



2015



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



### Caracterização do perfil biotecnológico de *Dilsea carnososa*.

Ensaio de cultivo em IMTA, Análise do conteúdo coloidal,  
Quantificação de potencial bioativo.

João Filipe Nogueira Marques

2015



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Caracterização do perfil biotecnológico de *Dilsea carnosa*.

Ensaio de cultivo em IMTA, Análise do conteúdo coloidal, Quantificação de potencial bioativo.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Leonel Pereira (Universidade de Coimbra), e co-orientada por Doutora Helena Abreu (ALGApplus) e Doutor Rui Pedrosa (Instituto Politécnico de Leiria)

João Filipe Nogueira Marques

---

2015

Créditos imagem de capa: nature22 (2012) Dumontiaceae, *Dilsea carnosa*

“The known is infinite, the unknown infinite; intellectually we stand on an islet the midst of an illimitable ocean of inexplicability. Our business in every generation is to reclaim a little more land, to add something to the extent and the solidity of our possessions.”

*in* “The reception of ‘Origin of Species’”

Thomas Henry Huxley



# Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao Professor Doutor Leonel Pereira a amizade, disponibilidade, preocupação e carinho que teve para comigo nesta etapa da minha vida. A sua orientação de excelência permitiu-me expandir horizontes, trabalhar conscientemente e desenvolver a minha capacidade crítica. Existirão, com certeza, poucas pessoas que reúnam coração e dádiva semelhantes. Tenho-o, por isso, como um mentor. A garantia do seu sucesso deixar-me-á feliz e realizado para todo o sempre, pois muito aprendi consigo. Obrigado, Professor.

Não poderia deixar de agradecer, em segundo lugar, o apoio e a amizade do Professor Doutor Jorge Canhoto, pela ajuda prestada em todas as peripécias, pela paciência e, essencialmente, por me proporcionar uma formação de excelência durante os dois anos em que frequentei o Mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. É, desta forma, com o maior orgulho e satisfação que afirmo que a escolha não poderia ter sido mais acertada.

Não posso deixar de agradecer à Doutora Helena Abreu e ao Doutor Rui Pereira a oportunidade de estagiar e desenvolver trabalho na ALGAplus, uma empresa que reflete o futuro da ciência e da sustentabilidade global. Muito obrigado pela experiência. Aproveito o ensejo para frisar que nada seria possível sem o companheirismo do Bruno, do Pedro e da Marta que me ajudaram em cada dia que passei na empresa. Doutora Helena Abreu, obrigado, uma vez mais pela co-orientação de excelência.

Ao Professor e co-orientador Doutor Rui Pedrosa agradeço a disponibilidade de não só me ter proporcionado a oportunidade de realizar investigação numa escola, onde a excelência da investigação marinha se faz a cada dia que passa mas como de me ter proporcionado a ocasião de fazer amigos, que em muito me ajudaram para o sucesso deste trabalho. A eles agradeço do fundo do Coração: à Susete, ao Celso, à Joana, ao Sidónio, ao André, à Sara e a restante e maravilhosa equipa do Grupo de investigação de Recursos Marinhos do IP Leiria (MARE).

Uma peça fulcral neste trabalho foi, sem dúvida, a amizade dos meus colegas e amigos, a quem agradeço toda a compreensão e apoio, quer nos momentos de trabalho, quer nos de lazer. Um obrigado, muito especial aos amigos do coração: António Neto, Pedro Fagulha, João Arnaut, Gonçalo Leston, Nuno Valente, Filipa Albuquerque, Filipa Costa e Francisca Marinho. Cumpro referir que todos os meus colegas de curso se revelaram, também, uma forte base de orientação nestes últimos anos: agradeço-lhes de forma humilde e amiga. Um especial obrigado a todos os colegas do Laboratório de Macroalgas da Universidade de Coimbra (MARE), em especial ao João Cotas pela enorme predisposição para ajudar, ao Loïc de Carvalho pela dádiva e ajuda na minha orientação, à Fabiana Soares pela companhia ao longo deste último ano e ao Paulo Silva, que me proporcionou uma importante linha de referência.

Agradeço incondicionalmente à minha família por ser a minha inspiração diária no amor e na confiança, os responsáveis por tudo o que sou e que algum dia poderei vir a ser. Nada seria possível sem vocês. Muito obrigado Avó Augusta, Tia Tita e Tio Zezé, Gonçalo, Miguel (e Luís Carlos).

Guardado para o fim fica o maior e mais sincero agradecimento de todos. Obrigado pai Idálio Marques por todo o amor, devoção, compaixão e crença no teu filho. Amo-te, a tua presença é muito importante para mim. Obrigado Maria Emília Nogueira pelo incomensurável

amor, empenho e dedicação ao teu melhor filho: ao teu lado não existem fronteiras nem barreiras a transpor. És o meu exemplo e eu serei a tua imagem. Disso estou certo... Obrigado mãe.

# Índice

Agradecimentos.....	i
Índice de figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 Flora Algal da costa Portuguesa.....	3
1.2 Algas.....	4
1.3 As macroalgas marinhas como mais-valia.....	7
1.3.1 Algas como alimento.....	8
1.3.2 Algas na indústria alimentar.....	10
1.3.3 A indústria de ficocoloides.....	11
1.3.3.1 Carragenanas.....	13
1.3.4 As algas no progresso médico, farmacêutico e cosmético.....	15
1.3.5 O seu valor ecológico e como serviço de ecossistemas.....	17
1.4 Aquacultura integrada multitrófica (IMTA).....	19
1.5 Dilsea carnosa.....	21
1.5.1 Taxonomia.....	22
1.5.1.1 Posição Taxonómica.....	23
1.5.2 Ecologia.....	23
1.5.3 Interesse Económico.....	24
1.6 Contextualização do trabalho e objetivos.....	26
2 Materiais e métodos.....	29
2.1 Recolha e tratamento de exemplares - ALGApplus.....	31
2.2 Tratamento das amostras - ALGApplus.....	31
2.3 Elaboração de exemplares de algário.....	32
2.4 Ensaio de cultivo - ALGApplus.....	33
2.4.1 Manutenção de material em cultivo.....	34
2.4.2 Ensaio Laboratoriais.....	35
2.4.2.1 Ensaio 1 – análise de densidades de cultivo.....	37
2.4.2.2 Ensaio 2 – análise do efeito combinado de densidade de cultivo e intensidade luminosa.....	38
2.4.3 Ensaio de cultivo exterior em regime de IMTA.....	39



2.5	Obtenção de extratos algais.....	40
2.5.1	Extração Alcalina em NaOH.....	41
2.5.2	Extração sequencial.....	42
2.5.2.1	Extrato em n-hexano.....	43
2.5.2.2	Extrato de Metanol.....	44
2.5.2.3	Precipitação dos polissacarídeos.....	44
2.5.3	Análise do rendimento das extrações.....	45
2.6	Análise do conteúdo em ficocoloides.....	46
2.7	Ensaio de bioatividade.....	46
2.7.1	Análises de potencial antioxidante.....	46
2.7.1.1	Avaliação da capacidade de redução de DPPH.....	47
2.7.1.2	Quantificação total de polifenóis.....	48
2.7.1.3	Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC).....	48
2.7.2	Avaliação da capacidade antimicrobiana.....	50
3	Resultados.....	53
3.1	Exemplares obtidos.....	55
3.2	Ensaio de cultivo laboratoriais.....	55
3.2.1	Ensaio laboratorial de densidades de cultivo.....	55
3.2.2	Ensaio laboratorial de intensidade luminosa.....	58
3.2.3	Ensaio exterior – IMTA.....	60
3.3	Resultados das extrações.....	64
3.3.1	Rendimento das extrações.....	65
3.3.2	Análise estatística.....	65
3.4	Espetros das amostras de FTIR-ATR.....	66
3.4.1	Espetros de exemplares de <i>D. carnosa</i> .....	66
3.4.2	Espetros do conteúdo nativo bruto e coloidal de amostras de <i>D. carnosa</i> .....	67
3.4.3	Espetros dos ficocoloides de <i>D. carnosa</i> .....	69
3.4.3.1	Espetros das extrações alcalina (3h-5h).....	69
3.4.3.2	Espetros das diferentes amostras.....	69
3.5	Avaliação da capacidade Antioxidante.....	72
3.5.1	Capacidade de redução de DPPH.....	72
3.5.1.1	Frações de n-hexano e metanol:.....	73
3.5.1.2	Fração de polissacarídeos.....	74
3.5.2	Quantificação Total de Polifenóis (QTP).....	75

3.5.3	Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) .....	76
3.5.3.1	Frações de n-hexano e metanol .....	77
3.5.3.2	Fração de Polissacarídeos .....	78
3.6	Avaliação do potencial antimicrobiano .....	78
3.6.1	Ensaio em <i>E. coli</i> .....	78
3.6.2	Ensaio em <i>S. aureus</i> .....	79
3.6.3	Ensaio em <i>C. albicans</i> .....	81
4	Discussão .....	83
4.1	Estabelecimento de analogias com <i>P.palmata</i> .....	85
4.2	Ensaio de cultivo .....	85
4.2.1	Ensaio laboratoriais .....	85
4.2.2	Ensaio exterior em regime de IMTA .....	89
4.3	Rendimento extrações .....	91
4.4	Análise dos espectros de FTIR-ATR .....	94
4.4.1	Amostras nativas Carreço vs IMTA .....	95
4.4.2	Amostras nativas vs Polissacarídeos .....	96
4.4.3	Extração alcalina 3h vs 5h .....	96
4.4.4	Polissacarídeos das diferentes amostras .....	97
4.5	Ensaio DPPH .....	98
4.6	Quantificação Total de Polifenóis .....	100
4.7	ORAC .....	101
4.8	Ensaio anti microbianos .....	103
5	Conclusões e perspectivas futuras .....	109
6	Referências bibliográficas .....	113
7	.....	128
8	Anexos .....	129
9	Apêndice .....	135



# Índice de figuras

- Figura 1** - Panorâmica das infraestruturas da empresa ALGAplus, à direita observam-se os tanques de cultivo algais, ao fundo os tanques de cultivo de dourada (*Sparus aurata*) e à esquerda as infraestruturas laboratoriais da empresa. (ALGAplus)..... 21
- Figura 2** – Fotografias e exemplar de algário de *D. carnosa* (Pereira 2010, Crouan & Crouan n.d., Guiry n. d.) 22
- Figura 3** – Ilustrações de *D. carnosa*, (Harvey n. d.)..... 23
- Figura 4** – Fotografias tiradas durante o processo de triagem: à esquerda, divisão do material por tamanho; ao centro, exemplares de tamanho grande para congelar; à direita, lavagem do material para cultivo laboratorial, numa câmara de fluxo. (Autor) ..... 32
- Figura 5** – Esquematização do sistema de IMTA da empresa ALGAplus (adaptados de Matos et al. (2006)). ... 34
- Figura 6** – Fotografias nos diferentes locais de cultivo da empresa ALGAplus. À esquerda uma das câmaras de cultivo. No centro, tanques exteriores de cultivo macroalgais. À direita, tanques de piscicultura. (Autor) . 34
- Figura 7** – Tanque utilizado para a manutenção do material algal de *D. carnosa*. Proveniente da canalização superior (mais escura), ocorre a entrada de água filtrada para o tanque. (Autor)..... 35
- Figura 8** – Preparação dos ensaios laboratoriais. À esquerda, material autoclavado disposto em cima da mesa, para iniciar o ensaio. No centro, quantificação de biomassa para incluir nos matrizes de cultivo, à direita, numa câmara de fluxo, observam-se os matrizes já prontos a colocar em cultura. (Autor)..... 37
- Figura 9** – À esquerda, montagem do sistema de tanques de 15L utilizados na atividade experimental exterior. No centro, close-up num dos tanques permite observar as condições físicas e mecânicas oferecidas aos espécimes de *D. carnosa* utilizados no ensaio. À direita observa-se a leitura de valores de pH, temperatura (°C) e salinidade (‰), pela sonda do medidor multiparamétrico, a 5 cm de profundidade. (Autor)..... 40
- Figura 10** – À esquerda, processo de quantificação de biomassa algal seca em amostras de diferentes origens; no centro, processo de moagem das algas num moinho de café. À direita, quantificação de um 1g de alga seca moída para iniciar o processo de extração. (Autor)..... 41
- Figura 11** – Metodologia utilizada no processo de filtração da solução de polissacarídeos. À esquerda, a primeira filtração, utilizando um filtro de porcelana e pano-cru, por vácuo em coluna de água. À direita, a segunda filtração, num filtro de sílica (G2), também por filtração em coluna de água. (Autor) ..... 42
- Figura 12** – Algumas etapas do processo de extração sequencial: à esquerda, preparação do material antes da primeira extração com solventes; à direita, atuação do solvente na biomassa algal moída, numa placa de agitação, durante 20 min. (Autor)..... 43
- Figura 13** – Na imagem da esquerda, os polissacarídeos de *D. carnosa* postos a secar na estufa, com Gel de Sílica para absorver eficazmente a humidade. Na imagem da direita observa-se a evaporação total do extratos de n-hexano, num evaporador rotativo, de modo a serem ressuspensos em DMSO. (Autor)..... 45
- Figura 14** – Esquematização do ensaio de avaliação da capacidade de redução do DPPH numa placa de micropoços. À esquerda, a caracterização da placa garante o correto procedimento do ensaio. À direita,

observável a diferença colorimétrica do radical DPPH após incubação com extratos de <i>D. carnos</i> . (Autor) .....	47
<b>Figura 15</b> – Placa de micropoços após período de incubação, no método de quantificação total de polifenóis, onde são facilmente observáveis as diferentes colorações das diversas amostras do ensaio, refletindo a atuação dos extratos algais como agentes antioxidantes sobre o reagente de Follin-Ciocalteu. ....	48
<b>Figura 16</b> – A preparação dos microrganismos utilizados nos ensaios de potencial antimicrobiano. À esquerda, preparação dos inóculos nos respetivos meios de cultivo. À direita, realização do inóculo. ....	50
<b>Figura 17</b> – Placas de micropoços utilizadas no ensaio, devidamente identificados com cada extrato utilizado, respetivo microrganismos e situações de controlo. ....	50
<b>Figura 18</b> – (A) Taxa de crescimento médio (RGR) das diferentes densidades de cultivo por semana, com reposição da densidade de cultivo inicial. (B) Produtividade média semanal das mesmas amostras. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=3) .....	56
<b>Figura 19</b> – Valores totais médios da RGR e Produtividade das densidades de cultivo com reposição à DC inicial (A) e sem reposição à DC inicial (B). Os valores apresentados para 20.A correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=3) .....	57
<b>Figura 20</b> – Valores de pH médios por densidade de cultivo, onde (m) representa a medição de pH realizada em meio de cultivo novo, e (cr) e (sr) representam os valores de pH do meio de cultivo algal com 3 dias de ensaio. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=3) .....	57
<b>Figura 21</b> – (A) Taxa de crescimento relativo (%) e Produtividade (B), nas diferentes semanas de cultivo, das diferentes amostras de <i>Dilsea carnos</i> sujeitas a diferentes intensidades luminosas e diferentes densidades de cultivo. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=3) .....	59
<b>Figura 22</b> – (A) Taxas de crescimento relativo médio e produtividade média do ensaio realizado em diferentes amostras de <i>D. carnos</i> , sujeitas a diferentes intensidades luminosas e diferentes densidades de cultivo; e (B) variações médias de pH registadas, por DC. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=3) .....	60
<b>Figura 23</b> – Parâmetros ambientais recolhidos ao longo do ensaio experimental, (A) Temperatura média da água dos tanques, (B) intensidade luminosa à superfície e a 5 cm de profundidade e (C) pH médio registado nos tanques de cultivo de <i>Dilsea carnos</i> . Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (A) (n=20), (B e C) (n = 40) .....	62
<b>Figura 24</b> - (A) Taxa de crescimento relativo (%) e Produtividade (B), nas diferentes semanas de cultivo em regime de IMTA, das diferentes amostras de <i>Dilsea carnos</i> sujeitas às condições da Ria de Aveiro. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=4) .....	63
<b>Figura 25</b> - RGR e produtividade médios do ensaio realizado em diferentes amostras de <i>D. carnos</i> , cultivadas em sistema de IMTA sujeitas às condições da Ria de Aveiro. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=4) .....	64
<b>Figura 26</b> – Espectros de FTIR-ATR de material algal de <i>Dilsea carnos</i> moída proveniente da Praia de Carreço e de cultivo em IMTA. ....	66

<b>Figura 27</b> – Espetros de FTIR-ATR de <i>Dilsea carnosa</i> moída proveniente da Praia de Carreço e do seu ficocoloide extraído por extração alcalina de 3 horas. ....	67
<b>Figura 28</b> - Espetros de FTIR-ATR de <i>Dilsea carnosa</i> moída proveniente do cultivo em IMTA e do respetivo ficocoloide, extraído por extração alcalina de 3 horas. ....	68
<b>Figura 29</b> – Espetros de FTIR-ATR dos polissacarídeos de <i>Dilsea carnosa</i> obtidos em diferentes tempos de extração alcalina. ....	69
<b>Figura 30</b> - Espetros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , obtidos por extração alcalina de 3 horas. ....	70
<b>Figura 31</b> – Espetros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , obtidos por extração alcalina de 3 horas, no intervalo de $[600\text{ cm}^{-1}, 1200\text{ cm}^{-1}]$ . ....	71
<b>Figura 32</b> - Espetros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , obtidos por extração alcalina de 3 horas, no intervalo de $[1200\text{ cm}^{-1}, 2000\text{ cm}^{-1}]$ . ....	72
<b>Figura 33</b> – Percentagem do radical DPPH por reduzir com extratos de n-hexano e metanol das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , a 1mg/mL. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ..	73
<b>Figura 34</b> – Capacidade de redução do DPPH – dependência da concentração (100 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) do extrato IMTA MeOH. ....	74
<b>Figura 35</b> - Percentagem do radical DPPH por reduzir nas frações de polissacarídeos das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , a 1mg/mL. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	75
<b>Figura 36</b> – Quantificação total de polifenóis (QTP) em mg EAG/g, (A) nas frações de n-hexano e (B) nas frações metanólicas das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> em estudo. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	76
<b>Figura 37</b> – Avaliação da capacidade antioxidante pela técnica de ORAC, em $\mu\text{g EQ trolox/g}$ de extrato, das (A) frações de n-hexano e (B) das frações metanólicas das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> em estudo. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	77
<b>Figura 38</b> – Avaliação da capacidade antioxidante pela técnica de ORAC, em $\mu\text{g EQ trolox/g}$ de extrato, da fração de polissacarídeos das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> em estudo. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	78
<b>Figura 39</b> – Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> em estudo, no crescimento de <i>E. coli</i> a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	79
<b>Figura 40</b> – Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de <i>Dilsea carnosa</i> , no crescimento de <i>S. aureus</i> a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão (SEM) (n=5). ....	80
<b>Figura 41</b> - Crescimento de <i>S. aureus</i> a 28°C na presença dos extratos, da fração do n-hexano, das amostras de <i>D. carnosa</i> que inibiram mais de 50% do crescimento de <i>S. aureus</i> . Dependências da concentração (100 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ ). ....	80

<b>Figura 42</b> - Crescimento de <i>S. aureus</i> 28°C na presença dos extratos, da fração do MeOH, da amostra de <i>Dilsea</i> carnosa que inibiu mais de 50% do crescimento de <i>S. aureus</i> . Dependências da concentração (100 – 1000 µg/ml).....	81
<b>Figura 43</b> - Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de <i>Dilsea</i> carnosa, no crescimento de <i>C. albicans</i> a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=5). .....	82
<b>Figura 44</b> – Números de onda identificativos de carragenanas presentes em algas da flora portuguesa (adaptado de (Pereira et al. 2009)).....	94
<b>Figura 45</b> - Teste Tuckey e SNK para a atividade experimental de cultivo de densidades (1ª atividade experimental).....	129
<b>Figura 46</b> - Tabela ANOVA para o ensaio 2, (em cima) interação da IL*DC com RGR, (em baixo) interação da IL*DC com Produtividade. ....	130
<b>Figura 47</b> – Teste T para amostras independentes, Ensaio de cultivo em IMTA.....	131
<b>Figura 48</b> – Comparações múltiplas entre os métodos de cultivo das amostras relativamente aos rendimentos dos processos de extração. ....	132
<b>Figura 49</b> – Rendimento médio das extrações efetuadas e <i>D. carnosa</i> pelos processos de extração por (1) n-Hexano, (2) MeOH e (3) precipitação de polissacarídeos com álcool isopropílico. ....	133
<b>Figura 50</b> - Método de elaboração do meio VSE.....	135
<b>Figura 51</b> – Números de onda para a caracterização de ficocolóides, adaptado de (Chopin et al. 1999).....	136
<b>Figura 52</b> – Moléculas precursoras e finais de diversas carragenanas, adaptado de (Pereira et al. 2009).....	137
<b>Figura 53</b> - Números de onda para a caracterização de carragenanas, adaptado de (Chopin et al. 1999).....	138

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Efeito da densidade de cultivo na RGR e na Produtividade (ANOVA) .....	58
<b>Tabela 2</b> - Efeito da densidade de cultivo e intensidade luminosa na RGR e Produtividade (ANOVA) .....	60
<b>Tabela 3</b> – Valores médios de pH, Temperatura (°C), intensidade luminosa (μE) à superfície da coluna de água e a 5 cm de profundidade medidos nos tanques de cultivo. ....	61
<b>Tabela 4</b> – Efeito da densidade de cultivo na RGR e Produtividade (ANOVA) na atividade de cultivo em IMTA .....	64
<b>Tabela 5</b> – Rendimentos médios do processo de extração das diferentes frações de amostras de <i>Dilsea</i> carnosa. ....	65
<b>Tabela 6</b> - Efeito da densidade de cultivo na RGR e Produtividade (ANOVA) na atividade de cultivo em IMTA .....	65
<b>Tabela 7</b> – Percentagem de DPPH não reduzido, no final do ensaio, pelas diferentes frações, das diferentes amostras de <i>D. carnosa</i> utilizadas no ensaio.....	73
<b>Tabela 8</b> – Teor polifenólico, em mg EAG por g de extrato testado, das diferentes frações de <i>Dilsea</i> carnosa ensaiadas. ....	75
<b>Tabela 9</b> – Valores obtidos na realização do método de ORAC, em μg EQ trolox/g, das diferentes frações de <i>Dilsea</i> carnosa. ....	77
<b>Tabela 10</b> – Valores de IC <sub>50</sub> para os extratos de <i>D. carnosa</i> que apresentaram inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> superior a 50%. ....	81
<b>Tabela 11</b> - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio laboratorial de densidades de cultivo. ....	129
<b>Tabela 12</b> - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio laboratorial de densidades cultivo combinadas com diferentes intensidades luminosas. ....	130
<b>Tabela 13</b> - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio em condições de IMTA. ....	131
<b>Tabela 14</b> – Valores médios semanais de pH, Temperatura (°C), intensidade luminosa (μE) medida à superfície e a 5 cm de profundidade em (A) tanques a uma densidade de 1 g/L e (B) 3 g/L. ....	131
<b>Tabela 15</b> – Peso das diferentes frações, obtidas por extração sequencial, seguidas de uma extração alcalina de 3 horas e precipitação dos polissacarídeos, das diferentes amostras de <i>D. carnosa</i> .. ....	132





# Abreviaturas

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µE – Microeletrões

µm – Micrometros

AAPH – 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorido

ABS – Absorvância

ANOVA – Analysis of variance)

ASW – Autoclaved Salted Water

AUC – Area under the curve

Carr – Carreço (amostra)

cm – Centímetro

(cr) – Com reposição

dH<sub>2</sub>O – Água destilada

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil

DST – Doenças sexualmente transmissíveis

DW – Dry weight

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

EQ trolox – Equivalentes de Trolox

EUC – European Union Comition

FDA – Food and Drug Administration

FTIR-ATR – Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflectance

FW – Final weight

GHG – Greenhouse gas

h – Hora

IMTA – Integrated Multi-trophic Aquaculture/(amostra)

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

IW – Initial weight

kDa – Kilodalton

L – Litro

Lab – Laboratorial (amostra)

LB – Lysogeny broth

(m) – meio de cultivo

M – molar

Mind – Mindelo (amostra)  
mm – Milímetro  
nm – nanómetros  
NMR – Nuclear Magnetic Resonance  
ORAC – Oxygen radical absorbance capacity  
PAR – Photosynthetically active radiation  
PE – Pouco Epifitado (amostra)  
Polis. – Polissacarídeos (amostra)  
Prod. – Produtividade  
PUFAs – Poly Polyunsaturated fatty acid  
QTP – Quantificação Total Polifenólica  
RGR – Relative Growth Rate  
rpm – rotações por minuto  
SEM – Standard Error Mean  
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences  
(sr) – Sem reposição  
TBT – Estanho tributil  
TSY – Trypticase soy Broth  
UVA – Ultravioleta A (radiação)  
UVB – Ultravioleta B (radiação MAA - Mycosporine-like amino acid)  
VSE – Von Stosch's enriched  
YPD – Yeast extract peptone dextrose

# Resumo

No presente trabalho são apresentados estudos de interesse biotecnológico na macroalga laminar vermelha (filo Rhodophyta) da família Dumontiaceae, *Dilsea carnosa* (Schmidel) Kuntze.

*D. carnosa* é uma alga do Atlântico Norte, esparsa na Europa Central e do Norte. Está presente ao longo da costa Centro e Norte Portuguesa, sendo o seu limite Sul de ocorrência descrito em Portugal, mais especificamente na Praia da Aguda, distrito do Porto. Ocorre naturalmente em cantos ou abrigos entre as rochas, em águas frias com temperaturas mínimas de 12°C e máximas de 15°C, no horizonte médiolitoral inferior ou infralitoral superior, até 25m de profundidade.

O cultivo de algas marinhas em sistemas de IMTA (Aquacultura integrada multitrófica) constitui não só, uma importante ferramenta para processos ecológicos mas também uma fonte de matéria-prima de excelência para as indústrias de exploração de recursos macroalgais marinhos. O cultivo desta espécie em diferentes condições foi avaliado, a fim de encontrar possíveis extrapolações para modelos de crescimento à escala comercial. Numa primeira fase foram estudados cultivos em condições laboratoriais e de seguida num sistema de IMTA concreto, da empresa ALGApplus na Ria de Aveiro (Portugal), de modo a prespetivar o seu potencial de cultivo em aquacultura.

Como fonte primária de matéria orgânica, as aplicações das algas marinhas no campo biotecnológico são muito vastas. Não só constituem uma fonte alimentar bastante completa em nutrientes, minerais e fibras, como no campo da nutracêutica têm provado fornecer importantes benefícios a quem as consome, graças às multifacetadas respostas antivirais, antibióticas, anti tumoral, entre outras. O potencial de comercialização de algas marinhas como alimentos funcionais para a indústria de produtos nutracêuticos é grande e assegura um futuro promissor.

De maneira a enriquecer este estudo, várias extrações com recurso a diferentes solventes orgânicos foram realizadas, em amostras de diferentes origens de *D. carnosa*, tendo o seu perfil para extrações descrito sob forma de rendimento. As frações obtidas: metanólica, em n-hexano e polissacarídeos, foram posteriormente alvo de estudos de bioatividade.

As aplicações industriais e científicas, baseadas na extração e utilização de compostos ficológicos, com especial incidência em polissacarídeos e extratos algais, constituem uma importante percentagem da utilização biotecnológica destes organismos. Com o objetivo de abrir portas a futuras investigações, o conteúdo dos polissacarídeos das diferentes amostras da alga *D. carnosa* foi analisado com recurso a tecnologia de FTIR-ATR, permitindo caracterizar o seu coloide consoante determinadas origens, a fim de determinar potenciais aplicações futuras. Análises do potencial antioxidante e antimicrobiano foram realizadas, segundo diversas metodologias. O Potencial antioxidante de extratos de *D. carnosa* foi traçado através das técnicas de ORAC, QTP e do método do DPPH. A nível do potencial antimicrobiano foram usados três organismos modelo, duas bactérias, Gram+ e Gram-, e um fungo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, respetivamente.

Outros estudos têm sido elaborados em torno desta alga. Grande parte do potencial de *D. carnosa* ainda se encontra por descobrir sendo portanto extremamente interessante a realização deste trabalho.

**Palavras-chave:** Biotecnologia marinha, Macroalgas, *Dilsea carnosa*, IMTA, Bioatividade



# Abstract

In the present work, the development of biotechnological research on laminar red macroalgae (phylum Rhodophyta) of the Dumontiaceae family, *Dilsea carnosa*, is proposed.

*Dilsea carnosa* is seaweed from the North Atlantic, common in Central and Northern Europe. It is present along the coast of Central and Northern Portugal, with the Southern limit of its occurrence profiled in Portugal – more specifically in Praia da Aguda, Porto district. It occurs naturally in shelters between rocks, in cold water with minimum temperatures of 12 °C and maximum of 15 °C, from the lower mediolittoral horizon to the higher infralittoral horizon, in waters up to 25m deep. Due mainly to the lack of current information available and with the aim of enriching the register of *D. carnosa* records, a new descriptive survey was conducted in this study.

The cultivation of seaweed in IMTA (Integrated Multitrophic Aquaculture) systems is not only an important tool for ecological processes, but is also an excellent source of raw material for other industries that explore seaweed resources. The cultivation of this species under different conditions was made in order to evaluate its cultivation potential. In the first phase, laboratory essays were conducted and then outdoor trials under the cultivation conditions of a commercial IMTA operation (ALGApplus Lda) Ria de Aveiro, Portugal.

As a primary source of organic matter, the applications of seaweed in the field of biotechnology are vast. Seaweeds not only constitute a very complete alimentary source of nutrients, minerals and fibres, but have also proven to provide significant benefit in the field of nutraceuticals for those who consume them, thanks to the multifaceted responses that can effectively provide developed antiviral reactions, antibiotic reactions and anti-tumour reactions, among others. The marketing potential of seaweed as functional foods for the nutraceutical products industry is large and ensures a promising future.

In order to enrich this study, several extractions using different organic solvents were performed on samples of different origins of *D. carnosa*, with the extractions profile described in the form of Yield. The obtained fractions: methanol, n-hexane and polysaccharides were subsequently targeted bioactivity studies. Industrial and scientific applications, based on the extraction and use of seaweed compounds, with a particular focus on polysaccharides and algal extracts, are an important percentage of the biotechnological uses of these organisms.

With the objective of opening the door to further investigations, the polysaccharides content of the different samples of *Dilsea carnosa* were analyzed using FTIR-ATR technology, allowing for the characterization of this colloid according to certain sources of the seaweed to determine its potential future applications. Analyses of antioxidant and antimicrobial potential were carried out according to various methodologies. The antioxidant potential of *D. carnosa* extracts was traced through ORAC techniques, QTP techniques and the DPPH method. The antimicrobial potential was measured using three model organisms: two bacteria (Gram + and Gram -) and a fungus, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, respectively.

Other studies have been developed on this alga due to its remarkable antifouling capacity and the possibility of preparing a dye through its pigmentation. Much of the potential of *Dilsea carnosa* remains undiscovered and, therefore, is extremely interesting this work.

**Keywords:** Marine Biotechnology, macroalgae, *Dilsea carnosa*, IMTA, Bioactivity



# **1 Introdução**





## 1.1 Flora Algal da costa Portuguesa

A costa continental Portuguesa disfruta de circunstâncias biogeográficas únicas que influenciam severamente a biodiversidade algal do país, a influência climática do Oceano Atlântico a Norte e do Mar Mediterrâneo a Sul fazem da sua costa uma zona de transição de floras algais, onde é possível observar um declínio gradual de espécies de águas temperadas à medida que a latitude decresce; formando um gradiente de biodiversidade ao longo de toda a costa (Araújo et al. 2009). A Norte do país é possível observar espécies de algas da Europa Central e a Sul, encontramos espécies de macroalgas essencialmente Mediterrânicas e Africanas (Gaspar et al. 2012). Este gradiente ecológico torna a costa Portuguesa uma zona biogeográfica de grande interesse para investigar mudanças na distribuição de diversas espécies de macroalgas marinhas (Araújo et al. 2005), destacando-se a região do Minho, considerada um *hot spot* de biodiversidade marinha que proporciona um ótimo local para estudo de diversas espécies e comunidades (Araújo et al. 2009).

A costa continental Portuguesa constitui o limite de ocupação Sul de aproximadamente 40 espécies de macroalgas (Araújo et al. 2009), possuindo um regime de marés semidiurno, com maior amplitude na primavera (3,5 a 4 m). Em específico, a costa do Noroeste português, tipicamente granítica, está exposta à ondulação oceânica de noroeste. No inverno regista ondulação severa, que pode ultrapassar os 5 metros de altura; a temperatura da água, à superfície, varia normalmente entre os 13°C e os 20°C (Araújo et al. 2005), sendo um fator dominante na distribuição geral dos *taxa*.

As linhas de costa constituem ambientes heterogêneos que suportam vastas variedades de formas bióticas. Na zona médiolitoral, definida pelo espaço físico do limite máximo da maré (preia-mar) até ao limite mínimo (baixa-mar), a distribuição das diferentes espécies dá-se ao longo de um eixo, com orientação vertical e direção do substrato rochoso terrestre para as profundezas oceânicas. Ao longo deste eixo é possível distinguir 3 zonas, o horizonte médiolitoral superior, horizonte médiolitoral médio e horizonte médiolitoral inferior (Pereira & Correia 2015), criadas pelo stresse provocado pela agitação marítima/padrão das marés e pelas respetivas tolerâncias fisiológicas das espécies que ocupam as diferentes zonas (padrão de zonação das costas rochosas) (Stephenson & Stephenson 1949, (Denny & Gaines 2007). O horizonte médiolitoral superior da costa Norte do país é dominado por líquenes incrustantes, o horizonte médiolitoral médio por algumas macroalgas castanhas como *Fucus spiralis*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* e *Pelvetia caniculata* (Phaeophyceae) e o médiolitoral

inferior caracterizado por uma abundância de espécies algais, entre elas *Saccorhiza polyschides*, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria hyperborea*, *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae) e *Chondracanthus aciculares* (Rhodophyta) (Araújo et al. 2005).

A biodiversidade algal é determinada pela combinação de vários fatores como perturbações físicas, predação por herbivoría, stresse abiótico e disponibilidade de nutrientes (Bracken et al. 2008). No horizonte médiolitoral, aquando da baixa-mar, ocorre a exposição de diversos organismos bentónicos ao ar e radiação solar, conferindo este stresse seletividade na distribuição das espécies bentónicas pelo substrato rochoso, com a baixa-mar ocorre também a formação de poças de maré, pequenas ilhas ecológicas com elevada biodiversidade. As poças de maré superiores tendem a ser mais *stressantes* devido a mudanças de maior amplitude térmica, salinidade, pH e concentração de oxigénio, sendo portanto as que possuem menor riqueza específica. Tendem a ser ocupadas maioritariamente por espécies mais tolerantes como cianobactérias e algas verdes. As comunidades encontradas em poças de maré intermédias e inferiores são bastante mais diversas dadas às condições físicas menos rigorosas (Lobban & Harrison 1997).

Nestes ecossistemas é possível, no mesmo local, encontrar comunidades bióticas bem distintas provocadas pelas variações na topografia do substrato, uma vez que locais com sombra proporcionam condições bem diferentes à fauna e flora que locais expostos à radiação solar (Lobban & Harrison 1997, Araújo et al. 2009).

## 1.2 Algas

As algas apresentam formas de vida muito variadas, habitando, em geral, em qualquer lugar onde as condições necessárias permitam a realização da Fotossíntese.

O termo Alga não apresenta qualquer valor filogenético, são polifiléticas, assim sendo no grupo das algas encontramos espécies pertencentes a diferentes Reinos, não partilhando verdadeiramente um ancestral comum (Madhusudan 2011). O seu agrupamento sistemático é baseado em características gerais como a composição química dos seus pigmentos, o tipo de ciclo de vida, a forma de armazenamento de substâncias de reserva, o tipo de parede celular e as características citológicas das suas ultraestruturas celulares (nomeadamente a estrutura dos seus cloroplastos ou da origem dos seus plastídios - origem endossimbiótica) (Graham et al. 2000). Atualmente, no panorama referente à diversidade, taxonomia e variabilidade das

formas algais o termo Alga define-se como sendo o conceito de agregação heterogênea, de seres de grupos remotamente relacionados que apresentam diversos atributos ecofisiológicos em comum: sendo maioritariamente fotossintéticos, produtores de oxigênio e matéria orgânica, na sua maioria aquáticos e geralmente mais pequenos e mais elementares que as plantas superiores. Existem porém exceções às duas primeiras generalizações, as espécies algais mixotróficas e heterotróficas e as algas que habitam meio terrestres; existindo porém exceções.

As algas variam muito em formas e tamanhos, sendo possível distinguir dois grandes grupos: as macroalgas e as microalgas. As microalgas, microscópicas (do grego *Mikros*, pequeno) e impercetíveis a olho nu são formas unicelulares ou coloniais muito diversas, encontradas por toda a superfície terrestre. Ocorrem em habitats litorais, bentônicos, terrestres, na coluna de água de rios e lagos, mares ou oceanos (neste último na forma de Fitoplâncton). São maioritariamente fotoautotróficas, podendo algumas formas ser heterotróficas apenas realizando a fotossíntese opcionalmente e os seus tamanhos podem variar entre os 3  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ .

Os meios bentônicos e estuarinos de águas pouco profundas suportam uma comunidade de flora exclusiva, compostas por seres multicelulares produtores de matéria orgânica e oxigênio, muito diversos - as Macroalgas.

As macroalgas estão muitas vezes relacionadas conceptualmente e sistematicamente com as plantas vasculares pois apresentam formas objetivamente parecidas em função. A diversidade morfológica dos seus talos contrasta fortemente com a uniformidade encontrada em plantas vasculares, sendo a diferenciação meristemática apenas observável em poucas macroalgas marinhas, sendo que a maioria cresce de forma linear ou por filamentos corticais (Lobban & Harrison 1997). São próximas das plantas nas estratégias de defesa que utilizam, pois produzem compostos anti-herbivoria, alelopáticos e antimicrobianos, contudo, estudos filogenéticos sugerem que estão remotamente ligadas às plantas e similaridades na estrutura macroscópica devem-se a formas de evolução paralelas (Graham et al. 2000).

