costa continental portuguesa: sua utilização industrial. INETI, Lisboa, pp.

PEAT, S. (1981) The infrared spectra of carrageenans extracted from various algae. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 495-502.

- PENMAN, A. e REES, D.A. (1973) Carrageenans. 9. Methylation analysis of galactan sulfates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis* - structure of xi-Carrageenan. *J Chem Soc Perk T I*(19): 2182-2187.
- PERCIVAL, E.J.V. (1949) Carbohydrate sulfates. *Quart. Rev. (Lond.)* 3: 369-384.
- PEREIRA, L. (1996a). Aspectos da biologia, taxonomia e biotecnologia das Gigartinaceae (Rhodophyceae). Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica (Trabalho de Síntese), Universidade de Coimbra, 243 pp.
- PEREIRA, L. (1996b). Ecologia das macroalgas marinhas. Estudo ecológico duma população de *Gigartina teedii* da baía de Buarcos. Provas de aptidão e capacidade científica (Relatório), Universidade de Coimbra, 99 pp.
- PEREIRA, L.; AMADO, A.M.; SCHOEPPPE, A.; BOULENGUER, P.; TRESPOEY, A.; CRITCHLEY, A.T.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. e MESQUITA, J.F. (2004). Identification of selected seaweed colloid using vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). In: *Marine Biopolymers (A satellite to the XVIII International Seaweed Symposium)*, Trondheim, Norway, *Poster presentation*.
- PEREIRA, L.; DIAS, N.G. e MESQUITA, J.F. (2002a) Internet database and collection of portuguese seaweeds at Botany Department (Univ. of Coimbra, Portugal). *Algal biotechnology - A sea of opportunities*, Book of Abstracts: 171.
- PEREIRA, L.; GASPAR, R. e MESQUITA, J.F. (2000). Macrophytobentos study at Buarcos bay (Figueira da Foz, Portugal): 1 - square method sampling essay. In: *2º Encontro da APAA*, Coimbra, Departamento de Botânica, FCTUC.
- PEREIRA, L.; GASPAR, R. e MESQUITA, J.F. (2001). Macrophytobenthos study at Buarcos bay (Figueira da Foz, Portugal): 2 - zonation patterns. In: ECSA (Ed.) *Estuaries and the coastal zone of northern Portugal: state of arte*, Porto, ICBAS, 46 pp.
- PEREIRA, L. e MESQUITA, J.F. (1994). Biology of red algae *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. var. *lusitanica* (Rodrigues). Ultrastructural and ecophysiological aspects. *29th SPME-BC Reunion*, Coimbra, Departamento de Botânica: 76.
- PEREIRA, L. e MESQUITA, J.F. (1999) Contribution for the knowledge of portuguese seaweeds. *Bol. Soc. Brot.* 69(1): 109.
- PEREIRA, L. e MESQUITA, J.F. (2003) Carrageenophytes of occidental Portuguese coast: 1- spectroscopic analysis in eight carrageenophytes from Buarcos bay. *Biomol Eng* 20(4-6): 217-222.
- PEREIRA, L. e MESQUITA, J.F. (2004) Population studies and carrageenan properties of *Chondrachantus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 16(5): 369-383.

- PEREIRA, L.; MESQUITA, J.F. e DIAS, J.D.S. (2002b). Optical and electron microscope study of heterosporic thalli (carpospores/tetraspores) in *Gigartina pistillata* (Gmel.) Stackh. (Rhodophyta). In: *Proceedings of the ICEM 15 - Vol.2 - Biology and Medicine*, Durban, South Africa: 747-748.
- PEREIRA, L.; PEREIRA, N. e OSÓRIO, H. (1998). Algas marinhas, um recurso para o próximo milénio (CD-ROM). *Prémio Francisco de Holanda*. Lisboa, Expo98.
- PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A.M. e RIBEIRO-CLARO, P.J.A. (2003) Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol Eng* 20(4-6): 223-228.
- PEREZ, R.; KAAS, R.; CAMPELLO, F.; ARBAULT, S. e BARBAROUX, O. (1992) La Culture des algues marines dans le monde. IFREMER, Plouzane, 613 pp.
- PÉREZ-RUZAFÁ, I.; IZQUIERDO, J.L.; ARAÚJO, R.; PEREIRA, L. e BÁRBARA, I. (2003) Distribution map of marine algae from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. XVII. *Laminaria rodriguezii* Bornet and additions to the distribution maps of *L. hyperborea* (Gunner.) Foslie, *L. ochroleuca* Bach. Pyl. and *L. saccharina* (L.) Lamour. (Laminariales, Fucophyceae). *Botanica Complutensis* 27: 155-164.
- PEROTTI, M.E.; PIROVANO, A. e PHILLIPS, D.M. (2003) Carrageenan formulation prevents macrophage trafficking from vagina: Implications for microbicide development. *Biol Reprod* 69(3): 933-939.
- PICULELL, L. (1995). Gelling carrageenans. In: A.M. STEPHEN (Ed.) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker Inc., New York: 205-244.
- POTIN, P.; BOUARAB, K.; KUPPER, F. e KLOAREG, B. (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* 2(3): 276-283.
- POTIN, P.; RICHARD, C.; BARBEYRON, T.; HENRISSAT, B.; GEY, C.; PETILLOT, Y.; FOREST, E.; DIDEBERG, O.; ROCHAS, C. e KLOAREG, B. (1995) Processing and Hydrolytic Mechanism of the Cgka-Encoded Kappa-Carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *Eur J Biochem* 228(3): 971-975.
- PÓVOA DOS REIS, M. (1962) Uma nova espécie de *Lemaneae* Bory encontrada em Portugal. *Bol. Soc. Brot.* 36: 175.
- PÓVOA DOS REIS, M. (1965) *Batrachospermum gulbenkianum*, sp. nov. *Anu. Soc. Brot.* 31: 31.
- PÓVOA DOS REIS, M. (1977) Novidades ficológicas para a Ria de Aveiro. *Bol. Soc. Brot.* 51: 91.
- PRADO-FERNANDEZ, J.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, J.A.; TOJO, E. e ANDRADE, J.M. (2003) Quantitation of kappa-, iota- and lambda-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Analytica Chimica Acta* 480(1): 23-37.

- PRINGLE, J.D. e MATHIESON, A.C. (1987) *Chondrus crispus* Stackhouse. Case studies of seven commercial seaweed resources. *FAO Fisheries Technical Paper* 281: 49-122.
- PRINGLE, J.D. e SEMPLE, R. (1984) Dragrake harvesting intensity in Irish moss (*Chondrus crispus*) beds in the southern Gulf of St. Lawrence. *Hydrobiologia* 116/117: 342-346.
- PROVASOLI, L. (1968). Medium and prospects to the culture of seaweeds. In: *Proceedings of the 11th Japan Conference of Plant Physiology*, Hakene, Japan: 63-75.
- PUESCHEL, C.M. (1979) Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J Phycol* 15(4): 409-424.
- PUVANENTHIRAN, A.; GODDARD, S.J. e AUGUSTIN, M.A. (2000) Milk-carrageenan gels. *Aust J Dairy Technol* 55(2): 111-116.
- PYBUS, C. (1977) Ecology of *Chondrus crispus* and *Gigartina stellata* (Rhodophyta) in Galway Bay. *J Mar Biol Assoc Uk* 57(3): 609-628.
- RAGAN, M.K.; BIRD, C.J.; RICE, E.L.; GUTELL, R.R.; MURPHY, C.A. e SINGH, R.K. (1994) A molecular phylogeny of the marine Red Algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit ribosomal-RNA gene. *P Natl Acad Sci USA* 91(15): 7276-7280.
- RAGASA, A.L.R. (2003). Characterization and interaction with food systems of carrageenan from the Red Alga, *Betaphycus philippinensis* Doty (= *Eucheuma gelatinae* J. Agardh) Solieriaceae, Gigartinales. PhD Thesis. University of the Philippines, 135 pp.
- RAMUS, J. (1972) Production of extracellular polysaccharide by unicellular Red Alga *Porphyridium aerugineum*. *J Phycol* 8(1): 97-106.
- RAMUS, J. e GROVES, S.T. (1972) Incorporation of sulfate into capsular polysaccharide of Red Alga *Porphyridium*. *J Cell Biol* 54(2): 399-410.
- RASCIO, N.; MARIANI, P.; VECCHIA, F.D. e TREVISAN, R. (1991) The vegetative thallus of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) .1. An ultrastructural and cytochemical study. *Bot Mar* 34(3): 177-185.
- REES, D.A. (1961) Estimation of Relative Amounts of Isomeric Sulphate Esters in Some Sulphated Polysaccharides. *J Chem Soc(DEC)*: 5168-5171.
- REES, D.A. (1963) The carrageenan system of polysaccharids I. The relation between the kappa and lambda-components. *J. Chem. Soc.* 340: 1821-1832.
- REES, D.A. (1969) Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Carrageenans and other natural sulphates. *Adv. Carbohydr. Biochem.* 24: 267-332.

- REES, D.A.; MORRIS, E.R. e MADDEN, J.K. (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. In: G.O. ASPINAL (Ed.) *The polysaccharides* Vol. 1. Academic Press Ltd., New York: 195-290.
- RENN, D. (1990) Seaweeds and biotechnology - inseparable companions. *Hydrobiologia* 204/205: 7-13.
- RENN, D. (1997) Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status, needs and prospects. *Trends in Biotechnology* 15(1): 9-14.
- REYNOLDS, E. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.
- RIBIER, J. e GODINEAU, J.C. (1984) Les algues. La Maison Rustique, Flammarion: 15-26.
- RICKER, R.W. (1987) Taxonomy and biogeography of Macquarie Island seaweeds. British Museum (Natural History), London, vi, 344 pp.
- RINAUDO, M. (2002) Alginates and carrageenans. *Actual Chimique*(11-12): 35-38.
- RINO, J.A. (1969) Subsídios para o conhecimento das algas de Portugal. IV. *Anu. Soc. Brot.* 35: 41.
- ROBERTS, M.A. e QUEMENER, B. (1999) Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis. *Trends Food Sci Tech* 10(4-5): 169-181.
- ROCHAS, C. e LAHAYE, M. (1989) Solid-State C-13-Nmr Spectroscopy of Red Seaweeds, Agars and Carrageenans. *Carbohyd Polym* 10(3): 189-204.
- ROCHAS, C.; LAHAYE, M. e YAPHE, W. (1986) Sulfate content of carrageenan and cgar determined by Infrared-Spectroscopy. *Bot Mar* 29(4): 335-340.
- RODD, A.B.; DAVIS, C.R.; DUNSTAN, D.E.; FORREST, B.A. e BOGER, D.V. (2000) Rheological characterisation of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloid* 14(5): 445-454.
- RODRIGUES, J.E.M. (1957) Contribuição para o conhecimento das algas marinhas da baía de Buarcos. *Publicações do XXIII Congresso Luso-Espanhol Separata do Tomo V*: 1-15.
- RODRIGUES, J.E.M. (1958) A new variety of *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux. *Bol. Soc. Brot.* (2) 32: 91-94.
- RODRIGUES, J.E.M. (1963) Contribuição para o conhecimento das Phaeophyceae da costa Portuguesa. *Separata das Memórias da Sociedade Broteriana XVI*: 124.
- ROMO, H.; ALVEAL, K. e WERLINGER, C. (2001) Growth of the commercial carrageenophyte *Sarcotalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) on suspended culture in central Chile. *J Appl Phycol* 13(3): 229-234.

- RUDOLPH, B. (2000). Seaweed products: red algae of economic significance. In: R.E. MARTIN (Ed.) *Marine & freshwater products handbook*. Technomic Pub. Co., Lancaster, PA: 515-529.
- RUPEREZ, P. e SAURA-CALIXTO, F. (2001) Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *Eur Food Res Technol* 212(3): 349-354.
- RUSS, J.C. (1974) X-ray microanalysis in the biological sciences. *J. Submicrosc. Cytol.* 6: 55-79.
- RUSS, J.C. e PANESSA, B.J. (1972). Thinsection microanalyses. In: *Symposium EDAX Lab.*, Raleigh, NC, 146 pp.
- SAITO, R.M. e OLIVEIRA, E.C. (1990) Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. *Hydrobiologia* 204(5): 585-588.
- SANTELICES, B. (1988) Synopsis of biological data on the seaweed genera *Gelidium* and *Pterocladia* (Rhodophyta). *FAO Fisheries Synopsis* 145: 55.
- SANTELICES, B. (1999) A conceptual framework for marine agronomy. *Hydrobiologia* 399: 15-23.
- SANTELICES, B.; CORREA, J.A.; HORMAZABAL, M. e FLORES, V. (2003) Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Mar Biol* 143(2): 381-392.
- SANTOS, G.A. (1989) Carrageenans of Species of *Eucheuma* Agardh, J. And *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). *Aquat Bot* 36(1): 55-67.
- SANTOS, L.M.A. e SANTOS, M.F. (2004) The Coimbra culture collection of Algae (ACOI). *Nova Hedwigia* 79(1-2): 39-47.
- SANTOS, M.F. e MESQUITA, J.F. (1981) Evolução dos estudos ficológicos no Instituto Botânico de Coimbra. *Bol. Soc. Brot.* 54(2): 415-423.
- SANTOS, R. e DUARTE, P. (1991) Marine Plant Harvest in Portugal. *J Appl Phycol* 3(1): 11-18.
- SAUNDERS, G.W. e KRAFT, G.T. (1994) Small-Subunit Ribosomal-Rna Gene-Sequences from Representatives of Selected Families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta) .1. Evidence for the Plocamiales Ord Nov. *Can J Bot* 72(9): 1250-1263.
- SAUNDERS, G.W. e KRAFT, G.T. (1996) Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta) .2. Recognition of the Halymeniales ord nov. *Can J Bot* 74(5): 694-707.
- SAUNDERS, G.W. e KRAFT, G.T. (1997) A molecular perspective on red algal evolution: focus on the Florideophycidae. *Plant Syst Evol*: 115-138.

- SCF (2003) Opinion of the Scientific Committee on Food on Carrageenan. Commission of the European Communities, Luxembourg, 8 pp.
- SCHAEFFER, D.J. e KRYLOV, V.S. (2000) Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotox Environ Safe* 45(3): 208-227.
- SCHMIDT, A.G.; WARTEWIG, S. e PICKER, K.M. (2003) Potential of carrageenans to protect drugs from polymorphic transformation. *Eur J Pharm Biopharm* 56(1): 101-110.
- SCROSATI, R.; GARBARY, D.J. e MCLACHLAN, J. (1994) Reproductive ecology of *Chondrus crispus* (Rhodophyta, Gigartinales) from Nova-Scotia, Canada. *Bot Mar* 37(4): 293-300.
- SEDLMEYER, F.; DAIMER, K.; RADEMACHER, B. e KULOZIK, U. (2003) Influence of the composition of milk-protein kappa/iota-hybrid-carrageenan gels on product properties. *Colloid Surface B* 31(1-4): 13-20.
- SEKKAL, M.; LEGRAND, P.; HUVENNE, J.P. e VERDUS, M.C. (1993) The use of FTIR Microspectrometry as a new tool for the identification *in situ* of polygalactanes in Red Seaweeds. *J Mol Struct* 294: 227-230.
- SELBY, H.H. e WYNNE, W.H. (1973). Agar. In: R.L. WHISTLER e J.N. BEMILLER (Eds.) *Industrial gums, polysaccharides and their derivatives*. Academic Press, New York: 29-48.
- SEMESI, A.K. e MSHIGENI, K.E. (1977) Studies on Yield and Ir-Spectra of Phycocolloids from *Chondrococcus hornemannii* (Lyngbye) Schmitz and *Sarconema filiforme* (Sonder) Kylin from Tanzania. *Bot Mar* 20(5): 271-275.
- SHACKLOCK, P.F.; ROBSON, D.R.; FORSYTH, I. e NEISH, A.C. (1973) Further experiments on the vegetative propagation of *Chondrus crispus* T4. *Natl. Res. Counc. Can., Atl. Reg. Lab., Tech. Rep.* 18.
- SHACKLOCK, P.F.; ROBSON, D.R. e SIMPSON, F.J. (1974) Propagation of Irish moss in tanks: comparative growth at different locations. *Natl. Res. Counc. Can., Atl. Reg. Lab., Tech. Rep.* 19.
- SIAP (1996) An introduction to carrageenan. SnapShot Solutions, Inc.; <http://philexport.org/members/siap/intro.htm>
- SILVA, P.C. e JOHANSEN, H.W. (1986) A Reappraisal of the Order Corallinales (Rhodophyceae). *Brit Phycol J* 21(3): 245-254.
- SMITH, D.B. e COOK, W.H. (1953) Fractionation of Carrageenin. *Arch Biochem Biophys* 45(1): 232-233.
- SMITH, D.B.; ONEILL, A.N. e PERLIN, A.S. (1955) Studies on the Heterogeneity of Carrageenin. *Can J Chem* 33(8): 1352-1360.

- SNOEREN, T.H.M. e PAYENS, T.A.J. (1976) Sol-Gel Transition in Solutions of Kappa-Carrageenan. *Biochim Biophys Acta* 437(1): 264-272.
- SOUSA, A. (2003). Usos e potencialidades das macroalgas do litoral centro, Peniche a Leiria. Relatório de estágio, Universidade de Coimbra, 97 pp.
- SOUSA-PINTO, I. (1998). The seaweed resources of Portugal. In: A.T. CRITCHLEY e M. OHNO (Eds.) *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka: 176-184.
- SPUR, A. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- STANCIOFF, D.J. (1981) Reflections on the interrelationships between red seaweed source chemistry and uses. *Proceedings of International Seaweed Symposium 6*: 595-609.
- STANCIOFF, D.J. e STANLEY, N.F. (1969). Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. In: *Proc. Int. Seaweed Symp.* 6, 595-609 pp.
- STANLEY, N.F. (1990). Carrageenans. In: P. HARRIS (Ed.) *Food gels*. Elsevier Applied Science, London: 79-119.
- STEVENSON, T.T. e FURNEAUX, R.H. (1991) Chemical Methods for the Analysis of Sulfated Galactans from Red Algae. *Carbohyd Res* 210: 277-298.
- STOLOFF, L. (1959) Carrageenan. Academic Press, New York: 83-113.
- STOLOFF, L. (1962) Algal classification: an aid to improved industrial utilization. *Econ. Bot.* 16: 86-94.
- STOLOFF, L. e SILVA, P.C. (1957) An attempt to determine possible taxonomic significance of the properties of water extractable polysaccharides in red algae. *Econ. Bot.* 11: 327-330.
- STORTZ, C.A.; BACON, B.E.; CHERNIAK, R. e CEREZO, A.S. (1994) High-Field NMR-spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. *Carbohyd Res* 261(2): 317-326.
- STORTZ, C.A.; CASES, M.R. e CEREZO, A.S. (1997a). Red Seaweed Galactans. In: R.R. TOWNSEND e A.T. HOTCHKISS (Eds.) *Techniques in glycobiology*. M. Dekker, New York: 567-593.
- STORTZ, C.A.; CASES, M.R. e CEREZO, A.S. (1997b) The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. *Carbohyd Polym* 34(1-2): 61-65.
- STORTZ, C.A. e CEREZO, A.S. (1992) The C-13 Nmr-Spectroscopy of Carrageenans - Calculation of Chemical-Shifts and Computer-Aided Structural Determination. *Carbohyd Polym* 18(4): 237-242.