Estas formas de vida macroscópica desempenham a importante função de suporte às cadeias tróficas bentônicas, constituindo alimento e zonas de maternidade em ecossistemas marinhos. Realizam diversas interações biológicas como relações de epifitismo com macro e microrganismos; de herbivoria (macroalgas e epiflora). Os principais fatores ambientais responsáveis pela sua ocorrência são: a luz, temperatura, salinidade, movimento da coluna de

água e disponibilidade de nutrientes, sendo que, os seus padrões de crescimento, morfologia e reprodução constituem efeitos combinados destes aspetos (Lobban & Harrison 1997).

Dos fatores preponderantes para a sua ocorrência, a quantidade e qualidade da luz que recebem para realizar fotossíntese desempenham um papel importante nas respostas metabólicas, contudo, estes dois parâmetros variam com a profundidade e com a turbidez da própria água. A capacidade de uma espécie de alga viver a uma determinada profundidade está intimamente relacionada com a composição dos seus pigmentos fotossintéticos e com a intensidade e características de luz que recebe. Desta forma a adaptação de cada espécie a determinada profundidade é feita até à profundidade máxima com que, o mínimo de luz lhe permite realizar a fotossíntese (Anon 1937). O Fotoperíodo apresenta um papel preponderante na indução de estados reprodutivos no ciclo de vida das algas. A salinidade regula a fisiologia das macroalgas através de variações do potencial osmótico e da composição iónica. A agitação marítima e o movimento da coluna de água são aspetos determinantes para as trocas gasosas e de nutrientes. A emersão aquando da baixa-mar representa outra ameaça à sua sobrevivência, nesta fase, encontram-se expostas à dessecação, a temperaturas fora do seu espetro ótimo e à ausência de nutrientes (Lobban & Harrison 1997).

São um grupo bastante grande de seres vivos, com um passado paleontologicamente bem documentado. Os primeiros registos de organismos fotossintéticos datam de há 3000 milhões de anos. Foram encontrados registos fósseis datados do Pré-Câmbrico de algas vermelhas e castanhas, com 600 milhões de anos (Anon 1937).

Apesar da evolução ao longo do tempo dos sistemas de classificação é consensual considerar 4 filas distintas de algas com base nas diferentes pigmentações. A presença exclusiva de clorofila *a* é característica do filo Cyanobacteria, assim como a presença dos carotenóides:  $\beta$ -caroteno, equinona, mixoxantofila, zeaxantina e de ficobilinas: C-ficocianina e C-ficoeritrina. A presença de clorofila *a* e *d*, assim como dos carotenóides:  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina e das ficobilinas: R-ficocianina e R-ficoeritrina são características do filo Rhodophyta. O filo Chlorophyta possui clorofilas *a* e *b* na sua pigmentação e apresenta os carotenóides  $\beta$ -caroteno, luteína e neoxantina, violaxantina e zeaxantina. Por último, o Filo Heterokontophyta (ou Ochrophyta) possui as clorofilas *a* e *c* e  $\beta$ -caroteno, violaxantina e fucoxantina como carotenóides (Pereira & Correia 2015).

As macroalgas merecem um especial destaque neste exercício de investigação, devido ao seu forte potencial biotecnológico com diversas aplicações no sector industrial capaz de gerar mais-valias na sua exploração.

### **1.3 As macroalgas marinhas como mais-valia**

O aumento frenético da população mundial trouxe a necessidade emergente de obtenção de mais recursos naturais para a Humanidade. Gradualmente estes recursos vão escasseando em terra seca. Os Ecossistemas marinhos são o berço de inúmeras comunidades bióticas com diversas formas de vida por explorar. Os seus recursos são um bem precioso à Humanidade, que terá por sua vez de os explorar com responsabilidade e inteligência, de uma forma sustentável para que esta preciosa fonte de vida e recursos nunca se esgote (Kim 2011).

As macroalgas são fontes muito ricas de compostos de interesse devido à versatilidade das suas formas e funções. Os compostos produzidos por estes seres vivos são capazes de desempenhar importantes tarefas biológicas contra diversas formas de agressões celulares. São igualmente tão úteis como importantes na descoberta, desenvolvimento e produção de fármacos, alimentos e outros produtos em geral (Pereira & Critchley 2009).

A polivalência e riqueza destes compostos algais são fatores adaptativos determinantes para resistir às condições marinhas extremas, tornando as macroalgas organismos extremamente bem adaptados para resistir às várias agressões do meio marinho. A elevada salinidade, dessecação prolongada, resistência mecânica contra o impacto da ondulação, horas prolongadas de exposição direta a raios solares, o combate ao parasitismo, entre muitos outros; combinados com uma fisiologia e histologia elementar (tecidos muito simples e pouco diferenciados) fazem das algas seres muito interessantes. O interesse nestes organismos tem sido crescente face à necessidade de obtenção de novas biomoléculas que procurem satisfazer as exigências da população humana, de tal modo, há quatro décadas que se têm vindo a isolar novos compostos provenientes de macroalgas, visando aproveitar todo o seu potencial biotecnológico (Kim 2011).

Os maiores produtores e exportadores de macroalgas para o comércio global são: a China, o Japão, a República da Coreia, os Estados Unidos da América, a Irlanda, a França, a Indonésia, a Noruega e o Canadá. Números para a viragem do milénio apontavam para uma produção de macroalgas marinhas no valor de 10 milhões de toneladas por ano, crescimento

este que tem sido suportado pela produção a larga escala em regimes de aquacultura, estando a colheita de algas em ambientes selvagens estagnada nos últimos 12 anos (Pereira 2012).

Muitas das propriedades dos seus compostos encontram-se ainda por explorar e a sua aplicabilidade pode ser realmente vasta em vários setores económicos. A exploração, inovação e desenvolvimento de produtos e funcionalidades provenientes dos compostos algais representam oportunidades promissoras para o futuro. As algas e os seus biocompostos podem ser usados diretamente como alimento para o Homem e para animais, usadas como medicamento nas áreas da medicina, farmacologia e nutraceutica devido aos seus conhecidos benefícios em inúmeras atividades biológicas (Pereira 2012).

### **1.3.1 Algas como alimento**

As macroalgas edíveis têm uma longa história cultural em países do Extremo Oriente e em diversas regiões do Pacífico, estando o consumo de algumas espécies de macroalgas datado do século VIII (Kim 2011). Em países como a Malásia, Coreia do Sul, Austrália, China e Japão têm uma aplicação gastronómica vastíssima, sendo que, constituem cerca de 10% a 25% da dieta tradicional japonesa. (Pereira 2012). Este mesmo facto não se constata nas culturas dos países da Europa e América Ocidental, onde o consumo de algas apenas está enraizado em países como a Irlanda ou Canadá, França e Portugal numa fração mais modesta (McHugh 2003).

As algas vermelhas mais comuns na alimentação são: *Porphyra tenera* – “Nori” (a alga mais utilizada na gastronomia Nipónica) e *Palmaria palmata* – “Dulse”, muito consumida em países ocidentais. As algas castanhas mais apreciadas na gastronomia oriental são o *Sargassum fusiforme* – “Hijiki”, *Undaria pinnatifida* – “Wakame”, e *Saccharina japonica* – “Makonbu”. Na classe das algas verdes a *Ulva sp.* é a alga mais utilizada na culinária Havaiana, denominada “Limu palahalaha” (Yuan & Walsh 2006).

A inclusão das algas na alimentação quotidiana é de extrema importância devido aos seus claros benefícios para a saúde. Ao comparar dietas dos países orientais, onde o consumo de algas é cultural, há muitos séculos, com as dietas que não incluem algas na alimentação, (dieta ocidental) verificou-se que, em países orientais, as taxas de incidência de doenças crónicas como o cancro da mama, intestino e pele são significativamente mais baixas. Estes dados epidemiológicos apresentam uma forte fundamentação em diversos estudos que

demonstraram uma vantagem considerável na inclusão de macroalgas na dieta ocidental diária, resultando numa forte prevenção deste tipo de doenças graças ao seu forte potencial antioxidante e anti-mutagénico (Pisani et al., 2002). São consideradas um superalimento graças às multifacetadas respostas que conseguem providenciar (Anon 1937), atuando em diversos mecanismos biológicos, onde desempenham eficazmente respostas antivirais, antibióticas, anticancerígena, anti tumoral, anti trombóticas, anti-inflamatórias, Hipo-colesterolémicas, hipoglicémicas entre outras (Smit 2004).

As algas não só apresentam altos potenciais antioxidantes quando frescas, devido a substâncias como o ascorbato e a glutatona mas também quando secas, devido a moléculas mais estáveis como carotenoides, aminoácidos micospórnicos e uma variedade muito considerável de polifenóis (e.g. catequinas, florotaninos) (Yuan & Walsh 2006). O potencial de comercialização de algas marinhas como alimentos funcionais para a indústria de nutracêutica é grande e assegura um futuro promissor. As macroalgas são agentes naturais apropriados para fornecer compostos antioxidantes de excelência porque (com base em aspetos multifuncionais destes metabolitos secundários) não apresentam toxicidade para o nosso organismo, potenciando efeitos sinérgicos entre as várias moléculas e aumentando também a capacidade de tamponização entre os compostos que possam ter sido intencionalmente ingeridos (Smit 2004, Pereira 2012).

Um alimento funcional é, a par do seu valor nutritivo, um alimento capaz de produzir efeitos benéficos numa ou mais funções fisiológicas aumentando o bem-estar de quem o consome. Nos anos que correm tem havido um aumento do interesse da população ocidental nestes alimentos, devido maioritariamente ao stresse e às carências nutritivas da dieta ocidental, sendo as algas um alimento funcional de excelência (Pereira 2012).

Todas as respostas estas biológicas devem-se a vários aspetos multifuncionais, como por exemplo o elevado conteúdo em minerais (como Iodo e Calcio, muito importantes para o organismo), podendo chegar até 36% do seu peso seco. São ricas em macronutrientes como sódio, magnésio, potássio, cloro, enxofre e fósforo; e micronutrientes como o ferro, zinco, cobre, selénio, molibdénio, flúor, manganésio, boro, níquel e cobalto (Madhusudan 2011). São reconhecidas como o alimento principal na biodisponibilidade de Iodo, visto que apresentam valores muito superiores a qualquer outra espécie vegetal (Madhusudan 2011, Pereira 2012).



Possuem um elevado conteúdo em fibras dietéticas insolúveis, importantíssimas para processos do trato gastrointestinal. São riquíssimas em vitaminas, destacando-se a presença de cobalamina - Vitamina B12, indispensável na eritropoiese e na manutenção do sistema nervoso. Na sua composição abundam também metabolitos secundários como a fucoxantina (um dos carotenoides mais abundantes em organismos vivos) que possui um papel preponderante na síntese de Vitamina A, que regula fenômenos como a respiração celular e síntese de pigmentos da retina. São uma importante fonte de compostos fenólicos, os florotaninos (taninos das algas castanhas e vermelhas) são importantes agentes sinérgicos atuando contra fenômenos de herbívora, proteção contra radiação UVB, e agente quelante na sequestração de metais pesados (Yuan & Walsh 2006, Pereira 2012). São ainda fracas em gorduras saturadas mas ricas em aminoácidos essenciais e ácidos gordos polinsaturados. Contêm poucos açúcares e são uma fonte de enzimas, entre elas lipases, proteases, transaminases, Importantíssimas na remoção de numerosos resíduos químicos tóxicos passíveis de se acumularem no nosso organismo (Madhusudan 2011). As algas começam, cada vez mais, a fazer parte da dieta ocidental aparecendo nos nossos pratos como uma fonte subexplorada de biomoléculas e benefícios para a saúde pois são eficientes gestoras e coletoras de energia eletromagnética, e por isso, são alimentos altamente nutritivos que podem e devem ser consumidos regularmente sem medo de toxicidades metabólicas (Pereira 2012).

### **1.3.2 Algas na indústria alimentar**

Atualmente a indústria alimentar recorre ao uso de diversos compostos de origem biológica de modo a melhorar e acrescentar valor ao produto final vendido ao consumidor (Kim 2011). Dentro desta panóplia, os polissacarídeos destacam-se devido ao grande espectro de utilizações e à polivalência de funções que desempenham, sendo que a incorporação de hidrocolóides algais em alimentos processados é feita em formulações muito baixas, cerca de 1 a 3% do peso total, não alterando a aparência do produto. Os ficocolóides possuem uma ótima capacidade de gelificação que permite desenvolver um variado leque de produtos alimentares como gelatinas, geleias, molhos, leites com sabores, vinho e cerveja, gelados, etc. (Pereira 2012). Na elaboração de vinhos as carragenanas são usadas como agente clarificante precipitando as impurezas (Lahann 2006), nas cervejas são o elemento que confere uma espuma apetecível (Pereira 2002), retardam a degradação de diversas substâncias como o

amido, retêm a humidade dos alimentos, potenciam o conteúdo em fibra, controlam a formação de cristais de gelo conferindo estabilidade a produtos que sofram muitos processos de congelamento e descongelamento, melhorando a qualidade do produto final (Pereira et al. 2013).

Os compostos antimicrobianos e antioxidantes algais têm provado fornecer benefícios não só na sua utilização mas como no seu consumo associado a outros alimentos, provando potenciar a segurança alimentar e melhorar a qualidade dos produtos. É esperado que este consenso potencie a sua utilização industrial em alimentos como em proteínas animais, pastas e farinhas, etc. Os polifenóis algais, principalmente abundantes em algas castanhas, provaram ser um importante antioxidante em produtos alimentares (Gupta & Abu-Ghannam 2011), em especial os florotaninos, que, aplicados no peixe aquando o seu congelamento provaram ser mais efetivos que o antioxidante sintético utilizado contra a peroxidação lipídica (Mohamed et al. 2012). A presença de *Undaria pinnatifida* na elaboração de massas favorece a interação entre grânulos de amido e as proteínas da matriz resultando numa textura mais suave (Prabhasankar et al. 2009). O efeito antimicrobiano dos extratos algais é muitas vezes utilizado em proteínas marinhas para consumo, peixes e mariscos são muitas vezes tratados com frações algais ricas também em polifenóis e polissacarídeos que provaram ser uma alternativa natural para o combate contra microrganismos patogénicos (Kumaran et al. 2010).

### **1.3.3 A indústria de ficocolóides**

Ficocolóides são moléculas de grande tamanho, constituídas por açúcares simples que preenchem a parede celular e os espaços intercelulares de grande número de algas castanhas e vermelhas (Pereira 2008). Remetendo á origem da palavra é possível compreender que ficocoloide, do Grego *Phykos* – alga, e coloide - relacionado com a habilidade de formar uma solução que apresenta duas fases distintas, uma contínua em suspensão noutra, pretende designar uma substância de origem algal com propriedades coloidais. Atuam como espessantes, gelificantes, emulsionantes e estabilizadores que não são digeridos nem assimilados pelo organismo. As suas principais propriedades são a carência de qualquer sabor, cheiro ou cor, solubilidade em água e conciliabilidade com a maioria dos alimentos (Pereira 2008). Estas propriedades fazem dos ficocolóides substâncias extremamente versáteis, muito apreciadas na indústria alimentar e farmacêutica (De Freitas et al. 1997, Zacharopoulos & Phillips 1997, Mercier et al. 2001, Zhou et al. 2004) .

Na indústria de extração de ficocolóides, são usadas 41 espécies de algas que produzem ácido algínico, 33 espécies que produzem agar e 27 espécies que produzem carragenanas (Pereira 2008), sendo Ahnfeltia, Gelidiella, Gelidium, Gracilaria e Pterocladia os géneros mais utilizados por esta indústria (Pereira 2012). Os códigos dos diferentes ficocolóides usados na indústria alimentar como aditivos naturais, definidos pela UE são:

Ácido algínico – E400  
Alginato de Sódio – E401  
Alginato de Potássio – E402  
Alginato de Amónia – E403  
Alginato de Cálcio – E404  
Alginato de propilenoglicol – E405  
Agar – E406  
Carragenana – E407

A descoberta do processo de extração do primeiro ficocoloide, o Agar, a partir de uma alga vermelha, data de 1658 no Japão. Extratos de *Chondrus crispus* contendo carragenanas, eram utilizados como agentes espessantes na Irlanda, no século XIX. Em 1930, foi extraído o primeiro ficocoloide a partir de uma alga castanha com propriedades gelificantes e espessantes, o alginato. Todavia, foi no período pós Segunda Guerra Mundial que esta indústria deu um grande salto, permitindo não só a obtenção a larga escala de ficocolóides diversificando a sua aplicação, como também permitindo que diversos avanços fossem possíveis, generalizando o processo de investigação em torno destes biocompostos para a maioria dos países (McHugh 2003).

O recurso ao cultivo destes organismos em sistemas de maricultura, através do conhecimento pleno dos seus ciclos de vida tornou possível aumentar em muito esta indústria. Na atualidade, são produzidas cerca de 1 milhão de toneladas de algas frescas, resultando num processo de extração de 55 000 toneladas dos três principais ficocolóides produzidos pela indústria – O Agar, as Carragenanas e os Alginatos (McHugh 2003). A produção de Carragenanas, o ficocolóide mais produzido é responsável por um lucro de 240 milhões de dólares (US\$) por ano, estava limitada à apanha, em modo selvagem, de *Chondrus crispus* que apenas crescia em água frias. Contudo, em 1970, desde a descoberta de outras algas produtoras de carragenanas e a respetiva produção em países de mão-de-obra mais económica permitiu um rápido avanço na produção industrial deste ficocolóide, sendo a aquacultura a principal fonte de matéria-prima para a indústria (McHugh 2003).

### 1.3.3.1 Carragenanas

As carragenanas são polissacarídeos extraídos de diversas famílias de algas da ordem Gigartinales. São responsáveis por um aumento de elasticidade dos seus talos de forma resistir ao stresse da zona das marés e, sobretudo, ao movimento das ondas, proporcionando uma grande flexibilidade. (Pereira 2004).

São substâncias mucilaginosas da matriz da parede celular de algumas algas vermelhas que se formam a partir da conversão de amido florídeo, regulador osmótico e principal substância de reserva citoplasmática da maioria das algas vermelhas (Lobban & Harrison 1997, Lehninger 2005, Vonthron-Sénécheau et al. 2008).

Na primavera, altura de crescimento vegetativo das macroalgas, verifica-se um aumento do conteúdo glicosídico associado à síntese e acumulação de amido florídeo, devido à abundância de nutrientes e boa radiação solar (Zinoun & Cosson 1996). Com a chegada do verão os níveis de azoto inorgânico decrescem e a radiação solar torna-se mais forte, registando-se um decréscimo em proporção inversa, do conteúdo de hidratos de carbono e azoto (amido florídeo) e um aumento (respetivo ao início da biossíntese) de carragenanas, através da conversão do amido florídeo (Fournet et al. 1999).

As carragenanas possuem na base da sua estrutura molecular polímeros de um açúcar monomérico de 6 carbonos, a galactose, com alternância de ligações  $\alpha(1-3)$  e  $\beta(1-4)$  (Pereira 2004). Possuem carga negativa devido ao elevado teor em ligações esteres de sulfato, sendo moléculas bastante ricas em radicais  $OSO_3^-$  (24 a 26%). Este carácter iónico negativo, pela elevada presença de radicais sulfatados, faz divergir as carragenanas do Agar, visto que este último apresenta um conteúdo em sulfatações substancialmente mais baixo. Por sua vez, os alginatos diferem das carragenanas pela natureza do potencial iónico, nomeadamente, devido à presença de grupos carboxílicos ( $COO^-$ ) em vez de grupos sulfatados (Pereira 2002, Pereira 2004).

O grau de sulfatações de uma carragenana é o fator que dita a habilidade para esta gelificar, assim, quanto maior for o índice de sulfatação, mais difícil será formar um gel em solução aquosa. Este facto deve-se aumento da eletronegatividade da totalidade da molécula com o aumento da sulfatação, resultando numa repulsão entre moléculas de galactose. Sabe-se também, que a habilidade para gelificar apenas é possível devido à formação de uma espiral de unidades de galactose. Cada monómero apresenta, no espaço, uma disposição “em cadeira”

e a sequência de todas estas moléculas adquire uma estrutura em hélice. Se a repulsão for excessiva devido à elevada sulfatação, não ocorre a formação de uma ponte de 3,6-anidro em C4 (caso da família de carragenanas  $\lambda$ ) e a estrutura em hélice não se forma, adquirindo a sequência molecular de galactose uma conformação em “zig-zag”, permanecendo as cadeias dispersas na água, (aumentando contudo a viscosidade da solução). Entre carragenanas gelificantes, o nível de sulfatações dita as características reológicas dos seus géis, sendo as carragenanas menos sulfatadas, as menos aptas a perder água por sinérese. As propriedades dos géis variam também consoante a concentração de carragenana em solução aquosa e com a temperatura (Pereira 2004).

Como é possível encontrar vários tipos de carragenanas diferentes, por convenção, classificam-se consoante a sua habilidade de formar géis em solução aquosa (grau de esterificação para carragenanas gelificantes), ou com a habilidade de aumentar a viscosidade de uma solução (para carragenanas viscosificantes ou espessantes). A nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) atribui a cada família de carragenanas uma letra do abecedário grego ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , etc.), tendo sempre como referência uma carragenana pura (e.g. a carragenana  $\pi$  extraída de *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata*). É de salientar também que não existem só carragenanas puras, é frequente encontrar carragenanas híbridas, partilhando similaridades entre famílias, ou até mesmo com Agar, denominadas carragares (Chopin et al. 1999).

São compostos de elevada carga molecular, com um elevado grau de polidispersividade. As carragenanas comerciais, muito utilizadas pela indústria alimentar, possuem um elevado peso molecular que varia normalmente entre os 400 e os 600 KDa. O seu peso mínimo foi estipulado por entidades reguladoras (FDA, EUC, etc.) nos 100 KDa face a relatos de ocorrência de ulceração do cego e colon, por carragenanas altamente degradadas. Em geral, a distribuição da massa molecular de cada carragenana varia de amostra para amostra dependendo da sua origem, idade do exemplar, época da colheita, modo de extração e duração do tratamento (Pereira 2004).

Sabe-se que o tipo de carragenana produzidas por uma alga pode variar consoante o estágio do ciclo de vida. Estão descritas na literatura, entre precursores e moléculas de carragenanas finais, mais de 10 tipos de carragenanas diferentes (Chopin et al. 1999). Contudo, algumas são características de macroalgas do hemisfério Sul e não serão abordadas neste trabalho. Globalmente, as carragenanas de maior valor comercial são a Iota ( $\iota$ ), a Kappa

(κ) e a Lambda (λ), tendo sido descrita na literatura a ocorrência em Portugal, de macroalgas carragenófitas das famílias supracitadas. A conversão dos precursores nas carragenanas gelificantes ocorre na membrana plasmática ou na parede celular, pela ação de sulfonidrolases, enquanto a conversão de carragenanas espessantes/viscosificantes ocorre no citoplasma por ação de enzimas “dekinkases”. Os precursores das carragenanas kappa e iota (gelificantes) são respetivamente os tipos mu (μ) e nu (ν), a carragenana θ é a precursora da carragenana λ (viscosificante) (Chopin et al. 1999, Pereira 2004).

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 coloides hidrófilos aniónicos (Pereira 2002, Pereira 2004). O recurso a ferramentas de caracterização como a espectroscopia por FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) fornece preciosos detalhes na caracterização dos grupos orgânicos destes polissacarídeos, possibilitando diversos avanços na área dos ficocolóides. Constituem uma técnica rápida, barata e simples que apenas requer pequenas porções de amostras secas e moídas, que inclusivamente podem ser provenientes de exemplares de herbarium. Esta tecnologia permite comparar polissacarídeos padrão, já conhecidos, como novos ficocolóides extraídos, de modo a prever de forma aproximada a sua estrutura (Chopin et al. 1999, Pereira et al. 2003).

#### **1.3.4 As algas no progresso médico, farmacêutico e cosmético**

Na indústria cosmética os alginatos e as carragenanas são largamente utilizados em cremes, loções corporais, pomadas para a pele, pois asseguram uma hidratação prolongada, potenciam a cicatrização de feridas e retardam o seu envelhecimento (Kim 2011, Pereira et al. 2013). Na talassoterapia, pastas feitas de algas moídas frias são aplicadas no corpo de uma pessoa e aquecidas por radiação infravermelha, relaxando e nutrindo a pele e em conjunto com a utilização de água do mar aliviam os sintomas do reumatismo e da osteoporose (McHugh 2003). No âmbito da investigação científica o agar e os géis de agarose são usados não só em métodos de separação e purificação laboratorial (em eletroforeses, cromatografias, etc.) mas também como em meios de cultura sólidos para o crescimento de microrganismos (Lahann 2006).

No panorama terapêutico de doenças crônicas a tendência atual aponta para a substituição de moléculas sintéticas, que trazem consequências secundárias para a saúde, por biomoléculas com princípios ativos semelhantes mas menos tóxicas. Estudos recentes em macroalgas destacam as propriedades das suas biomoléculas como potenciais substituintes das moléculas sintéticas (Mohamed et al. 2012), graças à enorme variedade de componentes bioativos já descritos, com estruturas diferentes das conhecidas e propriedades funcionais interessantes (Wijesinghe & Jeon 2012), capazes de adjuvar na cura e prevenção de doenças metabólicas crônicas e degenerativas. Um extenso trabalho de caracterização de bioatividade tem sido feito como método de pesquisa para novos medicamentos e descobertas. Resultados destas pesquisas apontam para potenciais usos de compostos macroalgais em terapias de diversos tipos de cancro, alergias, diabetes, stresse oxidativo, inflamações, trombooses, obesidade, hipertensão (Mohamed et al. 2012).

A nível de potencial antioxidante, as algas marinhas destacam-se das plantas superiores pela efetividade das suas respostas. Os flavonoides, biofenóis terrestres mais abundantes, possuem três a quatro anéis interligados (como é o caso das catequinas). Em comparação, os florotaninos algais para além de possuírem até oito anéis interligados (tornando-os 10 a 100 vezes mais potentes e estáveis do que os fenóis terrestres) possibilitam uma melhor e maior sequestração de radicais livres, possuindo também um período de meia vida que pode chegar até 12 horas no nosso organismo, comparados com os 30 a 180 minutos dos biofenóis terrestres (Kang et al. 2003). Outro sinal do grande potencial dos antioxidantes algais é observado através da redução da oxidação lipídica *in vivo*, mesmo em situações de doença e de envelhecimento. Os níveis de malodialdeído, marcador endógeno da peroxidação lipídica, foram significativamente reduzidos no fígado, coração e cérebro de mamíferos de idade avançada por porfiranas e galactanas sulfatadas de *Porphyra sp.* (Matanjun et al. 2008). O consumo de algas está associado a um aumento estimulatório endógeno da dismutase do superóxido, glutatona peroxidase e por vezes de catálases (Yuan & Walsh 2006).

No combate a doenças infecciosas causadas por microrganismos os polissacarídeos e extratos das algas vermelhas e castanhas desempenham fortes respostas antimicrobianas e antivirais. São inibidoras eficientes de diversos fungos e bactérias Gram positivas, inibindo também o crescimento de algumas bactérias Gram negativas (Ballantine et al. 1987). Os compostos antibacterianos com maior eficiência são os ácidos gordos, compostos lipofílicos, metabolitos secundários acetogénicos, terpenos, alcaloides e polifenóis (Cowan 1999, Potin et al. 2002, Salvador et al. 2007, Smyrniotopoulos et al. 2010, El Gamal 2010).

A capacidade antiviral de alguns tipos de carragenanas provou ser potente na inibição de diversos vírus que infetam a espécie humana. Algumas investigações sugerem-nas como drogas bastante eficazes na inibição do citomegalovírus – HCMV, o vírus da imunodeficiência adquirida, tipo 1 – HIV 1, o vírus da dengue, o vírus do papiloma humano (Alarcón et al. 1987, Baba et al. 1988, Buck et al. 2006), as estirpes 1 e 2 do Herpes simplex e o vírus sincicial respiratório (Feldman et al. 1999, Mohamed et al. 2012).

Providenciam ainda respostas contra mecanismos antiproliferativos e tumorais, com efeito supressivo quer de neoplasias benignas ou cancros (Eskin et al. 1995, Yang et al. 2010) sendo os polissacarídeos hidrossolúveis os principais compostos algais anticancro (Yamasaki-Miyamoto et al. 2009). Ao nível da tiroide, a suplementação de macroalgas aumenta a segregação da TSH (*thyroid stimulating hormone*) em mulheres pós-menopausa saudáveis, pois são uma fonte rica em iodina (Dunn & Delange 2001). As macroalgas possuem ainda propriedades fitoestrogénicas capazes de aumentar o ciclo menstrual, estimulando a ovulação e diminuindo a razão estrogénio/progesterona em mulheres na fase pré-menopausa (Skibola et al. 2005), sendo ainda capazes de alterar favoravelmente o metabolismo do estrogénio e do fitoestrogénio (Teas et al. 2009).

Devido ao seu elevado conteúdo em fibras dietéticas solúveis são ótimas no combate à, capazes de retardar a digestão e a absorção de calorías. Ajudam também a moderar o apetite atrasando a absorção a nível do intestino delgado. Os seus ácidos gordos  $\omega$ -3 diminuem os triglicéridos e têm efeitos regulatórios homeostáticos (Paxman et al. 2008). No controlo dos diabetes tipo 2, associado à resistência à insulina e envelhecimento (10% da população mundial), um estudo pela *Korean National Health and Nutrition*, mostrou que o consumo de algas fez decrescer a incidência em indivíduos do sexo masculino. O consumo de *Undaria pinnatifida* reduz o colesterol, a pressão sistólica e diastólica em pacientes hipertensos (Mohamed et al. 2012). São também fortes neuroprotetores contra a doença de Alzheimer (Alarcón et al. 2005, Jhamandas et al. 2005, Yoon et al. 2008, Natarajan et al. 2009, Mohamed et al. 2012)..

### **1.3.5 O seu valor ecológico e como serviço de ecossistemas**

As comunidades de macroalgas marinhas características da costa rochosa de países temperados são as principais modeladoras destes ecossistemas (Lobban & Harrison 1997, Tuya et al. 2014). Embora as primeiras referências ao conceito de funções e serviços de



ecossistemas datem de meados dos anos 1960 (De Groot et al. 2002), nas últimas décadas tem-se presenciado um aumento de preocupação em torno da economia ecológica e da valorização destes serviços e mais-valias face ao seu desgaste e às conseqüentes repercussões em diversos setores económicos (Kim 2011).

A avaliação económica destes ecossistemas, onde os serviços e bens são classificados em função do valor direto da sua utilização (e.g. compostos bioativos, comida fresca), do valor indireto (e.g. sequestração de carbono, retenção de nutrientes) e do valor da sua utilização relativa (e.g. emprego, investigação aplicada, património cultural e histórico associado), dependendo esta do valor que a sociedade atribui à preservação das comunidades macroalgais como herança cultural, reservatório de biodiversidade, banco genético, etc.. Deste modo todos os serviços de ecossistemas apresentam um valor definido económica e socialmente, passível de sofrer alterações segundo novas descobertas, aparecimento de indústrias emergentes e do melhor reconhecimento do seu papel socio-ecológico (De Groot et al. 2002, Unep 2007, Troell et al. 2009, Vásquez et al. 2013). Estes serviços são muitas vezes desvalorizados pelo Homem, não associando o bom estado de preservação de ecossistemas marinhos à saúde financeira de diversos setores como pescas, indústria farmacêutica e cosmética, turismo, entre outros; levando a uma depreciação da importância do meio ambiente e à sua respetiva deterioração, traduzindo-se na perda de biodiversidade em função da sua exploração excessiva (De Groot et al. 2002). Este facto para o futuro poderá trazer conseqüências gravíssimas.

As áreas costeiras são hoje os principais centros populacionais e de industrialização, sendo portanto as que mais sofrem com a atividade Humana. O crescimento acelerado da população e da conseqüente atividade humana através de práticas como agricultura intensiva, descarga de efluentes industriais, escoamento de esgotos urbanos, queima de combustíveis fósseis e criação intensiva de alimento em sistemas de maricultura resultado num aumento massivo do *in put* de poluentes no meio marinho, resultando, na maioria das vezes, em processos de destruição ambiental a escalas inimagináveis (Anon 1937).

A necessidade de solucionar a maior parte destes problemas, concentrou atenções na utilização de macroalgas como agente biorremediador (Anon 1937, He et al. 2008). Este precioso serviço de ecossistema deve-se à sua elevada capacidade de adsorção de metais pesados e nutrientes. As algas constituem eficientes biofiltros, capazes de extrair de águas eutrofizadas a maior parte dos nutrientes em excesso como o azoto e fósforo e de metais

pesados derivados de descargas industriais da atividade fabril de indústrias costeiras, como Zinco, Cádmiio, Cobre e Ferro (Chopin et al. 2001, Kim 2011), que se acumulam sem ser possível a sua decomposição (Anon 1937, Matsunaga et al. 1999).

São igualmente eficientes no tratamento de efluentes da aquacultura intensiva de peixe, sendo que a amónia, principal constituinte destes efluentes, é uma fonte nutritiva de excelência para o crescimento de macroalgas (Chopin et al. 2001, Buschmann et al. 2008, Kang et al. 2008).

#### **1.4 Aquacultura integrada multitrófica (IMTA)**

O aparecimento de sistemas de Aquacultura multi-trófica integrada permitiu resolver problemas de biomitigação, visto que quando cultivadas na proximidade de monoculturas de peixes, as macroalgas convertem em biomassa, quase na totalidade, os níveis de amónia, fosfatos e CO<sub>2</sub> excretados pelos peixes, devolvendo ao (eco)sistema água limpa (Abreu et al. 2011).

O mais recente relatório da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO 2014) alerta para a necessidade de alimentar em 2050 os 9,6 biliões de pessoas existentes no planeta, através de sistemas sustentáveis e eficientes de produção alimentar, capazes de garantir uma alimentação segura e equilibrada. Uma forma de atingir tais objetivos, acrescentam, assenta na utilização de sistemas de aquacultura eficientes como mais-valia na produção de alimento. Com um crescimento médio de 6.9% ao ano a produção de peixe em regime de aquacultura igualou em 2006 o valor anual de pescas desse mesmo ano e representa o sector de produção alimentar que mais cresce no mundo (Moffitt & Cajas-Cano 2014). Contudo, devido ao levantamento de preocupações por parte do consumidor na qualidade do peixe e do aumento da poluição ambiental provocada por esta atividade, tem-se verificado um abrandamento na taxa de crescimento neste setor (Abreu et al. 2011).

No relatório de 2014, a FAO atenta para a necessidade de um “crescimento azul” como abordagem coerente para a gestão ambientalmente compatível, socioeconomicamente sensível e integrada de recursos aquáticos (Moffitt & Cajas-Cano 2014). Nesse mesmo sentido, o conceito de Aquacultura Multitrófica Integrada, que conta com quase 30 anos de existência e desenvolvimento (Ryther et al. 1975) e que teve um aumento substancial nos últimos 15 anos (Chopin et al. 2008), surge como opção crucial para solucionar alguns dos

problemas ecológicos causados por práticas de aquacultura intensiva. Os sistemas de IMTA são ferramentas da engenharia ecológica que permitem mitigar os problemas ambientais causados pela sobrecarga de nutrientes, provenientes da alimentação da aquacultura intensiva de organismos marinhos e da elevada carga de agentes antibióticos libertados para as águas; capazes de promover uma maior sustentabilidade e integração (Chopin et al. 2001, Abreu et al. 2009). Neste contexto foi proposta por Buschmann e colaboradores em 2008, a inserção de macroalgas para crescimento em regimes de aquacultura (IMTA). A conversão de monoculturas em policulturas de diferentes níveis tróficos tem-se mostrado vantajosa, permitindo não só que os efluentes voltem a circular para o sistema limpos ou que sejam descarregados para o meio ambiente sem o colocar em risco (Chopin et al. 2001).

Estes avanços científicos, não só permitem resolver os problemas no âmbito da biorremediação e biomitigação como são passíveis de acrescentar um valor económico a estes sistemas, visto que a obtenção de biomassa algal de alta produtividade poderá e deverá ser canalizada como matéria-prima para outras indústrias. As indústrias no âmbito da produção utilização de ficocolóides, rações para animais, produtos cosméticos e farmacêuticos em muito beneficiam da adoção de práticas deste calibre, podendo adquirir matéria-prima a um preço mais competitivo (Chopin et al. 2001, Abreu et al. 2009), resultando num efeito sinérgico *win/win* para economias locais e nacionais.

Para atingir estas metas é importante reconhecer o carácter económico do sistema, tendo por base na escolha de potenciais macroalgas para cultivo, espécies com valor económico no mercado. A aposta em macroalgas com valor comercial quer devido à sua utilização para a alimentação humana/possibilidade de incorporação na alimentação de organismos dos outros níveis tróficos do sistema; quer como matéria-prima para indústrias de ficocolóides, farmacêutica ou cosmética; a par da sua eficiência como biofiltros, é crucial para o funcionamento económico e tecnológico do sistema (Chopin et al. 2001, Abreu et al. 2009). O cultivo de algas em regime de IMTA possui maiores índices de produtividade, com menos níveis de variabilidade do que o crescimento selvagem, devido a uma maior disponibilidade e melhor circulação de nutrientes no sistema (Chopin 2006, Abreu et al. 2009, Abreu et al. 2011). O uso de várias espécies bioassimiladoras, em conjunto, provou-se aumentar a eficiência do processo, diminuindo também a área requerida para o seu cultivo (Chopin et al. 2001, Abreu et al. 2009, Troell et al. 2009). A instalação de sistemas de IMTA em mar aberto é uma opção viável contudo enfrenta várias limitações na atualidade. A escolha de um local abrigado com pouca ondulação, os elevados custos de manutenção do sistema e os problemas

logísticos causados pela localização das infraestruturas são os maiores entraves destes modelos (Troell et al. 2009).