TAKANO, R.; NOSE, Y.; HAYASHI, K.; HARA, S. e HIRASE, S. (1994) Agarose-Carrageenan Hybrid Polysaccharides from *Lomentaria catenata*. *Phytochemistry* 37(6): 1615-1619.

TAKANO, R.; SHIOMOTO, K.; KAMEI, K.; HARA, S. e HIRASE, S. (2003) Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrid in the florideophycidae. *Bot Mar* 46(2): 142-150.

TAKO, M. e NAKAMURA, S. (1986a) Indicative evidence for a conformational transition in kappa-carrageenan from studies of viscosity-shear rate dependence. *Carbohydr Res* 155: 200-205.

TAKO, M. e NAKAMURA, S. (1986b) Synergistic Interaction between kappa-carrageenan and locust-bean gum in aqueous-media. *Agr Biol Chem Tokyo* 50(11): 2817-2822.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. e KOHDA, Y. (1987) Indicative evidence for a conformational transition in iota-carrageenan. *Carbohydr Res* 161(2): 247-255.

TASENDE, M.G. (2000) Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Sci Mar* 64(4): 421-426.

THERKELSEN, G.H. (1993). Carrageenan. In: R.L. WHISTLER e J.N. BEMILLER (Eds.) *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. Academic Press, San Diego: 145-180.

THIÉRY, J.P. (1967) Mise em évidence des polysaccharide sur coupes fines em microscopie électronique. *J. Microsc* 6: 987-1018.

THOMSON, A.W. e FOWLER, E.F. (1981) Carrageenan - a Review of Its Effects on the Immune-System. *Agents Actions* 11(3): 265-273.

TOBACMAN, J.K. (2001) Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ Health Persp* 109(10): 983-994.

TOFFANIN, R.; KNUTSEN, S.H.; BERTOCCHI, C.; RIZZO, R. e MURANO, E. (1994) Detection of Cellulose in the Cell-Wall of Some Red Algae by C-13 Nmr-Spectroscopy. *Carbohydr Res* 262(1): 167-171.

TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T.; YAMAMOTO, K.; TAKATA, I.; NISHIDA, Y. e CHIBATA, I. (1979) Immobilization of Enzymes and Microbial-Cells Using Carrageenan as Matrix. *Biotechnol Bioeng* 21(10): 1697-1709.

TROELL, M.; RONNBACK, P.; HALLING, C.; KAUTSKY, N. e BUSCHMANN, A. (1999) Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *J Appl Phycol* 11(1): 89-97.

TRONO, G.C. (1999) Diversity of the seaweed flora of the Philippines and its utilization. *Hydrobiologia* 399: 1-6.

- TSEKOS, I. (1981) Growth and differentiation of the golgi-apparatus and wall formation during carposporogenesis in the Red Alga, *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *J Cell Sci* 52(DEC): 71-84.
- TSEKOS, I. (1982) Tumor-Like Growths Induced by Bacteria in the Thallus of a Red Alga, *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *Ann Bot-London* 49(1): 123-126.
- TSEKOS, I. (1983) The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour (Gigartinales, Rhodophyceae) - Gonimoblast cells and carpospores. *Flora* 174(3-4): 191-211.
- TSEKOS, I. (1996) The supramolecular organization of red algal cell membranes and their participation in the biosynthesis and secretion of extracellular polysaccharides: A review. *Protoplasma* 193(1-4): 10-32.
- TSEKOS, I. (1999) The sites of cellulose synthesis in algae: Diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes. *J Phycol* 35(4): 635-655.
- TSEKOS, I. e DIANNELIDIS, B.E. (1990) Mitochondrial Structure at 2 Different Stages of Carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Rhodophyta). *Flora* 184(1): 78-80.
- TSEKOS, I.; OKUDA, K. e BROWN, R.M. (1996a) The formation and development of cellulose-synthesizing linear terminal complexes (TCs) in the plasma membrane of the marine red alga *Erythrocladia subintegra* Rosenv. *Protoplasma* 193(1-4): 33-45.
- TSEKOS, I.; OROLOGAS, N. e HERTH, W. (1999) Cellulose microfibril assembly and orientation in some bangiophyte red algae: relationship between synthesizing terminal complexes and microfibril structure, shape, and dimensions. *Phycologia* 38(3): 217-224.
- TSEKOS, I. e REISS, H.D. (1988) Freeze-Fractured Thylakoids of Some Marine Red Algae. *Phyton-Ann Rei Bot A* 28(2): 201-214.
- TSEKOS, I. e REISS, H.D. (1992) Occurrence of the Putative Microfibril-Synthesizing Complexes (Linear Terminal Complexes) in the Plasma-Membrane of the Epiphytic Marine Red Alga *Erythrocladia subintegra* Rosenv. *Protoplasma* 169(1-2): 57-67.
- TSEKOS, I. e REISS, H.D. (1993) The Supramolecular Organization of Red Algal Vacuole Membrane Visualized by Freeze-Fracture. *Ann Bot-London* 72(3): 213-222.
- TSEKOS, I. e REISS, H.D. (1994) Tip Cell-Growth and the Frequency and Distribution of Cellulose Microfibril-Synthesizing Complexes in the Plasma-Membrane of Apical Shoot Cells of the Red Alga *Porphyra yezoensis*. *J Phycol* 30(2): 300-310.
- TSEKOS, I.; REISS, H.D.; ORFANIDIS, S. e OROLOGAS, N. (1996b) Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New Phytol* 133(4): 543-551.

- TSEKOS, I.; REISS, H.D. e SCHNEPF, E. (1985) Occurrence of particle tetrads in the vacuole membrane of the marine Red Algae *Gigartina teedii* and *Ceramium rubrum*. *Naturwissenschaften* 72(9): 489-490.
- TSEKOS, I.; REISS, H.D. e SCHNEPF, E. (1993) Cell-Wall Structure and Supramolecular Organization of the Plasma-Membrane of Marine Red Algae Visualized by Freeze-Fracture. *Acta Bot Neerl* 42(2): 119-132.
- TSEKOS, I. e SCHNEPF, E. (1983) The Ultrastructure of Carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour - (Gigartinales, Rhodophyceae) - Auxiliary Cell, Cystocarpic Plant. *Flora* 173(1-2): 81-96.
- TSEKOS, I. e SCHNEPF, E. (1991) Acid-phosphatase-activity during spore differentiation of the Red Algae *Gigartina teedii* and *Chondria tenuissima*. *Plant Syst Evol* 176(1-2): 35-51.
- TSENG, C.K. (1945) The Terminology of Seaweed Colloids. *Science* 101(2633): 597-602.
- TSENG, C.K. (2001) Algal biotechnology industries and research activities in China. *J Appl Phycol* 13(4): 375-380.
- TURQUOIS, T.; ACQUISTAPACE, S.; VERA, F.A. e WELTI, D.H. (1996) Composition of carrageenan blends inferred from C-13-NMR and infrared spectroscopic analysis. *Carbohydr Polym* 31(4): 269-278.
- TURVEY, J.R. (1965) Sulfates of the simple sugars. 20: 183-218.
- TVETER, E. e MATHIESON, A.C. (1976) Sporeling Coalescence in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *J Phycol* 12(1): 110-118.
- USOV, A.I. (1984) Nmr-Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides - Agars, Carrageenans, and Xylans. *Bot Mar* 27(5): 189-202.
- USOV, A.I. (1992) Sulfated Polysaccharides of the Red Seaweeds. *Food Hydrocolloid* 6(1): 9-23.
- USOV, A.I. (1993) A New Chemical Tool for Characterization and Partial Depolymerization of Red Algal Galactans. *Hydrobiologia* 261: 641-645.
- USOV, A.I. (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloid* 12(3): 301-308.
- USOV, A.I. e KLOCHKOVA, N.G. (1992) Polysaccharides of Algae .45. Polysaccharide Composition of Red Seaweeds from Kamchatka Coastal Waters (Northwestern Pacific) Studied by Reductive Hydrolysis of Biomass. *Bot Mar* 35(5): 371-378.
- USOV, A.I.; YAROTSKY, S.V. e SHASHKOV, A.S. (1980) C-13-NMR Spectroscopy of Red Algal Galactans. *Biopolymers* 19(5): 977-990.

- VAN DE VELDE, F.; ANTIPOVA, A.S.; ROLLEMA, H.S.; BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; PEREIRA, L.; TROMP, R.H.; RUDOLPH, B. e GRINBERG, V.Y. (in press) The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research*.
- VAN DE VELDE, F. e DE RUITER, G.A. (2002). Carrageenan. In: E.J. VANDAMME; S.D. BAETS e A. STEINBÈUCHEL (Eds.) *Biopolymers v. 6. Polysaccharides II, polysaccharides from eukaryotes*. Wiley-VCH, Weinheim; Chichester: 245-274.
- VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A.I.; ROLLEMA, H.S. e CEREZO, A.S. (2002a) H-1 and C-13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci Tech* 13(3): 73-92.
- VAN DE VELDE, F.; LOURENCO, N.D.; PINHEIRO, H.M. e BAKKER, M. (2002b) Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Adv Synth Catal* 344(8): 815-835.
- VAN DE VELDE, F.; PEPPELMAN, H.A.; ROLLEMA, H.S. e TROMP, R.H. (2001) On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. *Carbohyd Res* 331(3): 271-283.
- VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L. e ROLLEMA, H.S. (2004) The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohyd Res* 339: 2309-2313.
- VAN DE VELDE, F.; ROLLEMA, H.S.; GRINBERG, N.V.; BUROVA, T.V.; GRINBERG, V.Y. e TROMP, R.H. (2002c) Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. *Biopolymers* 65(4): 299-312.
- VANDELLI, D. (1788) *Florae lusitaniae et brasiliensis specimen, Algae. Conimbricae* Vol. 68.
- VEIGA DE OLIVEIRA, E.; GALHANO, F. e PEREIRA, B. (1975) *Actividades agro-marítimas em Portugal*. Instituto de Alta Cultura, Lisboa, 236 pp.
- VIEIRA, V.V. e SANTOS, M. (1995) *Directório de aquacultura e biotecnologia marinha*. Escola Superior de Biotecnologia da Univ. Católica Portuguesa, Porto, 113 pp.
- VILLANUEVA, R.D.; MENDOZA, W.G.; RODRIGUEZA, M.R.C.; ROMERO, J.B. e MONTANO, M.N.E. (2004) Structure and funcional performance of gigartinacean kappa-iota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. *Food Hydrocolloid* 18: 283-292.
- VILLANUEVA, R.D. e MONTANO, M.N.E. (2003) Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (Sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *J Phycol* 39: 513-518.
- VREELAND, V. (1970) Localization of a cell wall polysaccharide in a Brown Alga with labeled antibody. *J Histochem Cytochem* 18(5): 371-380.
- VREELAND, V. (1972) Immunocytochemical localization of extracellular polysaccharide alginic acid in Brown Seaweed, *Fucus distichus*. *J Histochem Cytochem* 20(5): 358-363.

VREELAND, V. e KLOAREG, B. (2000) Cell wall biology in red algae: Divide and conquer. *J Phycol* 36(5): 793-797.

VREELAND, V. e LAETSCH, W.M. (1989) Identification of associating carbohydrate sequences with labeled oligosaccharides - Localization of alginate-gelling subunits in cells walls of a Brown Alga. *Planta* 177(4): 423-434.

VREELAND, V.; SLOMICH, M. e LAETSCH, W.M. (1984) Monoclonal-Antibodies as Molecular Probes for Cell-Wall Antigens of the Brown Alga, Fucus. *Planta* 162(6): 506-517.

VREELAND, V.; ZABLACKIS, E.; DOBOSZEWSKI, B. e LAETSCH, W.M. (1987) Molecular markers for marine algal polysaccharides. *Hydrobiologia* 151: 155-160.

VREELAND, V.; ZABLACKIS, E. e LAETSCH, W.M. (1992) Monoclonal-antibodies as molecular markers for the intracellular and cell-wall distribution of carrageenan epitopes in *Kappaphycus* (Rhodophyta) during tissue-development. *J Phycol* 28(3): 328-342.

WEINER, M.L. (1991) Toxicological Properties of Carrageenan. *Agents Actions* 32(1-2): 46-51.

WHITNEY, S.E.C.; GOTHARD, M.G.E.; MITCHELL, J.T. e GIDLEY, M.J. (1999) roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology* 121: 657-663.

WHYTE, J.N.C.; FOREMAN, R.E. e DEWREEDE, R.E. (1984) Phycocolloid screening of British-Columbia Red Algae. *Hydrobiologia* 116(SEP): 537-541.

WHYTE, J.N.C.; HOSFORD, S.P.C. e ENGLAR, J.R. (1985) Assignment of Agar or Carrageenan Structures to Red Algal Polysaccharides. *Carbohyd Res* 140(2): 336-341.

WILLIAMS, D.H. e FLEMING, I. (1980) Spectroscopic methods in organic chemistry. McGraw-Hill, London, 251 pp.

WONG, K.F. e CRAIGIE, J.S. (1977) Enzymic Conversion of Mu to Kappa-Carrageenan by a Sulfohydrolase from *Chondrus-Crispus*. *Plant Physiol* 59(6): 6-6.

WONG, K.F. e CRAIGIE, J.S. (1978) Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *Plant Physiol* 61(4): 663-666.

WU, C.Y. (1998). The seaweed resources of China. In: A.T. CRITCHLEY e M. OHNO (Eds.) *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka: 34-46.

WU, Y. (1996). Ph.D. dissertation. PhD dissertation, Michigan Technological University, Houghton, Michigan, 120 pp.

- YAMADA, T.; OGAMO, A.; SAITO, T.; WATANABE, J.; UCHIYAMA, H. e NAKAGAWA, Y. (1997) Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohyd Polym* 32(1): 51-55.
- YAPHE, W. (1959) The determination of k-carrageenin as a factor in the classification of the Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* 37: 751-757.
- YAPHE, W. e ARSENAUL, G.P. (1965) Improved Resorcinol Reagent for Determination of Fructose and of 3,6-Anhydrogalactose in Polysaccharides. *Anal Biochem* 13(1): 143-148.
- YAPHE, W. e BAXTER, B. (1955) The Enzymic Hydrolysis of Carrageenin. *Appl Microbiol* 3(6): 380-383.
- YAROTSKY, S.V.; SHASHKOV, A.S. e USOV, A.I. (1977) Analysis of C-13-Nmr Spectra of Some Red Seaweed Galactans. *Bioorg Khim+* 3(8): 1135-1137.
- YUGUCHI, Y.; THUY, T.T.T.; URAKAWA, H. e KAJIWARA, K. (2002) Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloid* 16(6): 515-522.
- YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H. e KAJIWARA, K. (2003) Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. *Food Hydrocolloid* 17(4): 481-485.
- ZABLACKIS, E.; VREELAND, V.; DOBOSZEWSKI, B. e LAETSCH, W.M. (1991) Differential localization of carrageenan gelling sequences in *Kappaphycus alvarezii* var *tambalang* (Rhodophyta) with fitc-conjugated carrageenan oligosaccharides. *J Phycol* 27(2): 241-248.
- ZABLACKIS, E.; VREELAND, V. e KLOAREG, B. (1993) Isolation of protoplasts from *Kappaphycus alvarezii* var *tambalang* (Rhodophyta) and secretion of iota-carrageenan fragments by cultured-cells. *J Exp Bot* 44(266): 1515-1522.
- ZACHAROPOULOS, V.R. e PHILLIPS, D.M. (1997) Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. *Clin Diagn Lab Immun* 4(4): 465-468.
- ZAR, J.H. (1996) Biostatistical Analysis. Prentice Hall International Editions, London, 662 p.
- ZINOUN, M. (1993). Etudes biochimiques des polysaccharides parietaux produits par deux Gigartinales (Rhodophycées) des cotes de la Mache, *in situ* et en cultures contrôlées: *Calliblepharis jubata* et *Gigartina teedii*. Tese de Doutorado em Ciências, Université de Technologie de Compiègne, 219 pp.
- ZINOUN, M. e COSSON, J. (1996) Seasonal variation in growth and carrageenan content of *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae, Gigartinales) from the Normandy coast, France. *J Appl Phycol* 8(1): 29-34.
- ZINOUN, M.; COSSON, J. e DESLANDES, E. (1993a) Influence of Culture Conditions on Growth and Physicochemical Properties of Carrageenans in *Gigartina teedii* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Bot Mar* 36(2): 131-136.

ZINOUN, M.; COSSON, J. e DESLANDES, E. (1993b) Physicochemical characterization of carrageenan from *Gigartina teedii* (Rooth) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 5(1): 23-28.

ZINOUN, M.; DIOURIS, M.; POTIN, P.; FLOCH, J.Y. e DESLANDES, E. (1997) Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata*. *Bot Mar* 40(1): 49-53.

Anexo I

Lista das algas colhidas

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
001	29-09-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF		40.7	
002	29-09-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T		23.1	
003	29-09-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF		57.4	
004	29-09-2000	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB		20.2	
005	29-09-2000	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	GF		21.0	
006	29-09-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF		38.5	
007	29-09-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF		35.9	
008	29-09-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T		30.4	
009	09-03-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T		24.9	IR e RMN
010	09-03-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF		28.0	IR e RMN
011	09-03-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF		32.1	
012	09-03-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T		25.2	
013	16-10-2000	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	29.0	25.0	
014	16-10-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	23.0	23.7	
015	16-10-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.0	27.6	
016	16-10-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	21.0	20.0	RMN
017	16-10-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	13.3	35.9	
018	16-10-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	10.8	38.8	
019	16-10-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	13.1	31.7	RMN
020	16-10-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	18.9	24.9	
021	16-10-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.3	36.7	
022	26-10-2000	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	24.7	38.0	
023	26-10-2000	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	20.0	29.0	
024	26-10-2000	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	11.9	4.3	
025	14-11-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	23.9	41.7	
026	14-11-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	27.4	30.7	
027	14-11-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	25.0	28.2	
028	14-11-2000	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	T	37.5	36.6	
029	14-11-2000	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	28.2	21.7	
030	14-11-2000	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	33.3	30.0	
031	14-11-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	21.0	26.4	
032	14-11-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	25.0	27.0	
033	14-11-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	21.2	31.0	
034	14-11-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	18.1	28.0	
035	14-11-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	18.0	38.1	
036	14-11-2000	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	33.6	6.0	IR
037	14-11-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	26.0	15.8	
038	14-11-2000	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	26.0	4.3	
039	14-11-2000	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	28.0	15.1	
040	13-12-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	17.1	29.8	
041	13-12-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	19.0	23.5	
042	13-12-2000	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	16.4	32.7	
043	13-12-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.0	24.8	
044	13-12-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.0	27.0	
045	13-12-2000	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	24.0	14.0	IR
046	13-12-2000	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	8.3	4.1	
047	13-12-2000	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	30.0	14.8	
048	13-12-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	24.3	22.7	
049	13-12-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	24.6	34.1	
050	13-12-2000	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	23.9	31.7	
051	02-01-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	20.6	29.5	
052	02-01-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	24.0	18.7	
053	02-01-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	24.0	24.3	
054	02-01-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	21.0	15.7	
055	02-01-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	29.0	15.1	
056	02-01-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	10.5	4.0	
057	02-01-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	8.1	9.7	
058	02-01-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	15.2	29.4	
059	02-01-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	16.6	28.5	
060	02-01-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	12.4	41.3	
061	02-01-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.1	33.9	