**Figura 1** - Panorâmica das infraestruturas da empresa ALGApplus, à direita observam-se os tanques de cultivo algais, ao fundo os tanques de cultivo de dourada (*Sparus aurata*) e à esquerda as infraestruturas laboratoriais da empresa. (ALGApplus)

A instalação destes sistemas em terra abre portas, não só, a algumas possibilidades no tratamento e aproveitamento dos efluentes mas também à exploração de espécies não passíveis de cultivar em sistema *long-line*. Sistemas piloto de exploração de IMTA como o da empresa ALGApplus, localizado na cidade de Ílhavo, distrito de Aveiro, Portugal são de extrema importância para o desenvolvimento futuro deste conceito. A ALGApplus, pioneira na implementação comercial de um sistema de cultivo de macroalgas sob o conceito IMTA em terra firme, vocaciona a sua investigação para a produção de macroalgas adaptada à necessidade dos sectores alimentares e cosmética, trabalhando tanto no desenvolvimento do cultivo de espécies de interesse como na melhoria da composição química de espécies com sistemas de cultivo implementados. Estas empresas são exemplos que representam uma mais-valia no panorama global da aquicultura pois constituem polos de informação e investigação de referência, valiosos para o futuro do planeta no caminho para a sustentabilidade global.

## 1.5 *Dilsea carnosa*

*Dilsea carnosa* é uma alga do filo Rhodophyta, da ordem Gigartinales, possui frondes grandes e carnudas, sendo considerada uma das maiores algas vermelhas. É facilmente identificável pelas suas lâminas que podem medir entre 15 a 30 cm de comprimento e 5 a 20 cm de largura em forma de colher, eretas, sem nervura central, nem veios. Apresenta uma coloração vermelha escura, cor rubra de sangue e a sua fronde descreve uma lágrima, perfeita e invertida, fixando-se ao substrato através de um disco de forma ovoide, com aproximadamente 30 a 40 mm de comprimento e 20 a 30 mm de largura; de onde emergem vários exemplares através de pequenas estipes cilíndricas. O seu talo é cartilágneo, bastante

rígido, achatado e espesso (ou maciço) (do Latim *carosum*; caroso, espesso), é considerada a alga mais espessa das espécies folhosas do Atlântico Norte. Ao toque, a sua textura aproxima-se com a de couro, assim como um odor semelhante fora de água. Nos seus estádios juvenis apresenta uma forma ligulada bastante definida, em idades mais avançadas pode apresentar rasgos verticais ou secções de corte circulares no seu talo, quase nunca divergindo da sua forma original; a coloração amarelada na extremidade apical do seu talo é também característica de estádios de desenvolvimento tardios. Pertencente à Classe *Florideophyceae* (consideradas das mais evoluídas), exhibe um ciclo de vida congruentemente complexo (Pereira & Correia 2015). Vulgarmente pode ser confundida com *Schizymenia dubyi*, *Kallymenia reniformis*, *Grateloupia turuturu* e *Palmaria palmata*; sendo todas estas espécies substancialmente mais finas, pequenas e escorregadias ao toque que a própria *D. carnososa* (Guiry & Guiry 2015)



**Figura 2** – Fotografias e exemplar de algário de *D. carnososa* (Pereira 2010, Crouan & Crouan n.d., Guiry n. d.)

### 1.5.1 Taxonomia

Foi primeiramente descrita em 1794 pelo botânico alemão Schmidel, tendo lhe atribuído o nome de *Fucus carnosus*. A sua primeira descrição detalhada foi publicada por Withering, em 1796, ainda com o nome de *Fucus edulis*, provavelmente a partir de amostras fornecidas por Stackhouse, que também publicou uma descrição do taxon sob o mesmo nome no ano seguinte. O seu nome genérico foi alterado em 1809 por Stackhouse, para *Dilsea edulis* (Stackhouse). Durante o seu longo processo de classificação, vários outros nomes foram propostos até que, em 1898 outro botânico Alemão, Otto Kuntze, a estabeleceu no género *Dilsea*, com o nome que perdura até hoje, *Dilsea carnososa* (Lindstrom 1985).

A classificação atual de algas da família das Dumontiaceae (17 géneros descritos na literatura (Saunders 2005)) é maioritariamente feita recorrendo à observação morfológica de

similaridades entre espécies (Saunders & Lindstrom 2011). Tai et al. (2001) descrevem o género *Dilsea* como sendo monofilético e a família das Dumontiaceae como possuidora de diversas espécies crípticas. A análise genética comparativa das diferentes espécies do género *Dilsea* realizada por Saunders (2005), através do marcador mitocondrial da subunidade I do citocromo oxidase (*cox*), permitiu estabelecer uma filogenia muito próxima entre as espécies *Dilsea integra* (Canadá) e *D. carnososa* (Europa). Diferenças na sequência genética de *cox 1-5'* entre as duas espécies de apenas 7 nucleótidos permitiram a Saunders concluir que não se trataria de uma espécie críptica mas sim duas espécies muito próximas filogeneticamente. Hebert e colaboradores (2003) classificaram esta técnica como a base para um sistema de bioidentificação global de seres vivos, devido à sua versatilidade, podendo observar-se valores intraespecíficos a variar entre 0 e 3 nucleótidos e de 0 a 30 pares de bases em valores interespecíficos.

#### 1.5.1.1 Posição Taxonómica

Domínio: Eucariota  
Reino: Plantae  
Filo: Rhodophyta  
Subfilo: Eurhodophytina  
Classe: Florideophyceae  
Subclasse: Rhodymeniophycidea  
Ordem: Gigartinales  
Família: Dumontiaceae  
Género: *Dilsea*

**Espécie: *Dilsea carnososa* (Schmidel) Kuntze**



**Figura 3** – Ilustrações de *D. carnososa*, (Harvey n. d.)

#### 1.5.2 Ecologia

É uma alga do Atlântico Norte, escarsa na Europa Central e do Norte. Mais especificamente em Portugal, Espanha, França, Dinamarca, Noruega, Suécia, Ilhas Britânicas, Islândia e ilhas do arquipélago ártico Norueguês de Svalbard (Guiry & Guiry 2015) onde possui o seu Limite Norte de ocorrência. A sua observação mais a Sul é descrita em Portugal (Araújo et al. 2009), mais especificamente por Gaspar et al. (2012), no distrito do Porto, na praia da Aguda. Ocorre naturalmente em águas frias, com temperaturas mínimas de 12 °C e máximas de 15 °C, no horizonte médiolitoral inferior ou médiolitoral superior, até 25m de profundidade. É normalmente encontrada em cantos ou abrigos entre as rochas, necessitando

a sua observação de uma paciente e cuidadosa busca, restrita a determinados lugares do substrato rochoso. Preferencialmente ocorre em poças de maré profundas e escuras, em zonas sombrias e resguardadas ou em florestas de *kelp*; aparecendo quase sempre em comunidades pontuais (Barry & Dillon 1945).

### 1.5.3 Interesse Económico

A edibilidade de algumas macroalgas marinhas é um aspeto chave para a valorização destas como produtos alimentares, pois constituem um alimento muito versátil, exótico para a maioria da população ocidental, trazendo um pouco de requinte aos pratos de quem as decide provar. *D. carnosa* é descrita como tendo um sabor apurado e distinto (Pereira 2012) e apesar de estar presente na alta cozinha, utilizada por *chefs* como José Avillez (<http://revistadesignmagazine.com/mergulho-no-mar/>), não consta na lista de espécies edíveis da Europa.

Alem disso, e sem tirar protagonismo a este carácter exótico e requintado, as macroalgas edíveis merecem destaque também por outras razões. O facto de serem alimentos funcionais de excelência (Yuan & Walsh 2006, MacArtain et al. 2007), já referido neste trabalho, confere a este grupo características bem benéficas para a saúde de quem as consome. É o caso de *D. carnosa*, uma espécie, descrita como semelhante a nível nutricional e de sabor à espécie *Palmaria palmata* (Pereira 2012). *D. carnosa*, com alga vermelha, é rica em PUFA's como Omega 3 e Omega 6. É possuidora de inúmeros carotenoides como luteína, licopeno e Zeaxantina, muito eficazes na proteção contra fenómenos mutagénicos e de hipertensão. Possui altos teores de pigmentos que, ao serem ingeridos, desempenham papeis antioxidantes como as Ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina). Possui diversos polifenóis, em especial flavenóides. Possui carragenanas com eficientes propriedades anti-tumorais e com atividade imunomodulatória (Pereira 2012).

A exploração de compostos de interesse em *D. carnosa* também representa uma faceta de grande potencial desta alga na biotecnologia, em comparação a *Palmaria palmata* (Yuan et al. 2009), a utilização de aminoácidos micospornicos (MAAs) e polifenóis e para incorporação em loções protetoras de raios solares UV parece ser um tópico promissor para indústrias cosméticas (Yuan & Walsh 2006, Pereira 2012). Um estudo encabeçado por Mille-Claire, em 1993 foi capaz de desenvolver um corante com função de marcador imunofluorescente através da extração da r-ficoeritrina de *D. carnosa*.

Vários estudos acerca do carácter anti incrustante de extratos *D. carnososa* contra epibiontes revelaram também sucesso (Hellio et al. 2002, Nylund et al. 2005, Nylund & Pavia 2005, Vonthron-Sénécheau et al. 2011), depois da abolição do aditivo comercial de tintas navais com TBT (estanho tributil) em embarcações até 25 metros (Santillo & Langston 2001). As alternativas mais promissoras à substituição de metais pesados passarão sem dúvida pelo desenvolvimento de camadas anti-incrustantes cuja atividade molecular provem de uma fonte biológica marinha como as macroalgas, partindo do pressuposto que estas espécies de forma de vida sésil, estão acostumadas a lidar com organismos epífitos durante todo o seu período de vida (Hellio et al. 2002), sendo que a chave para este processo deverá incidir sobre a formação do biofilme bacteriano que proporciona o início do processo de epifitização (Wieczorek & Todd 1997).

O elevado conteúdo em galactanas sulfatadas de *D. carnososa*, em especial carragenanas da família  $\lambda$  (Chopin et al. 1999), demonstra uma aplicabilidade vasta em ensaios clínicos. Atualmente, a investigação em carragenanas da família  $\lambda$  está associada a diversas patologias, provocadas pelo tipo 1 e 2 do vírus da Dengue (Talarico & Damonte 2007), tipo dois do *Herpes simplex* (Zacharopoulos & Phillips 1997, Bourne et al. 1999). Provou, em coadjuvância com a formalina, proporcionar alívio da inflamação causadora de problemas de homeostase na barreira hemato-encefálica (Brooks et al. 2005). Provou possuir atividade antitumoral, por meio da imuno-modulação do sistema imunológico (Zhou et al. 2004).

A aplicabilidade das carragenanas da família lambda no se restringe só a ensaios clínicos, estas são largamente utilizadas na indústria alimentar, no processamento de bens alimentares, prolongando o seu tempo efetivo de consumo, como é o caso da aplicação em carnes com baixo teor em gordura e leite, ajudando a melhorar a estabilidade e propriedades reológicas. Capacidade vantajosa uma vez que na natureza destas propriedades não existe qualquer reação entre as proteínas de origem animal (De Freitas et al. 1997). As carragenanas da família  $\lambda$  provaram ser as melhores estabilizadoras de soluções com leites, dada á sua natureza coloidal a qualquer temperatura e estado de ionização, resultando numa interação bastante forte com os micélios da caseína do leite, aumentando a estabilidade da solução. Facto que se deve à carga electroestática da molécula de carragenanas lambda, permitindo ter um forte papel estabilizador de produtos e emulsões de leites ricos em gorduras como natas, gelados e leites achocolatados (Langendorff et al. 2000).



Estas carragenanas ainda possuem aplicabilidade a nível fitopatológico, onde o potencial de aplicação de extratos de carragenanas  $\lambda$  em plantas superiores foi descrito por Mercier e colaboradores em 2001 como estimulatório da transcrição de uma série alargada de genes de defesa da planta sem afetar o metabolismo primário; podendo desempenhar um papel importante na indução de defesas em culturas de larga escala, a fim de prevenir danos em de laraga escala.

O recurso á utilização de tecnologias como FTIR permite concluir que a química dos seus ficocolóides é bastante mais complexa do que aparentava ser, necessitando de mais investigação no futuro. A procura de novos tipos de carragenanas, com novas propriedades e funcionalidades físicas tem despertado interesse na indústria dos ficocolóides. Com o objetivo de diversificar a busca e desenvolver novos produtos, esta procura faz-se em algas cuja caracterização do perfil dos seus coloides não tenha sido realizada (McHugh 2003). Embora já se encontre referenciada na literatura, a caracterização da sua carragenana tem levantado deixado incertezas. Um trabalho revisão de Chopin e colaboradores (1999) referencia os coloides provenientes de algas da família Dumontiaceae como polímeros complexos de caracterizar, apresentando características distantes do “típico”, com padrões de substituição heterogéneos, requerendo futuras investigações. Neste trabalho a carragenana de *D. carnos*a é referenciada como um híbrido de carragenana  $\lambda$  e  $\mu$ , contendo ainda uma pequena fração de carragenana  $\kappa$ , facto que se mostra sedutor face à procura de novos biopolímeros e subsequentes novas funcionalidades, merecendo este facto destaque neste exercício de investigação.

## **1.6 Contextualização do trabalho e objetivos**

A realização do presente trabalho atenta abranger as potencialidades da macroalga *D. carnos*a em diversas áreas de atividade biotecnológica, assim, através de estudos de interesse o seu potencial foi testado em âmbitos de produção em aquacultura Integrada multi-trófica, de extração de compostos de interesse e na aplicação de extratos num screening por bioatividade.

Deste modo, o seu potencial de cultivo em IMTA foi testado, não só objetivando a integrabilidade de *D. carnos*a num sistema de produção de bens alimentares mas também de matéria-prima para indústrias do setor farmacêutico, alimentar e de hidrocoloides.

A quantificação sob a forma de rendimento tornou possível concluir acerca do seu potencial de produção de biocompostos para aplicações nas indústrias supracitadas.

O estudo da aplicação dos extratos obtidos tencionou inferir acerca dos seus níveis de biodiversidade em várias áreas. Para tal, foram realizados os ensaio de quantificação de potencial antioxidante DPPH, QTP e ORAC e de quantificação de atividade antimicrobiana, em 3 microrganismos distintos.



## **2 Materiais e métodos**



## 2.1 Recolha e tratamento de exemplares - ALGAplus

Os exemplares de *Dilsea carnosa* foram recolhidos em duas praias a Norte de Portugal. O primeiro local de recolha situa-se no distrito do Porto, na praia de Mindelo. O segundo localiza-se na praia de Carreço, distrito de Viana do Castelo, a aproximadamente 60 km Norte do primeiro. As duas recolhas foram realizadas com uma semana de intervalo, sendo que a primeira decorreu no dia 9 do mês de Julho de 2014 (09/07/2014) e a segunda no dia 16 do mesmo mês (16/07/2014).

O acesso à plataforma infralitoral superior foi feito na baixa-mar, pelo substrato rochoso até à linha de maré. Nesse local, localizaram-se os potenciais sítios para a observação e recolha de exemplares. A escolha de locais abrigados onde fosse possível encontrar pequenas enseadas e vales subaquáticos com cerca de 2m de profundidade, juntamente com a ocorrência de algas como *Saccorhiza polyschides* e *Laminaria hyperborea* que conferissem alguma sombra em profundidade, foram determinantes para o sucesso da busca de *D. carnosa* (Barry & Dillon 1945, Guiry & Guiry 2015). Após entrada na água, com o devido equipamento (material de *snorkeling*, uma faca própria para a recolha de material e uma rede para recolha das amostras) as comunidades de *D. carnosa* foram localizadas; apresentando pequenas dimensões e não possuindo mais do que 20 indivíduos por comunidade; ocorrendo quer em substrato arenoso quer em rocha, em cantos recatados. Os exemplares foram recolhidos com o auxílio da faca tentando, quando possível, destacar apenas o talo. Alguns discos de fixação foram também coletados para futuros ensaios. Já em terra seca, procedeu-se à lavagem para remoção de material epífito e detritos, com água do mar. O material, húmido, foi dividido por sacos de plásticos etiquetados com a data e local da recolha e o respetivo nome específico. O material foi posteriormente colocado numa arca frigorífica que mantivesse a temperatura baixa a fim de ser transportado para laboratório. Não houve necessidade de recolher água do mar.

## 2.2 Tratamento das amostras - ALGAplus

Ao chegar ao laboratório, as amostras sofreram uma segunda lavagem em água do mar, mais minuciosa, com auxílio de uma zaragatoa e pincéis para remover os contaminantes que pudessem persistir. Depois de secas num centrifugador manual, foi realizada uma pesagem para quantificar o total de biomassa recolhido por local. Esta biomassa foi depois

alvo de um processo de triagem com diferentes fins, tendo o material em mau estado sanitário sido descartado. Os talos de maiores dimensões, após separados por origem, foram selados em sacos de plástico rígidos e congelados a uma temperatura de -16 °Celsius, constituindo as amostras selvagens **Mindelo (Mind)** e **Carreço (Carr)** para futuras extrações e ensaios. Os talos de dimensões médias provenientes das duas praias foram juntos numa só amostra, com destino a ensaios de aquacultura tendo sido colocados a aclimatar em tanques de manutenção exteriores (alguns exemplares de melhor aspeto foram selecionados para a elaboração de exemplares de herbário). Os talos mais pequenos, com destino a ensaios de cultivo laboratoriais, sofreram ainda uma terceira lavagem. Neste processo, com recurso a uma câmara de fluxo, as amostras foram cuidadosamente limpas com uma zaragatoa, seguidas de repetidas imersões em água do mar e autoclavada (ASW), intermediadas por uma breve imersão em água destilada (dH<sub>2</sub>O) (libertação de organismos epífitos), tendo sido colocadas a aclimatar em cultura, numa câmara a 14.5 °C ±2 °C, num matraz de manutenção com meio de cultura.



**Figura 4** – Fotografias tiradas durante o processo de triagem: à esquerda, divisão do material por tamanho; ao centro, exemplares de tamanho grande para congelar; à direita, lavagem do material para cultivo laboratorial, numa câmara de fluxo. (Autor)

### 2.3 Elaboração de exemplares de algário

Para a elaboração de preparações definitivas de exemplares de algário, alguns critérios foram tidos em conta. Foi escolhido o material que se apresentava em melhor estado sanitário, não contendo organismo epífitos; dada a impossibilidade de identificar diferentes estágios do ciclo de vida dos exemplares, a integridade física dos talos característicos de *D. carnosa* foi o critério determinante para a escolha dos espécimes a utilizar.

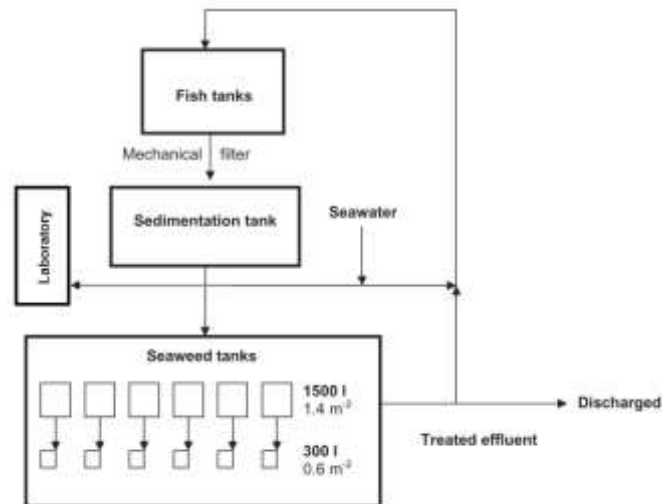
A montagem, utilizando a metodologia descrita por Pereira & Correia (2015), foi feita numa tina retangular de plástico com a altura de aproximadamente 8 cm, com água do mar perfazendo uma altura de aproximadamente 4,5 cm. O papel, de gramagem elevada e

previamente identificado a lápis com dados referentes ao nome específico, data e local da colheita e nome do coletor foi submerso na tina, lentamente, com auxílio de uma placa de acrílico, com uma inclinação suave. De seguida, o espécime de *D. carnososa* foi mergulhado lentamente, disposto no centro do papel e centrado com o auxílio de uma pinça e de uma agulha de dissecação. Para retirar o exemplar de algário da tina fez-se deslizar o mesmo pela placa de acrílico, com movimentos ténues. Para que este estivesse pronto a prensar foi posto a secar durante aproximadamente 5 minutos numa superfície lisa e com uma pequena inclinação. Para finalizar o processo as preparações foram montadas numa prensa, dispondo sobre cada uma gaze grossa, seguida de 7 a 8 folhas de jornal de modo a absorver a humidade e colocadas a secar numa estufa para material vegetal existente na empresa. Depois de parcialmente seca a gaze foi retirada, tendo sido o papel de jornal trocado regularmente, até o papel de suporte e o exemplar se encontrarem secos, prontos para a sua introdução na base de dados MACOI e para o arquivo da empresa.

## **2.4 Ensaios de cultivo - ALGAplus**

Os ensaios para avaliar o potencial de cultivo de *D. carnososa*, em condições laboratoriais e em sistema de IMTA sob as condições da costa portuguesa, foram realizados na empresa ALGAplus, em Ílhavo. Esta empresa pratica o cultivo de macroalgas num sistema de IMTA aberto, na ria de Aveiro, onde a água proveniente da piscicultura de douradas (*Sparus aurata*) em tanques de grandes dimensões, rica em nutrientes, é continuamente canalizada para diversos tanques de cultivo de macroalgas e posteriormente libertada para a ria. A produção de macroalgas está sujeita a variações de temperatura e luminosidade naturais, sendo possível controlar aspetos relativos ao arejamento, assim como o fluxo de entrada e saída de água dos tanques (renovação de nutrientes).





**Figura 5** – Esquematização do sistema de IMTA da empresa ALGAplus (adaptados de Matos et al. (2006)).

Para estudos laboratoriais e investigação, a empresa possui duas câmaras de cultivo laboratorial, mantidas a temperatura constante, com fotoperíodo diferentes, *long-day* (16:8) e *short-day* (12:12), e água do mar canalizada. A água do mar para o uso laboratorial é proveniente dos tanques da aquacultura de peixes exterior e devido à elevada presença de partículas em suspensão necessita de diversos tratamentos mecânicos até chegar, pela canalização, ao laboratório.



**Figura 6** – Fotografias nos diferentes locais de cultivo da empresa ALGAplus. À esquerda uma das câmaras de cultivo. No centro, tanques exteriores de cultivo macroalgais. À direita, tanques de piscicultura. (Autor)

### 2.4.1 Manutenção de material em cultivo

As amostras provenientes das recolhas nas praias de Mindelo e Carreço destinadas ao cultivo laboratorial (exemplares juvenis) permaneceram, provisoriamente, em manutenção num balão de 4L na câmara de cultivo em *short-day*, com meio de cultura VSE e dióxido de germânio, até à data de início das atividades laboratoriais. As amostras de tamanho médio, com destino a ensaios de IMTA foram colocadas num tanque de 100L, com fluxo contínuo,

no exterior, tendo sido mantidas até à data de início da atividade experimental. Ambas as amostras permaneceram pouco tempo em manutenção garantindo que, no início de cada atividade experimental se apresentassem em pleno estado para futuros estudos.



**Figura 7** – Tanque utilizado para a manutenção do material algal de *D. carnosa*. Proveniente da canalização superior (mais escura), ocorre a entrada de água filtrada para o tanque. (Autor)

## 2.4.2 Ensaios Laboratoriais

Os ensaios laboratoriais de *D. carnosa* tiveram como objetivo averiguar o crescimento da espécie em cultura (determinando taxas de crescimento relativas e produtividade), a fim de extrapolar para o modelo de IMTA as melhores características para o cultivo da espécie. Ambos os ensaios foram realizados com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão (*long-day*), a uma temperatura constante de  $14.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em matrizes de 1L, utilizando o meio de cultura *Von Stosch enriched* (VSE) e dióxido de germânio ( $\text{GeO}_2$ ) para prevenção do aparecimento de diatomáceas. Como nestes ensaios se pretendeu observar o crescimento vegetativo do material, asseguraram-se, através do controlo do fotoperíodo (Fortes & Lüning 1980) e da temperatura ótima de crescimento, as condições necessárias para este que este ocorresse.

No início de cada ensaio, para manter as condições de assepsia, a fim de evitar possíveis contaminações, a água do mar canalizada para o laboratório assim como todo o material utilizado nos ensaios (matrizes, varetas, tubagens, goblés, etc.) foram autoclavados. Toda a montagem do sistema foi feita com recurso a uma câmara de fluxo e todos estes procedimentos foram repetidos, rotineiramente, quando necessária a manutenção do sistema e mudanças de meio previstas nas experiências. Seguiu-se a montagem do sistema de arejamento nas prateleiras da câmara de cultivo. Este sistema, através de uma bomba, canaliza

ar por tubagens conectadas às varetas dos matrizes permitindo arejamento e agitação constante do conteúdo do matraz, resultando numa maior uniformização dos nutrientes e numa exposição à luz homogénea para todos os exemplares em cultivo.

Na câmara de fluxo, procedeu-se à elaboração do meio de crescimento nos matrizes:

1000 mL de ASW (*Autoclaved salted water*)

6 mL de *stock* de VSE

1 mL de GeO<sub>2</sub>

Após os matrizes estarem prontos a receber os explantes de *D. carnosa*, uma quantificação da biomassa, parcialmente seca em papel, para cada ensaio foi feita, procedendo-se de seguida a uma lavagem das algas numa câmara de fluxo. Esta lavagem, rigorosa, consistiu numa exfoliação física dos talos de *D. carnosa* com uma zaragatoa esterilizada para remover epífitas, seguida de 3 emersões sucessivas em goblés com, ASW, dH<sub>2</sub>O e ASW (respetivamente), sendo colocado por fim no matraz respetivo. Após selados com *parafilm*, os matrizes contendo os espécimes de *D. carnosa* foram posicionados na estante da câmara de cultivo e conectados às tubagens. A colocação prévia de válvulas na canalização de cada matraz permitiu regular uniformemente o arejamento, garantindo que este fosse igual para todos.

No final, todo o material proveniente dos dois ensaios foi lavado com dH<sub>2</sub>O, junto numa só amostra e criopreservado a -16 °C, constituindo para as extrações e ensaios de bioatividade futuros a amostra laboratorial (**Lab**).

Os resultados obtidos deste ensaio permitiu calcular as seguintes taxas:

$$\text{Taxa de crescimento (RGR)} = \left( \frac{\ln(FW) - \ln(IW)}{n^{\circ} \text{ de dias}} * 100 \right) \%$$

$$\text{Produtividade (Yield)} = \left( \frac{(FW - IW) * \%DW}{\text{área de ocupação} * \text{tempo}} \right) \%$$

Onde a percentagem de peso seco é dada pela fórmula:

$$\% \text{ Peso seco (DW)} = \left[ \frac{\text{peso seco do espécime}}{\text{peso húmido do espécime}} \right] * 100$$

A área de ocupação corresponde à área da circunferência basal do matraz dada pela expressão:

Área de ocupação = área da circunferência basal  $\Leftrightarrow$

$$\Leftrightarrow \text{Área de ocupação} = \pi r^2$$



**Figura 8** – Preparação dos ensaios laboratoriais. À esquerda, material autoclavado disposto em cima da mesa, para iniciar o ensaio. No centro, quantificação de biomassa para incluir nos matrizes de cultivo, à direita, numa câmara de fluxo, observam-se os matrizes já prontos a colocar em cultura. (Autor)

#### 2.4.2.1 Ensaio 1 – análise de densidades de cultivo

Este ensaio teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes densidades de cultivo no crescimento de *D. carnosa* em ambiente laboratorial, utilizando dois métodos experimentais ((a) com remoção da biomassa para manutenção da DC e (b) sem remoção de biomassa durante a experiência). Deste modo procedeu-se à montagem do sistema descrito em 2.4.2. Com o auxílio de um fotómetro, medindo no interior de um matraz com água do mar, foi possível marcar na prateleira da câmara de cultura o sítio exato de colocação dos matrizes com *D. carnosa*, de modo a registassem 100  $\mu\text{E}$ . Valor máximo obtido pela colocação dos matrizes adjacentes à fonte de luz.

O ensaio teve a duração total de 4 semanas, sendo a primeira considerada como período de aclimação dos exemplares às condições impostas. No primeiro dia de cada semana procedeu-se à mudança de meio de crescimento, previamente elaborado nas condições descritas no início do capítulo (2.4.2 – Ensaios laboratoriais), assim com a manutenção do sistema, quantificação da biomassa semanal e reposição da biomassa inicial (ensaio (a)). Mudanças de meio intermédias, sem quantificação da biomassa, foram realizadas às quintas-feiras. Foram testadas 3 densidades de cultivo, 1 g/L, 3 g/L e 5 g/L, cada uma com três réplicas ( $n=3$ ), semanalmente a biomassa foi repostada ao valor inicial e analisado o seu crescimento. Cada amostra contou ainda com um matraz extra ( $3n+1$ ), onde não houve

reposição da biomassa (b), sendo que neste a análise de crescimento foi feita apenas ao final de 3 semanas.

Uma análise uni-fatorial de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar a influência da densidade de cultivo sobre a RGR e a produtividade de *D. carnosa*. *A posteriori* foi verificado se existe homogeneidade das variâncias através do teste de Levene e realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de Tuckey. Todas estas análises foram efetuadas com auxílio do *software* estatístico SPSS versão 20.

#### **2.4.2.2 Ensaio 2 – análise do efeito combinado de densidade de cultivo e intensidade luminosa**

Este ensaio teve como objetivo avaliar em ambiente laboratorial, o efeito combinado da luz com as melhores densidades de cultivo encontradas em 2.4.2.1 de *D. carnosa*.

Uma vez mais, procedeu-se à montagem do sistema descrito em 2.4.1. e utilizando a mesma metodologia do ensaio anterior, marcaram-se na prateleira duas zonas de intensidades luminosas distintas, de modo a posicionar os matrizes contendo *D. carnosa*. Uma primeira linha de exposição, próxima do foco de luz, garantiu uma intensidade elevada (100  $\mu$ E) e uma segunda linha, mais distante, localizada por trás da primeira, garantiu uma exposição moderada à luz (40  $\mu$ E). Esta análise teve em conta trabalhos publicados com outras espécies de algas vermelhas e a seletividade preferencial esperada para esta espécie, que confina a sua ocorrência a lugares sombrios e resguardados (Barry & Dillon 1945, Guiry & Guiry 2015).

Neste ensaio foram usadas as densidades de cultivo de 1g/L, 3g/L com 3 réplicas (n=3) por cada por valor de intensidade luminosa, desta forma, DC (1,3) x IL (40, 100) x 3 replicas. O ensaio teve a duração total de 4 semanas, tendo sido a primeira o período de aclimação às condições de cultivo experimental. A manutenção do sistema, mudança de meio e quantificação de biomassa com análise de crescimento decorreram nos mesmo dias da semana que no ensaio prévio, nas mesmas condições descritas no início do capítulo (2.4.1 – Ensaios laboratoriais). Uma análise multifatorial de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar a influência da densidade de cultivo e da intensidade luminosa sobre a RGR e a produtividade de *D. carnosa*. A análise foi efetuada com auxílio do *software* estatístico SPSS versão 20.

### 2.4.3 Ensaio de cultivo exterior em regime de IMTA

Para o arranque da atividade experimental exterior, o material que se encontrava há cerca de 20 dias em manutenção, no tanque de 15 L, foi alvo de uma nova triagem. Assim, foi possível separar o material que se encontrava em bom estado sanitário (destinado para a experiência) do restante material (contendo alguns organismos epífitos). O material epifitado foi posteriormente lavado com dH<sub>2</sub>O e auxílio de uma escova dentífrica para remover parcialmente os contaminantes, tendo sido criopreservado de modo a constituir a amostra para as futuras extrações e ensaios de potencial bioativo – IMTA pouco epifitado (**PE**).

Este ensaio experimental consistiu na avaliação do crescimento da espécie *D. carnosa* no sistema de IMTA da empresa ALGAplus. As condições de temperatura e fotoperíodo são as existentes naturalmente na Ria de Aveiro, sujeitas às variações estacionais. A água fornecida ao sistema é efluente da aquacultura de douradas, disponibilizando ao crescimento macroalgal diversos nutrientes. Este ensaio teve a duração de 4 semanas, tendo sido atribuído à primeira o período de aclimação às novas condições. Foram testadas as densidades de cultivo de 1g/L e 3g/L, com 4 réplicas cada (n=4), em tanques de 15 L com fluxo contínuo e arejamento permitindo a circulação livre dos talos de *D. carnosa* pelo tanque.

O fluxo contínuo de água para o sistema foi calibrado e uniformizado em todos os tanques com recurso a um cronómetro e um recipiente de volume conhecido, tendo como objetivo manter estacionário o fluxo com o máximo de renovação. Esta medida teve o objetivo de diminuir a temperatura da água no tanque com o aumento da circulação, visto se tratar de uma espécie característica do patamar infralitoral superior, com temperaturas ótimas de crescimento a rondar os 12 °C a 15 °C (Barry & Dillon 1945, Guiry & Guiry 2015). Desta forma foi também possível, caso necessário, calcular a taxa de crescimento de cultura nos tanques de 15L.



**Figura 9** – À esquerda, montagem do sistema de tanques de 15L utilizados na atividade experimental exterior. No centro, *close-up* num dos tanques permite observar as condições físicas e mecânicas oferecidas aos espécimes de *D. carnosa* utilizados no ensaio. À direita observa-se a leitura de valores de pH, temperatura (°C) e salinidade (‰), pela sonda do medidor multiparamétrico, a 5 cm de profundidade. (Autor)

Diariamente foram registados os parâmetros de temperatura, pH e luminosidade fora e a 5cm de profundidade. Semanalmente procedeu-se à reposição da biomassa inicial (quando necessário) e à limpeza de todo o sistema com hipoclorito de sódio.

As densidades de cultivo foram então avaliadas segundo as taxas definidas na secção de ensaios de cultivo laboratorial, considerando neste caso a área de cultivo corresponde à zona exposta à luminosidade (área da superfície circular superior do tanque), dada pela equação:

$$\begin{aligned} \text{Área de ocupação} &= \text{área circular da superfície do tanque} \Leftrightarrow \\ &\Leftrightarrow \text{Área de ocupação} = \pi r^2 \end{aligned}$$

No final do ensaio toda a biomassa foi lavada com dH<sub>2</sub>O, apresentando-se no geral bastante epifitada, sendo congelada posteriormente constituindo a amostra para ensaios futuros – **IMTA**.

Foi verificado se existe homogeneidade das variâncias através do teste de Levene e realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de Tuckey. Todas estas análises foram efetuadas com auxílio do *software* estatístico SPSS versão 20.

## 2.5 Obtenção de extratos algais

As extrações realizadas na espécie *D.carnosa* foram realizadas no laboratório de macroalgas marinhas da Universidade de Coimbra – *Marine and environmental sciences centre* (MARE). Em primeira instância procedeu-se a moagem, num moinho de café, das

amostras disponíveis. Deste processo resultaram dois tipos de materiais provenientes da mesma amostra. O primeiro, um pó de grão muito fino, acumulado no topo da tampa do moinho, ideal para a análise FTIR, tendo sido portanto coletado para o efeito; o segundo, um pó homogêneo com partículas um pouco maiores foi guardado para a realização dos processos de extração.



**Figura 10** – À esquerda, processo de quantificação de biomassa algal seca em amostras de diferentes origens; no centro, processo de moagem das algas num moinho de café. À direita, quantificação de um 1g de alga seca moída para iniciar o processo de extração. (Autor)

### 2.5.1 Extração Alcalina em NaOH

Esta metodologia foi utilizada com intuito de extrair, com alto rendimento, coloides de *D. carnosá*, descrita por Pereira e colaboradores (2003). A biomassa utilizada (1g por extração) foi primeiramente submetida a uma lavagem numa mistura de metanol-acetona (1:1) *overnight*, de modo a eliminar a fração solúvel. De seguida, foi decantada a fração líquida apenas conservando a biomassa sólida e posta a secar ao ar durante sensivelmente 10 minutos. Após a evaporação total da mistura metanol-acetona, com auxílio de um esguicho com  $\text{dH}_2\text{O}$ , o material foi hidratado com apenas algumas gotas, de modo a aumentar a sua permeabilidade para o passo seguinte da extração.

Num goblé contendo 150 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de 8g/L, a biomassa foi colocada em banho-maria, durante um período mínimo de 3 horas. Este passo pretendeu aumentar as cadeias do coloide, permitindo no final uma melhor precipitação (Pereira 2004, Tuvikene et al. 2006). De seguida efetuaram-se duas filtrações a quente, por vácuo em coluna de água, sendo a primeira realizada num filtro de porcelana com pano-cru e a segunda realizada num filtro de sílica em funil, com porosidade



G2, acoplado a um quitasato. A biomassa, maioritariamente compostas por fibras celulósicas foi descartada na primeira filtração.

De seguida, ainda a quente, precipitou-se a fase líquida contendo polissacarídeos de *D. carnososa*, com a adição, numa razão de 1:1, de álcool propílico (2-isopropanol) á solução, que permaneceu *overnight* a sedimentar à temperatura ambiente. Para remoção dos polissacarídeos de *D. carnososa* decantou-se o sobrenadante e colocou-se o coloide a desidratar imerso em Etanol a 96%, também durante a noite, no frigorífico. No dia seguinte, após a decantação do Etanol, os polissacarídeos foram colocados a secar numa estufa a 60°C, durante 6 horas, de modo a quantificar o seu peso seco. Para avaliar o efeito do tratamento alcalino foram realizados dois banhos-maria com durações diferentes. O mais curto teve a duração das 3 horas definidas por Pereira et al. (2003), o segundo teve a duração de 5 horas. Decorridos os procedimentos supracitados os coloides foram guardados para análise de conteúdo.