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
062	26-02-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	12.4	10.0	
063	26-02-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	9.2	18.5	
064	26-02-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	20.6	42.6	
065	26-02-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	20.3	23.7	
066	26-02-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	24.0	33.8	IR
067	26-02-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	23.0	23.2	
068	26-02-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	18.0	38.1	
069	26-02-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	25.0	23.2	IR
070	26-02-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	16.6	41.8	
071	26-02-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	14.2	23.0	
072	26-02-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	31.0	19.4	
073	11-03-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	10.2	7.6	
074	11-03-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	7.6	10.8	IR
075	11-03-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	13.9	37.5	
076	11-03-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	13.0	34.0	
077	11-03-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	15.0	36.0	
078	11-03-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.0	21.2	
079	11-03-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	22.0	30.3	
080	11-03-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	20.0	29.0	
081	11-03-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	28.9	20.2	
082	11-03-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	18.9	49.8	
083	11-03-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	19.8	51.0	
084	24-04-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	8.5	24.2	IR, RMN
085	24-04-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	8.6	20.0	
086	24-04-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	T	8.9	21.5	
087	24-04-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	12.8	41.0	
088	24-04-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	13.9	44.4	IR (alga seca e moída)
089	24-04-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	12.0	30.0	
090	24-04-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	21.3	30.0	RMN
091	24-04-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	23.2	50.0	
092	24-04-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	20.0	45.0	
093	24-04-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	T	20.0	45.0	
094	24-04-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	20.8	29.1	
095	24-04-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	23.5	36.7	
096	24-04-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	28.1	18.5	
097	24-04-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	30.0	12.2	
098	24-04-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.1	15.7	
099	20-05-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	T	11.2	28.4	IR, RMN
100	20-05-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	11.4	40.4	
101	20-05-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	10.1	17.6	RMN
102	20-05-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	11.6	30.0	
103	20-05-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	15.8	43.7	
104	20-05-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	15.8	35.7	
105	20-05-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	30.0	18.7	SEC-MALLS
106	20-05-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	26.2	36.6	IR, Raman
107	20-05-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	22.4	11.5	
108	20-05-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	25.3	35.0	
109	20-05-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	23.1	47.8	
110	20-05-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	21.0	15.0	
111	21-06-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	21.2	12.0	
112	21-06-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	14.7	32.1	IR, Raman, RMN
113	21-06-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	14.9	43.6	IR, Raman, RMN
114	21-06-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	27.0	24.5	IR, Raman, RMN
115	21-06-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	12.6	23.3	
116	21-06-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	11.4	10.0	
117	21-06-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	21.6	40.0	
118	21-06-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	18.5	30.0	
119	21-06-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.3	30.0	
120	21-06-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	22.3	30.0	
121	07-09-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	24.6	41.4	
122	07-09-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	18.1	2.9	
123	07-09-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	18.0	38.7	
124	07-09-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	18.1	44.9	RMN
125	07-09-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	19.5	57.0	
126	07-09-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	23.8	49.9	
127	07-09-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	21.1	36.0	
128	07-09-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	19.4	28.1	

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
129	07-09-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	14.3	35.8	
130	07-09-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	14.9	30.0	
131	07-09-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	15.5	35.6	RMN
132	07-09-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	23.8	10.6	RMN
133	07-09-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	21.2	30.0	
134	07-09-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	20.7	51.5	
135	18-10-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	17.7	34.9	
136	18-10-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	13.0	39.0	
137	18-10-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	17.9	28.0	
138	18-10-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.0	10.3	
139	18-10-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	27.9	25.0	
140	18-10-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.5	40.2	
141	18-10-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	22.7	31.2	
142	18-10-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	21.1	20.0	
143	18-10-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	11.8	31.7	
144	18-10-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	14.8	35.9	
145	18-10-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	13.0	5.5	
146	18-10-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	19.4	9.1	
147	18-10-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	5.3	5.0	
148	30-11-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	9.0	7.9	
149	30-11-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	7.6	11.0	
150	30-11-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	18.9	37.0	
151	30-11-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.1	24.7	
152	30-11-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	18.9	37.8	
153	30-11-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	28.2	51.0	
154	30-11-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	21.7	10.0	
155	30-11-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	22.4	40.2	
156	30-11-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	20.6	33.5	
157	30-11-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	14.4	30.7	
158	30-11-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	12.7	41.7	
159	30-11-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	9.3	28.2	
160	30-11-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	11.4	6.6	
161	30-11-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	24.4	10.0	
162	06-08-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF/T	18.5	28.0	
163	06-08-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	18.1	28.1	IR
164	06-08-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	14.2	36.6	
165	06-08-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	13.8	44.7	
166	06-08-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	10.1	33.2	
167	06-08-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	23.7	49.0	
168	06-08-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	22.1	36.8	
169	06-08-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	15.0	23.1	SEC-MALLS
170	06-08-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	23.6	10.3	IR
171	06-08-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	19.3	45.4	
172	06-08-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.8	59.7	RMN
173	06-08-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	16.7	11.0	
174	06-08-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	20.9	11.5	IR, RMN
175	06-08-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	12.2	13.7	
176	06-08-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	11.4	18.5	
177	06-08-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	23.1	30.0	RMN, SEC-MALLS
178	06-08-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	20.1	45.4	
179	06-08-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	17.5	42.5	
180	18-10-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	18.8	49.8	
181	18-10-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	20.0	61.1	IR, Raman, RMN, SEC-MALLS
182	14-07-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	9.6	19.0	
183	14-07-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	12.4	24.8	
184	14-07-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	13.3	58.0	
185	14-07-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	9.4	35.7	
186	14-07-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	12.3	37.1	
187	14-07-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	32.2	44.0	
188	14-07-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	NF	22.1	31.5	
189	14-07-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	25.9	42.4	
190	14-07-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	21.6	35.3	
191	14-07-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.3	53.2	
192	14-07-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	20.7	20.6	
193	14-07-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	23.2	27.0	
194	14-07-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	21.5	13.5	IR, RMN

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
195	14-07-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	21.1	15.7	
196	14-07-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	29.1	23.4	
197	21-06-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	14.6	22.7	IR, Raman
198	21-06-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	21.9	29.4	
199	21-06-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	19.7	14.9	
200	21-06-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	12.7	13.5	
201	21-06-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	11.4	10.0	
202	21-06-2001	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	29.1	10.5	RMN
203	21-06-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	18.5	28.0	
204	21-06-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	18.1	51.5	
205	21-06-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	36.0	40.6	
206	15-12-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.5	41.0	
207	15-12-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.9	33.2	
208	15-12-2001	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	24.3	39.5	
209	15-12-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	29.6	35.5	
210	15-12-2001	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	22.8	39.7	
211	15-12-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	15.8	24.0	RMN
212	15-12-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	11.5	26.2	Raman, RMN
213	15-12-2001	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	16.9	29.0	
214	15-12-2001	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	33.0	31.7	
215	15-12-2001	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	16.3	11.2	RMN
216	15-01-2002	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	25.0	14.0	IR, RMN
217	15-01-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	21.3	34.0	
218	15-01-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	21.5	26.9	
219	15-12-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	7.6	4.1	
220	15-12-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	9.0	10.5	
221	15-12-2001	Buarcos	<i>C. jubata</i>	T	8.3	7.3	
222	15-01-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	18.1	46.4	
223	15-01-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	13.3	38.2	
224	15-01-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	15.6	40.0	
225	15-01-2002	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	NF	22.1	35.4	
226	15-01-2002	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	GF	34.5	35.5	
227	30-12-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	27.8	54.3	
228	30-12-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	23.9	49.0	IR, Raman
228b	30-12-2001	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	21.5	26.9	
229	15-01-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	24.6	32.5	IR
230	15-01-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	28.2	39.1	RMN
230b	15-01-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.9	39.2	
231	15-01-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	8.0	10.3	RMN
232	15-01-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	T	7.9	13.4	
233	15-01-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	8.3	12.9	
234	15-01-2002	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	G	30.6	22.5	RMN
235	15-01-2002	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	19.5	12.0	
236	15-01-2002	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	23.9	10.0	
237	19-02-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	8.0	9.5	
238	19-02-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	8.6	9.6	
239	20-03-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	19.4	49.8	IR
240	20-03-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	21.0	35.5	RMN
241	20-03-2002	Buarcos	<i>Grateloupia doryphora</i>	-	10.32	16.4	
242	20-03-2002	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	32.3	7.4	RMN
243	20-03-2002	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	20.2	15.6	RMN
244	16-04-2002	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.1	15.7	IR
245	16-04-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	22.4	51.1	IR, Raman
246	16-04-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	23.0	55.5	
247	12-06-2002	Aguda	<i>C. jubata</i>	NF	10.4	20.0	
248	12-06-2002	Aguda	<i>C. jubata</i>	GF	8.6	32.3	
249	12-06-2002	Aguda	<i>C. jubata</i>	T	8.3	9.5	
250	12-06-2002	Aguda	<i>M. stellatus</i>	G	23.0	3.3	
251	12-06-2002	Aguda	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	15.3	47.0	
252	12-06-2002	Aguda	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	11.6	44.0	
253	12-06-2002	Aguda	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	12.4	68.0	
254	12-06-2002	Aguda	<i>G. crenulatus</i>	TB	14.9	12.3	
255	12-06-2002	Aguda	<i>G. pistillata</i>	T	20.4	48.7	
256	12-06-2002	Aguda	<i>G. pistillata</i>	GF	20.4	42.0	
257	12-06-2002	Aguda	<i>C. crispus</i>	NF	19.6	21.6	
258	12-06-2002	Aguda	<i>C. crispus</i>	T	22.7	13.5	

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
259	12-06-2002	Aguda	<i>C. crispus</i>	GF	19.7	12.8	
260	13-06-2002	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	26.4	12.0	
261	26-06-2002	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	18.4	2.9	
262	29-06-2002	Lavadores	<i>C. crispus</i>	T	26.1	25.0	
263	29-06-2002	Lavadores	<i>C. crispus</i>	NF	22.6	14.5	
264	29-06-2002	Lavadores	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	13.1	21.6	
265	29-06-2002	Lavadores	<i>M. stellatus</i>	GF	26.5	14.3	
266	29-06-2002	Lavadores	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	11.8	32.9	
267	29-06-2002	Lavadores	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	10.6	10.0	
268	29-06-2002	Lavadores	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	9.2	13.0	
269	13-07-2002	Lavadores	<i>M. stellatus</i>	NF	23.3	7.2	
270	13-07-2002	Lavadores	<i>C. crispus</i>	NF	22.3	14.5	
271	13-07-2002	Lavadores	<i>C. crispus</i>	T	26.6	25.0	
272	13-07-2002	Lavadores	<i>C. crispus</i>	GF	25.3	9.5	
273	12-07-2002	Miramar	<i>C. jubata</i>	NF	12.0	34.5	
274	12-07-2002	Miramar	<i>C. jubata</i>	GF	13.4	25.2	
275	12-07-2002	Miramar	<i>C. jubata</i>	T	13.8	9.2	
276	12-07-2002	Miramar	<i>C. crispus</i>	NF	24.7	35.9	
277	12-07-2002	Miramar	<i>C. crispus</i>	T	26.2	18.2	
278	12-07-2002	Miramar	<i>C. crispus</i>	GF	24.2	10.0	
279	12-07-2002	Miramar	<i>M. stellatus</i>	G	24.2	6.4	
280	12-07-2002	Miramar	<i>A. devoniensis</i>	G	19.4	18.0	RMN
281	12-07-2002	Miramar	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.3	16.7	
282	12-07-2002	Miramar	<i>Grateloupia filicina</i>	T	22.8	6.5	
283	13-07-2002	Valadares	<i>Grateloupia filicina</i>	G	21.0	7.0	
284	13-07-2002	Valadares	<i>C. jubata</i>	T	12.5	10.2	
285	13-07-2002	Valadares	<i>C. jubata</i>	GF	14.3	26.0	
286	13-07-2002	Valadares	<i>C. jubata</i>	NF	9.6	33.0	
287	13-07-2002	Valadares	<i>M. stellatus</i>	G	31.2	7.0	
288	13-07-2002	Valadares	<i>C. crispus</i>	T	26.3	41.9	
289	13-07-2002	Valadares	<i>C. crispus</i>	NF	24.9	14.8	
290	13-07-2002	Valadares	<i>C. crispus</i>	GF	23.5	9.6	
291	13-07-2002	Valadares	<i>G. crenulatus</i>	TB	23.0	23.3	
292	13-07-2002	Valadares	<i>G. pistillata</i>	GF	27.1	42.0	
293	13-07-2002	Valadares	<i>G. pistillata</i>	T	25.8	30.6	
294	13-07-2002	Valadares	<i>G. pistillata</i>	NF	25.8	21.3	
295	13-07-2002	Valadares	<i>A. devoniensis</i>	G	19.0	5.3	
296	13-07-2002	Valadares	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	10.1	10.0	
297	13-07-2002	Valadares	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	11.4	14.0	
298	13-07-2002	Valadares	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	12.2	33.5	
299	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	14.3	-	Enviadas p/F
300	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	14.0	-	Enviadas p/F
301	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	15.5	-	Enviadas p/F
302	26-08-2002	SPedro Moel	<i>C. crispus</i>	NF	23.4	14.1	
303	26-08-2002	SPedro Moel	<i>C. crispus</i>	T	27.0	18.4	
304	26-08-2002	SPedro Moel	<i>C. crispus</i>	GF	20.9	7.4	
305	26-08-2002	SPedro Moel	<i>G. pistillata</i>	GF	27.7	52.0	
306	26-08-2002	SPedro Moel	<i>G. pistillata</i>	NF	27.8	52.7	
307	26-08-2002	SPedro Moel	<i>G. pistillata</i>	T	27.5	29.8	
308	26-08-2002	SPedro Moel	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.8	3.0	
309	26-08-2002	SPedro Moel	<i>A. devoniensis</i>	G	17.0	3.0	
310	23-08-2002	Baleal	<i>G. crenulatus</i>	TB	18.0	4.0	
311	23-08-2002	Baleal	<i>A. devoniensis</i>	G	18.0	4.7	
312	23-08-2002	Baleal	<i>C. jubata</i>	-	-	-	
313	23-08-2002	Baleal	<i>C. acicularis</i>	-	17.2	57.0	
314	23-08-2002	Baleal	<i>C. teedei</i>	GF	12.3	32.0	
315	23-08-2002	Baleal	<i>C. teedei</i>	T	14.6	49.0	
316	23-08-2002	Baleal	<i>C. teedei</i>	NF	12.4	31.9	
317	24-08-2002	S. M. Porto	<i>G. pistillata</i>	GF	28.0	51.0	
318	24-08-2002	S. M. Porto	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.6	3.8	
319	24-08-2002	S. M. Porto	<i>M. stellatus</i>	G	24.0	3.0	
320	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>M. stellatus</i>	G	28.2	10.7	
321	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. crispus</i>	NF	22.7	36.5	
322	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. crispus</i>	T	25.3	21.4	
323	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>A. devoniensis</i>	G	-	-	
324	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	10.7	42.2	

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
325	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	12.1	14.2	
326	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	12.3	52.6	
327	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. jubata</i>	NF	10.7	33.0	
328	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>C. jubata</i>	GF	12.2	12.6	
329	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>G. crenulatus</i>	TB	23.6	23.3	
330	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>G. pistillata</i>	T	23.8	25.0	
331	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>G. pistillata</i>	H	26.3	26.8	
332	26-07-2002	A-Ver-o-Mar	<i>G. pistillata</i>	NF	24.5	27.7	
333	11-09-2002	Afife	<i>M. stellatus</i>	G	27.3	9.8	
334	11-09-2002	Afife	<i>G. pistillata</i>	GF	21.5	25.2	
335	11-09-2002	Afife	<i>G. pistillata</i>	T	22.2	31.8	
336	11-09-2002	Afife	<i>G. pistillata</i>	NF	20.4	10.0	
337	11-09-2002	Afife	<i>C. crispus</i>	NF	28.5	20.8	
338	11-09-2002	Afife	<i>C. crispus</i>	T	28.5	27.5	
339	11-09-2002	Afife	<i>A. devoniensis</i>	G	17.7	1.0	
340	11-09-2002	Afife	<i>G. crenulatus</i>	TB	15.3	26.1	
341	13-08-2002	P. do Norte	<i>G. pistillata</i>	T	27.0	59.6	
342	13-08-2002	P. do Norte	<i>G. pistillata</i>	GF	27.3	28.0	
343	13-08-2002	P. do Norte	<i>G. pistillata</i>	NF	26.7	65.4	
344	13-08-2002	P. do Norte	<i>G. pistillata</i>	H	28.0	26.5	
345	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. crispus</i>	GF	26.1	13.8	
346	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. crispus</i>	NF	26.7	12.5	
347	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. crispus</i>	T	28.0	13.8	
348	13-08-2002	P. do Norte	<i>M. stellatus</i>	GF	29.2	11.8	
349	13-08-2002	P. do Norte	<i>M. stellatus</i>	NF	28.4	16.9	
350	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. acicularis</i>	-	25.0	39.0	
351	13-08-2002	P. do Norte	<i>G. crenulatus</i>	TB	18.8	19.2	
352	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. jubata</i>	NF	12.3	24.0	
353	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. jubata</i>	GF	14.7	27.0	
354	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	22.6	10.8	
355	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	13.7	25.0	
356	13-08-2002	P. do Norte	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	20.0	14.6	
357	11-08-2002	Buarcos	<i>M. stellatus</i>	GF	31.7	6.3	
358	11-08-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	23.1	27.0	
359	11-08-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	24.0	20.6	Raman (alga seca e moída)
360	11-08-2002	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	25.4	26.2	
361	11-08-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	H	27.4	22.9	
362	11-08-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	29.6	60.0	
363	11-08-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	27.5	29.8	
364	11-08-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	NF	27.8	63.8	
365	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	17.1	49.0	
366	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	18.7	41.2	
367	11-08-2002	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	15.3	26.2	Raman, RMN
368	11-08-2002	Buarcos	<i>C. acicularis</i>	-	20.5	45.9	
369	11-08-2002	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	21.1	6.6	
370	11-08-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	14.2	24.7	
371	11-08-2002	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	14.3	33.0	
372	11-08-2002	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	18.4	12.1	
373	08-10-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF			P/ cultura
374	08-10-2002	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T			P/ cultura
375	13-08-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	GF	22.4	11.8	
376	13-08-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	T	27.2	31.7	
377	13-08-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	NF	25.4	31.3	
378	13-08-2002	Moledo	<i>G. crenulatus</i>	TB	24.6	3.0	
379	13-08-2002	Moledo	<i>A. devoniensis</i>	G	19.0	7.9	
380	13-08-2002	Moledo	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	14.9	23.0	
381	13-08-2002	Moledo	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	16.0	17.5	
382	13-08-2002	Moledo	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	15.9	16.4	
383	13-08-2002	Moledo	<i>M. stellatus</i>	GF	36.9	15.1	
384	13-08-2002	Moledo	<i>M. stellatus</i>	NF	36.6	14.8	
385	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	14.0	51.7	
386	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>G. pistillata</i>	T	28.0	24.0	
387	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>G. pistillata</i>	NF	29.3	52.0	
388	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>C. acicularis</i>	-	20.8	43.9	
389	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>G. crenulatus</i>	TB	17.2	2.1	
390	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>M. stellatus</i>	G	26.6	12.0	