**Figura 11** – Metodologia utilizada no processo de filtração da solução de polissacarídeos. À esquerda, a primeira filtração, utilizando um filtro de porcelana e pano-cru, por vácuo em coluna de água. À direita, a segunda filtração, num filtro de sílica (G2), também por filtração em coluna de água. (Autor)

### 2.5.2 Extração sequencial

A metodologia utilizada nas extrações foi adaptada do trabalho de mestrado desenvolvido por Loïc de Carvalho (2013). Todo o processo foi concebido de forma a retirar numa só extração, através da aplicação de diferentes solventes orgânicos, o máximo de conteúdo para aplicações biotecnológicas de *D. carnososa*, consistindo o processo numa extração inicial com n-hexano, seguido de uma segunda em metanol (MeOH) e uma terceira extração, alcalina com precipitação do coloide em álcool isopropílico.

Para adequar a técnica à macroalga em estudo, a primeira extração foi realizada com material aproveitado, proveniente da moagem das 5 amostras diferentes, servindo exclusivamente para calibrar a metodologia. Desta extração, considerando a presença de pigmentação como sendo boa indicadora do processo, concluiu-se que seriam necessárias 3 lavagens em n-hexano e 4 em MeOH. Lavagens futuras pelos solventes mostraram-se desnecessárias devido à transparência e da falta de pigmentação (Carvalho 2013).

De modo a calcular o índice de produtividade das extrações das diferentes amostras de *D. carnosa*, todas estas foram realizadas em triplicado (3n), utilizando as 5 amostras de biomassa disponíveis: **Mindelo, Carreço, Laboratorial, IMTA e PE**. No final dos processos, após calculados os índices de produtividade, as extrações provenientes da mesma amostra foram juntas. Todos os solventes foram recuperados num evaporador rotativo (Kumar et al. 2015), tendo sido devidamente identificados, para uso exclusivo em *D. carnosa*, procedimento recorrente nesta indústria, como medida de controlo de custos.



**Figura 12** – Algumas etapas do processo de extração sequencial: à esquerda, preparação do material antes da primeira extração com solventes; à direita, atuação do solvente na biomassa algal moída, numa placa de agitação, durante 20 min. (Autor)

### 2.5.2.1 Extrato em n-hexano

Depois de quantificado 1g total de biomassa moída (quantidade definida devido à baixa disponibilidade de biomassa), deu-se início ao processo de extração com o primeiro solvente, n-hexano, a uma proporção de 1:20 (m/v), ou seja 1 g de alga moída para 20 mL de solvente, numa placa de agitação com um magneto, durante 20 minutos. Intercalando cada lavagem foi feita a uma filtração por vácuo em coluna de água, num filtro de sílica em funil, com porosidade G3, acoplado a um quitasato, permitindo desta forma separar a fração

extraída, da restante biomassa algal. Repetido este processo 3 vezes, as frações de n-hexano foram concentradas no evaporador rotativo (vácuo por tromba de água e com a temperatura do banho maria a 37-40°C) num volume final de cerca de 7mL, tendo sido de seguida identificadas e congeladas.

### **2.5.2.2 Extrato de Metanol**

A biomassa proveniente da extração em n-hexano foi deixada num local arejado, a evaporar, de modo a prosseguir com o processo. Passado poucos minutos foi adicionado, na mesma proporção o solvente MeOH, tendo os passos na extração sido idênticos aos descritos em 2.5.2.1, à exceção das quatro lavagens para este solvente.

Após recolhida a totalidade do extrato num Erlenmeyer, procedeu-se à sua concentração e à respetiva recuperação do solvente. De seguida, através da adição de dH<sub>2</sub>O, numa razão aproximada de 1:1, ressuspendeu-se o extrato substituindo o metanol por água. Todo este processo aconteceu no evaporador rotativo e teve como adquirido que o metanol, sendo mais volátil que a água, evapora em primeiro lugar. Assim, utilizando o banho-maria a uma temperatura de 37-40°C foi possível retirar o metanol da solução e descartá-lo. A adição de um pouco mais de água do que metanol (9mL) permitiu conferir que o processo retirou todo o solvente. Depois da substituição o extrato final foi congelado para futuros ensaios e a biomassa restante foi retirada do filtro de sílica usado na última filtração, prosseguindo para a próxima etapa do processo.

### **2.5.2.3 Precipitação dos polissacarídeos**

Nesta etapa, para extrair a carragenana recorreu-se ao banho-maria em solução alcalina descrito em 2.5.1. posteriormente efetuaram-se duas filtrações a quente, por vácuo em coluna de água, sendo a primeira realizada num filtro de porcelana com pano-cru e a segunda realizada num filtro de sílica em funil, com porosidade G2, acoplado a um quitasato. A biomassa, maioritariamente compostas por fibras celulósicas, foi descartada. A precipitação foi feita na razão de 1:1 com isopropanol, tendo permanecido de noite, à temperatura ambiente a sedimentar. No dia seguinte o coloide foi retirado decantando a fase líquida e imerso em Etanol a 96%, onde permaneceu, a desidratar, mais uma noite. Para cálculos de

rendimento da extração, no dia seguinte, o mesmo foi posto a secar durante 6 horas na estufa e pesado no final. Todos os polissacarídeos foram armazenados no estado seco, para posterior análise de bioatividade.

### 2.5.3 Análise do rendimento das extrações

O cálculo do rendimento dos processos de extração permite concluir acerca da quantidade de compostos obtidos pela atuação do solvente. O cálculo é feito com base no peso seco dos extratos através da seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento da extração} = \left( \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa da amostra p/ extração (g)}} * 100 \right) \%$$

Para o cálculo do rendimento do processo de extração, tararam-se previamente os recipientes utilizados, a fim de se registar o peso dos extrato secos. Para a obtenção de extratos secos as frações metanólicas suspensas em água, foram liofilizadas; as frações em n-hexano foram evaporadas num evaporador rotativo. De modo a facilitar os cálculos e devido à pouca disponibilidade de material para extrações, utilizou-se 1 g de biomassa seca por cada extração.



**Figura 13** – Na imagem da esquerda, os polissacarídeos de *D. carnosus* postos a secar na estufa, com Gel de Sílica para absorver eficazmente a humidade. Na imagem da direita observa-se a evaporação total do extratos de n-hexano, num evaporador rotativo, de modo a serem ressuspensos em DMSO. (Autor)

Uma análise fatorial mista de variância (ANOVA) foi utilizada para confirmar se existe influência do método de cultivo sobre o rendimento do processo de extração pelos diversos solventes. *A posteriori* foi verificado se existe homogeneidade das variâncias para a atuação de cada solvente através do teste de Levene e realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de Tuckey. Todas estas análises foram efetuadas com auxílio do *software* estatístico SPSS versão 20.

## 2.6 Análise do conteúdo em ficocolóides

A análise do conteúdo de ficocolóides de *D. carnososa* foi feita com recurso à técnica de espectroscopia FTIR-ATR (*Fourier transform infrared spectroscopy, attenuated total reflectance*), na Universidade de Aveiro. Para análise foram enviados estratos de carragenanas moídas das 5 amostras (**Carr**, **Mind**, **Lab**, **IMTA** e **PE**), bem como amostras de carragenanas das duas extrações alcalinas (**3** e **5 horas**). Para auxiliar a análise fora, também enviadas duas amostras de *D. carnososa* moída, provenientes de **Carr** e **IMTA**.

O processamento e tratamento dos espectros brutos enviados para análise foram efetuados no programa Origin9 (OriginLab), de modo a definir apenas a zona dos espectros referente à análise dos colóides. Deste modo, em primeira instância, foi formatado o comprimento do eixo dos *xx* para o intervalo de valores [600,2000]. De seguida, o eixo dos *yy* foi removido; tendo-se posteriormente evidenciado todos os picos do espectro, ajustando os valores do máximo e mínimo absolutos das curvas para os valores limite máximo e mínimo do eixo dos *yy*, respetivamente.

## 2.7 Ensaios de bioatividade

Os ensaios de bioatividade foram realizados na Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar do Instituto politécnico de Leira, Peniche. Nestes ensaios foram utilizadas as frações de n-hexano, MeOH e polissacarídeos, das 5 amostras de *D. carnososa*.

No laboratório, procedeu-se evaporação dos solventes dos extratos de n-hexano e MeOH num evaporador rotativo e quantificou-se a biomassa do extrato, de modo a ser possível trabalhar numa concentração de extrato conhecida. Posteriormente os extratos foram ressuspensos em DMSO (dimetilsulfóxido a 99,9%, Sigma, Steinheim, Alemanha) e criopreservados a -20 °C para futuras utilizações (Pinteus 2011).

### 2.7.1 Análises de potencial antioxidante

Todas as frações de *D. carnososa* foram testadas pelos métodos DPPH e pelo método *Oxygen radical absorbent capacity* (ORAC) por se tratarem de métodos quantitativos não específicos. A realização do método de quantificação total polifenólica (QTP) cingiu-se às frações de n-hexano e metanol, visto não ser específica para testar polissacarídeos.

### 2.7.1.1 Avaliação da capacidade de redução de DPPH

Este método colorimétrico, rápido e eficiente, permite determinar o potencial de neutralização de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por amostras vegetais. A capacidade de sequestração do radical DPPH das amostras de *D. carnososa*, foi avaliada segundo o método descrito por Duan e colaboradores (2006), havendo contudo, a substituição do metanol como solvente por etanol.

Para dar início ao ensaio foi preparada uma solução de DPPH a 0,1 mM em etanol absoluto. De seguida, numa placa de micropoços, 10 µL de amostra foram adicionados a 990µL da solução de DPPH (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), tendo cada amostra 5 réplicas (5n).



**Figura 14** – Esquematização do ensaio de avaliação da capacidade de redução do DPPH numa placa de micropoços. À esquerda, a caracterização da placa garante o correto procedimento do ensaio. À direita, observável a diferença colorimétrica do radical DPPH após incubação com extratos de *D. carnososa*. (Autor)

Após homogeneizado o conteúdo dos poços com o movimentos *up & down* através de micropipeta multicanal, a placa foi posta no escuro a encubar durante um período de 30 min, à temperatura ambiente. Findo o tempo de encubação, procedeu-se à leitura da absorvância dos micropoços a um comprimento de onda de 517 nm, tendo sido a capacidade de redução dos extratos calculada através da equação:

$$\% \text{ de redução} = \left[ \frac{(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco})}{Abs \text{ controlo}} \right] * 100$$

Onde:

Abs<sub>controlo</sub>: Absorvância da solução de DPPH + 10 µL de DMSO

Abs<sub>amostra</sub>: Absorvância da solução de DPPH + 10 µL de amostra

Abs<sub>branco</sub>: Absorvância da amostra (990 µL etanol + 10 µL de amostra)

Todos os extratos foram analisados à concentração máxima de 1 mg/mL. Em extratos cuja percentagem de redução de DPPH foi superior a 50%, efetuaram-se ensaios dependência da concentração (0,3 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,03 mg/mL) para determinação do valor de EC50.

### 2.7.1.2 Quantificação total de polifenóis

A quantidade total de polifenóis (QTP) foi avaliada através do método de Folin-Ciocalteu, adaptada a partir dos trabalhos realizados por Yu e colaboradores (2002) e Pinteus (2011). Foi usado o Ácido Gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) como padrão para a curva de calibração, sendo a quantidade total de polifenóis expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

O ensaio foi realizado numa placa de microtubos onde, em cada poço, foi adicionado 890 µl de água destilada, 10 µl de amostra e 50 µl de reagente de Folin-Ciocalteu (Fluka Biochemika, Sigma Aldrich, Suíça). Posteriormente adicionou-se 150 µl de carbonato de sódio, (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 20% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação foi incubada ao escuro, durante uma hora, à temperatura ambiente, tendo posteriormente sido medida a absorvância num espetofotómetro a um comprimento de onda de 755 nm. Tendo sido usadas 5 réplicas por amostra (5n).



**Figura 15** – Placa de micropoços após período de incubação, no método de quantificação total de polifenóis, onde são facilmente observáveis as diferentes colorações das diversas amostras do ensaio, refletindo a atuação dos extratos algais como agentes antioxidantes sobre o reagente de Follin-Ciocalteu.

### 2.7.1.3 Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC)

Neste trabalho experimental o método de ORAC foi adaptado a partir do trabalho realizado por Dávalos e colaboradores (2004). A técnica permitiu quantificar a capacidade de neutralização de radicais AAPH por extratos de *D. carnosa*, com recurso à fluoresceína como

marcador fluorescente e através da elaboração de uma curva padrão do antioxidante conhecido, análogo à Vitamina A, Trolox.

Deste modo começou-se por fazer as diluições de Trolox para a curva padrão, em tampão Fosfato (75 mM), para as concentrações de 80, 40, 20, 10, 5 e 0  $\mu\text{M}$ ; seguido das respectivas diluições das amostras (1, 0.1 e 0.01 mg/mL) também em tampão fosfato (75 mM, pH 7.4). De seguida, adicionando 20  $\mu\text{L}$  das diluições das amostras nos poços respetivos à análise dos extratos e 20  $\mu\text{L}$  de Trolox nos poços destinados à realização da curva de calibração.

Posteriormente procedeu-se à realização da Fluoresceína a 0.117  $\mu\text{M}$ , através de diluições sucessivas em tampão fosfato (75 mM) e adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  aos poços da curva e das amostras. Nos poços destinados aos brancos da amostra e da curva, o mesmo volume foi adicionado substituindo a fluoresceína por tampão Fosfato (75 mM).

Realizou-se uma pré-incubação de 15 min, a 37 °C, num leitor de fluorescência com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e com um comprimento de onda de emissão de 528 nm, com leituras de 1 em 1 minuto. Durante este último passo, foi realizado o AAPH a 40mM. Quando a pré-incubação terminou, com o auxílio de uma pipeta multicanal foi adicionado 60  $\mu\text{L}$  da solução de AAPH a cada poço da placa procedendo-se à leitura de fluorescência (excitação 485nm, emissão 528nm) a 37 °C a cada minuto durante 4 horas.

Os resultados são expressos em micromole de equivalentes de Trolox por grama de extrato (ET/g extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicado. A curva antioxidante (fluorescência em função do tempo) é normalizada com a curva do branco correspondente ao mesmo ensaio, multiplicando os dados pelo fator de fluorescência  $f_{\text{branco}, t=0}$  /fluorescência  $f_{\text{amostra}, t=0}$ . A partir da curva normalizada a área abaixo da curva (AUC) é calculada através da seguinte equação:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0$$

Onde  $f_0$  corresponde à leitura de fluorescência inicial ao tempo 0 minutos e  $f_i$  corresponde à leitura de fluorescência ao tempo  $i$  minutos. A AUC total corresponde a uma amostra e é calculada subtraindo-se a AUC correspondente ao branco. Equações de regressão entre a AUC total e a concentração antioxidante foram calculadas para todas as amostras (Dávalos et al. 2004, Horta et al. 2014).



## 2.7.2 Avaliação da capacidade antimicrobiana

A metodologia adotada neste ensaio foi baseada no trabalho desenvolvido por Pinteus (2011). De modo a avaliar a efetividade dos extratos de *D. carnosa*, foram utilizados 3 microrganismos modelo, duas bactérias, Gram+ e Gram-, e um fungo, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231), respetivamente. Os microrganismos encontravam-se em *stock* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a partir do qual se retiraram 100  $\mu\text{L}$ , sendo transferidos para transferidos para 100 mL dos meios líquidos TSY (Trypticase Soy Agar), LB (Luria-Bertani Broth) e YPD (Yeast Peptone Dextrose), respetivamente. Posteriormente procedeu-se a uma incubação dos microrganismos a  $37^{\circ}\text{C}$  a 150 rpm (Heidolph Inkubator 1000) durante 24 horas.



**Figura 16** – A preparação dos microrganismos utilizados nos ensaios de potencial antimicrobiano. À esquerda, preparação dos inóculos nos respetivos meios de cultivo. À direita, realização do inóculo.

Antes da realização dos ensaios com os extratos algais foi necessário proceder à monitorização da curva de crescimento dos microrganismos tendo sido efetuadas diversas leituras a diferentes horas do crescimento para determinar o início da sua fase exponencial de crescimento (Horta et al. 2014). Após uma incubação de 5 horas, através da leitura da absorvância a 600 nm (Balasundaram et al. 1999), a capacidade antimicrobiana dos extratos foi avaliada na presença e ausência de extratos. Foram retirados 5  $\mu\text{L}$  de cada microrganismo para os poços de um microplaca, contendo 193  $\mu\text{L}$  do meio respetivo e 2  $\mu\text{L}$  de extrato/DMSO filtrado (situação controlo), perfazendo um total de 200  $\mu\text{L}$ .



**Figura 17** – Placas de micropoços utilizadas no ensaio, devidamente identificados com cada extrato utilizado, respetivo microrganismos e situações de controlo.

A capacidade antimicrobiana foi calculada pela redução do crescimento (% do controlo) através da equação:

$$\text{Redução do crescimento (\% Controlo)} = \left[ \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controlo}} \right] * 100$$

Onde:

Abs<sub>controlo</sub>: absorvância do crescimento microrganismo em meio de cultura

Abs<sub>amostra</sub>: absorvância do crescimento microrganismo na presença dos extratos

Abs<sub>branco</sub>: absorvância dos extratos no meio de cultura

Todos os extratos foram analisados à concentração máxima de 1 mg/mL. Em extratos cuja percentagem de inibição do crescimento foi superior a 50%, efetuaram-se ensaios dependência da concentração (0,3 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,03 mg/mL) para determinação do valor de IC50. Os resultados foram expressos em percentagem média de controlo ± erro padrão (SEM) (Pinteus 2011, Horta et al. 2014).



### **3 Resultados**



### **3.1 Exemplos obtidos**

O primeiro trabalho de busca, na praia de Mindelo, a 09/06/2014, revelou-se infrutífero para encontrar comunidades submersas de *Dilsea carnososa*. Cerca de 2 horas de busca, em locais descritos por Barry & Dillon (1945) falharam, resultando apenas na coleta de material que se encontrou destacado, em poças de maré superiores (habitat não preferencial da espécie), facto que não foi de todo indicador da sua ocorrência neste local.

A busca no segundo lugar de colheita, Praia de Carreço, a 16/09/2014, revelou-se proveitosa. Nos locais semelhantes aos do primeiro exercício de recolha, várias comunidades de *D. carnososa* foram localizadas, apresentando pequenas dimensões e não possuindo mais do que 20 indivíduos por comunidade; ocorrendo quer em substrato arenoso quer rochoso, em locais abrigados (Guiry & Guiry 2015).

Dos dois processos de busca resultaram 611,52g de biomassa proveniente da Praia de Carreço e 35,67g de biomassa de *D. carnososa* proveniente da Praia de Mindelo para futuros ensaios.

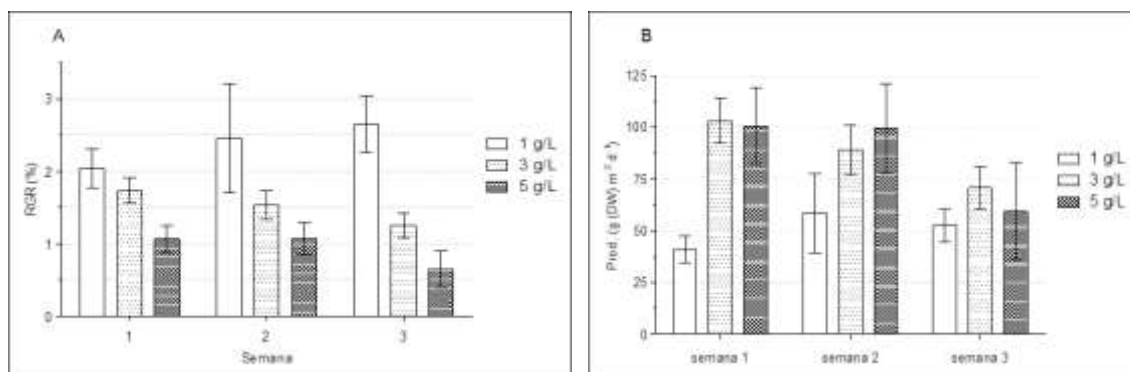
### **3.2 Ensaios de cultivo laboratoriais**

#### **3.2.1 Ensaio laboratorial de densidades de cultivo**

A primeira atividade experimental realizada em laboratório obteve resultados de crescimento positivos. Toda a biomassa apresentou valores crescentes de peso nos controlos de densidade semanais realizados. No final do ensaio, apresentou sinais favoráveis de viabilidade e bom estado sanitário. Todas as densidades de cultivo utilizadas (1 g/L, 3g/L e 5g/L) apresentaram diferenças de peso quantificáveis, que permitiram concluir acerca da taxa de Crescimento Relativo Médio e de Produtividade.

A percentagem de peso seco (%DW) foi calculada com base na fórmula apresentada em 2.4.2 e obtida através da quantificação da biomassa seca de 3 réplicas de *D. carnososa* provenientes deste ensaio, secas numa estufa a 45°C durante 3 dias. O conteúdo relativo em água de exemplares de *D. carnososa* cultivados neste ensaio foi de 75,72% e a média do peso seco, para este ensaio foi de 24.28%. Ver dados brutos em anexo.

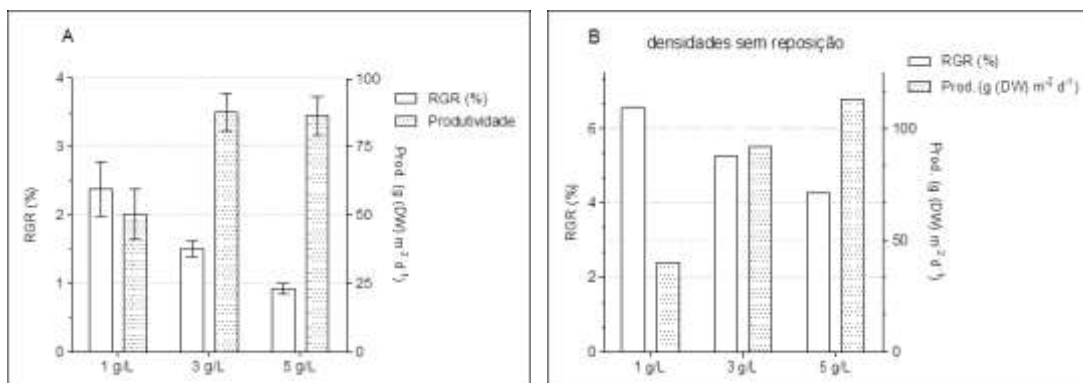
Para amostras onde a ocorreu reposição do valor da biomassa inicial, o crescimento médio semanal, na forma de RGR (%) é apresentado na Fig. 18A. Consta-se que a densidade que apresenta um crescimento médio maior por semana é a densidade de 1 g/L, sendo este crescente ao longo do tempo; enquanto que a amostra que possui um crescimento mais lento foi a amostra com maior biomassa, 5 g/L.



**Figura 18** – (A) Taxa de crescimento médio (RGR) das diferentes densidades de cultivo por semana, com reposição da densidade de cultivo inicial. (B) Produtividade média semanal das mesmas amostras. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=3)

Relativamente à média da produtividade das amostras de diferentes densidades de cultivo por semana (Fig. 18B), o comportamento verificado foi diferente. Na primeira semana, as densidades 3 g/L e 5 g/L apresentaram produtividades médias aproximadamente semelhantes e elevadas, quando em comparação com os valores registados pela amostra de 1 g/L. Após a primeira semana, a produtividade média da amostra de 3 g/L registou decréscimos, quer em valor absoluto face à semana 1, quer comparativamente à amostra de 5 g/L, que na segunda semana manteve o seu valor. Na última semana, os valores observados foram os mais baixos de todo o ensaio, tendo sido o da densidade de 5 g/L o que registou um decréscimo mais acentuado. Para esta semana a densidade de cultivo de 3 g/L foi a que apresentou níveis de produtividade média maiores.

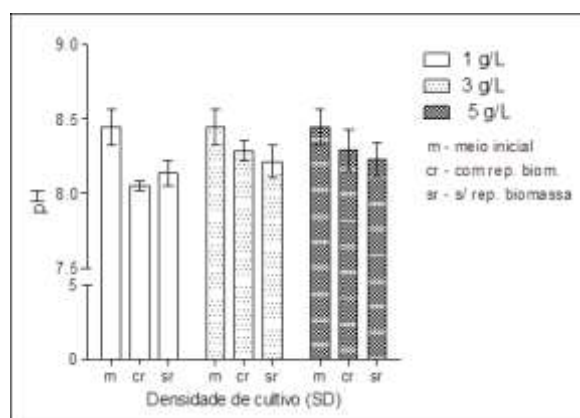
Ao analisar as taxas de crescimento e produtividade médias de toda a experiência em amostras onde se efetuou a reposição semanal à biomassa inicial (Fig. 19A) é possível constatar que se obtém uma produtividade maior nas maiores densidades de cultivo e um crescimento maior na amostra de menor densidade.



**Figura 19** –Valores totais médios da RGR e Produtividade das densidades de cultivo com reposição à DC inicial (A) e sem reposição à DC inicial (B). Os valores apresentados para 20.A correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=3)

No que diz respeito ao crescimento médio relativo e produtividade média, de matrizes onde a reposição semanal à densidade de cultivo inicial não foi realizada, observa-se aparentemente, um decréscimo de produtividade com o aumento da taxa de crescimento relativo entre as amostras (Fig 19B).

O gráfico da Fig. 20 pretende mostrar potenciais diferenças de pH (valor médio), por densidade de cultivo (com e sem reposição à densidade inicial). As medições efetuadas à saída (cr, sr) e entrada de novo meio (m) aquando a manutenção do sistema permitem quantificar variações de pH justificativas da ocorrência de processos biológicos como fotossíntese.



**Figura 20** – Valores de pH médios por densidade de cultivo, onde (m) representa a medição de pH realizada em meio de cultivo novo, e (cr) e (sr) representam os valores de pH do meio de cultivo algal com 3 dias de ensaio. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=3)



Através da realização da ANOVA de uma via obtiveram-se os seguintes resultados apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Efeito da densidade de cultivo na RGR e na Produtividade (ANOVA)

	RGR				Produtividade			
	df1	df2	F	p	df1	df2	F	p
Dens Cult.	2	6	9,23	0,015	2	6	7,362	0,024
Teste de Levene	L=3,815			0,085	L= 0,118			0,891

Estes resultados permitem concluir que não existe igualdade entre as médias de RGR e Produtividade para as diferentes densidades de cultivo ( $p < 0.05$ ). Segundo o Teste de Tuckey verifica-se que existem densidades de cultivo com RGR médios semelhantes, sendo eles 3 g/L e 5 g/L, enquanto a densidade 1 g/L apresenta um valor maior para este parâmetro. Para valores de produtividade média verifica-se o inverso, isto é, a densidade de cultivo 1 g/L apresenta uma produtividade mais baixa face às outras duas densidades, estatisticamente semelhantes (consultar dados brutos em Anexo).

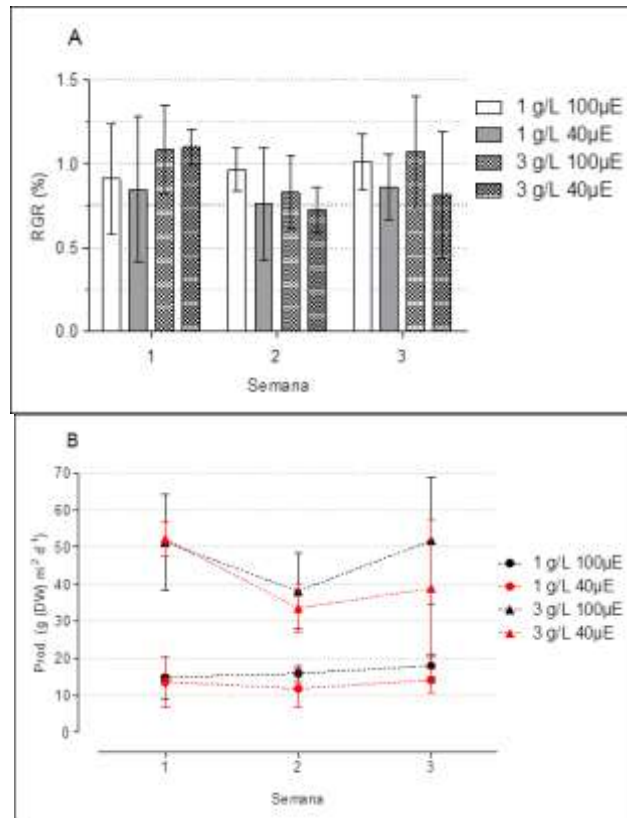
### 3.2.2 Ensaio laboratorial de intensidade luminosa

Esta atividade experimental permitiu inferir acerca de qual a melhor intensidade luminosa para o cultivo de *D. carnosa* em ambiente laboratorial, tendo obtido resultados positivos. Toda a biomassa no final do ensaio apresentou sinais favoráveis de viabilidade e bom estado de conservação.

Para a quantificação da percentagem de peso seco (%DW) foram utilizadas 3 réplicas de *D. carnosa*, secas numa estufa a 45°C durante 3 dias. Desta análise concluiu-se que cerca de 79,71% do peso fresco de amostras, provenientes deste ensaio de cultivo são água, sendo o peso seco médio de 20.29%, para o ensaio. Ver dados brutos em Anexo.

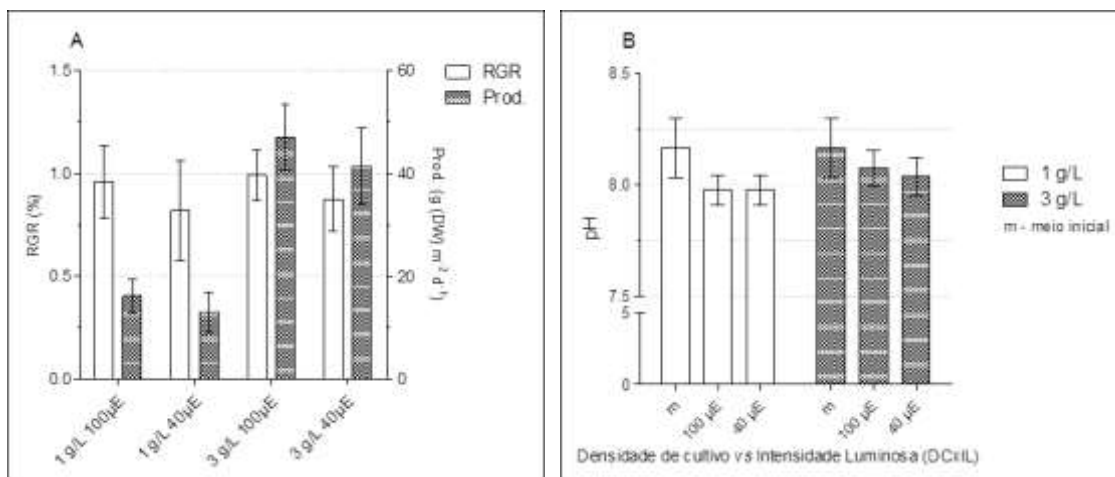
Atendendo à leitura dos valores de crescimento semanal médio (%) fornecidos pela Fig 21A, é possível constatar que as amostras de *D. carnosa* cultivadas numa densidade de 3 g/L apresentam, na primeira semana, maiores valores de RGR. Na segunda semana, um decréscimo no crescimento é observado nestas amostras, diminuindo em valor absoluto e perante as amostras cultivadas a 1 g/L, que por sua vez, sofreram um pequeno incremento no valor de crescimento relativo. Na terceira e última semana o valores de RGR das amostras de 3g/L voltam a registar subidas, sendo acompanhadas pelas demais.

Relativamente à produtividade das amostras avaliadas (Fig 21B), constata-se ser maior em amostras com uma densidade de cultivo maior, assim ao longo do ensaio, as amostras de *D. carnosa* cultivadas numa densidade de 3 g/L, apesar de apresentarem uma maior variação da sua produtividade em valor absoluto, registam valores de produtividade superiores às de 1 g/L



**Figura 21** – (A) Taxa de crescimento relativo (%) e Produtividade (B), nas diferentes semanas de cultivo, das diferentes amostras de *Dilsea carnosa* sujeitas a diferentes intensidades luminosas e diferentes densidades de cultivo. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=3)

O gráfico A da Fig. 24 permite observar que, em geral, os valores de produtividade e RGR médios de amostras que receberam uma maior intensidade luminosa (Fig 22A) são maiores aos seus correspondentes de menor intensidade. Os valores de pH para as amostras testadas aparentam ser semelhantes.



**Figura 22** – (A) Taxas de crescimento relativo médio e produtividade média do ensaio realizado em diferentes amostras de *D. carnosa*, sujeitas a diferentes intensidades luminosas e diferentes densidades de cultivo; e (B) variações médias de pH registadas, por DC. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=3)

Através da realização da ANOVA de duas vias obtiveram-se os seguintes resultados

**Tabela 2** - Efeito da densidade de cultivo e intensidade luminosa na RGR e Produtividade (ANOVA)

	RGR				Produtividade			
	df	df2	F	P	df	df2	F	P
Dens Cult (DC)	1	8	0,061	0,811	1	8	28,585	0,001
I. Luminosa (IE)	1	8	0,491	0,503	1	8	0,603	0,46
DC x IE	1	8	0,005	0,948	1	8	0,05	0,82
teste de Levene	L=0,449			0,725	L= 1,624			0,259

Os resultados descritos na tabela acima permitem concluir que não existe interação entre os fatores, densidade de cultivo e intensidade luminosa ( $p > 0.05$ ). Segundo esta análise verifica-se que, a intensidade luminosa não é estatisticamente significativa, para que se observem diferenças nos comportamentos de RGR e produtividade das diferentes densidades de cultivo estudadas.

### 3.2.3 Ensaio exterior – IMTA

Esta atividade experimental pretendeu avaliar a capacidade de cultivo de *D. carnosa* em regime de IMTA, com as características da Costa Portuguesa, em específico da região geográfica da Ria de Aveiro. A biomassa esteve exposta às condições oferecidas na empresa ALGApplus para o cultivo de espécies macroalgais, usufruindo de condições climáticas que não apresentaram grandes variações.

O ensaio foi realizado durante os meses de Agosto e Setembro, teve uma duração de 3 semanas e ao longo destas todos os procedimentos de limpeza para garantir o bom estado do material foram assegurados. Intercalando os dias de manutenção e limpeza do sistema, observou-se sistematicamente nos tanques do ensaio, um crescimento rápido de algas de carácter oportunista (*Ceramium* sp. (Rhodophyta), *Ulva* sp. (Chlorophyta) e *Echtocarpus* sp. (Phaeophyceae)).

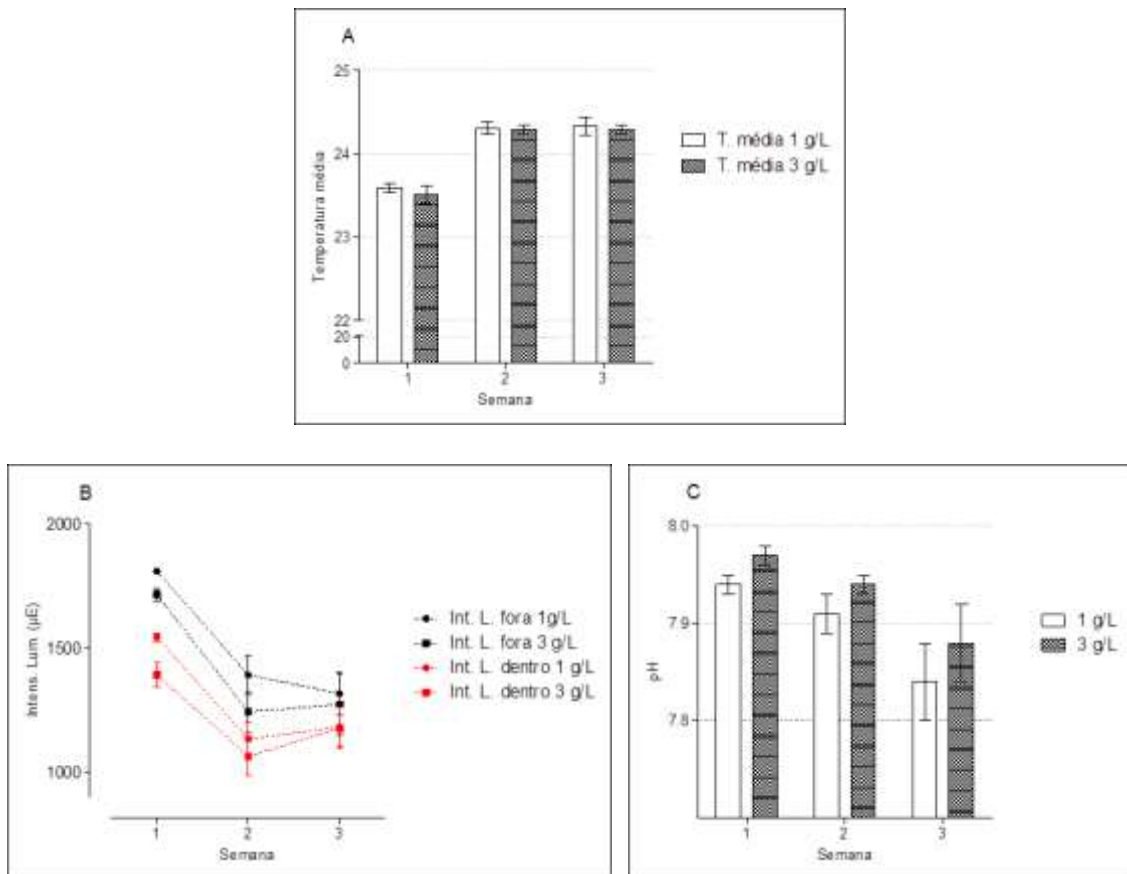
Foi registado crescimento durante todo o período do ensaio, contudo, dia após dia, os espécimes apresentavam um aspeto cada vez mais debilitado. No final do ensaio apresentavam fortes sinais de debilidade e mau estado de conservação, sugerindo a inviabilidade do cultivo a longo prazo nestas condições. Foi facilmente observável um grau severo de epifitização por briozoários e por macroalgas como *Ceramium virgatum*, *Echtocarpus* sp. e *Ulva* sp..

Através da análise da Tabela 3 é possível observar que a temperatura média da água, medida na hora de maior incidência da radiação solar, rondou os 24 °C. Durante o ensaio as variações na temperatura fora de pequeno valor, tendo a temperatura nestes meses se mantido amena e constante ao longo do ensaio. Em todos os tanques, a intensidade luminosa ( $\mu\text{E}$ ) à superfície e a uma profundidade de 5 cm do tanque foram registadas, todos os dias, às 17 horas e 30 min.

**Tabela 3** – Valores médios de pH, Temperatura (°C), intensidade luminosa ( $\mu\text{E}$ ) à superfície da coluna de água e a 5 cm de profundidade medidos nos tanques de cultivo.

	Hora	1 g/L	3 g/L
		Média $\pm$ SEM	Média $\pm$ SEM
pH	13:00	7,89 $\pm$ 0,02	7,92 $\pm$ 0,02
Temp (°C)	13:00	24,1 $\pm$ 0,06	24,15 $\pm$ 0,07
Int. Lum sup. ( $\mu\text{E}$ )	17:30	1491,13 $\pm$ 40,10	1411,73 $\pm$ 45,26
Int. Lum 5cm. ( $\mu\text{E}$ )	17:30	1276,29 $\pm$ 41,05	1237,73 $\pm$ 45,24
T. de redução de luz		14.4 %	12.3 %

Os tanques estiveram expostos à radiação solar direta durante todo o período do ensaio. Durante este mesmo período apenas se verificou por uma vez a ocorrência de pluviosidade bastante moderada, não sendo portanto considerada relevante para eventual interpretação dos resultados. Para consulta em maior detalhe poderão ser vistos dados semanais detalhados, em bruto, no Anexo.



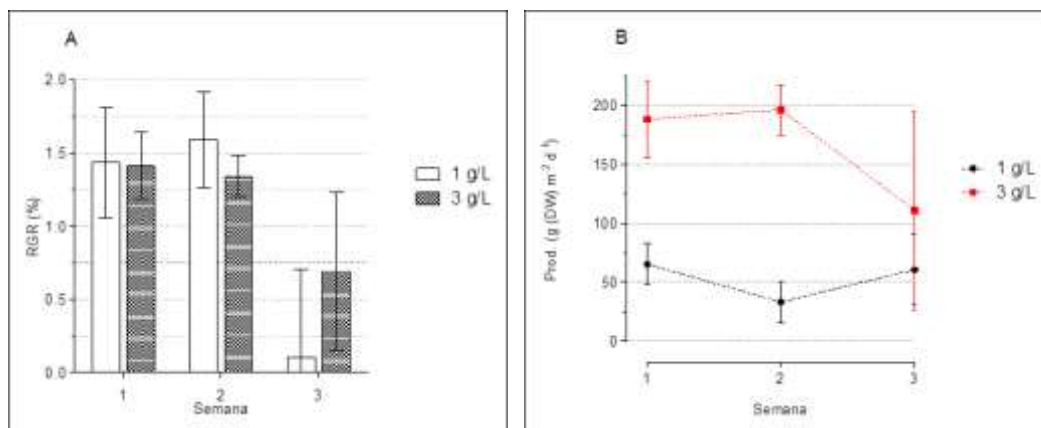
**Figura 23** – Parâmetros ambientais recolhidos ao longo do ensaio experimental, (A) Temperatura média da água dos tanques, (B) intensidade luminosa à superfície e a 5 cm de profundidade e (C) pH médio registado nos tanques de cultivo de *Dilsea carnosa*. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (A) (n=20), (B e C) (n = 40).

Para a quantificação da percentagem de peso seco (%DW) foram utilizadas 6 réplicas de *D. carnosa* provenientes do ensaio de cultivo exterior, secas numa estufa a 45°C, durante 3 dias. A média do peso seco obtida para este ensaio foi de 29.257%. Ver dados brutos em anexo.

O conteúdo médio em água foi o mais baixo registado em todos os ensaios de cultivo de *D. carnosa*, representando cerca de 70% do seu total de biomassa.

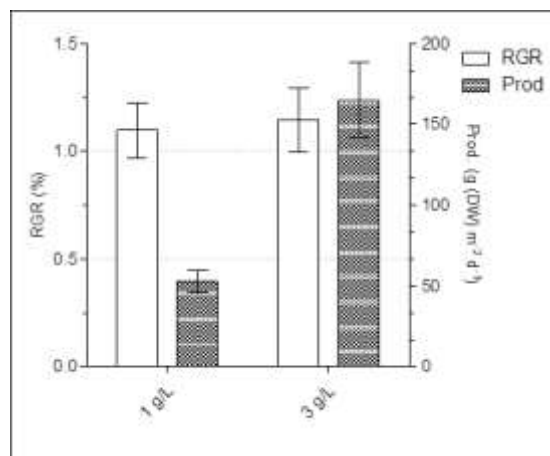
Durante as 3 semanas de realização do ensaio os valores de RGR das amostras de *Dilsea* variaram bastante (Fig 24A). Na primeira semana, valores para as amostras de diferentes densidades de cultivo permaneceram idênticos, registando na semana seguinte um ligeiro aumento da taxa de crescimento médio para a densidade de cultivo de 1 g/L. A última semana registou valores de crescimento médio substancialmente mais baixos.

A produtividade ao longo do ensaio foi sempre superior nas amostras de maior densidade de cultivo. Na primeira e segunda semana a densidade 3 g/L, a vermelho na Fig 24B, registou valores de produtividade média na casa dos 200g (DW) m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, porém reduzindo drasticamente a sua produtividade para os 100g (DW) m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> na última semana do ensaio. Amostras cultivadas a 1 g/L, não apresentaram variações nos valores de produtividade média semanal tão elevadas, tendo sido o rendimento médio semanal substancialmente mais baixo. Na primeira semana e terceira semanas a produtividade foi ligeiramente superior a 50g (DW) m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> e na segunda semana o valor médio observado andou a baixo deste último valor, na casa dos 40g (DW) m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>.



**Figura 24** - (A) Taxa de crescimento relativo (%) e Produtividade (B), nas diferentes semanas de cultivo em regime de IMTA, das diferentes amostras de *Dilsea carnosa* sujeitas às condições da Ria de Aveiro. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=4)

O crescimento médio relativo do ensaio para amostras cultivadas a uma densidade de 1 g/L foi, no geral, igual ao valor obtido para amostras cultivadas a 3 g/L. A Fig. 25 estabelece a comparação dos respetivos RGR e produtividade média, no ensaio. Através da análise da Figura 25 é possível observar, destacado, um valor na casa dos 160g (DW) m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> de produtividade das amostras de 3 g/L de densidade, contudo já foi referenciado anteriormente neste trabalho que, apesar de ser registado crescimento semanal na forma de RGR e produtividade, todos os espécimes utilizados pioram bastante o seu aspeto com o passar do tempo, não sendo estes valores indicadores de um desenvolvimento saudável e por tempo prolongado dos exemplares de *D. carnosa* no ensaio.



**Figura 25** - RGR e produtividade médios do ensaio realizado em diferentes amostras de *D. carnososa*, cultivadas em sistema de IMTA sujeitas às condições da Ria de Aveiro. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=4)

Através da realização da ANOVA de duas vias obtiveram-se os seguintes resultados

**Tabela 4**– Efeito da densidade de cultivo na RGR e Produtividade (ANOVA) na atividade de cultivo em IMTA

Dens Cult.	RGR				Produtividade			
	df	df2	F	P	df	df2	F	P
teste de Levene	1	6	0,064	0,809	1	6	21,662	0,003
	L=0,138			0,723	L= 4,069			0,09

Os resultados descritos na tabela acima permitem concluir que, para as amostras testadas em cultivo de IMTA, a densidade de cultivo influencia a produtividade ( $p > 0.05$ ), facto que não se verifica na taxa de crescimento relativo.

### 3.3 Resultados das extracções

No final do processo de extração, resultaram 3 frações secas (n-hexano, metanol e polissacarídeos) das diferentes amostras disponíveis (**Carr, Mind, Lab, PE e IMTA**). Neste ensaio experimental constatou-se a impossibilidade de extrair o coloide com precipitação da solução aquosa por Etanol, tendo sido substituído este passo por uma extração alcalina com precipitação com Isopropanol. Devido à pouca disponibilidade de material para extracções, utilizou-se 1 g de biomassa seca por cada extração, sendo o processo de extração repetido 3 vezes, para cálculos estatísticos e processamento de dados. Os resultados, em bruto, encontram-se no Anexo.

### 3.3.1 Rendimento das extrações

O cálculo deste índice permitiu comparar o rendimento de extração dos diferentes solventes orgânicos, em material vegetal de *D. carnososa* de diferentes origens, tendo-se obtido os seguintes valores médios:

**Tabela 5** – Rendimentos médios do processo de extração das diferentes frações de amostras de *Dilsea carnososa*.

	Rendimento médio (%)			
	Metanol	n-Hexano	Polissacarídeos	Total
<b>Carr</b>	2,254	0,144333	36,655	39,1
<b>Mind</b>	2,765667	0,610333	27,69	31,07
<b>Lab</b>	2,279333	0,611667	31,66667	34,6
<b>PE</b>	0,532667	0,788667	41,025	42,3
<b>IMTA</b>	0,918	1,057367	28,84833	30,8

### 3.3.2 Análise estatística

Da análise dos rendimentos obtidos nas diferentes extrações, destacam-se alguns valores díspares, através da realização do mesmo método de extração. Referente à atuação do solvente n-hexano, constata-se que o rendimento de **IMTA** foi sensivelmente maior que os resultados de **PE**, **Lab** e **Mind**, que por sua vez foram também superiores ao rendimento da extração no material **Carr**. Na extração metanólica observa-se que o rendimento de **PE** e **IMTA** foi mais baixo que o das amostras **Carr**, **Mind**, e **Lab**. Quanto ao rendimento do conteúdo de polissacarídeos, as amostras de **PE** apresentaram o maior valor, tendo o resto dos resultados permanecido bastante diversos.

**Tabela 6** - Efeito da densidade de cultivo na RGR e Produtividade (ANOVA) na atividade de cultivo em IMTA

	n-Hexano				Metanol				Polissacarídeos			
	df1	df2	F	P	df1	df2	F	P	df1	df2	F	P
C. cultivo	4	10	13,478	< 0,001	4	10	57,299	< 0,001	4	10	13,442	< 0,001
T. Levene	L=3,084			0,068	L= 3,162			0,064	L= 2,971			0,074



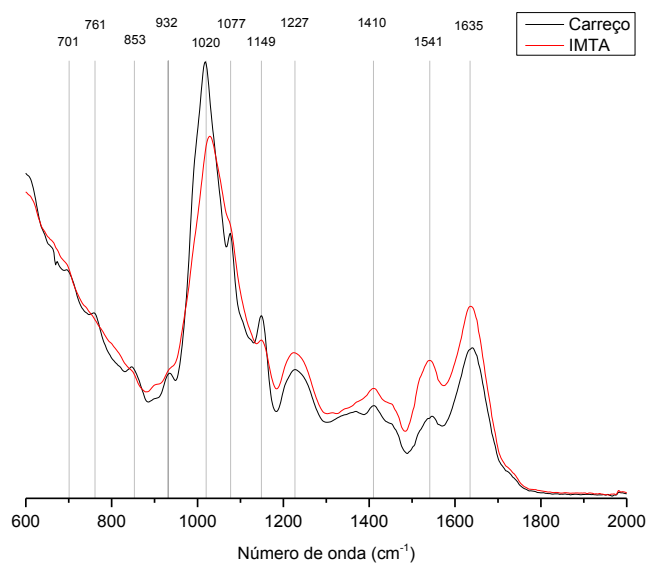
Todos estes dados foram posteriormente analisado através de uma ANOVA, utilizando o *software* IBM SPSS.

### 3.4 Espetros das amostras de FTIR-ATR

Em seguida são apresentados os espectros de FTIR-ATR das diversas amostras enviadas para estudo. Os parâmetros correlacionáveis são apresentados por figura, tendo sido traçadas em cada uma, linhas de interseção com picos de possível relevância para a caracterização.

#### 3.4.1 Espetros de exemplares de *D. carnosa*

Os espectros relativos à análise do conteúdo da alga seca *D. carnosa*, proveniente da Praia de Carreço e do cultivo em IMTA, apresentam várias diferenças a nível da absorção em diversos números de onda.



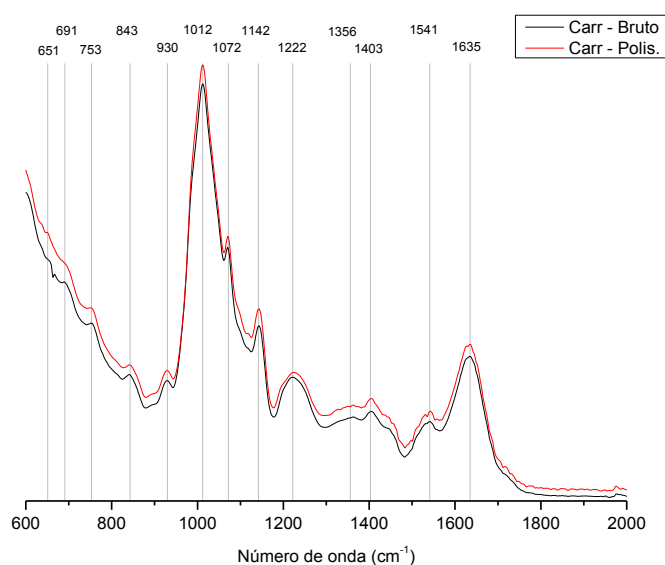
**Figura 26** – Espetros de FTIR-ATR de material algal de *Dilsea carnosa* moída proveniente da Praia de Carreço e de cultivo em IMTA.

Analisando os espectros no sentido crescente do número de onda, um primeiro pico na ordem dos 1020  $\text{cm}^{-1}$ , estreito e de grande intensidade é claramente identificável, apresentando-se bastante mais evidenciado na amostra proveniente do meio selvagem (**Carr**). Para um número de onda na ordem dos 1077  $\text{cm}^{-1}$ , outra diferença, relativa, é observável,

neste caso a amostra de **IMTA** apresenta um pico, que embora com a mesma intensidade, revela uma forma de ombro mais atenuada contrastando com a forma do exemplar de **Carreço**, que o apresenta mais aguçado. A  $1149\text{ cm}^{-1}$  um pico estreito está presente no espectro da amostra **IMTA**, sendo mais protuberante que o correspondente da amostra de **Carreço**. Para os valores de  $1227\text{ cm}^{-1}$  e de  $1410\text{ cm}^{-1}$  observam-se dois picos largos, onde a amostra de **IMTA** se destaca com evidência da amostra de **Carreço**. Nos últimos dois picos observáveis nos espectros ( $1541\text{ cm}^{-1}$  e  $1635\text{ cm}^{-1}$ ) as amostras de **IMTA** voltam a apresentar bastante mais intensidade que as de **Carreço**, em picos estreitos.

### 3.4.2 Espectros do conteúdo nativo bruto e coloidal de amostras de *D. carnosa*

Os espectros relativos à análise comparativa do conteúdo da alga seca *D. carnosa* proveniente da Praia de **Carreço** e do seu coloide, extraído por extração alcalina de 3h, não apresentam diferenças significativas a nível da absorção de diferentes números de onda.

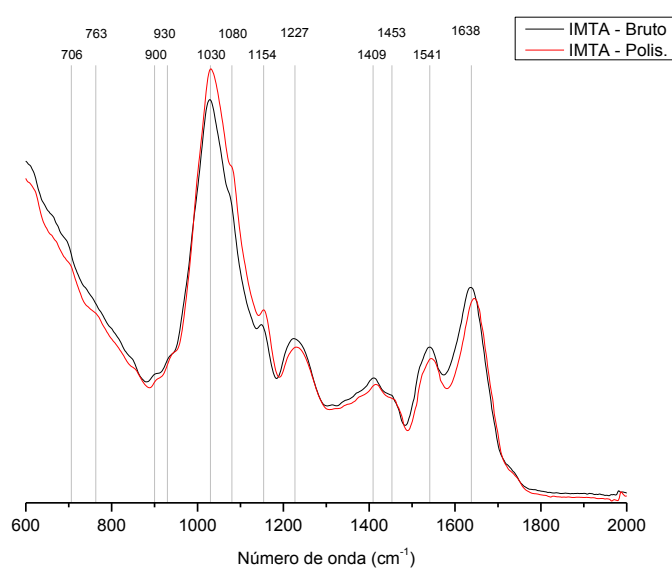


**Figura 27** – Espectros de FTIR-ATR de *Dulsea carnosa* moída proveniente da Praia de Carreço e do seu ficocoloide extraído por extração alcalina de 3 horas.

Nestes espectros apenas é observável uma maior amplitude do espectro dos coloides, não havendo diferenças maioritárias na morfologia dos picos das duas amostras. Ambas apresentam picos estreitos para ordens de grandeza de 843, 930, 1012, 1072, 1142, e  $1636\text{ cm}^{-1}$ . Apresentam também alguns picos com conformação de ombro a  $1222$  e  $1356\text{ cm}^{-1}$ . Ambas

as amostras apresentam ainda vários picos de pequenas dimensões para os valores de números de onda na casa dos 753, 1403 e 1551  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros de análise comparativa do conteúdo da alga seca *D. carnosa* proveniente do cultivo em **IMTA** e do seu **polissacarídeo** extraído por extração alcalina de 3h, não apresentam diferenças significativas a nível da absorção de diferentes números de onda. As diferenças constatáveis assentam num carácter quantitativo, apesar de não mensurável. Assim, nos picos com o número de onda de 1030 e 1147  $\text{cm}^{-1}$ , de forma aguçada e de ombro respetivamente, a amostra de **polissacarídeos** regista valores ligeiramente superiores à de **alga moída**.



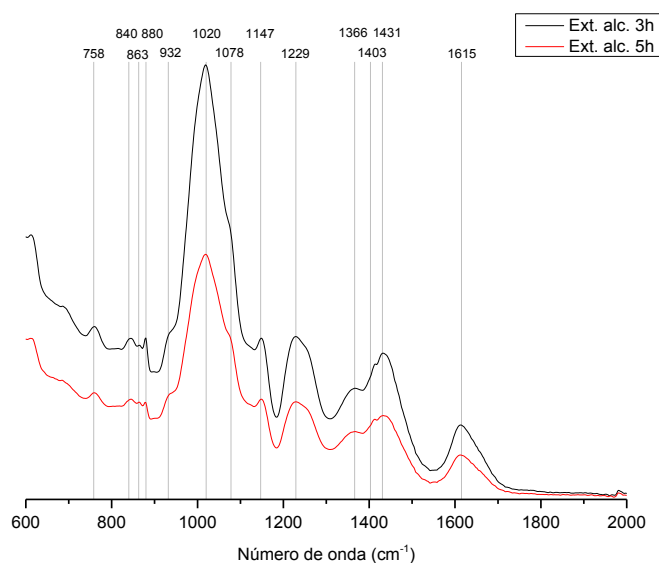
**Figura 28** - Espectros de FTIR-ATR de *Dulse carnosa* moída proveniente do cultivo em IMTA e do respetivo ficocoloide, extraído por extração alcalina de 3 horas.

Nos picos seguintes esta tendência inverte-se, observando-se quantitativamente uma pequena superioridade realtiva na amostra de **alga bruta**, sendo na generalidade quase todos os picos de forma estreita (1409, 1453, 1541 e 1638  $\text{cm}^{-1}$ ), à exceção do pico 1227  $\text{cm}^{-1}$  que se apresenta mais suave.

### 3.4.3 Espectros dos ficocoloides de *D. carnosa*

#### 3.4.3.1 Espectros das extrações alcalina (3h-5h)

A análise dos espectros do conteúdo dos polissacarídeos de *D. carnosa* provenientes da extração alcalina a quente com diferentes durações, apresenta uma diferença significativa a nível da intensidade dos picos, não se registando contudo diferenças de números de onda entre as duas amostras enviadas para análise.



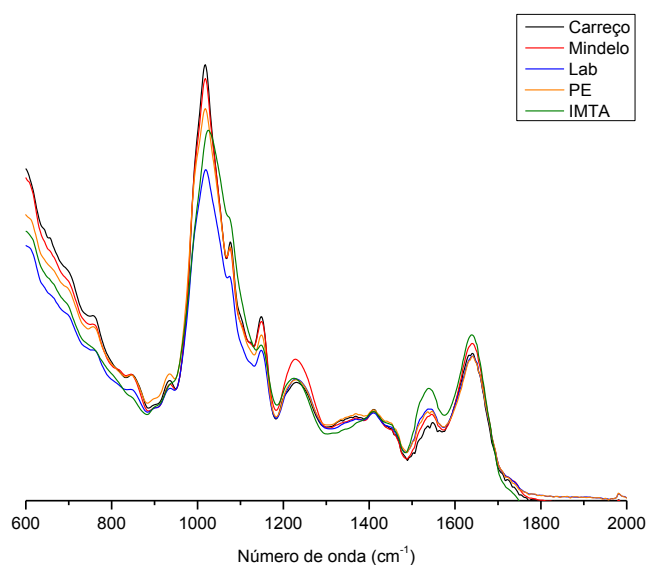
**Figura 29** – Espectros de FTIR-ATR dos polissacarídeos de *Dilsea carnosa* obtidos em diferentes tempos de extração alcalina.

Ambas as amostras apresentam picos bastante estreitos, bem definidos, nos valores de número de onda de 758, 840, 880, 1020, 1147 cm<sup>-1</sup>. Os espectros ainda apresentam 4 picos muito evidentes, de grande amplitude mas contudo mais suaves, nos valores de 1229, 1366, 1431 e 1615 cm<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3.2 Espectros das diferentes amostras

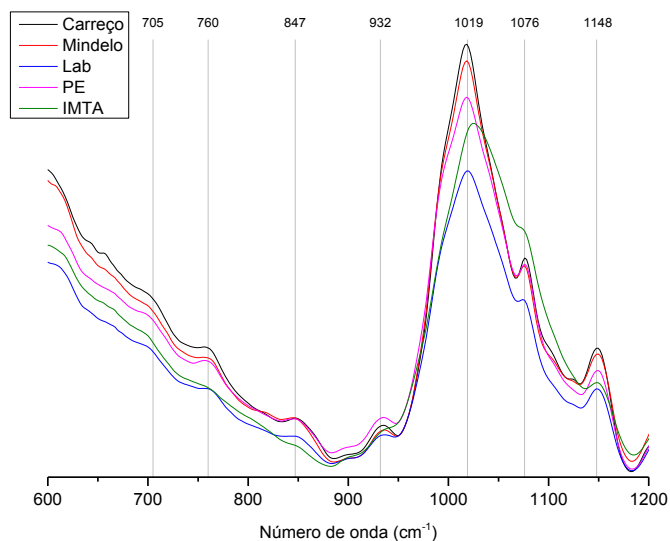
Os espectros de análise dos polissacarídeos de *D. carnosa*, obtidos pelo mesmo método de extração, provenientes da Praia de **Carreço**, da Praia de **Mindelo**, de cultivo

**Laboratorial**, do cultivo em **IMTA** e de material com a mesma origem mas **Pouco Epifitado** apresentam algumas diferenças detalhadas para análise.



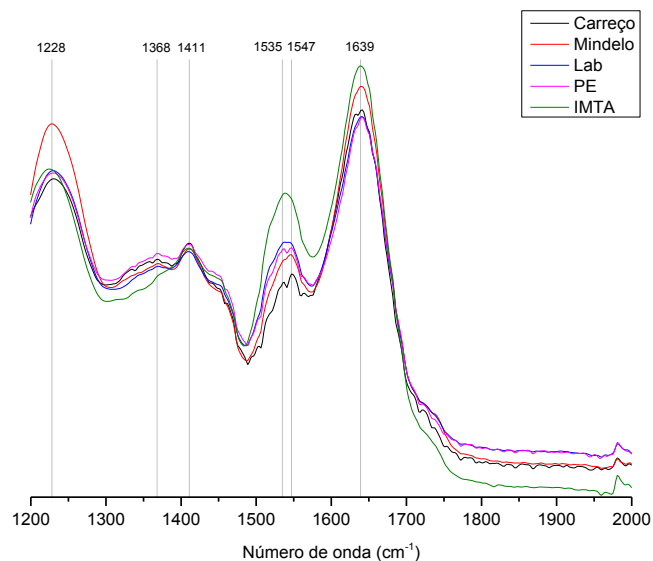
**Figura 30** - Espectros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de *Dilsea carnosa*, obtidos por extração alcalina de 3 horas.

À primeira vista cumpre destacar, que para o pico de maior amplitude, as amostras selvagens (**Carr** e **Mind**) são as que apresentam o maior valor relativo. Destacadamente para o um valor de 1228 cm<sup>-1</sup> (ver Fig 30), o coloide extraído da amostra selvagem de **Mindelo** também apresenta a maior amplitude de todos os espectros. A amostra de **IMTA** também se destaca, em primeira análise nos picos [1535 cm<sup>-1</sup>, 1547 cm<sup>-1</sup>] e 1639 cm<sup>-1</sup> (ver Fig. 30), contudo o detalhe do gráfico apresentado a cima não permite uma precisa avaliação dos espectros, pelo que de seguida serão apresentadas duas versões maximizadas do mesmo para uma melhor e correta interpretação.



**Figura 31** – Espectros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de *Dilsea carnosa*, obtidos por extração alcalina de 3 horas, no intervalo de [600  $\text{cm}^{-1}$ , 1200  $\text{cm}^{-1}$ ].

Resultante da primeira divisão do eixo dos  $xx$  [600  $\text{cm}^{-1}$ , 1200  $\text{cm}^{-1}$ ], da gama de números de onda onde a caracterização dos ficocoloides é possível ([600  $\text{cm}^{-1}$ , 2000  $\text{cm}^{-1}$ ]) destaca-se, a 1019  $\text{cm}^{-1}$ , um pico estreito, o maior em amplitude de todos os do gráfico, um máximo atingido pela amostra de **Carreço** (seguidas em ordem decrescente as demais **Mind**, **PE**, **IMTA** e **Lab**). A 1076  $\text{cm}^{-1}$ , com um pico atenuado, a amostra de **IMTA** apresenta valor máximo relativo, apresentando a amostra **Laboratorial** o valor mínimo relativo registado. Na gama dos 1148  $\text{cm}^{-1}$  todos os picos apresentados pelas amostras são também morfologicamente estreitos, sendo a amostra selvagem **Carreço** a que apresenta o valor máximo relativo.



**Figura 32** - Espectros de FTIR-ATR dos polissacarídeos das amostras de *Dilsea carnosa*, obtidos por extração alcalina de 3 horas, no intervalo de [1200  $\text{cm}^{-1}$ , 2000  $\text{cm}^{-1}$ ].

Na segunda parte do espectro, [1200  $\text{cm}^{-1}$ , 2000  $\text{cm}^{-1}$ ], um primeiro pico inicial de número de onda de 1228  $\text{cm}^{-1}$ , destaca vincadamente das outras, a amostra selvagem recolhida em **Mindelo**. Outros picos de intensidade mais moderada são manifestados com o aumento da grandeza do eixo dos xx, nomeadamente os picos 1368  $\text{cm}^{-1}$  e 1411  $\text{cm}^{-1}$  onde todas as amostras apresentam valores semelhantes. Na gama de números de onda entre [1535  $\text{cm}^{-1}$ , 1547  $\text{cm}^{-1}$ ] surge destacadamente a amostra de **IMTA**, com considerável intensidade face às demais, num pico estreito. Por fim, nesta segunda parte do gráfico, o pico estreito de maior amplitude mostra que a amostra de **IMTA** é a que regista o valor máximo relativo, seguida da amostra de **Mindelo**, não parecendo porem significativamente diferente perante as outras.

### 3.5 Avaliação da capacidade Antioxidante

#### 3.5.1 Capacidade de redução de DPPH

O DPPH é um radical livre, relativamente estável, que pode ser reduzido por moléculas antioxidantes. Através deste método é então possível quantificar a capacidade de redução de polissacarídeos e extratos de amostras de *D. carnosa*. Todos os resultados dos ensaios são apresentados na forma de percentagem de DPPH por reduzir.

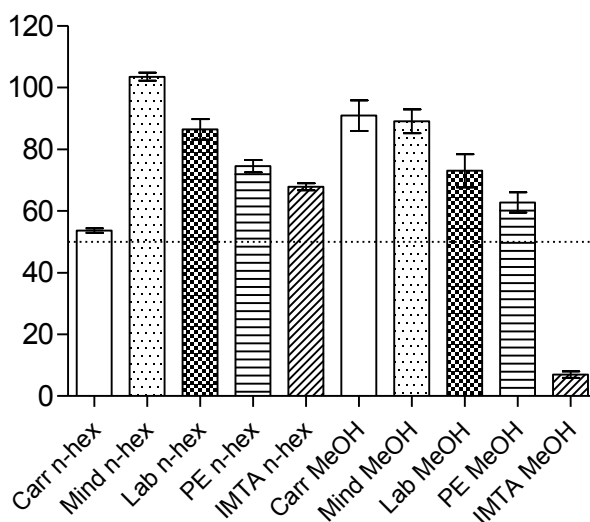
**Tabela 7** – Percentagem de DPPH não reduzido, no final do ensaio, pelas diferentes frações, das diferentes amostras de *D. carnosa* utilizadas no ensaio.

	n-hex (% DPPH p/ reduzir)			MeOH (% DPPH p/ reduzir)			Polis. (% DPPH p/ reduzir)		
	n	SEM	n	Média	SEM	n	Média	SEM	n
<b>Carr</b>	53,615	0,735	5	90,890	4,970	5	96,52	0,713	3
<b>Mind</b>	100	1,308	5	89,036	3,853	5	100	1,155	3
<b>Lab</b>	86,419	3,358	5	73,00623	5,359	5	100	0,696	3
<b>PE</b>	74,489	1,976	5	62,764	3,261	5	99,66	0,345	3
<b>IMTA</b>	67,848	1,121	5	6,936231	1,066	5	100	0,308	3

### 3.5.1.1 Frações de n-hexano e metanol:

Na sua generalidade, os resultados apresentam variações de redução de DPPH na ordem do 0 a 30%, contudo duas frações distintas apresentaram valores fora desta gama de resultados.

O extrato de **n-hexano** proveniente da Praia de **Carreço** apresentou valores de redução próximos dos 50%, não conseguindo porém inibir metade do teor em radicais.

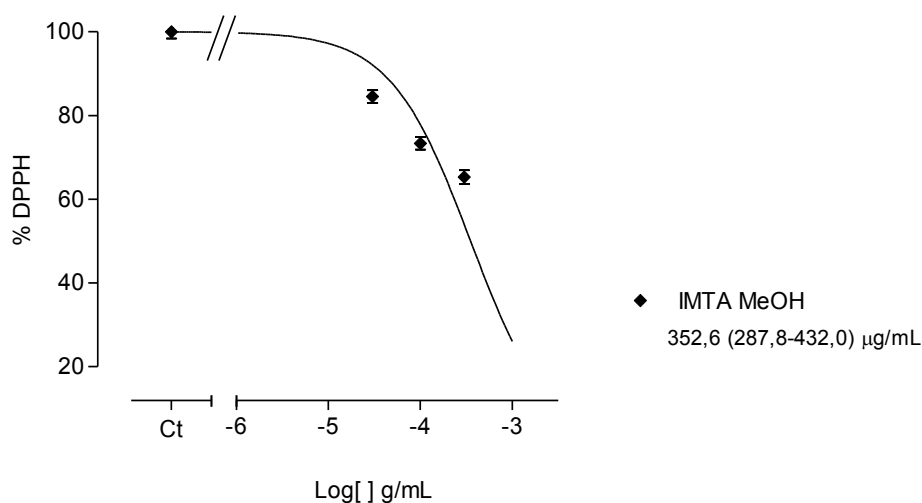


**Figura 33** – Percentagem do radical DPPH por reduzir com extratos de n-hexano e metanol das amostras de *Dilsea carnosa*, a 1mg/mL. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=5).

O extrato **metanólico** proveniente do regime de **IMTA** foi o único a inibir eficazmente mais de metade do DPPH. De modo a perceber se a redução do DPPH ocorreu de um modo dependente da concentração decidiu-se realizar um ensaio de dependências da



concentração inicial utilizada (1 mg/mL), deste modo foi também possível calcular o seu  $EC_{50}$ .

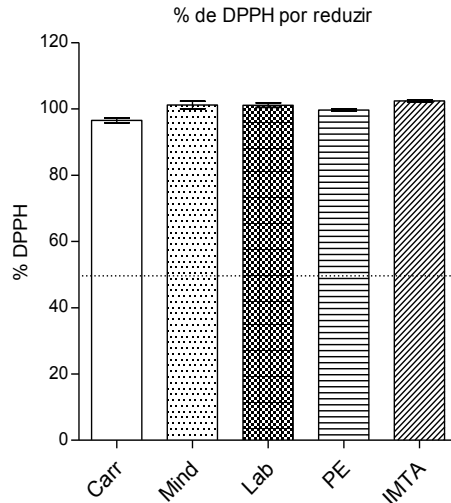


**Figura 34** – Capacidade de redução do DPPH – dependência da concentração (100 – 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) do extrato IMTA MeOH

A realização do ensaio de dependências da concentração do extrato de **IMTA MeOH** permitiu concluir que a inibição se deu em função da concentração. O valor redutório de 50% do DPPH do ensaio para o extrato de **IMTA MeOH** foi de 0,3526 mg de extrato/mL.

### 3.5.1.2 Fração de polissacarídeos

O resultado da sequestração de radicais de DPPH por polissacarídeos de *D. carnosus* foi, na sua generalidade muito fraco.



**Figura 35** - Percentagem do radical DPPH por reduzir nas frações de polissacarídeos das amostras de *Dilsea carnosa*, a 1mg/mL. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=5).

A uma concentração de 1mg/mL, todas as amostras de polissacarídeos apresentaram uma capacidade de redução próxima do zero relativo.

### 3.5.2 Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

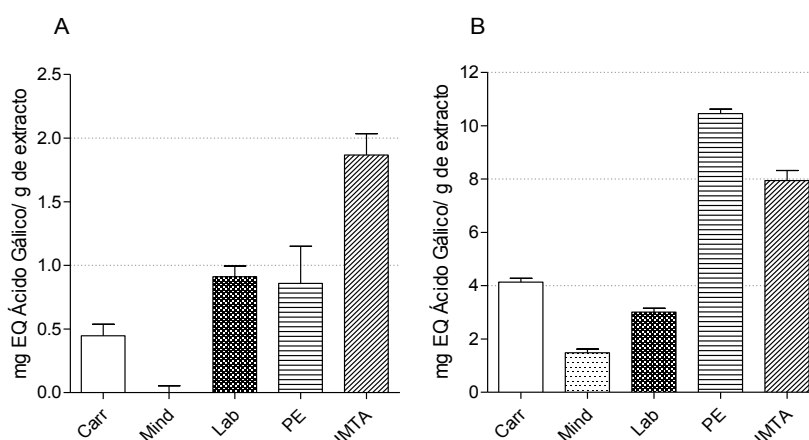
A quantificação do conteúdo total polifenólico, das diferentes frações de extratos de *D. carnosa* foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, obtendo-se os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) na seguinte Tabela.

**Tabela 8** – Teor polifenólico, em mg EAG por g de extrato testado, das diferentes frações de *Dilsea carnosa* ensaiadas.

	n-hexano (mg EAG/g)			MeOH (mg EAG/g)		
	Média	SEM	n	Média	SEM	n
<b>Carr</b>	0,447	0,0905	5	4,136	0,141	5
<b>Mind</b>	0	0,054	5	1,481	0,140	5
<b>Lab</b>	0,911	0,083	5	3,01224	0,139	5
<b>PE</b>	0,858	0,291	5	10,455	0,172	5
<b>IMTA</b>	1,868	0,167	5	7,942	0,378	5

Tal como pode ser observado na Fig 36A, para as frações de n-hexano, o extrato que apresenta um maior conteúdo em polifenóis, foi proveniente da amostra **IMTA** ( $1,87 \pm 0,167$

mg EAG/g). As frações dos extratos **Lab** e **PE** apresentaram valores na ordem dos 0.9 mg EAG/g, apresentando-se todos os valores descritos na tabela 8.



**Figura 36** – Quantificação total de polifenóis (QTP) em mg EAG/g, (A) nas frações de n-hexano e (B) nas frações metanólicas das amostras de *Dilsea carnosa* em estudo. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=5).

Relativamente à fração de metanol (Fig. 36B), a amostra **PE** foi a que apresentou o valor mais elevado,  $10,45 \pm 0,172$  mg EAG/g, seguida da amostra de **IMTA**,  $7,94 \pm 0,378$  mg EAG/g.

Se avaliarmos o conjunto das duas frações (Tabela 8) de forma a entender o conteúdo total de polifenóis por amostra, retirados pela atuação dos dois solventes, é possível perceber que, na sua totalidade as amostras **PE** e **IMTA** apresentam um teor muito superior do que as demais amostras analisadas (11,313 e 9,81 mg EAG/g, respetivamente).