Código	Data colheita	Local	Espécie	Geração	Peso seco (% peso fresco)	Conteúdo carragenana (% peso seco)	Obs.
391	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>C. crispus</i>	GF	25.7	21.4	
392	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>C. crispus</i>	NF	26.0	42.9	
393	13-08-2002	V. P. Ancora	<i>C. crispus</i>	T	28.6	35.7	
394	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	22.9	17.1	
395	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	10.7	31.7	
396	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	20.0	17.0	
397	26-07-2002	Aguçadoura	<i>G. pistillata</i>	NF	30.0	40.6	
398	26-07-2002	Aguçadoura	<i>G. pistillata</i>	GF	29.1	40.0	
399	26-07-2002	Aguçadoura	<i>G. pistillata</i>	T	33.3	27.2	
400	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. jubata</i>	NF	14.5	20.6	
401	26-07-2002	Aguçadoura	<i>M. stellatus</i>	G	29.5	4.0	
402	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. crispus</i>	GF	26.6	19.3	
403	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. crispus</i>	NF	21.4	18.1	
404	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. crispus</i>	T	25.3	40.4	
405	26-07-2002	Aguçadoura	<i>C. acicularis</i>	-	23.6	25.8	
406	26-07-2002	Aguçadoura	<i>G. crenulatus</i>	TB	20.9	7.6	
407	11-09-2002	Moledo	<i>M. stellatus</i>	GF	36.9	15.1	
408	11-09-2002	Moledo	<i>M. stellatus</i>	NF	36.6	14.8	
409	11-09-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	NF	-	31.3	
410	11-09-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	T	-	17.8	
411	11-09-2002	Moledo	<i>C. crispus</i>	GF	-	11.8	
412	20-03-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	Seca e moída		IR
413	20-03-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	Seca e moída		IR
414	20-03-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Despigment., seca e moída		IR, Raman
415	16-04-2003	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	Despigment., seca e moída		Raman
416	16-04-2003	Buarcos	<i>C. jubata</i>	NF	Despigment., seca e moída		Raman
417	16-04-2003	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	Despigment., seca e moída		Raman
418	16-04-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Despigment., seca e moída		Raman
419	16-04-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	Despigment., seca e moída		Raman
420	03-06-2003	Buarcos	<i>C. jubata</i>	GF	Despigment., seca e moída		Raman
421	03-06-2003	Buarcos	<i>A. devoniensis</i>	G	Despigment., seca e moída		Raman
422	03-06-2003	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	Despigment., seca e moída		Raman
423	03-06-2003	Buarcos	<i>C. crispus</i>	GF	Despigment., seca e moída		Raman
424	03-06-2003	Buarcos	<i>C. crispus</i>	NF	Seca e moída		IR
425	03-06-2003	Buarcos	<i>C. crispus</i>	T	Seca e moída		IR
426	03-06-2003	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	Seca e moída		IR
427	03-06-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	Seca e moída		IR, Raman
428	03-06-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	Seca/moída, extracção aquosa		IR, Raman, RMN, SEC-MALLS
429	03-06-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Seca e moída		IR
430	03-06-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	Seca/moída, extracção aquosa		IR, Raman, RMN, SEC-MALLS
431	27-11-2003	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	GF	Seca/moída, extracção aquosa		Raman, RMN
432	27-11-2003	Buarcos	<i>G. pistillata</i>	T	Extracção aquosa e alcalina		RMN, SEC-MALLS
433	27-11-2003	Buarcos	<i>Grateloupia doryphora</i>	-	Seca e moída		IR
434	27-11-2003	Buarcos	<i>G. crenulatus</i>	TB	Seca e moída		IR
435	20-03-2003	Buarcos	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	Extracção aquosa		RMN, SEC-MALLS
436	26-07-2002	Apúlia	<i>C. crispus</i>	GF	26.6	19.3	
437	26-07-2002	Apúlia	<i>C. crispus</i>	NF	26.7	18.1	
438	26-07-2002	Apúlia	<i>C. crispus</i>	T	25.9	13.8	
439	26-07-2002	Apúlia	<i>M. stellatus</i>	GF	29.0	10.7	
440	26-07-2002	Apúlia	<i>M. stellatus</i>	NF	29.2	11.8	
441	26-07-2002	Apúlia	<i>G. crenulatus</i>	TB	22.0	12.0	
442	26-07-2002	Apúlia	<i>C. jubata</i>	NF	12.3	20.6	
443	26-07-2002	Apúlia	<i>C. jubata</i>	GF	12.2	26.0	
444	26-07-2002	Apúlia	<i>G. pistillata</i>	GF	27.3	40.0	
445	26-07-2002	Apúlia	<i>G. pistillata</i>	T	33.3	27.7	
446	26-07-2002	Apúlia	<i>G. pistillata</i>	NF	26.7	40.2	
447	26-07-2002	Apúlia	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	T	22.6	11.0	
448	26-07-2002	Apúlia	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	GF	22.9	17.0	
449	26-07-2002	Apúlia	<i>C. teedei</i> var. <i>lusitanicus</i>	NF	20.0	14.6	
Xa	2 meses de cultura		<i>M. stellatus</i>	G	Cultura laboratorial		Raman
Xb	2 meses de cultura		<i>M. stellatus</i>	G	Cultura laboratorial		RMN

Anexo II

Utilização das carragenanas

Aplicações na área alimentar

Na União Europeia é feita a distinção entre a carragenana refinada e a carragenana semi-refinada (SRC, PES). As autoridades europeias aprovaram o uso do código E407 para designar a carragenana refinada e o código E407a para a carragenana semi-refinada (lista de agentes emulsionantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes permitidos (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/flav_index_en.html). A opinião do comité científico europeu, na área alimentar, pode ser consultada em <http://www.cybercolloids.net/news/EU-carrageenan-opinion.pdf> (SCF, 2003).

Nos Estados Unidos da América (EUA) as carragenanas são reconhecidas, pelos especialistas da “Food and Drug Administration” (21CFR 182.7255), como GRAS (“generally recognised as safe”), tendo sido aprovadas como aditivo alimentar (21 CFR 172.620). Consultar a base de dados dos aditivos alimentares, EAFUS, da U.S. Food & Drug Administration, em <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization), pela voz dos especialistas em alimentos e aditivos, concluiu que não era necessário especificar um limite para a dose diária máxima em carragenanas (<http://www.who.int/pcs/jecfa/trs909.pdf>) (FAO/WHO, 2001).

Estes pareceres técnicos e regulamentações permitem que a carragenana seja usada, com segurança, na área alimentar. O uso de carragenana em aplicações alimentares foi recentemente revisto no “Handbook of Hydrocolloids” (Imeson, 2000). As principais aplicações nesta área encontram-se sumariadas na Tabela 1.8 (capítulo “Introdução”).

Indústria dos produtos lácteos e confeitaria

A principal indústria alimentar, no que respeita ao uso de carragenanas, é a indústria dos derivados lácteos. Em geral são usadas pequenas quantidades de carragenana, que variam entre 0.01 e 0.05% (Puvanenthiran *et al.*, 2000). Por exemplo, a adição de carragenana kappa (0.01 a 0.04%) ao queijo evita a separação do soro; uma quantidade idêntica de carragenana, adicionada aos gelados, também evita a separação dos seus diferentes componentes e evita a formação de cristais de gelo. O cacau presente no leite achocolatado pode ser mantido em suspensão pela adição de pequenas quantidades de carragenana kappa. As misturas solúveis de cacau ou chocolate possuem na sua composição carragenana lambda para que, quando adicionadas ao leite ou à água, se dissolvam facilmente. Para além disso, a carragenana lambda permite estabilizar as partículas de cacau no leite e aumentar (potenciar) o seu sabor, tornando a bebida mais agradável. A carragenana lambda (0.2 a 0.3%) pode melhorar as bebidas lácteas com café, prevenindo a separação da matéria gorda. Algumas embalagens pequenas com leite UHT têm carragenana kappa de forma a evitar a separação da fracção proteica. A carragenana lambda ou kappa podem ser adicionadas a cremes lácteos naturais (batidos de leite) para ajudar a diminuir o valor calórico, incorporando ar quando estes são agitados (Imeson, 2000).