### 3.5.3 Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC)

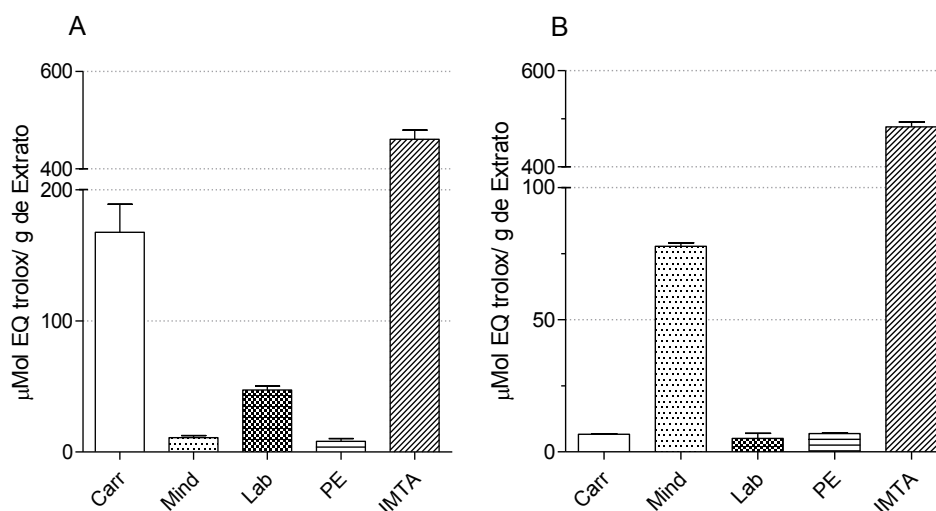
Os extratos de *D. carnosa* que apresentaram melhores resultados no método do ORAC foram os extratos relativos às frações do cultivo de *D. carnosa* em **IMTA**. Assim para a sua fração de n-hexano foram obtidos  $460,825 \mu\text{g EQ trolox/g}$  de extrato, para o seu extrato metanólico foram obtidos  $483,379 \mu\text{g EQ trolox/g}$  de extrato e o valor de  $20,349 \mu\text{g EQ trolox/g}$  respeitante aos seus coloides. Todos os resultados obtidos nesta técnica encontram-se discriminados na Tabela seguinte.

**Tabela 9** – Valores obtidos na realização do método de ORAC, em  $\mu\text{g EQ trolox/g}$ , das diferentes frações de *Dilsea carnosa*.

	n-hex ( $\mu\text{g EQ trolox/g}$ )			MeOH ( $\mu\text{g EQ trolox/g}$ )			Polis. ( $\mu\text{g EQ trolox/g}$ )		
	Média	SEM	n	Média	SEM	n	Média	SEM	n
<b>Carr</b>	167,381	21,45	4	6,633	0,21	4	6,633	0,21	4
<b>Mind</b>	10,919	1,554	4	77,791	1,35	4	4,015	1,738	4
<b>Lab</b>	47,291	2,975	4	5,084	1,922	4	3,882	1,925	4
<b>PE</b>	8,088	2,208	4	6,912	0,272	4	6,912	0,272	4
<b>IMTA</b>	460,825	18,873	4	483,379	9,853	4	20,349	1,575	4

### 3.5.3.1 Frações de n-hexano e metanol

Tal como pode ser observado na Fig 37A, para as frações de n-hexano, o extrato que apresenta um maior conteúdo em polifenóis, é o extrato proveniente da amostra **IMTA** ( $1,87 \pm 0,167 \mu\text{g EQ trolox/g}$ ). As frações dos extratos **Lab** e **PE** apresentaram valores na ordem dos  $0.9 \text{ mg EAG/g}$ , apresentando-se todos os valores descritos na Tabela 9.

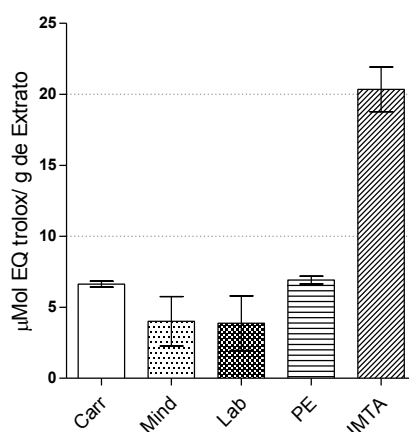


**Figura 37** – Avaliação da capacidade antioxidante pela técnica de ORAC, em  $\mu\text{g EQ trolox/g}$  de extrato, das (A) frações de n-hexano e (B) das frações metanólicas das amostras de *Dilsea carnosa* em estudo. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=5).

Relativamente aos extratos metanólicos testados neste ensaio (Fig 37B), o que apresentou maior bioatividade foi o extrato de **IMTA** ( $483,379 \pm 9,853 \mu\text{g EQ trolox/g}$ ).

### 3.5.3.2 Fração de Polissacarídeos

A realização do método ORAC nos polissacarídeos das amostras de *D. carnososa* apresentou também alguma discrepância de valores. Novamente, o extrato que apresenta maior atividade é o de **IMTA**, destacando-se de todos os outros ( $6,912 \pm 0,272 \mu\text{g EQ trolox/g}$ ).



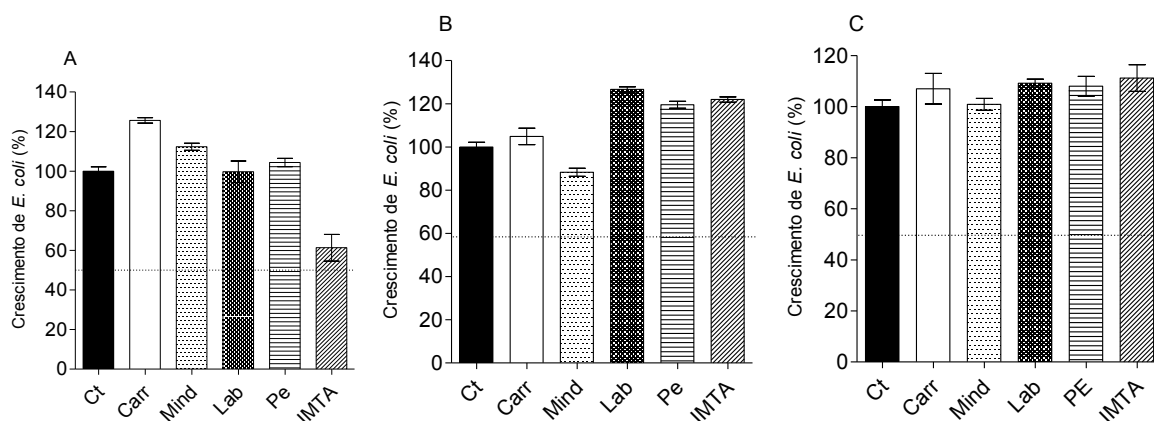
**Figura 38** – Avaliação da capacidade antioxidante pela técnica de ORAC, em  $\mu\text{g EQ trolox/g}$  de extrato, da fração de polissacarídeos das amostras de *Dilsea carnososa* em estudo. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) ( $n=5$ ).

## 3.6 Avaliação do potencial antimicrobiano

Para avaliar a capacidade antimicrobiana foram utilizados como modelos celulares os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* nas respectivas fases exponenciais de crescimento. Sabendo que este período ocorre numa janela temporal entre as 15 e 26 horas do respetivo crescimento, a realização do ensaio para avaliar a atividade dos extratos decorreu às 20 horas do crescimento dos microrganismos.

### 3.6.1 Ensaio em *E. coli*

Os resultados relativos à avaliação da inibição do crescimento de *E. coli*, por ação de extratos de *D. carnososa*, encontra-se representada na Fig. 39. A ação de extratos de n-hexano (A), uma vez mais só se mostrou efetiva na amostra de **IMTA**, ocorrendo mesmo como estímulo de crescimento para outras amostras.



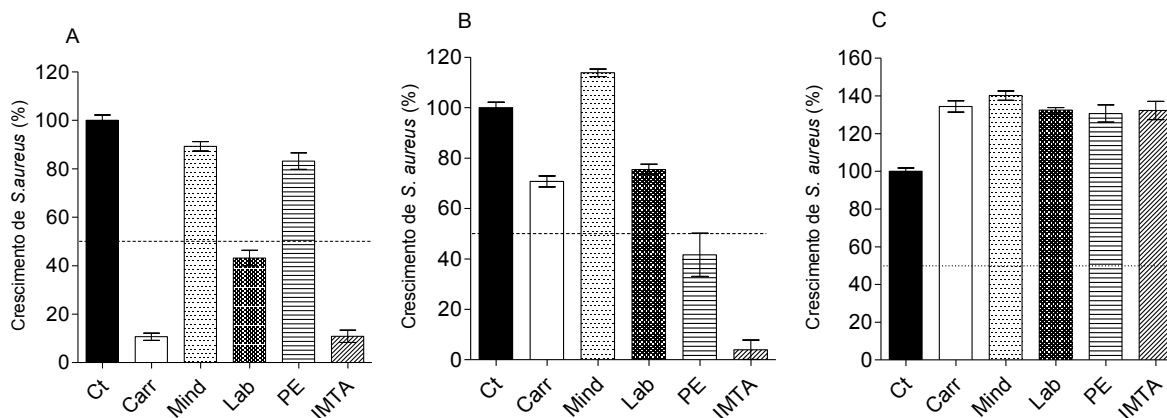
**Figura 39** – Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de *Dilsea carnosa* em estudo, no crescimento de *E. coli* a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=5).

Os extratos metanólicos (B) foram, na sua maioria, igualmente estimulatórios do crescimento de *E. coli*. Apenas a amostra de Mindelo foi capaz de, aquando a realização do ensaio, inibir cerca de 10% do seu crescimento verificado em 100% de controlo. Os polissacarídeos (C) de *D. carnosa* mostraram-se ineficazes na inibição do crescimento deste microrganismo, quase todos os extratos mostraram crescimentos maiores que a situação controlo.

### 3.6.2 Ensaio em *S. aureus*

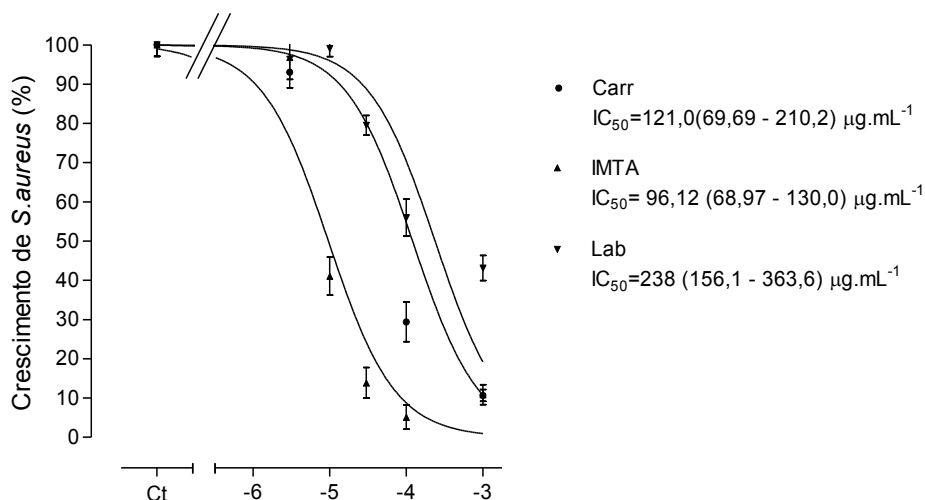
Os resultados relativos à avaliação da inibição do crescimento de *S. aureus*, por ação de extratos de *D. carnosa*, encontra-se representada na Fig. 40. A ação de extratos de n-hexano (A), mostrou-se bastante efetiva na amostra de **IMTA** e **Carreço** e ainda em **Lab**.

Os extratos metanólicos (B), na sua maioria, apresentaram resultados inibitórios do crescimento de *S. aureus*. As amostras **PE** e **IMTA** neste ensaio provocaram mais de metade da inibição do crescimento deste microrganismo. De registar também, foi o carácter estimulatório do extrato metanólico **Mind** que potenciou o crescimento do microrganismo.



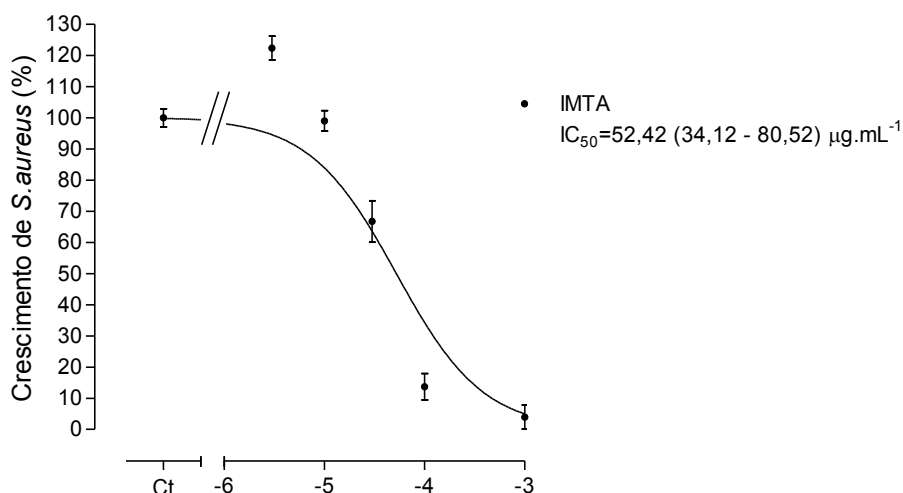
**Figura 40** – Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de *Dilsea carnosa*, no crescimento de *S. aureus* a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média ± erro padrão (SEM) (n=5).

Todos os polissacarídeos (C) de *D. carnosa* testados contra o crescimento de *S. aureus* mostraram-se ineficazes na inibição do crescimento deste microrganismo, potenciando, na sua generalidade, entre 30 a 40% o seu crescimento. De modo a avaliar a potência dos efeitos verificados pelas frações que demonstraram inibição  $\geq 50\%$ , para a concentração máxima testada (1 mg/ml) no crescimento da *S. aureus*, decidiu-se avaliar a dependência da concentração dos efeitos obtidos. Os resultados referentes às frações de n-hexano e metanólicas, encontram-se expressos nas Fig. 41 e 42, respetivamente.



**Figura 41** - Crescimento de *S. aureus* a 28°C na presença dos extratos, da fração do n-hexano, das amostras de *D. carnosa* que inibiram mais de 50% do crescimento de *S. aureus*. Dependências da concentração (100 – 1000 μg/ml).

Referente aos extratos de n-hexano, a amostra de **IMTA** foi o que apresentou o menor  $IC_{50}$ , seguida da amostra Carr e Lab.



**Figura 42** - Crescimento de *S. aureus* 28°C na presença dos extratos, da fração do MeOH, da amostra de *Dilsea carnosa* que inibiu mais de 50% do crescimento de *S. aureus*. Dependências da concentração (100 – 1000 µg/ml).

A inibição do crescimento em função da concentração de *S. aureus*, do extrato metanólico de IMTA também se encontra descrito na Fig. 44 e na Tabela 10, na forma do seu valor de  $IC_{50}$ , assim como todos os outros resultados de extratos em que se estudou o seu efeito dependendo da concentração.

**Tabela 10** – Valores de  $IC_{50}$  para os extratos de *D. carnosa* que apresentaram inibição do crescimento de *S. aureus* superior a 50%.

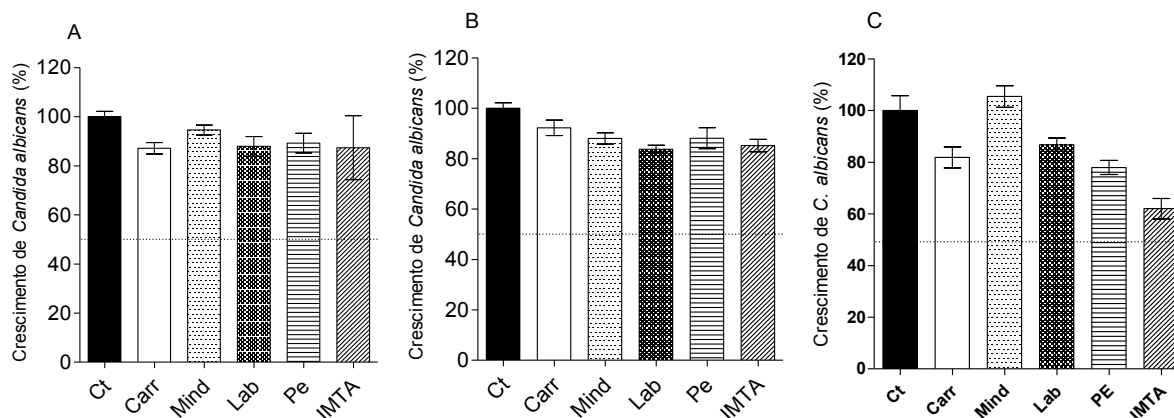
	N-Hexano ( $IC_{50}$ µg/mL)	Metanol ( $IC_{50}$ µg/mL)
<b>Carr</b>	121,0 (69,69 - 210,2)	-
<b>Lab</b>	238,0 (156,1 - 363,6)	-
<b>IMTA</b>	96,12 (68,97 - 130,0)	52,42 (34,12 - 80,52)

### 3.6.3 Ensaio em *C. albicans*

Os resultados relativos à avaliação da inibição do crescimento de *E. coli*, por ação de extratos de *D. carnosa*, encontra-se representada na Fig. 43. A ação das frações de n-hexano (A), mostraram-se pouco efetivas na inibição do crescimento do fungo *C. albicans*.



As frações metanólicas (B) e de polissacarídeos (C) também não apresentaram efeitos inibitórios de relevância, não conseguindo nenhum dos extratos ensaiados atingir 50% da inibição do fungo.



**Figura 43** - Efeito dos extratos (1mg/mL) da fração de n-hexano (A), de MeOH (B) e de polissacarídeos (C), das amostras de *Dilsea carnosa*, no crescimento de *C. albicans* a 28 °C, após 5 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  erro padrão (SEM) (n=5).

## **4 Discussão**



## 4.1 Estabelecimento de analogias com *P.palmata*

Devido à escassez de publicações e trabalhos realizados referenciando *Dilsea carnos*, as diversas metodologias abordadas neste trabalho estabelecem, principalmente, comparações com a macroalga vermelha *Palmaria palmata* (Lineanaeus), assumindo que partilha características ecofisiológicas próximas das observadas na macroalga em estudo (Pereira 2012). Contudo, tratando-se de organismos diferentes, as correlações efetuadas assentam num carácter meramente hipotético, necessitando, portanto, de uma maior base de fundamentação.

## 4.2 Ensaio de cultivo

### 4.2.1 Ensaio laboratoriais

A **primeira atividade** laboratorial de cultivo teve como objetivo averiguar qual a melhor densidade de cultivo da alga em estudo, para uma possível extrapolação para modelos de larga escala de IMTA. Esta atividade testou o crescimento vegetativo de pequenas lâminas de *Dilsea carnos* em diferentes densidades de cultivo (1 g/L, 3 g/L e 5 g/L), com luminosidade e fotoperíodo constantes (100  $\mu$ E e 16:8 horas, respetivamente). A escolha da melhor densidade de cultivo é feita através da análise do crescimento vegetativo dos explantes cultivados (Werner & Dring 2011), não tendo as diferentes fases do ciclo de vida influência para o estudo, de modo a obter valores duplamente proveitosos, de crescimento e de produtividade, para uma determinada densidade de cultivo (Abreu et al. 2011).

Os valores de produtividade e crescimento registados neste ensaio apresentam concordância com valores de crescimento, característicos, de espécies algais do horizonte infralitoral superior (Pang & Lüning 2004, Matos et al. 2006, Bak 2014) onde a intensidade luminosa se apresenta diminuta em relação à do patamar médio; este último bastante mais exposto à ação da radiação solar. Desta forma se infere que o crescimento verificado nesta espécie aparenta ser lento (Lobban & Harrison 1997). Este facto é também reforçado dada a ocorrência preferencial de *D. carnos* em locais sombrios e com pouca luminosidade, abrigados de correntes marinhas (Barry & Dillon 1945), desta forma utilizando gamas de PAR (photosynthetic active radiation) na região da luz verde e amarelo (525-600 nm) (Lobban & Harrison 1997), através da sua pigmentação vermelha forte, rica em ficobilinas (R-

ficocianina e R-ficoeritrina) e carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina) (Lobban & Harrison 1997, Pereira & Correia 2015) clorofilas *a* e *d* e MAAs (J. Aguilera et al. 2002).

Uma vez que a taxa de crescimento decresce com o aumento da densidade de cultivo, verificando-se tendencialmente a situação oposta para a taxa de produtividade (Pereira et al. 2006), a análise da influência dos fatores ecofisiológico das diferentes densidades de cultivo, é observável num sistema com reposição da biomassa inicial. De facto, as densidades 1g/L e 5 g/L acabam por refletir os extremos da relação inversa entre RGR e Produtividade nas condições oferecidas ao explantes neste ensaio. Uma densidade de cultivo baixa (**1 g/L**) traduz-se num aumento de fatores como o espaço físico, disponibilidade de nutrientes e PAR (existe mais sombra) por explante em cultivo (Lobban & Harrison 1997, Pereira et al. 2006, Bak 2014,). Como resposta a estas condições, o crescimento ativo traduz-se num aumento em tamanho, com restrição do aumento da biomassa por área do indivíduo (Produtividade). No outro extremo, densidades de cultivo elevadas (**5 g/L**) oferecem um menor espaço físico por si só, proporcionando menos recursos por exemplar em cultivo, causados pelo aumento da sombra, limitação do espaço físico e diminuição de nutrientes (Dring 1982). Como resposta ecofisiológica a estas condições verifica-se um menor crescimento em tamanho (RGR), sendo o crescimento ativo direcionado para um aumento em biomassa por superfície do organismo (Produtividade).

A limitação proporcionada por altas densidades de cultivo pode, não só, conferir um aumento de conformações em mosaico das concentrações de nutrientes no conteúdo do matraz (como resultado da depleção, tridimensional, da absorção de nutrientes pelos explantes), como resultar no seu esgotamento mais acelerado (Abreu et al. 2011). Estes factos foram facilmente contornados, não só pela utilização de a água proveniente da piscicultura rica em fosfatos e nitratos, como também pela adição de meio VSE, que constitui uma fonte abundante de macro/micronutrientes e vitaminas. Todos estes fatores foram ainda atenuados por um movimento correto, constante e uniforme dos talos garantido pelo sistema de arejamento montado (Werner & Dring 2011).

A realização de uma ANOVA de uma via permitiu também concluir que existem diferenças estatísticas significativas entre as três densidades de cultivo no que diz respeito às taxas de RGR e Produtividade, tendo os testes de comparações múltiplas (Tuckey e SNK, ver dados em Anexo) sugerido que a densidade de cultivo 1 g/L apresenta um comportamento

diferente relativamente das outras densidades de cultivo. Estes resultados corroboram uma interpretação gráfica da Fig. 19A

Os valores médios de pH registados neste ensaio, em meio com 3 dias de utilização, mostram um ligeiro decréscimo face ao controlo (pH do meio inicial). Apesar de não concordantes com o hipotético aumento de pH (resultante da fotossíntese) do meio descrito na literatura ( Lobban & Harrison 1997, Graham et al. 2000, Pereira et al. 2006, Denny & Gaines 2007, Abreu et al. 2011), tal variação poderá, aparentemente, apresentar justificação devido à libertação de CO<sub>2</sub> para o meio como produto respiratório, uma vez que as leituras (realizadas no início do dia) poderão ter coincidido com o início da fase de luz da câmara de cultivo. Como consequência, sendo o pH medido numa altura em que o material vegetal, provavelmente, acabaria de trocar de um processo metabólico de respiração (*dark respiration*) para um correspondente, de produção de matéria orgânica. É sabido que na ausência de luz, a respiração ocorre abaixo da sua taxa máxima, uma vez que o ATP e NADPH<sub>2</sub> não são fornecidos de forma suficiente pela fase de luz da fotossíntese. Nesta situação, a taxa de respiração ultrapassa a taxa fotossintética e ocorre consumo energético em detrimento da sua produção (Dring 1982, Bak 2014). Sabendo que os níveis de saturação luminosa para algas vermelhas características do horizonte sublitoral variam normalmente entre os 150  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e os 200  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Dring 1982) e que para uma intensidade máxima (matrizes adjacentes à fonte de luz) se obteria um valor (máximo, medido na perpendicular) de 100  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E}$ ), provavelmente este efeito de variação de pH não se deveu a processo de fotoinibição. Além do mais, a utilização de luz artificial fria, providenciada por lâmpadas brancas fluorescentes, aparenta não representar um fator fotoagressor, pois a qualidade e intensidade da luz de cultivo utilizada não é equiparável à intensidade da radiação solar (Bak 2014).

Através da análise dos resultados obtidos no cultivo sem reposição da biomassa inicial das três densidades, foi possível observar o comportamento contínuo das taxas de crescimento e de produtividade de cada uma das amostras durante o período total da experiência. De acordo com a Fig 19B, é possível correlacionar os valores de produtividade (Prod) e crescimento relativo (RGR) e verificar que a **densidade de cultivo de 3 g/L**, aparentemente, se apresenta como a mais adequada para extrapolar o cultivo de *D. carnosa* para o modelo de IMTA

O **segundo ensaio** de cultivo laboratorial teve o objetivo de avaliar o efeito combinado da intensidade luminosa e densidade de cultivo nas taxas de crescimento e de produtividade. Assumindo que os seus níveis de saturação luminosa variam normalmente entre os 150  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e os 200  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Dring 1982, Bak 2014) foram testadas duas intensidades luminosas (**100  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $\mu\text{E}$ )** e **40  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $\mu\text{E}$ )**) combinadas com duas densidades de cultivo com comportamentos diferentes ditados pelo ensaio anterior (**1 g/L** e **3 g/L**). Como as algas vermelhas, graças à polivalência do conteúdo em pigmentos fotossintéticos, constituem eficientes organismos processadores de radiação luminosa, era expectável, segundo a literatura (Sagert & Schubert 2000, Pang & Lüning 2004) que ambas as taxas se verificassem crescentes em função do aumento da intensidade luminosa.

Através de uma ANOVA de duas vias, foi possível perceber que, para este estudo, não existe influência do fator combinado intensidade luminosa/densidade de cultivo sobre as taxas de crescimento e produtividade. Este facto constata-se através da análise da Fig. 22A, onde o crescimento a determinada intensidade luminosa aparenta assumir o mesmo valor nas duas densidades testadas, verificando-se a mesma situação para a produtividade. Segundo os resultados da ANOVA, as diferenças observáveis entre diferentes densidades, para a mesma intensidade luminosa, é justificada somente pelo feito isolado da densidade de cultivo. Neste caso verifica-se, uma vez mais, que uma maior densidade de cultivo favorece um aumento em produtividade.

Consultando alguns trabalhos existentes na literatura, é possível comparar níveis de produtividade de *P. palmata*. Matos et al. (2006), num ensaio com condições ambientais semelhantes, obteve valores médios de produtividade próximos aos obtidos neste ensaio. Outros trabalhos, desenvolvidos por Hanelt & Nultsch (1995), Pang & Lüning (2004) e Bak (2014) apresentam valores de crescimento sob variadas condições, onde os dados neste trabalho registados podem enquadrar, contudo tendo em consideração que se tratam de algas distintas, aparentemente com comportamentos parecidos.

No que respeita às leituras de pH, a situação do ensaio prévio foi verificada. Desta forma é, aparentemente, justificável o abaixamento em poucas décimas do pH pela altura do dia em que foram realizadas as leituras, não representando, aparentemente, uma correlação significativa.

#### 4.2.2 Ensaio exterior em regime de IMTA

Com base nos resultados dos ensaios laboratoriais as densidades de cultivo de **1 g/L e 3 g/L** foram escolhidas para testar no sistema de IMTA da empresa ALGAplus. Neste sistema, exemplares de *D. carnosa* foram colocados em cultivo, expostos às condições estivais do mês de Agosto. Como resultado deste ensaio, todos os exemplares testados, apesar de evidenciarem crescimento vegetativo quantificável durante o período do ensaio (bastante heterogéneo), apresentaram **fortes sinais de debilidade**, sendo observável despigmentação, assim como a morte tecidular por necrose e fenómenos de herbivoria, em algumas extremidades. Segundo Werner & Dring (2011) a desintegração das fronteiras constitui um forte sinal de que as condições de cultivo não serão as mais corretas, sendo a razão mais plausível o excesso de radiação solar.

No final do ensaio, os exemplares de *D. carnosa* apresentavam-se fortemente epifitados por algas (*Ceramium* sp. (Rhodophyta), *Ulva* sp. (Chlorophyta) e *Echtocarpus* sp. (Phaeophyceae)), briozoários e alguns moluscos jovens (*Mytilus* sp.), apresentando também um biofilme bastante espesso, característico de um forte processo de epifitização (Wieczorek & Todd 1997). Estas características podem ser provocadas pela elevada presença de esporos e zigotos na água proveniente da piscicultura e/ou pela escolha de densidades de cultivo baixas para o tipo de ensaio em questão; oferecendo espaço para proliferar, com condições favoráveis como luz e nutrientes, para o crescimento de organismo epífitos e/ou oportunistas de crescimento rápido. A presença de microestruturas reprodutivas de material contaminante, assim como uma densidade desadequada, não só conferem stresse ao organismo de interesse como favorecem o crescimento de organismos indesejados à cultura (situação duplamente desvantajosa). Espécies oportunistas estão geralmente adaptadas a intensidades luminosas mais elevadas, de tal modo que o aumento da densidade de cultivo (aumentando a sombra e a diminuindo a disponibilidade de nutrientes) ou diminuição direta da luz poderiam atenuar o crescimento destas formas de vida na cultura (Werner & Dring 2011). Em suma, relativamente à escolha das DC para este ensaio, segundo o aparecimento e proliferação de organismos epífitos, conclui-se que necessitariam de um ajuste de modo a atenuar este comportamento.

A Temperatura média foi outro fator que possivelmente inviabilizou o cultivo de *D. carnosa*, visto que, medida ao final da tarde, rondou os 24 °C (mínima 22,9 °C, máxima 25,1 °C), elevada para o cultivo de *D. carnosa*. Deste modo se prevê que a temperatura a que



esteve sujeita poderá, muito provavelmente, ter sido ainda mais elevada em horas do pico da radiação solar, proporcionando (graças à inércia térmica da água), um aumento constante e de efeito prolongado, grande para que ocorresse desenvolvimento, sob forma saudável, dos espécimes de *D. carnosa*. Desenvolvendo-se em águas frias (entre os 6 °C e os 15 °C), característica do horizonte sublitoral, *D. carnosa* estará provavelmente acostumada a usufruir do efeito tampão da profundidade da coluna de água, que mantém a temperatura baixa com pequenas amplitudes térmicas, efeito este que no presente ensaio não se fez sentir, ficando sujeita a um enorme stress térmico (Morgan et al. 1980). Este facto também aparece descrito para *P. palmata* por Hanelt & Nultsch (1995) e Matos et al. (2006).

Apresentando aproximadamente os mesmos valores na taxa de redução de luz para as duas densidades de cultivo testadas (pequenas variações justificadas aparentemente pelo posicionamento dos tanques face à luz), a elevada intensidade luminosa (registada à superfície e também a 5 cm de profundidade), terá contribuído não só para o aumento da temperatura da água como, em grande parte, para a ocorrência de processos degradativos do material estudado. Segundo Hanelt e colaboradores (1997), algas características do horizonte médiolitoral possuem a capacidade de alterar a sua pigmentação em resposta à intensidade luminosa, o autor acrescenta que estas podem adquirir um tom esverdeado sobre intensa radiação solar. Sagert & Schubert (2000) referem que o conteúdo de Ficoeritrina, como consequência da forte intensa luminosidade, em material de **campo**, este facto terá provavelmente ocorrido nos exemplares de *D. carnosa* em cultivo, visto que se apresentavam uma coloração verde escura, longe do vermelho rubro característico.

Assumindo que esta espécie possui um valor de fotoinibição perto do observado na sua correspondente *P. palmata*, isto é, próximo dos 210  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme descrito por Dring (1982); tal degradação parece plausível face à média de valores registados para a intensidade luminosa, 1451  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 1257  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (à superfície e a 5 cm de profundidade, respetivamente). A excessiva intensidade luminosa é responsável por aumentar a taxa de fotoagressão dos fotossistemas cloroplastidiais, sendo a velocidade da agressão maior do que a taxa de regeneração dos complexos fotossintéticos. Este facto leva a que ocorra fotoinibição (como mecanismo fotoprotetor) dissipando energia através de um aumento do conteúdo de Zeaxantina, no fotossistema II (Hanelt & Nultsch 1995, Sagert & Schubert 2000, Landrum & Bone 2001); aparentemente fundamentado, também, pelos valores baixos de pH obtidos (Hanelt & Nultsch 1995). É sabido que o stress provocado por altas temperaturas e irradiações solares elevadas, atuam em conjunto decrescendo a eficiência e

capacidade fotossintética (Henley et al. 1992) levando, a longo prazo, à morte dos exemplares, facto que poderá ter ocorrido nas amostras em cultivo, Correspondendo a ineficiência fotossintética a um aumento do CO<sub>2</sub> no meio por aumento proporcional da respiração (e conseqüente aumento do pH) (Dring 1982).

Como resultado do teste T para amostras independentes, constatou-se que o fator densidade de cultivo, neste ensaio, apenas apresenta influência na produtividade, sendo a taxa de crescimento semelhante nas duas densidades de cultivo, como se pode constatar na Fig. 25..

Como conclusão dos ensaios laboratoriais, observou-se que os resultados obtidos **não constituíram um modelo exato de extrapolação** para o modelo de aquacultura, visto as considerações finais não incluem, à partida, fenómenos de concorrência e competição (explantos confinados à monoespecificidade proporcionada pelo matraz e pelo rigoroso controlo de assepsia, eliminando competição interespecífica e herbivoría) e de condições muito abaixo das ideais, com flutuações térmicas, verificadas em aquacultura, em comparação com as condições uniformes oferecidas em cultura laboratorial (Lobban & Harrison 1997).

Como conclusão do ensaio em Aquacultura Integrada Multitrófica observa-se uma **impossibilidade de cultivo de *D. carnosus*, neste sistema em períodos estivais**. Resultados parecidos foram obtidos por Matos et al. (2006) no cultivo da espécie *P. palmata* em Portugal, num sistema com características semelhantes. Apesar desta impossibilidade, os ensaios de cultivo laboratorial mostram ser capazes de propagar vegetativamente *D. carnosus*, garantindo um importante *stock* de material durante o tempo quente, abrindo a possibilidade de o manter em estado vegetativo até à chegada do período invernal ou frio, onde poderão novamente ser testados, possivelmente com sucesso.

### 4.3 Rendimento extrações

O método de extração utilizado nesta atividade experimental permitiu que componentes solúveis presentes na biomassa seca de *D. carnosus* fossem removidos de um modo sequencial, através da atuação de solventes orgânicos (Baiano 2014). Assumindo que substâncias com forças moleculares, de tipo e magnitude, semelhantes são solúveis uma na outra, um solvente apolar irá facilmente dissolver matéria apolar e um solvente polar irá

certamente dissolver matéria que apresente polaridade (aumentando esta com o grau de polaridade do solvente) (Chang 2010).

Este método de extração foi obtido através de adaptações das metodologias primeiramente descritas para extração lipídica por Bligh & Dyer (1959) e Folch et al. (1987) e permite combinar as propriedades de solventes como o n-Hexano (apolar) e Metanol (polar) para a obtenção de compostos biológicos de interesse ( Smedes & Thomasen 1996, Miao & Wu 2006, Sheng et al. 2011, Kumar et al. 2015). Constitui uma rápida, fácil e eficiente maneira de extração para um grande número de amostras (Kumar et al. 2015).

Neste ensaio comparou-se sob a forma de rendimento (%) as diversas extrações em amostras de *D. carnosa*, nomeadamente, através de uma análise em triplicado, da quantificação de biomassa dos diferentes extratos por método de cultivo. Os resultados da ANOVA demonstraram que existe uma influência no rendimento por metodologia de extração (n-hexano, MeOH e ext. alcalina) em função das condições de onde as amostras se desenvolveram, ou seja, que o conteúdo apolar/polar/coloidal varia em função do meio. Acrescentando, comparações múltiplas pelo método de Tuckey, sugerem várias relações entre amostras diferentes da mesma fração (ver dados brutos em anexo), com isto se quer dizer que houve diferentes comportamentos, de determinadas frações (apolar, polar e coloidal) por método de cultivo. Este facto sugere o desenvolvimento de determinado conteúdo molecular com resposta a fatores ecofisiológicos característicos do meio onde cada amostra se desenvolveu.

Seguindo este raciocínio e com o auxílio desenvolvido no trabalho por Sagert & Schubert (2000) é possível afirmar que *D.carnosa*, ajuste o seu conteúdo em pigmentação fotossintética e restante composição, para fins benéficos a longo prazo mediante as condições que ocupa. Descrito na literatura está também a correlação da produção de compostos antioxidantes e antimicrobianos como consequência de interações bióticas entre algas e predadores (Cowan 1999, El Gamal 2010, Potin et al. 2002). Como consequência, os diferentes valores de rendimento, para determinada fração descrevem uma data de adaptações, não só devido ao meio que ocupam mas também aos diversos fatores ecofisiológicos a que estão sujeitas.

É sabido que devido à sua apolaridade e carácter hidrofóbico, o **n-hexano**, é capaz de dissolver compostos apolares como ceras, lípidos e alguns pigmentos (Lehninger 2005, Packer 2009). Comparações múltiplas pelo método de Tuckey sugerem a elaboração de três

grupos homogéneos para este solvente, sendo o grupo de maior rendimento constituído apenas pelo extrato de **IMTA**, seguido por um grupo de rendimento intermédio, constituído pelas amostras **PE**, **LAB** e **Mind** e por fim um grupo onde aparece sozinho o rendimento de **Carr**. Segundo esta análise conclui-se, com fundamentação dos dados da ANOVA, que o conteúdo apolar aparenta ser menor na amostra oriunda de uma comunidade nativa – **Carr**. Todas as outras amostras apresentaram um cultivo distante do referido anteriormente, destacadas do substrato, podendo este facto ter interferência na formação de compostos apolares, sob a forma de stresse. Sendo que o grupo intermédio é constituído pelas amostras **PE**, **LAB** e **Mind**, especula-se ainda que, o fator stresse proporcionado pelo elevado tempo de cultivo e condições desadequadas, poderá ter provocado um aumento ainda maior na produção de compostos apolares na amostra **IMTA**

O extrato **Metanólico** é responsável por um efeito extrativo bastante grande, graças à sua polaridade elevada (Lehninger 2005) é capaz de não só extrair uma vasta gama de compostos polares como diversos pigmentos fotossintéticos, ácidos gordos insaturados, vários fenóis, proteínas membranares, florotaninos, alcaloides, terpenos, poli-hidroxi-esteróis, saponinas, entre outros; como algumas moléculas não polares (Ballantine et al. 1987, El Gamal 2010, Smyrniotopoulos et al. 2010). Comparações múltiplas pelo método de Tuckey sugerem a elaboração de dois grupos homogéneos para este solvente, sendo as algas que sofreram um processo de cultivo em **IMTA** (**IMTA** e **PE**) as que pertencem ao grupo que obteve menor rendimento. Sagert & Schubert (2000) afirmam que algas características do horizonte infralitoral possuem maior facilidade de ajuste no seu conteúdo em pigmentos fotossintéticos, mediante as condições de ocupação de diferentes meios, como adaptação.

O rendimento das amostras do processo de extração dos **colóides** de *D. carnosa* mostra diversas diferenças na biomassa, sendo que as comparações múltiplas estabelecidas pelo método de Tuckey sugerem considerar dois grupos homogéneos para esta metodologia. O primeiro grupo, constituído pelas amostras **Mind**, **IMTA** e **Lab** e o segundo grupo, com rendimento superior, **Carr** e **PE**. Os factores responsáveis pelos padrões 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, a salinidade da água e os níveis de fósforo e azoto no meio (efeito “Chopin” e “Neish”, respetivamente) (Chopin et al. 1995). Apesar das variações do conteúdo em carragenana estarem relacionadas com interações complexas de diversos fatores, parece que dois deles, a temperatura e o nível de nutrientes na água, jogam um papel chave nas flutuações do teor deste ficocolóide (Pereira 2004). Devido a elevada

heterogeneidade das diversas condições e fatores sujeitos às amostras de *D. carnososa*, o estabelecimento de correlações torna-se bastantes difícil, visto que todos eles se apresentam interrelacionados, sendo difícil separar o efeito de cada um deles.

#### 4.4 Análise dos espectros de FTIR-ATR

Descrito por Chopin e colaboradores (1999) como possuidora de uma carragenana híbrida das famílias  $\lambda$  e  $\mu$ , podendo ainda conter uma fração de carragenana da família  $\kappa$ , o coloide de *D. carnososa* proveniente das diferentes condições de cultivo, obtido por extração alcalina de 3 horas, foi analisado pela tecnologia de FTIR-ATR. A interpretação foi realizada com recurso aos dados fornecidos por Pereira e colaboradores (2009) e Chopin et al. (1999). Consultar dados brutos disponíveis em Apêndice.

Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Bond(s)/group(s)	Letter code	Type of carrageenan							
			Kappa ( $\kappa$ )	Mu ( $\mu$ )	Iota ( $\iota$ )	Nu ( $\nu$ )	Beta ( $\beta$ )	Theta ( $\theta$ )	Lambda ( $\lambda$ )	Xi ( $\xi$ )
1240-1260	S=O of sulphate esters		+	++	++	+++	-	++	+++	++
1070	C-O of 3,6-anhydrogalactose	DA	+	-	+	-	+	+	-	-
970-975	Galactose	G/D	+	s	+	s	+	+	-	-
930	C-O of 3,6-anhydrogalactose	DA	-	-	+	-	+	+	-	-
905	C-O-SO <sub>3</sub> on C2 of 3,6-anhydrogalactose	DA25	-	-	-	-	+	+	-	-
890-900	Unsulphated $\beta$ -D-galactose	G/D	-	-	-	-	+	-	-	-
867	C-O-SO <sub>3</sub> on C6 of galactose	G/D65	-	+	-	+	-	-	+	-
845	C-O-SO <sub>3</sub> on C4 of galactose	G45	+	+	+	+	-	-	-	-
825-830	C-O-SO <sub>3</sub> on C2 of galactose	G/D25	-	-	-	+	-	+	+	n
815-820	C-O-SO <sub>3</sub> on C6 of galactose	G/D65	-	+	-	+	-	-	+	-
805	C-O-SO <sub>3</sub> on C2 of 3,6-anhydrogalactose	DA25	-	-	+	-	-	+	-	-

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

**Figura 44** – Números de onda identificativos de carragenanas presentes em algas da flora portuguesa (adaptado de (Pereira et al. 2009))

Numa análise geral, o pico dos coloides desta alga, referente ao número de onda de 845 cm<sup>-1</sup>, sugere uma parecença com carragenanas da família  $\kappa$  e  $\mu$ , através da presença de um grupo SO<sub>3</sub> em C<sub>4</sub> da molécula de 3,6-anidrogactose, aparentemente diferente da forte intensidade registada, neste valor, pela carragenana  $\lambda$  padrão. Percorrendo o espectro no sentido crescente do número de onda é, novamente evidenciado um pequeno pico presente na carragenana  $\kappa$  padrão, de valor 930 cm<sup>-1</sup> correspondente à ligação C-O da 3,6-anidrogactose (Vincent et al. 1957, Rees 1961, Chopin et al. 1999). Recorrendo à Fig 51, presente no Apêndice, a identificação de um pico aos 1020 cm<sup>-1</sup>, é descrita por Chopin et al. (1999) como resultado de um tratamento alcalino em carragenana  $\lambda$ , contudo Pereira et al. (2013, 2003) (entre outros autores (Balavigneswaran et al. 2013)) descreve estes valores de absorvância como vibrações dos anéis de piranose, comuns a todos o ficocoloides. O pico observado a 1070 cm<sup>-1</sup>, correspondente à ligação C-O da 3,6-anidrogactose e é bastante mais

evidenciado nas amostras de *D. carnosa*, em carragenanas da família  $\lambda$  e agares do que para valores relativos a carragenanas da família  $\kappa/\iota$  (Vincent et al. 1957, Rees 1961, Chopin et al. 1999). Para valores de número de onda de  $1150\text{ cm}^{-1}$ , observa-se um pico característico de estéres de Sulfato (Chopin et al. 1999). O pico seguinte,  $1230\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$ , referenciado por Chopin (1999) como bom indicador do nível de sulfatos, apresenta uma intensidade moderada. Sendo esta espécie descrita como possuidora de uma carragenana fortemente sulfatada, este valor poderá aparentemente indicar que, uma molécula de um outro coloide constituinte poderá ter mascarado este o efeito da forte sulfatação, conferindo menor intensidade na vibração para esta gama de números de onda (Pereira et al. 2009), adiante, Chopin et al. (1999) acrescenta que esta absorvância moderada é típica de um carragar, visto ser mais ténue que a forte intensidade observada em carragenana  $\lambda$  *standard*. Os restantes picos evidenciados caracterizam complexos proteicos do grupo das amidas (e. g.  $1420\text{ cm}^{-1}$ ,  $1640\text{ cm}^{-1}$ ) (Chopin et al. 1999).

Todos estes factos, concordantes com a bibliografia, comprovam que o coloide extraído de *D. carnosa* se apresenta distante dos do conhecimento científico “típico”, sugerindo investigação futura com recurso a diferentes tecnologias como FTIR-Raman e NMR de modo a tornar a interpretação mais sólida e conclusiva.

#### **4.4.1 Amostras nativas Carreço vs IMTA**

A comparação de amostras nativas de *D. carnosa* proveniente de ambiente selvagem (Praia de Carreço) e de cultivo em IMTA apresentam algumas diferenças em amplitude e intensidade de alguns picos. A escolha deste material foi devida essencialmente à observação *in situ* de comunidades naturais de *D. carnosa* no local (Carreço).

Uma vez que os respetivos espetros se encontram na mesma escala, é possível observar que a amostra selvagem possui um conteúdo aproximadamente igual em ligações a grupos sulfatos, no Carbono 4, das moléculas de Galactose que a amostra de cultivo em aquacultura (dado pelos valores  $701\text{ cm}^{-1}$ ,  $853\text{ cm}^{-1}$ ), pressupondo que existirá um conteúdo igual entre a alga nativa e o seu coloide. A interpretação das diferentes intensidades observadas no pico  $1020\text{ cm}^{-1}$  sugere que o conteúdo em carragenana possa ser maior na amostra selvagem, podendo este facto ser devido ao “efeito de Neish” e “efeito Chopin” (Pereira 2004). O valor de  $1227\text{ cm}^{-1}$ , indicador do índice de sulfatação da carragenana (Chopin et al. 1999), indica que este conteúdo é maior no coloide proveniente de cultivo em

IMTA, facto possivelmente devido às extremas condições adversas verificadas e à correspondente necessidade de adaptação, visto que estão na base do seu esqueleto (Pereira 2004). Também verificado está o aumento proteico em amidas, compostos azotados associadas a glicoproteínas membranares (Lehninger 2005), nas amostras provenientes de aquacultura, este facto pode ser devido ao carácter bioacumulador de compostos azotados pelas macroalgas (Matos et al. 2006, Pereira et al. 2006) conjugado com uma água rica em nitratos proveniente da piscicultura (Abreu et al. 2011).

#### **4.4.2 Amostras nativas vs Polissacarídeos**

A comparação de amostras de *D. carnosa* selvagens nativa (**Carreço**) com os seus coloides, não revela grandes alterações, apresentando-se todos os picos dos gráficos coincidentes no valor e amplitude. O único facto destacável parece ser um ligeiro aumento de intensidade para a amostra do coloide, facto que pode se dever à influência do processo de extração alcalina (Rees 1961, Tuvikene et al. 2006).

Relativamente à comparação estabelecida com exemplares de cultivo em **IMTA** o resultado é idêntico ao obtido para **Carreço**, para números de onda compreendidos entre 930  $\text{cm}^{-1}$  e 1200  $\text{cm}^{-1}$  (fração relativa ao possível conteúdo em carragenana  $\lambda$  e ligação C-O dos ésteres sulfato da 3,6-Anidrogactose). Na restante parte do espectro é perfeitamente visível um aumento no conteúdo na amostra de alga nativa, não observável na carragenana.

#### **4.4.3 Extração alcalina 3h vs 5h**

Relativamente às amostras de *D. carnosa* sujeitas a diferentes tempos de extração alcalina, observa-se uma aparente ineficiência no processo mais demorado. O efeito da exposição prolongada dos coloides a um meio alcalino, já foi descrito como causador de perdas e estragos nas cadeias coloidais (Rees 1961, Tuvikene et al. 2006), sendo portanto a duração do tratamento alcalino mais apropriado de 3 horas, conforme descrito por Pereira et al. (2003).

#### 4.4.4 Polissacarídeos das diferentes amostras

Na comparação dos ficocoloides de amostras provenientes de distintas condições de cultivo, são observáveis diferenças essencialmente na intensidade dos picos para vários números de onda. Relativamente às ligações C-S/C-O-C presentes em compostos agaróides, as amostras **Carr**, **Mind** e **PE** são as que apresentam maior intensidade ( $760\text{ cm}^{-1}$ ). Esta mesma proporção é verificada para o próximo pico, referente ao conteúdo em ligações C-O-SO<sub>4</sub> do C4 da galactose, registando-se também um valor igual no pico ulterior, referente ao conteúdo em ligações C-O das moléculas de 3,6-anidrogactose.

Relativamente ao conteúdo de piranose, dado pelo pico  $1020\text{ cm}^{-1}$  observa-se que este é sensivelmente maior para as mostras selvagens e menor para as amostras de ficocoloides cultivados em laboratório, revelando as amostras de cultivo em aquacultura (**IMTA** e **PE**) valores de intensidade intermédios. Para o pico observado a  $1070\text{ cm}^{-1}$  correspondente à ligação C-O de ésteres de sulfato da 3,6-anidrogactose e é bastante mais evidenciado na amostra de **IMTA**, (facto que poderá conferir maior viscosidade a esta amostra). Para  $1148\text{ cm}^{-1}$ , relativamente às ligações de ésteres de sulfato observa-se uma maior quantidade em **amostras selvagens**, seguida por amostra de cultivo em aquacultura e por fim por amostras cultivadas em **laboratório**. Na região indicadora do total conteúdo em sulfatos ( $1210\text{ cm}^{-1}$  -  $1260\text{ cm}^{-1}$ ) a amostra que aparece evidenciada foi a que se encontrou destaca numa possa de maré (**Mindelo**). Para os picos referentes ao conteúdo em amidas, a amostra de **IMTA** aparece destacada das outras com maior intensidade.

Em conclusão da análise dos diferentes espetros obtidos de FTIR-ATR, é possível concluir que os coloides obtidos se apresentam híbridos, mostrando uma forte conjugação de domínios coloidais de várias famílias; aparentando as famílias de carragenanas  $\lambda$ ,  $\mu$  e  $\kappa$ , os polissacarídeos de maior presença em *D. carnos*. Ademais se conclui que é possível que *D. carnos* utilize outros tipos de coloide, nomeadamente agar, para se constituir; tratando-se, segundo Chopin et al. (1999), de uma espécie da família Dumontiaceae descrita como possuidora de um carregar (relembre-se, com uma forte componente carragenófito). Deste modo, a leitura da banda [ $1210\text{ cm}^{-1}$  -  $1260\text{ cm}^{-1}$ ] traduz-se num modesto conteúdo de sulfatos; No presente trabalho foi confirmado a sua impossibilidade de gelificar, provocada aparentemente pela elavada sulfatação das sua galactanas. O aumento da utilização do termo carregar para descrever estruturas híbridas (nem simples agares, nem carragenanas simples) é, em alguns casos, utilizado para descrever variações aparentes no conteúdo de ficocoloides



divergentes das carragenanas da família  $\lambda$ , uma vez que remontam superficialmente à aparência e constituição da mesma. Uma vez que a repetição de monómeros idealmente perfeitos são extremamente raros de ser observados em galactanas da parede celular das algas (Chopin et al., 1999). Este facto poderá conferir à espécie propriedades interessantes não descritas, maioritariamente devido à forte sulfatação apresentada e a multifacetadas propriedades, provenientes dos distintos tipos de coloides que possui. Todas estas características devem constituir uma base para investigações futuras, demonstrando precisamente um facto promissor e de destaque para o avanço da indústria de exploração e obtenção de novos biopolímeros.

#### 4.5 Ensaio DPPH

O potencial antioxidante das macroalgas vermelhas é tido como um importante regulador de processos de oxidação quer *in vivo* quer *in vitro* (Mohamed et al. 2012), derivando a maioria da atividade antioxidante de compostos ricos polifenóis, carotenoides, vitaminas e hormonas (Abad et al. 2013). O potencial antioxidante de diferentes frações de *D. carnosa*, foi avaliado segundo o método do DPPH, descrito por Duan e colaboradores (2006). Os resultados para as frações de n-hexano e metanol apresentaram, em geral, baixa atividade, destacando apenas a fração metanólica da amostra **IMTA**, que mostrou sinais de eficiente redutora de radicais DPPH, podendo este valor sugerir que, a elevada presença de compostos antioxidantes nesta amostra é obtida como resultado da fotoagressão sofrida no processo de cultivo, levando ao aumento da síntese de compostos como carotenoides (e. g. Zeaxantina, Luteína) (Dring 1982), compostos amínicos (como MAAs) (Hanelt & Nultsch 1995, Sagert & Schubert 2000), entre outros

Os resultados obtidos em *D. carnosa*, no presente ensaio, apresentam concordância com resultados obtidos por Yuan et al. (2005), na alga homóloga *P. palmata*, onde a maioria dos extratos não apresentou demais atividade. Neste ensaio, a par do obtido por Yuan et al. (2005), é verificada uma correlação de dependência do potencial antioxidante em função da concentração do extrato utilizado no ensaio, ou seja, o seu efeito é potenciado com o aumento da sua concentração. Os restantes resultados, apesar de discrepantes entre amostras, apresentam também concordância com a literatura, visto que são diversas as variáveis podem interagir no processo de síntese destes compostos antioxidantes, conferindo também especificidade a cada amostra, visto que foram sujeitas a diferentes condições de cultivo

(Yuan et al. 2005, Ambrozova et al. 2014). É sabido, também, que a eficiência da utilização de metanol é consideravelmente maior do que a utilização de n-hexano no processo de extração, sendo portanto expectável que os extratos metanolólicos apresentem conteúdos superiores em compostos antioxidantes.

A eficiência do Metanol como solvente orgânico, em quantidade e diversidade de compostos extraídos, poderá dever-se a uma maior abundância de compostos lipídicos polares em *D. carnososa* (Lehninger 2005, Ambrozova et al. 2014). Contudo, todos os valores observados de potencial antioxidante, sejam altos ou baixos, não dependem só de uma boa capacidade de carga/extração do solvente utilizado, visto existir influência direta de diferentes variáveis ambientais e bioquímicas características do meio onde o espécime cresce (Lehninger 2005). Diferentes condições de cultivo podem revelar valores de conteúdos e potenciais antioxidantes bastante distintos. A capacidade antioxidante é diretamente relacionada com mecanismos de fotoproteção, sendo esta aparentemente mais elevada em espécies características do horizonte médio litoral, expostas a mudanças drásticas no espectro de radiação luminosa e UV (Aguilera et al. 2002). Assim é possível observar uma proporção direta da concentração de aminoácidos micoesporínicos (MAAs) em função da intensidade luminosa, verificando-se a proporção inversa no conteúdo em R-ficoeritrina e ácido ascórbico (Yuan et al. 2005). Todos os resultados dependem também do tratamento ulterior oferecido às amostras, podendo a secagem ao sol e o subsequente armazenamento reduzir drasticamente todo este potencial (Aguilera et al. 2002, Yuan et al. 2005, Ambrozova et al. 2014). Um dado que cativou atenção para o ensaio foi, o da extração metanólica de **IMTA** apresentar para este ensaio, a maior atividade, sendo que no processo de extração obteve um dos piores rendimentos. Apesar dos estudos se desenvolverem a concentrações na escala dos microgramas, este dado confere alguma efetividade, relativa, ao extrato, não significando que um processo de extração vantajoso determine uma maior bioatividade. Neste caso, para 1 g de biomassa, o solvente MeOH extraiu menos compostos para a amostra **IMTA**, que no final, se mostraram mais efetivos.

Em concordância com os baixos valores obtido, em *P. palmata*, por Li et al. (2012) ficaram também os polissacarídeos de *D. carnososa*, que mostraram fraca capacidade antioxidante para o radical DPPH. Yuan et al. (2005) refere que o caráter antioxidante provém do grau de sulfatação e tipo de coloide constituinte. Abad et al. (2013) acrescenta que a presença de duplas ligações e grupos OH também tem influencia positiva no potencial

antioxidante, descrito, em carragenanas, como crescente no sentido  $\lambda < \iota < \kappa$ , contudo os polissacarídeos sulfatados de *Dilsea* não valores satisfatórios.

#### 4.6 Quantificação Total de Polifenóis

Os polifenóis representam uma vasta classe de compostos como flavonoides (i. e. flavonas, flavonóis, flavanonas), lignanos, ligninas, tocoferóis, taninos, ácido fenólico; desempenhando conhecidas propriedades antioxidantes (Cowan 1999, Yuan et al. 2005). Das frações analisadas destacam-se com valores consideráveis, as amostras de algas provenientes de aquicultura (**IMTA** e **PE**).

Para a fração de n-hexano, os resultados do extrato **IMTA** poderão aparentemente encontrar justificação nas condições adversas de cultivo proporcionadas aos explantes; uma vez que a forte epifitização e fenómenos de predação por moluscos e briozoários poderá levar a um aumento na produção de compostos de defesa. A mesma situação é possível de identificar nas duas frações **PE**, visto que sofreram uma fração temporal diminuta do mesmo método de cultivo (aproximadamente 20 dias).

A fração de n-hexano proveniente de **Mindelo** não apresenta qualquer conteúdo polifenólico em equivalentes de ácido gálico. Este facto incôndito, poderá ter sido provocado por uma ação menos correta, pelo utilizador, aquando a realização da metodologia, uma vez que é de todo estranho que uma fração de *D. carnosus* não apresente qualquer conteúdo polifenólico. Comparando o rendimento do processo apolar de extração verifica-se que a extração obteve biomassa quantificável (aproximadamente 0,61%).

Outro facto que poderá ter influenciado os valores do ensaio foi o composto antioxidante utilizado para estabelecer comparação, a utilização de ácido gálico é tida para comparações polifenólicas em amostras vegetais superiores, uma vez que este é um antioxidante constituinte de plantas terrestres (Jinshui et al. n.d.), sendo portanto uma metodologia de comparação indireta do conteúdo polifenólico, através de um equivalente (ácido gálico), entre plantas superiores e organismos algais. Alguns estudos sugerem o tanino floroglucinol como o adequado para estabelecer comparações em macroalgas, uma vez que este faz parte da sua constituição (Hubbard et al. 2004, Jung et al. 2006). Apesar de concordantes com diferentes valores baixos em espécies algais vermelhas (Chakraborty et al. 2013, De Alencar et al. 2014), os resultados obtidos poderão indicar que a defesa conferida

por polifenóis algais não se apresenta única contra processos de oxidação, contando as algas com múltiplas defesas traduzidas em elevados conteúdos vitamínicos (precursores e moléculas finais) como  $\alpha$ -tocoferol, d-tocoferol,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, tiamina, ácido ascórbico, glutathione (Yuan et al. 2005).

## 4.7 ORAC

A exposição de algas vermelhas a PAR, e radiação UV-A e UV-B influencia não só a capacidade antioxidante, o perfil de aminoácidos microsporínicos (Yuan et al. 2009), como também a composição e concentração de pigmentos em tecidos fotossintéticos; nomeadamente o conteúdo em clorofila *a*, ficoeritrina e ficocianina, que denotam presença em concentrações inversamente proporcionais a radiação UV recebida (J. Aguilera et al. 2002, Y. Yuan et al. 2005, Yuan et al. 2009). Sendo que é sabido que, o mecanismo antioxidante de ação de MAAs funciona na base da cedência de eletrões, e não na sequestração, como forma de controlar radicais livres por estes aminoácidos (Yuan et al. 2009).

Um estudo realizado por Yuan et al. (2009), na homóloga *P. palmata* adianta que a influência do aumento de radiação UVA e UVB, como consequência de um aumento de latitude, influencia a predominância de determinados MAAs, em função de outros. Ademais, noutro estudo realizado pelo mesmo autor (Yuan et al. 2005), é associada, através da observação de fenómenos de peroxidação lipídica (causada pelo radical livre AAPH), a capacidade antioxidante de MAAs na prevenção da ocorrência deste tipo de fenómenos e que este efeito é sobejamente maior em frações hidrofílicas. Este facto pode-se apresentar justificativo dos bons índices obtidos por algumas frações metanólicas nas amostras de *D. carnosus*. Yuan et al. (2005) adianta que a atividade antioxidante de MAAs registada no estudo por ele realizado pode não se dever direta e exclusivamente aos MAAs, mas também à presença de compostos flavonóicos e ácidos fenólicos que utilizem a mesma via de síntese (ver também Potin et al. 2002).

A boa eficiência, verificada na técnica de ORAC, pelo extrato Metanólico de **Carr**, não corresponde em proporção e destaque à mesma fração testada, para o conteúdo total de polifenóis. O elevado valor obtido no ensaio de QTP para a fração de n-hexano **PE**, não correspondeu com uma atividade antioxidante forte no método de ORAC. A amostra das frações n-hexano e MeOH de **IMTA** apresentaram atividade distinta em ambos os ensaios.

Aparentemente, através da comparação destes dados se pode inferir que o potencial antioxidante, aparentemente, não depende única e exclusivamente do conteúdo polifenólico da amostra. Apesar do conteúdo polifenólico total, segundo Lee & Kim (2015) ser positivamente relacionado com valores obtidos em ensaios de ORAC, não quererá dizer que esta seja a única forma de defesa contra radicais livres.

Segundo Yuan et al. (2005) a atividade antioxidante pode se dever presença de MAAs, compostos flavonólicos, entre outros (ver também Potin et al. 2002). Mais estudos têm sido efetuados, aplicando esta metodologia em diferentes elementos constituintes de *P. palmata*, descrevendo, assim, o seu potencial antioxidante. A fração hidrossolúvel (metanol:água) de enzimas foi comprovada por Wang et al. (2010) como parcela constituinte do potencial antioxidante, conferindo-lhes responsabilidade neste tipo de resultados em *P. palmata*. A maioria dos estudos realizados dão enfoque a compostos polares e hidrofílicos, sendo que a utilização de extratos polares como o de n-hexano não é verificada em estudos como os de Yuan et al. (2009), Wang et al. (2010) e Harnedy & FitzGerald (2013). Não obstante, as amostras de *D. carnosa* demonstram alguns valores, na fração apolar, com considerável atividade, como é o caso de **IMTA** e **Carreço**. Segundo Harnedy et al. (2014) frações hidrofílicas proteicas, apesar de conferirem atividade antioxidante a amostras, não dependem do método ou local de cultivo, não sendo portanto o conteúdo proteico justificativo dos valores obtidos por diferentes extratos de diferentes amostras de *D. carnosa*.

Comparativamente às diferentes proporções observadas, respetivamente, em extratos selvagens de n-hexano e metanólicos, uma possível justificação aparenta ser devida às condições oferecidas nos diferentes meios onde se procedeu à recolha, a colheita do material **Mindelo** ocorreu numa poça de maré, no patamar médio litoral superior (destacada do substrato). Neste local registam-se diversos fatores capazes de conferir alguma inospitalidade para a seletividade, ocorrência e integridade dos exemplares aí colhidos. Lobban & Harrison (1997) descreve a fisionomia do talo de espécies como *D. carnosa* como favorecedora de longevidade e resistência ambiental, característica de patamares infralitorais. Este local de ocupação, descrito por Barry & Dillon (1945), provavelmente irá conferir diferentes conteúdos proteicos, lipídicos (entre outros) e conseqüentemente distintas propriedades antioxidantes, facto que poderá eventualmente marcar diferenças observáveis no presente ensaio, visto que algas que cresceram em comunidades com condições ecofisiológicas naturais apresentam diferentes resultados, nesta técnica.

Os resultados obtidos nas frações coloidais das amostras em estudo apresentaram valores de  $\mu\text{g}$  de equivalentes de Trolox por gramas de extrato bastante mais reduzidos que os extratos das restantes frações, sendo a amostra de **IMTA** a que se destacou através de um comportamento maior nesta análise. A avaliação do comportamento antioxidante de polissacarídeos sulfatados tem sido evidenciada na literatura e diversos resultados têm sido reportados sendo que, o grau de sulfatação aparece normalmente associado a um aumento do potencial antioxidante (Barahona et al. 2012). Contudo o mesmo autor evidencia que esta metodologia é específica para detetar atividade antioxidante através de radicais peróxido, não se apresentando explícito o potencial antioxidante total. O autor adianta que a metodologia utilizada é focalizada para medição de uma molécula alvo e que esta influencia a medição do comportamento nativo de polissacarídeos face ao radical escolhido para medir o potencial antioxidante (Barahona et al. 2012). Abad et al. (2013) avança que o potencial antioxidante é tido como crescente em carragenanas  $\lambda < \iota < \kappa$ . Contudo Yuan et al., (2005) discute que não só ao grau de sulfatação confere carácter antioxidante em ficocoloides carragenófitos mas também a presença de duplas ligações e grupos OH. Este facto é confirmado por Barahona et al. (2012), adiantando que a capacidade antioxidante com radicais OH é verificada com a diminuição da sulfatação. Tratando-se de uma carragenana nativa com presença de diversas famílias como  $\lambda$  e  $\kappa$ , a amostra de coloides de *D. carnosus* que demonstrou maior atividade parece demonstrar elevados potenciais antioxidantes não só característicos da forte sulfatação verificada em cultivo IMTA (ver 5.3.4) como possivelmente pela presença de componentes agaróides, possivelmente mais evidenciada nesta amostra e conferindo-lhe um efeito antioxidante combinado, com características interessantes (Matsuhiro et al. 2014). É de salientar que moléculas de agarose neutras mostram potencial moderado em contraste com agaroses sulfatadas, sendo que estes resultados indicam que não só a presença de grupos sulfato, mas outros fatores tais como a posição do sulfato e a estrutura e o peso molecular do polissacarídeo são características importantes envolvidas na atividade antioxidante. Toda esta abordagem a coloides híbridos revela-se complexa e necessita de mais investigação (Matsuhiro et al. 2014).

#### **4.8 Ensaio anti microbianos**

As algas possuem uma enorme capacidade para produzir metabolitos secundários, capazes de funcionar como mecanismos de defesa contra macro e microrganismos (Cowan

1999, Potin et al. 2002). A produção destes biocompostos pode ser feita por diversas vias metabólicas como causa de determinados fatores, sendo eles endógenos de determinadas espécies ou grupo taxonómico, derivados de comportamentos ambientais ou ainda derivados de interações biológicas. Da vasta gama de compostos antimicrobianos produzidos pelas algas, cumprem mais uma vez ser evidenciados os fenóis e polifenóis (ácido fenólico, flavononas flavonoides e flavonóis), os taninos, os terpenos e terpenóides, as quinonas, as lectinas, etc. como os metabolitos mais estudados em pesquisas científicas (Cowan 1999, Mohamed et al. 2012). A produção de compostos muito reativos, como os derivados de halogéneo e de terpenos, e a sua dispersão no meio aquático constituem eficientes respostas, que se adequam quer ao tipo de organismos quer ao meio que ocupam (Potin et al. 2002, Genovese et al. 2009, Smyrniotopoulos et al. 2010). Em geral a produção destes metabolitos está associada à produção de ultraestruturas celulares especializadas no seu armazenamento, a fim de evitar fenómenos de autocitotoxicidade (Genovese et al. 2009), tornando estes organismos eficientes gestores e produtores de biomoléculas contra agentes microbióticos. A resistência bacteriana representa um grande desafio para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos algais, visto que infeções bacterianas como as causadas por *S. aureus* e *E. coli* tornaram-se novamente uma ameaça séria em países desenvolvidos (Smyrniotopoulos et al. 2010). Em conjunto, toda esta informação realça o papel ativo das algas em interações bióticas, pois são capazes de, ativamente, alterar a sua própria suscetibilidade a diversos mecanismos de ataque (Potin et al. 2002).

A capacidade antimicrobiana de extratos e polissacarídeos de amostras de *D. carnosa* foi avaliada em três organismos modelo, duas bactérias, Gram+ e Gram- e um fungo, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231), respetivamente. Este potencial foi avaliado através do método descrito por Horta et al. (2014), traduzindo-se numa forma simples, económica e reprodutível de inferir acerca da bioatividade das amostras.

A atividade antimicrobiana em *E. coli* dos extratos e polissacarídeos de *D. carnosa*, à exceção de algumas frações como a de **IMTA**, apresentaram níveis inibição reduzidos ou nulos (o contrário foi verificado em *S. aureus*). Este resultado é consensual na medida em que, a atividade de extratos algais contra bactérias Gram + é mais efetiva do que para bactérias Gram - (Ballantine et al. 1987, Stirk et al. 2007, Mohamed et al. 2012). A dificuldade verificada na inibição do crescimento de *E. coli* deve-se possivelmente pela presença de uma ultraestrutura membranar de peptidoglicano e de um espaço periplasmático

nas bactérias Gram - (Cowan 1999), constituindo mecanismos de defesa (física) na forma de uma barreira polipeptídica, como (química) pela presença de numerosas enzimas no espaço periplasmático capazes de degradar um vasto leque de moléculas, conferindo assim uma forte resistência contra muitos antibióticos ou outras moléculas estranhas (Lambert 2002).

Outro facto verificado neste ensaio foi o favorecimento do crescimento por algumas frações de *D. carnososa*, em detrimento da sua inibição. Este acontecimento dever-se-á possivelmente à presença mais acentuada, nesses extratos, de compostos capazes de, não só garantir fontes de alimento para metabolismo primário de *E. coli*, como de o favorecer, uma vez que o crescimento registado foi maior do que o do crescimento em meio de cultivo na ausência de extrato (controlo). Ademais, a presença de extrato de polissacarídeos (açúcares) parece potenciar o crescimento dos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Como com a concentração máxima estudada não se foi capaz de inibir o crescimento (por vezes potenciando-o), especula-se que estas frações não terão aplicabilidade comercial aparente, do ponto de vista antimicrobiano, uma vez que, testada a concentração máxima capaz de favorecer a viabilidade celular e evitar fenómenos de citotoxicidade, não ocorreu inibição do crescimento (Pinteus 2011).

Num *screening* da atividade antimicrobiana de diversas algas da flora mediterrânica, utilizando os mesmos organismos modelo, Salvador et al. (2007) obteve para filo Rhodophyta os maiores níveis de inibição contra bactérias Gram negativas e bolores. Dentro das Rhodophyta, as ordens Ceramiales e Gigartinales tiveram atividade antimicrobiana notável. Apesar de *D. carnososa* pertencer a esta última ordem, a atividade geral contra bactérias Gram negativas apresentou-se aparentemente nula, tendo-se apresentado modesta para o fungo, em todas as frações testadas.

Os efeitos dos extratos no microrganismo Gram +, *S. aureus*, os efeitos dos extratos de n-hexano e metanólicos de *D. carnososa*, foram diferentes, conseguindo-se em alguns deles, obter inibição do crescimento a mais de 50%, para as concentrações máximas de 1 mg/mL. Este facto revela-se determinante na escolha de um potencial composto antimicrobiano, uma vez que, esta concentração é fisiologicamente capaz de não conferir agressões ao organismo hospedeiro, apresentando uma toxicidade diminuta, traduzindo-se consequente numa maior facilidade na sua remoção do organismo. A fração de n-hexano foi a que obteve melhores resultados de inibição para este microrganismo. Os extratos de **IMTA** (IC<sub>50</sub> de 96.12 µg/mL) **Carreço** (IC<sub>50</sub> de 121,0 µg/mL) **LAB** (IC<sub>50</sub> de 238.0 µg/mL) apresentaram, por ordem



crescente, efeitos antibacterianos em função da sua concentração. Um trabalho realizado por Genovese et al. (2009) obteve bons resultados na inibição do crescimento antimicrobiano com extratos apolares do género *Asparagopsis* (Rhodophyta), atribuindo esta atividade maioritariamente a compostos lipofílicos halogenados. Através da análise da Tabela 5 é possível observar que o extrato de **Carreço** apresentou um rendimento muito baixo, contudo este apresentou uma bioatividade considerável. O extrato de n-hexano que produziu o melhor efeito na inibição de *S. aureus* foi também o que obteve melhor rendimento na extração, **IMTA**.

A fração metanólica de **IMTA** também foi capaz de inibir mais de 50% do crescimento de *S. aureus*, tendo também este efeito variado em função da concentração do extrato ( $IC_{50} = 52.42 \mu\text{g/mL}$ ). O rendimento do processo de extração para este extrato foi baixo, contudo este provou possuir boas capacidades antimicrobianas. Um trabalho levado a cabo por El Gamal (2010) destaca, entre os compostos algais constituintes da fração polar, vários fenóis, sais alcalóides, aminoácidos, poli-hidroxi-esteróis, saponinas, ácidos gordos e terpenos como os principais responsáveis pelo potencial antimicrobiano. Um estudo realizado por Ballantine et al. (1987) descreve também o papel dos sesquiterpenos halogenados com responsáveis por demais atividade da fração polar. A mesma conclusão é obtida num trabalho encabeçado por Smyrniotopoulos et al. (2010), que atribui a bioatividade de extratos algais de *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta) às pequenas alterações estruturais em compostos terpenóides.

Apesar das diversas frações de *D. carnos*a apresentarem, aparentemente, interferência no crescimento do fungo *C. albicans*, nenhum extrato foi capaz de provocar inibição a mais de 50%. Os colóides de *D. carnos*a, foram a fração que apresentou, em média, maior inibição do crescimento do fungo, destacando-se modestamente, uma vez mais, a fração de **IMTA**, contudo não oferecendo resultados satisfatórios.

De um modo geral foi encontrada mais bioatividade em extratos de n-hexano seguida da fração metanólica. Os polissacarídeos de *D. carnos*a apresentaram resultados não desejados tendo sido aparentemente mais efetivos na inibição do fungo *C. albicans*. O estudo em microrganismos de diferentes características revela-se vantajoso de modo a tonar perceptível a descoberta de compostos de interesse que, cujas diferentes polaridades, possam se reconhecer mais efetivas para determinado microrganismo. Este facto revela também a grande complexidade das moléculas envolvidas nestes estudos. Stirk et al. (2007) adianta que, à

exceção do efeito no fungo *C. albicans* e apesar da complexidade das moléculas estudadas, a sazonalidade poderá influenciar bastante todos os resultados obtidos.

A passagem de outros solventes com polaridades intermédias como o Diclorometano, ou soluções aquosas de metanol a diferentes percentagens de formulação poderiam ter extraído mais compostos capazes de conferir bioatividade às amostras de *D. carnososa*, conferindo no final um espectro de maior de compostos de *D. carnososa* com polaridades mais variadas.

Este exercício constitui um método eficiente na busca de novas soluções, possíveis de serem incorporadas em diversas modalidades de aquacultura, capazes de fortalecer vários meios e organismos em cultura, como peixes, moluscos e algas. Ademais, parece coerente que, para a obtenção destes compostos bioativos, a exposição de fatores sinalizadores de agressões (como produtos resultantes da degradação das paredes celulares) favoreça o reconhecimento e provoque um aumento da síntese destes compostos em macroalgas em cultivo com essa finalidade. A subjugação de algas a métodos agressivos de cultivo parece ser também um bom método de obtenção de compostos de interesse. Estes resultados são também importantes para aumentar o conhecimento e a compreensão dos mecanismos envolvidos em processos de ação e síntese, de forma a desenvolver novos biocompostos, possibilitando também no futuro a substituição de moléculas sintéticas pelas demais.