A pesquisa e a produção de novos produtos com elevado valor acrescentado, constitui um desafio constante para as empresas produtoras de carragenanas. Um novo

mercado na área alimentar surgiu na década de 90 do século passado, aquando da procura de alternativas para a substituição da gelatina de origem animal, devido à propagação da doença das vacas loucas (Nunes *et al.*, 2003). Embora a carragenana não possa substituir a gelatina em todas as aplicações, a fracção iota constitui um excelente substituto desta na confeitaria.

Alimentos de base aquosa

Como referido anteriormente, com o aparecimento da encefalopatia espongiforme bovina (BSE ou doença das vacas loucas), foram desenvolvidos esforços no sentido de encontrar substitutos para a gelatina de origem animal (Nunes *et al.*, 2003). As gelatinas de origem animal tiveram grande sucesso na indústria das sobremesas devido, sobretudo, à sua textura suave e facilidade na libertação dos sabores e aromas, devido à sua temperatura estrutural e de fusão características. As gelatinas feitas à base de carragenana iota têm a desvantagem de possuírem uma temperatura de fusão muito elevada e, por isso, não são agradáveis quando ingeridas. No entanto, têm a vantagem de não derreterem em dias quentes e de não precisarem de frigorífico para gelificarem, característica muito vantajosa em países tropicais. Além disso, as gelatinas de carragenana iota não enrijecem com o passar dos dias.

Nos últimos dois anos as companhias de ingredientes alimentares desenvolveram misturas de hidrocolóides que imitam as propriedades da gelatina. Estas companhias descobriram que ao combinarem vários tipos de carragenana com farinha de alfarroba e amido, conseguiam obter uma grande variedade de gelatinas com diferentes temperaturas de fusão e com diversas texturas. Mousses e sobremesas de longa duração baseadas na carragenana e na pectina são opções válidas para determinados grupos étnicos e vegetarianos, pois não contêm gelatina animal.

As geleias convencionais de frutos são baseadas na pectina e num elevado conteúdo de açúcar. Nas geleias “light”, de baixo conteúdo calórico, a pectina é substituída por misturas de carragenana kappa e iota. As bebidas que simulam sumos de fruta podem ser reconstituídas pela dissolução de um pó em água fria. A adição de carragenana lambda dá corpo à bebida e potencia o seu sabor. Os sorvetes constituem uma alternativa cremosa e sem gordura aos gelados de base láctea; o uso de misturas de carragenana kappa e iota, em adição à farinha de alfarroba ou pectina, dá origem a texturas suaves.

Os condimentos e molhos para saladas com pouca gordura, ou mesmo sem gordura, contêm carragenana kappa ou iota para manter em suspensão as ervas aromáticas e potenciar o sabor. Uma combinação de carragenana e xantana é usada em maioneses de baixo conteúdo calórico.

Produtos à base de carne

Na preparação de fiambres, a adição de carragenana à salmoura melhora a qualidade do produto, pois a carragenana absorve a água e interage com as proteínas solúveis, promovendo a sua retenção.

Nos últimos anos tem havido um incremento na procura por produtos à base de aves pré-cozinhadas, tais como a galinha (frango) e o peru. Para que este tipo de produto não perca peso e se mantenha com uma textura agradável é usual “injectar” uma salmoura com sal, fosfato e carragenana na massa muscular das aves.

O uso de hidrocolóides na obtenção de produtos alimentares tem sido testado como substituinte de gordura. Quando se reduz a gordura e o sal a carne fica menos

tenra, menos suculenta e, conseqüentemente, perde sabor. Para evitar isto são adicionados fosfatos e carragenana de forma a reestruturar o aspecto e o sabor original. A carragenana kappa tem sido usada, com algum sucesso, na substituição de metade da gordura normal presente nas salsichas do tipo “Frankfurt”. A mistura de carragenana iota com carne de vaca picada permite obter um hambúrguer de baixo conteúdo calórico, como é o exemplo do “MacLean” comercializado por uma conhecida rede de restaurantes.

As aplicações da carragenana em alimentos pré-cozinhados à base de carne são uma das áreas com grande possibilidade de expansão (McHugh, 2003).

Alimentos para animais

A indústria de comida para animais de estimação (gatos e cães) é a principal consumidora de SRC, ou seja de carragenana semi-refinada (PES). O seu consumo anual é de cerca de 5.500 toneladas. Esta indústria também pode usar carragenana refinada, mas o seu preço, quando comparado com o da SRC, é demasiado elevado (cerca de 4 vezes superior). O uso de farinha de algas torna-se ainda uma melhor opção quando combinada com a farinha de alfarroba, pois é necessária menos carragenana. Estes dois hidrocolóides ajudam a manter homogénea a mistura dos diferentes componentes: a carne, a água e os aromas.

Aplicações em áreas não alimentares

Aplicações técnicas

As tintas aquosas podem ser espessadas e estabilizadas com carragenana kappa e iota (0.15 a 0.25%). A sua principal função é a de evitar a deposição dos pigmentos. A adição de carragenana também melhora a fluidez da tinta.

A carragenana iota é usada para suspender e estabilizar as partículas insolúveis em vernizes cerâmicos e suspensões abrasivas.

A clarificação de bebidas pode ser feita com todos os tipos de carragenana, apesar disso a carragenana preferida por esta indústria é a kappa. A carragenana adicionada à cerveja e ao vinho funciona como agente de complexação (formação de complexos carragenana-proteína). As partículas formadas são removidas através de processos de filtração ou por centrifugação. Neste processo são normalmente preferidas as carragenanas semi-refinadas.

As carragenanas, juntamente com outros polissacarídeos, são usadas em óleos para perfuração, para aumentar a sua viscosidade. Este incremento de viscosidade melhora a capacidade de transporte do fluido (SIAP, 1996).

Aplicações médicas

Na investigação médica as carragenanas são usadas para promover a formação de edemas em cobaias (Tobacman, 2001), como modelo de inflamação, para o ensaio de novos medicamentos anti-inflamatórios (Renn, 1997).

A administração de fracções de carragenana directamente no sistema sanguíneo promove a activação do sistema imunitário (Thomson e Fowler, 1981; Nachimuthu *et al.*, 1991).

Hoje, as carragenanas são reconhecidas como agentes que ajudam a prevenir ou a inibir o desenvolvimento de infecções virais por via sexual (Neushul, 1990; Zacharopoulos e Phillips, 1997; Schaeffer e Krylov, 2000; Perotti *et al.*, 2003).

As carragenanas são também consideradas como novas drogas, promissoras no combate ao HIV (Yamada *et al.*, 1997; Haslin *et al.*, 2001). O modo de actuação das carragenanas (e de outros polissacarídeos sulfatados) está relacionado com a transcriptase reversa do vírus (Nakashima *et al.*, 1987). Os fucanos (outro ficocolóide sulfatado) são considerados mais activos do que as carragenanas, pois possuem um maior grau de sulfatação e, por isso, preferido para futuras aplicações médicas (Feldman *et al.*, 1999; Schaeffer e Krylov, 2000).

As carragenanas têm sido consideradas como uma boa fonte de “fibras” dietéticas e estudos recentes mostraram que têm efeito hipo-glicémico e anti-colesterolico (Panlasigui *et al.*, 2003).

Aplicações farmacêuticas

Na indústria farmacêutica as carragenanas são usadas como excipientes, devido às suas propriedades físicas. A carragenana iota (0.1 a 0.5 %) é usada para estabilizar emulsões e suspensões de óleo mineral e na preparação de drogas insolúveis. Os complexos de carragenana podem ser usados para promover a libertação controlada de compostos farmacêuticos (princípio activos). No fabrico de cápsulas a carragenana é usada como ingrediente e como agente de revestimento (Schmidt *et al.*, 2003).

Agricultura

Oligossacarídeos de carragenana, preparados por hidrólise ácida ou por degradação enzimática, são comercializados pelos laboratórios Goemar como fertilizantes e estimulantes de crescimento (www.goemar.com). Quando aplicados na fase de floração, estes compostos estimulam a nutrição, da qual resulta uma melhor floração e conseqüente frutificação. Os oligossacarídeos sulfatados são reconhecidos como estimulantes dos mecanismos de defesa das plantas. Além disso as oligocarragenanas podem ser usadas como estimuladoras do crescimento (Bouarab *et al.*, 1999; Potin *et al.*, 1999).

Ambientadores em gel

Quando é necessário disfarçar os maus odores em determinadas zonas da casa, o uso de ambientadores em gel constitui uma das opções disponíveis. Estes ambientadores são feitos à base de carragenana kappa, sal de potássio, água e perfume. Quando misturados estes componentes formam um gel perfumado que se adapta bem a qualquer tipo de embalagem. A embalagem é depois selada para evitar a evaporação do odor. Cerca de 200 toneladas/ano de carragenanas são consumidas por esta indústria (Imeson, 2000).

Pasta de dentes

Os ingredientes essenciais usados no fabrico de pasta de dentes são o calcário (ou diatomito), o detergente, o aroma, a água e um agente que dê corpo à pasta e assegure a correcta mistura destes. O agente espessante tixotrópico (carragenana iota) permite que a pasta flua facilmente. A carragenana iota (1 %) é um dos agentes

espassantes mais úteis na indústria da higiene pessoal. Visto que o mercado das pastas de dentes é de dimensão considerável, mesmo um 1 % de concentração representa um grande mercado para a carragenana iota (Imeson, 2000).