## **5 Conclusões e perspectivas futuras**



A realização do presente trabalho permitiu concluir que os resultados obtidos nos diversos ensaios se apresentam em conexão, repercutindo, as diversas metodologias, efeitos característicos de processos naturais, como consequência de todas condições, tratamentos e metodologias proporcionados aos exemplares de *Dilsea carnososa*. Como resultado deste processo, o desenvolvimento do poder interpretativo e do sentido crítico, foram eficazmente assimilados, para que uma correta compreensão da matéria, aqui abordada, se veja de uma maneira coerente num *continuum* de processos ecofisiológicos. A abordagem biotecnológica foi projetada com base na sustentabilidade e adequabilidade das metodologias oferecidas pela ciência do presente, objetivando avanços da ciência para o futuro.

Os conteúdos desenvolvidos em torno da Aquacultura Integrada Multitrófica provaram ser a aproximação, não só mais orgânica, mas também a mais acertada, para o futuro da produção intensiva de formas alimentares marinhas, possibilitada pelo conhecimento científico-tecnológico atual, traduzindo-se este processo, num sistema *win-win* para o Homem e para o meio ambiente. Neste novo paradigma de conceção de sistemas de produção alimentar mais eficientes, mais investigação será sempre necessária de modo a tornar extrapolável, sustentável e orgânico o fornecimento de bens alimentares ao crescente número da população mundial.

A realização de ensaios laboratoriais de extração de compostos algais de interesse é, sem dúvida, uma importante faceta do desenvolvimento biotecnológico de setores industriais, alimentares, médico-terapêuticos e farmacológicos, que direciona a investigação científica para uma vertente mais atual, de obtenção de novas biomoléculas e biocompostos. A investigação em torno da obtenção e isolamento destas biomoléculas algais é uma área delicada mas que representa um caminho importante no combate a patologias, não só humanas como de organismos de interesse para o Homem. Em suma, esta área torna capaz a solução, no futuro, de problemas que no presente, se apresentam passíveis de gerar repercussões a ter em conta e que exigem novas abordagens.

A realização deste trabalho tornou possível obter resultados em diversas metodologias aplicadas à espécie *Dilsea carnososa* que, até então, não se apresentavam descritas na literatura. Os ensaios de cultivo da espécie em IMTA, a otimização de um protocolo para um eficiente processo de extração, a caracterização do seu coloide e a caracterização do seu perfil antioxidante mediante variadas tecnologias constituíram nova informação capaz de constituir uma base sólida para estudos futuros em diversos campos biotecnológicos e científicos.

No presente trabalho foi possível perceber que existe um entrave na sua produção em aquacultura em meses estivais, contudo esta espécie mostrou ser capaz de se manter em cultivo laboratorial, garantindo um *stock* de biomassa, para a possibilidade de cultivo em temperaturas mais baixas. Com a caracterização do seu coloide, foi possível perceber que este se apresenta distante de uma forma “típica” e que a hibridização de polissacarídeos de diversas famílias carragenófitas e possivelmente agarófitas fazem deste biopolímero um novo hidrocoloide capaz de cativar o interesse para novas investigações, a fim de desenvolver novas aplicabilidades. A nível de bioatividade, a importância de um novo registo, enriqueceu o conhecimento científico geral em torno desta alga, uma vez que se apresentam escassos na literatura, dados que a refiram.

Em conclusão, este exercício de investigação permitiu enriquecer diversas lacunas do conhecimento científico sobre a espécie *D. carnosa*, fornecendo informação, sobre as potencialidades biotecnológicas da espécie em áreas não descritas até ao presente.

## 6 Referências bibliográficas

- Abad, L. V et al., 2013. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 79, pp.73–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733032>.
- Abreu, H. et al., 2011. Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), pp.190–199. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.034>.
- Abreu, M.H. et al., 2011. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312(1-4), pp.77–87. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.036>.
- Abreu, M.H. et al., 2009. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. *Aquaculture*, 293(3-4), pp.211–220. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.043>.
- Aguilera, J. et al., 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology*, 140(6), pp.1087–1095.
- Aguilera, J., Dummermuth, a & Karsten, U., 2002. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biology*, pp.1–19. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00300-002-0362-2>.
- Alarcón, R. et al., 2005. Expression of scavenger receptors in glial cells: Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound  $\beta$ -amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), pp.30406–30415.
- De Alencar, D.B. et al., 2014. Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, *amansia multifida* and *meristiella echinocarpa*, from the coast of Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(1), pp.251–263.



- Ambrozova, J.V. et al., 2014. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, 19(2), pp.2344–2360.
- Anon, 1937. Marine Algae - Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology. In *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0> [Accessed October 30, 2014].
- Araújo, R. et al., 2009. Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina*, 52(1), pp.24–46.
- Araújo, R. et al., 2005. Spatial variability of intertidal rocky shore assemblages in the northwest coast of Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(4), pp.658–670.
- Baba, M. et al., 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), pp.1742–1745. Available at: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.32.11.1742>.
- Baiano, A., 2014. Recovery of Biomolecules from Food Wastes — A Review. *Molecules*, 19(9), pp.14821–14842. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14821/>.
- Bak, U.G., 2014. *Suitable cultivation areas for *Palmaria palmata* ( Rhodophyta ) and *Saccharina latissima* ( Phaeophyceae ) in the inner Danish waters in relation to variations in light , temperature and salinity.*
- Balasundaram, D., Tabor, C.W. & Tabor, H., 1999. Sensitivity of spermidine-deficient *Saccharomyces cerevisiae* to paromomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), pp.1314–1316.
- Balavigneswaran, C.K. et al., 2013. Anti-oxidant activity of polysaccharides extracted from *Isocrysis galbana* using RSM optimized conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, pp.100–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.014>.
- Ballantine, D.L. et al., 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, 151-152(1), pp.463–469.

- Barahona, T. et al., 2012. A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, 347(1), pp.114–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.11.014>.
- Barry, V.C. & Dillon, T., 1945. A Galactan Sulphuric Ester from *Dilsea edulis*. , p.2015.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37.
- Bourne, K.Z. et al., 1999. Plant products as topical microbicide candidates: Assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 42(3), pp.219–226.
- Bracken, M.E.S. et al., 2008. Functional consequences of realistic biodiversity changes in a marine ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), pp.924–928.
- Brooks, T. a et al., 2005. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *In Situ*, 5050, pp.738–743.
- Buck, C.B. et al., 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathogens*, 2(7), pp.0671–0680.
- Buschmann, a H. et al., 2008. Mariculture waste management. *Ecological Engineering. Vol. 3 of Encyclopedia of Ecology vol. 5.*, 3, pp.2211–2217. Available at: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=aRKO6ZazC8UC&oi=fnd&pg=PA318&dq=Mariculture+waste+management&ots=R1u9Hhz5Zi&sig=-idRiU4Mfc4UDv\\_\\_uftaWoyKCZ0](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=aRKO6ZazC8UC&oi=fnd&pg=PA318&dq=Mariculture+waste+management&ots=R1u9Hhz5Zi&sig=-idRiU4Mfc4UDv__uftaWoyKCZ0).
- Carvalho, L., 2013. *Avaliação do potencial biotecnológico de micro e macroalgas da flora portuguesa*. Available at: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/24928>.
- Chakraborty, K., Joseph, D. & Praveen, N.K., 2013. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, 52(April), pp.1–12.
- Chang, R., 2010. *CHEMISTRY*,
- Chopin, T., 2006. Integrated Multi-Trophic Aquaculture. , (August), p.2006.
- Chopin, T. et al., 2001. MINIREVIEW INTEGRATING SEAWEEDS INTO MARINE AQUACULTURE SYSTEMS: A KEY TOWARD SUSTAINABILITY. *Science*, 986(6),

pp.975–986. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x/full>.

Chopin, T. et al., 2008. Multitrophic Integration for Sustainable Marine Aquaculture. *Ecological of Ecology*, 3, pp.2463–2475.

Chopin, T., Gallant, T. & 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<sup>1</sup>. *Journal of Phycology*, 31(2), pp.283–293. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.1995.00283.x>.

Chopin, T., Kerin, B.F. & Mazerolle, R., 1999. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*, 47(3), pp.167–188.

Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), pp.564–582. Available at: <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.short>.

Crouan, P. & Crouan, H., n. d.. *Alguier des frères Crouan, Université de Bourgogne*. Available at: [http://serres.u-bourgogne.fr/article.php3?id\\_article=779](http://serres.u-bourgogne.fr/article.php3?id_article=779) (Accessed: 12 April 2015)

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B., 2004. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp.48–54.

Denny, M.W. & Gaines, S., 2007. *Encyclopedia of Tidalpools and Rocky Shores*,

Dring, M.J., 1982. *The Biology of Marine Plants*,

Duan, X.J. et al., 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1), pp.37–43.

Dunn, J.T. & Delange, F., 2001. Commentary: Damaged reproduction: The most important consequence of iodine deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(6), pp.2360–2363.

Eskin, B. a. et al., 1995. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biological Trace Element Research*, 49(1), pp.9–19.

- Feldman, S.C. et al., 1999. Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 6(5), pp.335–340. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80055-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80055-5).
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H., 1987. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. , 55(5), pp.999–1033.
- Fortes, M.D. & Lüning, K., 1980. Growth rates of North Sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 34(1), pp.15–29.
- Fournet, I. et al., 1999. To Culture Conditions. *European Journal of Phycology*, 34(2), pp.125–130.
- De Freitas, Z. et al., 1997. Carrageenan Effects on Salt-Soluble Meat Proteins in Model Systems. *Journal of Food Science*, 62(3), pp.539–543. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04425.x>.
- El Gamal, A. a., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), pp.1–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>.
- Gaspar, R., Pereira, L. & Neto, J.M., 2012. Ecological reference conditions and quality states of marine macroalgae sensu Water Framework Directive: An example from the intertidal rocky shores of the Portuguese coastal waters. *Ecological Indicators*, 19, pp.24–38.
- Genovese, G. et al., 2009. The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: A source of compounds against *Leishmania*. *Marine Drugs*, 7(3), pp.361–366.
- Graham, L.E. et al., 2000. Algae. In p. 25.
- De Groot, R.S., Wilson, M. a. & Boumans, R.M.J., 2002. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological Economics*, 41(3), pp.393–408.
- Gupta, S. & Abu-Ghannam, N., 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), pp.315–326. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>.
- Guiry, M.D., n. d.. *The seaweed site: information on marine algae*. Available at: [http://www.seaweed.ie/descriptions/Dilsea\\_carnosa.php](http://www.seaweed.ie/descriptions/Dilsea_carnosa.php) Accessed: 12 April 2015

- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 5 May 2015.
- Hanelt, D. & Nultsch, W., 1995. Field Studies of Photoinhibition Show Non-Correlations between Oxygen and Fluorescence Measurements in the Arctic Red Alga *Palmaria palmata*. *Journal of Plant Physiology*, 145(1-2), pp.31–38. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81842-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81842-0).
- Hanelt, D., Wiencke, C. & Nultsch, W., 1997. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 38(1), pp.40–47.
- Harnedy, P. a. et al., 2014. The effect of time and origin of harvest on the in vitro biological activity of *Palmaria palmata* protein hydrolysates. *Food Research International*, 62, pp.746–752. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.035>.
- Harnedy, P. a. & FitzGerald, R.J., 2013. In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates. *Journal of Applied Phycology*, 25(6), pp.1793–1803.
- Harvey, W. M., n d. *Phycologia Britannica*. Consultado através de: [https://www.google.pt/search?q=dilsea+carnosa&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAcQ\\_AUoAWoVChMIkuGskc2BxwIVQbYUCh1y3Ax\\_&biw=1366&bih=599#imgrc=Bnw9sKnJmVEKVM%3a](https://www.google.pt/search?q=dilsea+carnosa&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAcQ_AUoAWoVChMIkuGskc2BxwIVQbYUCh1y3Ax_&biw=1366&bih=599#imgrc=Bnw9sKnJmVEKVM%3a) (12 de Abril de 2015)
- He, P. et al., 2008. Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water Research*, 42(4-5), pp.1281–1289.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270 Suppl (figure 1), pp.S96–S99.
- Hellio, C. et al., 2002. Screening of Marine Algal Extracts for Anti-settlement Activities against Microalgae and Macroalgae. *Biofouling*, 18(3), pp.205–215.
- Henley, W.J. et al., 1992. Photosynthetic response of *Ulva rotundata* to light and temperature during emersion on an intertidal sand flat. *Oecologia*, 89, pp.516–523.

- Horta, A. et al., 2014. Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Marine Drugs*, 12(3), pp.1676–1689.
- Hubbard, C.B. et al., 2004. Host specificity and growth of kelp gametophytes symbiotic with filamentous red algae (Ceramiales, Rhodophyta). *Helgoland Marine Research*, 58(1), pp.18–25.
- Jhamandas, J.H. et al., 2005. Fucoïdan inhibits cellular and neurotoxic effects of A $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) in rat cholinergic basal forebrain neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21(10), pp.2649–2659.
- Jinshui, C. et al., Determination of Phenolic Compounds in Apple Orchard Soil.
- Jung, H.A. et al., 2006. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, 72(6), pp.1292–1299.
- Kang, K. et al., 2003. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Archives of pharmacal research*, 26(4), pp.286–293.
- Kang, Y.H. et al., 2008. A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), pp.183–190.
- Kim, S., 2011. Seaweeds: The Wealth of Oceans. In *Handbook of Marine Macroalgae Biotechnology and Applied Phycology*. p. 22.
- Kumar, R.R., Rao, P.H. & Arumugam, M., 2015. Lipid extraction methods from microalgae : a comprehensive review. , 2(January), pp.1–9.
- Kumaran, S. et al., 2010. Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(12), pp.977–981. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60013-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60013-8).
- Lahann, J., 2006. Vapor based polymer coatings for potential biomedical applications. *Polymer international*, 1370(February), pp.1361–1370. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pi.2098/full>.

- Lambert, P. a, 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, (31), p.46S–54S.
- Landrum, J.T. & Bone, R. a, 2001. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of biochemistry and biophysics*, 385(1), pp.28–40.
- Langendorff, V. et al., 2000. Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14(4), pp.273–280.
- Lee, J.-H. & Kim, G.-H., 2015. Evaluation of Antioxidant Activity of Marine Algae-Extracts From Korea. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(3), pp.227–240. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2013.770809>.
- Lehninger, 2005. Principles of Biochemistry. , p.1119.
- Li, Z. et al., 2012. Influence of preparation methods on the yield, components and antioxidant activities of polysaccharides from *Palmaria palmata*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(15), pp.1157–1165.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J., 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*, Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0> [Accessed November 10, 2014].
- MacArtain, P. et al., 2007. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition reviews*, 65(12 Pt 1), pp.535–543.
- Madhusudan, C., 2011. Seaweeds a diet with nutrition.pdf. , pp.153–157.
- Matanjun, P. et al., 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), pp.367–373.
- Matos, J. et al., 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture*, 252(1), pp.31–42.
- Matsuhiro, B. et al., 2014. Sulfation of agarose from subantarctic *Ahnfeltia plicata* (Ahnfeltiales, Rhodophyta): studies of its antioxidant and anticoagulant properties in vitro and its copolymerization with acrylamide. *Journal of Applied Phycology*, pp.2011–2019.

- Matsunaga, T. et al., 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), pp.33–38.
- McHugh, D.J., 2003. *A guide to the seaweed industry FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*,
- Mercier, L. et al., 2001. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist*, 149(1), pp.43–51.
- Miao, X. & Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97(6), pp.841–846.
- Moffitt, C.M. & Cajas-Cano, L., 2014. Blue Growth: The 2014 FAO State of World Fisheries and Aquaculture. *Fisheries*, 39(11), pp.552–553. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03632415.2014.966265>.
- Mohamed, S., Hashim, S.N. & Rahman, H.A., 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23(2), pp.83–96. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>.
- Morgan, K., Wright, J. & Simpson, F., 1980. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (dulse). *Economic Botany*, 34(17762), pp.27–50. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02859553> [Accessed October 29, 2014].
- Natarajan, S., Shanmugiahthevar, K.P. & Kasi, P.D., 2009. Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). *Natural product research*, 23(4), pp.355–369.
- Nature22 Dumontiaceae, *Dilsea carnosa* (2012) Available at: <http://nature22.com/estran22/vegetaux/rouges/rhodophyta1.html>
- Nylund, G. & Pavia, H., 2005. Chemical versus mechanical inhibition of fouling in the red alga *Dilsea carnosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 299, pp.111–121.
- Nylund, G.M. et al., 2005. Chemical inhibition of bacterial colonization by the red alga *Bonnemaisonia hamifera*. *Marine Ecology Progress Series*, 302, pp.27–36.



- Packer, M., 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy*, 37(9), pp.3428–3437. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2008.12.025>.
- Pang, S. & Lüning, K., 2004. Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: Effects of intermittent light on growth rate, yield and growth kinetics. *Journal of Applied Phycology*, 16(2), pp.93–99.
- Paxman, J.R. et al., 2008. Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects. *Appetite*, 51(3), pp.713–719.
- Pereira, L., 2012. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*. pp. 15–47.
- Pereira, L., 2010. *MACOI, Portuguese seaweeds website*. Disponível em:<http://macoi.ci.uc.pt/imagem.php?id=3340&tp=7> (Acedido em 14 de Junho de 2015)
- Pereira, L., 2008. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. *Monografias*, 913, pp.1–19.
- Pereira, L., 2002. Extracção, Caracterização e Utilização das Carragenanas. *Anais/Aeccom: 2002*.
- Pereira, L. et al., 2003. Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), pp.223–228.
- Pereira, L., Amado, A. & Critchley, A., 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food ...*, 23(7), pp.1903–1909. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08002750> [Accessed October 29, 2014].
- Pereira, L. & Correia, F., 2015. Macroalgas Marinhas da Costa Portuguesa. biodiversidade, ecologia e utilizações. Nota de Rodapé edições
- Pereira, L. & Critchley, A., 2009. A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of applied ...*, 21(5), pp.599–605. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-009-9447-4> [Accessed October 29, 2014].
- Pereira, L., Gheda, S.F. & Ribeiro-claro, P.J. a, 2013. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries.

- International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013(vi), pp.1–7. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/537202/abs/>.
- Pereira, L.C. dos R.T., 2004. *Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa - aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos*.
- Pereira, R., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I., 2006. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 252(1), pp.66 – 78.
- Pinteus, S., 2011. *Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico*.
- Potin, P. et al., 2002. Biotic interactions of marine algae. *Current opinion in plant biology*, 5(4), pp.308–317.
- Prabhasankar, P. et al., 2009. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*, 115(2), pp.501–508. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.047>.
- Rees, D.A., 1961. Estimation of the Relative Amounts of Isomeric Sulphate Esters in Some Sulphated Polysaccharides. , (5168), pp.5168–5171.
- Ryther, J.H. et al., 1975. Physical models of integrated waste recycling- marine polyculture systems. *Aquaculture*, 5(2), pp.163–177.
- Sagert, S. & Schubert, H., 2000. Acclimation of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) to light intensity: comparison between artificial and natural light fields. *Journal of Phycology*, 1128, pp.1119–1128. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.2000.99156.x/full> [Accessed October 29, 2014].
- Salvador, N. et al., 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, 71(March), pp.101–113. Available at: <http://scientiamarina.revistas.csic.es/index.php/scientiamarina/article/viewArticle/32>.
- Santillo, D. & Langston, W.J., 2001. Tributyltin (TBT) antifoulants: a tale of ships, snails and imposex. *Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000*, (No. 22),

pp.135–148.

Available

at:

[http://reports.eea.eu.int/environmental\\_issue\\_report\\_2001\\_22/en/tab\\_abstract\\_RLR](http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2001_22/en/tab_abstract_RLR).

- Saunders, G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1462), pp.1879–1888.
- Saundersl, G.W. & Lindstrom, S.C., 2011. A multigene phylogenetic assessment of the Dilsea/Neodilsea species complex (Dumontiaceae, Gigartinales) supports transfer of Neodilsea natashae to the genus Dilsea. *Botanica Marina*, 54(5), pp.481–486.
- Sheng, J., Vannela, R. & Rittmann, B.E., 2011. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from Synechocystis PCC 6803. *Bioresource Technology*, 102(2), pp.1697–1703. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.007>.
- Skibola, C.F. et al., 2005. Brown kelp modulates endocrine hormones in female sprague-dawley rats and in human luteinized granulosa cells. *The Journal of nutrition*, 135(2), pp.296–300.
- Smedes, F. & Thomasen, T.K., 1996. Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 32(8-9), pp.681–688.
- Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products : A review. , pp.245–262.
- Smyrniotopoulos, V. et al., 2010. Ioniols I and II, tetracyclic diterpenes with antibacterial activity, from Sphaerococcus coronopifolius. *Chemistry and Biodiversity*, 7(3), pp.666–676.
- Stephenson, T. a. & Stephenson, A., 1949. The universal features of zonation between tide-marks on rocky coasts. *Journal of Ecology*, 37(2), pp.289–305. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2256610>.
- Stirk, W. a., Reinecke, D.L. & Van Staden, J., 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 19(3), pp.271–276.
- Tai, V., Lindstrom, S.C. & Saunders, G.W., 2001. Phylogeny of the Dumontiaceae (Gigartinales, Rhodophyta) and associated families based on SSU rDNA and internal transcribed spacer sequence data. *Journal of Phycology*, 37(1), pp.184–196.

- Talarico, L.B. & Damonte, E.B., 2007. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology*, 363(2), pp.473–485.
- Teas, J. et al., 2009. Dietary seaweed modifies estrogen and phytoestrogen metabolism in healthy postmenopausal women. *The Journal of nutrition*, 139(5), pp.939–944.
- Troell, M. et al., 2009. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297(1-4), pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.010>.
- Tuvikene, R. et al., 2006. Extraction and quantification of hybrid carrageenans from the biomass of the red algae *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus*. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.*, 55(1), pp.40–53.
- Tuya, F. et al., 2014. Ecological structure and function differs between habitats dominated by seagrasses and green seaweeds. *Marine Environmental Research*, 98, pp.1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.03.015>.
- Unep, 2007. Guidelines for Conducting Economic Valuation of Coastal Ecosystem Goods and Services. *Technical Publication*, No. 8, p.42.
- Vásquez, J. et al., 2013. Economic valuation of kelp forests in northern Chile: values of goods and services of the ecosystem. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0173-6>.
- Vincent, B., Barry, C. & McCormick, J.E., 1957. Properties of Periodate-oxidised Polysaccharides. Part VI.\* The Mucilage from *Dilsea, edulia*. , pp.2777–2783.
- Vonthron-Sénécheau, C. et al., 2011. Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. *Marine drugs*, 9(6), pp.922–933.
- Vonthron-Sénécheau, C. et al., 2008. X-ray structure of floridoside isolated from the marine red algae *Dilsea carnosa*. *Carbohydrate Research*, 343(15), pp.2697–2698.
- Wang, T. et al., 2010. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), pp.1387–1393. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.010>.

- Werner, A. & Dring, M., 2011. Aquaculture Explained Principal authors Aquaculture Explained Cultivating *Palmaria palmata*. *Irish Sea Fisheries Board*, (27), p.85.
- Wieczorek, S.K. & Todd, C.D., 1997. Inhibition and facilitation of bryozoan and ascidian settlement by natural multi-species biofilms: Effects of film age and the roles of active and passive larval attachment. *Marine Biology*, 128(3), pp.463–473.
- Wijesinghe, W. a J.P. & Jeon, Y.J., 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), pp.13–20. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.029>.
- Yamasaki-Miyamoto, Y. et al., 2009. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), pp.8677–8682.
- Yang, Y.J. et al., 2010. A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer. *The British journal of nutrition*, 103(9), pp.1345–1353.
- Yoon, N.Y. et al., 2008. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, 74(1), pp.200–207.
- Yu, L. et al., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), pp.1619–1624.
- Yuan, Y., Carrington, M.F. & Walsh, N. a, 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(7), pp.1073–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833383> [Accessed September 23, 2014].
- Yuan, Y. V & Walsh, N.A., 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), pp.1144–1150.
- Yuan, Y. V. et al., 2009. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*, 112(2), pp.321–328. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608006286> [Accessed October 19, 2014].

- Yuan, Y. V., Bone, D.E. & Carrington, M.F., 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry*, 91(3), pp.485–494.
- Zacharopoulos, V.R. & Phillips, D.M., 1997. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4(4), pp.465–468.
- Zhou, G. et al., 2004. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research*, 50(1), pp.47–53.
- Zinoun, M. & Cosson, J., 1996. Seasonal variation in growth and carrageenan content of *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae, Gigartinales) from the Normandy coast, France. *Journal of Applied Phycology*, 8(1), pp.29–34.



## 7 Anexos

**Tabela 11** - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio laboratorial de densidades de cultivo.

Peso fresco	Peso seco (g)	% DW
1,019	0,25	24,534
1,009	0,3	29,732
1,023	0,19	18,573
Média	SD	SE
24,28	5,584	3,224
Conteúdo em água (%)		
75,72		

**Crescimento (%)**

Densidade de Cultivo	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>			
5 g/L	3	,9266667	
3 g/L	3	1,5066667	
1 g/L	3		2,3800000
Sig.		,139	1,000
Tukey HSD <sup>a</sup>			
5 g/L	3	,9266667	
3 g/L	3	1,5066667	1,5066667
1 g/L	3		2,3800000
Sig.		,279	,094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

**Produtividade (g %DW m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>)**

Densidade de Cultivo	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>			
1 g/L	3	50,5566667	
5 g/L	3		86,4133333
3 g/L	3		87,5566667
Sig.		1,000	,920
Tukey HSD <sup>a</sup>			
1 g/L	3	50,5566667	
5 g/L	3		86,4133333
3 g/L	3		87,5566667
Sig.		1,000	,994

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

**Figura 45** - Teste Tuckey e SNK para a atividade experiemtal de cultivo de densidades (1<sup>a</sup> atividade experimental).



**Tabela 12** - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio laboratorial de densidades cultivo combinadas com diferentes intensidades luminosas.

Peso fresco	Peso seco (g)	% DW
1,028	0,24	23,346
1,004	0,273	27,191
1,026	0,106	10,331
Média	SD	SE
20,29	8,836	5,101
Conteudo em água (%)		
79,71		

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: RGR

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>a</sup>
Corrected Model	,055 <sup>a</sup>	3	,018	,186	,903	,065	,557	,072
Intercept	9,991	1	9,991	101,242	,000	,927	101,242	1,000
Dens_Cult	,006	1	,006	,061	,8113	,008	,061	,055
Int_Lum	,048	1	,048	,491	,5032	,058	,491	,095
Dens_Cult * Int_Lum	,000	1	,000	,005	,9475	,001	,005	,050
Error	,789	8	,099					
Total	10,835	12						
Corrected Total	,844	11						

a. R Squared = ,065 (Adjusted R Squared = -,286)

b. Computed using alpha = ,05

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Produtividade

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power <sup>a</sup>
Corrected Model	2689,675 <sup>a</sup>	3	896,558	9,746	,005	,785	29,238	,953
Intercept	10408,109	1	10408,109	113,142	,000	,934	113,142	1,000
Dens_Cult	2629,545	1	2629,545	28,585	,0007	,781	28,585	,996
Int_Lum	55,499	1	55,499	,603	,4597	,070	,603	,106
Dens_Cult * Int_Lum	4,632	1	4,632	,050	,8281	,006	,050	,055
Error	735,930	8	91,991					
Total	13833,714	12						
Corrected Total	3425,606	11						

a. R Squared = ,785 (Adjusted R Squared = ,705)

b. 0,459667

**Figura 46** - Tabela ANOVA para o ensaio 2, (em cima) interação da IL\*DC com RGR, (em baixo) interação da IL\*DC com Produtividade.

**Tabela 13** - Dados recolhidos para o cálculo da percentagem de peso seco (DW) no ensaio em condições de IMTA.

Peso fresco (g)	Peso seco (g)	% DW
2,063	0,535	25,933
2,071	0,473	22,839
2,009	0,51	25,386
2,025	0,615	30,37
2,053	0,591	28,787
2,041	0,584	28,613
Média (%DW)	SD	SE
29,257	0,968	0,559
Conteúdo em água (%)		
70,743		

**Tabela 14** – Valores médios semanais de pH, Temperatura (°C), intensidade luminosa (µE) medida à superfície e a 5 cm de profundidade em (A) tanques a uma densidade de 1 g/L e (B) 3 g/L.

A		1 g/L					
		Semana 1		Semana 2		Semana 3	
	Hora	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
pH	13:00	7,94	0,01	7,91	0,02	7,84	0,04
Temp (°C)	13:00	23,59	0,05	24,31	0,07	24,33	0,11
Int. Lum sup. (µE)	17:30	1807,25	12,58	1389,63	78,64	1314,05	84,38
Int. Lum 5cm (µE)	17:30	1542,25	15,40	1131,25	65,17	1181,70	79,72

B		3 g/L					
		Semana 1		Semana 2		Semana 3	
	Hora	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
pH	14:00	7,97	0,01	7,94	0,01	7,88	0,04
Temp (°C)	14:00	23,51	0,11	24,29	0,06	24,29	0,06
Int. Lum sup. (µE)	17:30	1713,13	25,11	1241,10	83,90	1270,55	122,71
Int. Lum 5cm (µE)	17:30	1390,22	48,29	1062,03	78,51	1175,15	83,49

		Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
RGR (%)	Equal variances assumed	,138	,723	-,253	8	,809	-,04942	,18012	-,32087	,22003	
	Equal variances not assumed			-,253	5,857	,809	-,04942	,19512	-,32958	,23068	
Productividade	Equal variances assumed	4,068	,030	-4,854	8	,003	-112,26988	24,12184	-171,28400	-53,24598	
	Equal variances not assumed			-4,854	3,531	,013	-112,26988	24,12184	-182,88951	-41,84045	

**Figura 47** – Teste T para amostras independentes, Ensaio de cultivo em IMTA.

**Tabela 15** – Peso das diferentes frações, obtidas por extração sequencial, seguidas de uma extração alcalina de 3 horas e precipitação dos polissacarídeos, das diferentes amostras de *D. carnosus*.

	Peso dos extratos (g)		
	Metanol	n-Hexano	Polis.
<b>Carr1</b>	0,02082	0,00116	0,3370
<b>Carr2</b>	0,02012	0,00129	0,3795
<b>Carr3</b>	0,02668	0,00188	0,3831
<b>Mind1</b>	0,03059	0,0043	0,2721
<b>Mind2</b>	0,02473	0,00526	0,2923
<b>Mind3</b>	0,02765	0,00875	0,2663
<b>Lab1</b>	0,02255	0,00554	0,3061
<b>Lab2</b>	0,02269	0,00511	0,322
<b>Lab3</b>	0,02314	0,0077	0,3219
<b>PE1</b>	0,00606	0,00853	0,4391
<b>PE2</b>	0,00472	0,00672	0,3601
<b>PE3</b>	0,0052	0,00841	0,4314
<b>IMTA1</b>	0,00913	0,011551	0,2637
<b>IMTA2</b>	0,00767	0,00834	0,2868
<b>IMTA3</b>	0,01074	0,01183	0,3149

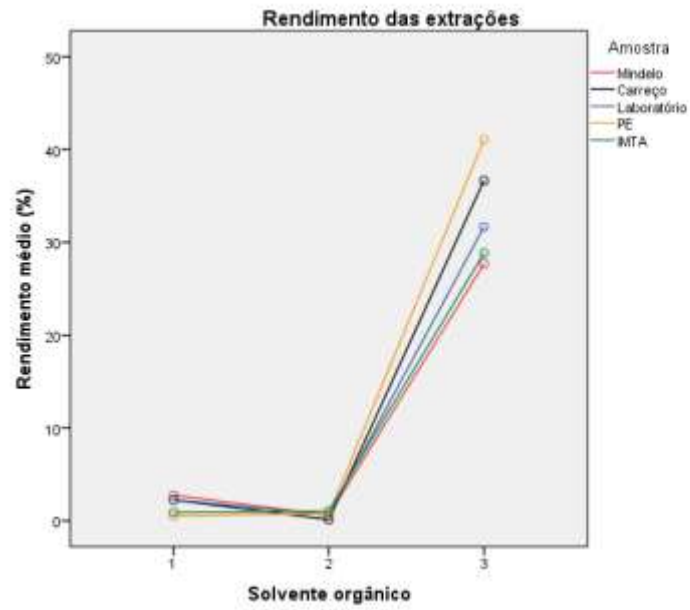
rendimento_n_hexano				rendimento_Metanol					
Origem do material	N	Subset for alpha = 0.05			Origem do material	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3			1	2	3
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>									
Carrego	3	144333			PE	3	532667		
Mindelo	3		610333		IMTA	3	918000		
Laboratório	3		611667		Carrego	3		2,254800	
PE	3		788667	788667	Laboratório	3		2,279333	
IMTA	3			1,057367	Mindelo	3		2,765667	
Sig.		1,000	,782	,063	Sig.		,059	,891	
Tukey HSD <sup>a</sup>					PE	3	532667		
Carrego	3	144333			IMTA	3	918000		
Mindelo	3		610333		Carrego	3		2,254800	
Laboratório	3		611667		Laboratório	3		2,279333	
PE	3		788667	788667	Mindelo	3		2,765667	
IMTA	3			1,057367	Sig.		,279	,101	
Sig.		1,000	,847	,293					

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

rendimento_Polissac				
Origem do material	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>				
Mindelo	3	27,690500		
IMTA	3	28,840333		
Laboratório	3	31,666667		
Carrego	3		36,655000	
PE	3		41,625000	
Sig.		,205	,070	
Tukey HSD <sup>a</sup>				
Mindelo	3	27,690500		
IMTA	3	28,840333		
Laboratório	3	31,666667	31,666667	
Carrego	3		36,655000	36,655000
PE	3			41,625000
Sig.		,402	,217	,320

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

**Figura 48** – Comparações múltiplas entre os métodos de cultivo das amostras relativamente aos rendimentos dos processos de extração.



**Figura 49** – Rendimento médio das extrações efetuadas e *D. carnosa* pelos processos de extração por (1) n-Hexano, (2) MeOH e (3) precipitação de polissacarídeos com álcool isopropílico.



## 8 Apêndice

**VON STOSCH'S ENRICHED SEAWATER MEDIUM**

von Stosch's Enrichment (as cited by Ott, 1956)

The seawater should be filtered (Whatman's #1) to remove large organic particles and sand. Then sterilize by autoclaving (time: 100 ml requires 10 minutes; 2 liters requires 40 minutes; 3 liters requires 50 minutes; and 5 liters requires 70 minutes). To each liter of seawater, then add the following:

<u>Salts</u>	<u>1 liter of seawater</u>
x (1) Na NO <sub>3</sub>	42.50 mg
x (2) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	10.75 mg
x (3) FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	278.00 ug
x (4) NaCl 4H <sub>2</sub> O	19.80 ug
- (5) Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	3.72 mg
<u>Vitamins</u>	
x (6a) Thiamine-HCl	0.20 mg
(6b) Biotin	1.00 ug
(6c) B <sub>12</sub>	1.00 ug

It is convenient to prepare a stock solution of each salt in distilled water, of such concentration that 1 ml of the stock solution gives the required concentration of each ingredient. The three vitamins may be incorporated in the same stock solution which should be refrigerated. The salts and vitamins after preparation into stock solutions should be sterile filtered.

- I. To make stock solutions use deionized distilled water and clean volumetric flasks.
- II. Filter each stock solution through separate 0.22 um millipore filters. Each solution will have to be sterilized separately.
- III. Aseptically pour filtered volume of liquid into autoclaved stock bottles.

<u>1 liter stock solution</u>	<u>2 liter stock solution</u>
(1) 42.500 grams 21,250	85.000 grams
(2) 10.750 " 5,375	21.500 "
(3) 0.278 " 0,139	0.556 "
(4) 0.0198 " 0,0099	0.039 "
(5) 3.720 " 1,860	7.440 "
(6a) 0.200 " 0,100	0.400 "
(6b) 0.001 " 0,0005	0.002 "
(6c) 0.001 " 0,0005	0.002 "

Figura 50 - Método de elaboração do meio VSE

Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Bonds
3500	O-H
2960	CH <sub>2</sub>
2900–2920	C-H (good reference for total sugar content)
2845	O-CH <sub>3</sub> (shoulder on the band at 2920 in highly methylated agars)
1725	COOH
1690–1695	Amide I from proteins
1640–1650	H <sub>2</sub> O and proteins CO-NH/amide II from proteins
1605	Carboxylate anion of pyruvate
1450	Ester-sulfate
1420	Amide III from proteins
1370–1320	Ester-sulfate
1210 < 1240 < 1260	S=O of ester-sulfate (good indication of total sulfate content)
1180	P-O-C (alkyl substituents suggesting organic phosphates)
1150	Ester-sulfate
1070	C-O of 3,6-anhydrogalactose (shoulder)
1040	C-O of ester-sulfate and hydroxyl
1020	? (in λ-carrageenan after alkaline treatment)
970–975	Galactose: peak with alkali modified ι-/small peak with unmodified ι-/shoulder with α-carrageenan (peak also present in agars)
930	C-O of 3,6-anhydrogalactose (reduced when precursors) (also contributed by galactose 4-sulfate)
905	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of 3,6-anhydrogalactose (shoulder)
890–900	Unulfated β-D-galactose (or with 6-O-methylgalactose or with pyruvate)
867	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>6</sub> of galactose (shoulder, indicates precursors)
845	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>4</sub> of galactose/floridean starch
825–830	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of galactose (narrow when ξ-carrageenan present)
815–820	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>6</sub> of galactose
805	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of 3,6-anhydrogalactose
790	Characteristic of agar-type in second derivative spectra
780	?
730–750	C-S/C-O-C bending mode in glycosidic linkages of agars
717	Characteristic of agar-type in second derivative spectra/C-O-C bending mode in glycosidic linkages of agars
705	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>4</sub> of galactose
580	S-O in sulfated galactans

Large band at 1000–1200 cm<sup>-1</sup> indicates sulfates + floridean starch; less marked peaks at 845 and 805 cm<sup>-1</sup> (depression between 845 and 805 cm<sup>-1</sup> less pronounced) indicate precursors (which provide vibrations at 820–830 cm<sup>-1</sup>).

**Figura 51** – Números de onda para a caracterização de ficocolóides, adaptado de (Chopin et al. 1999)

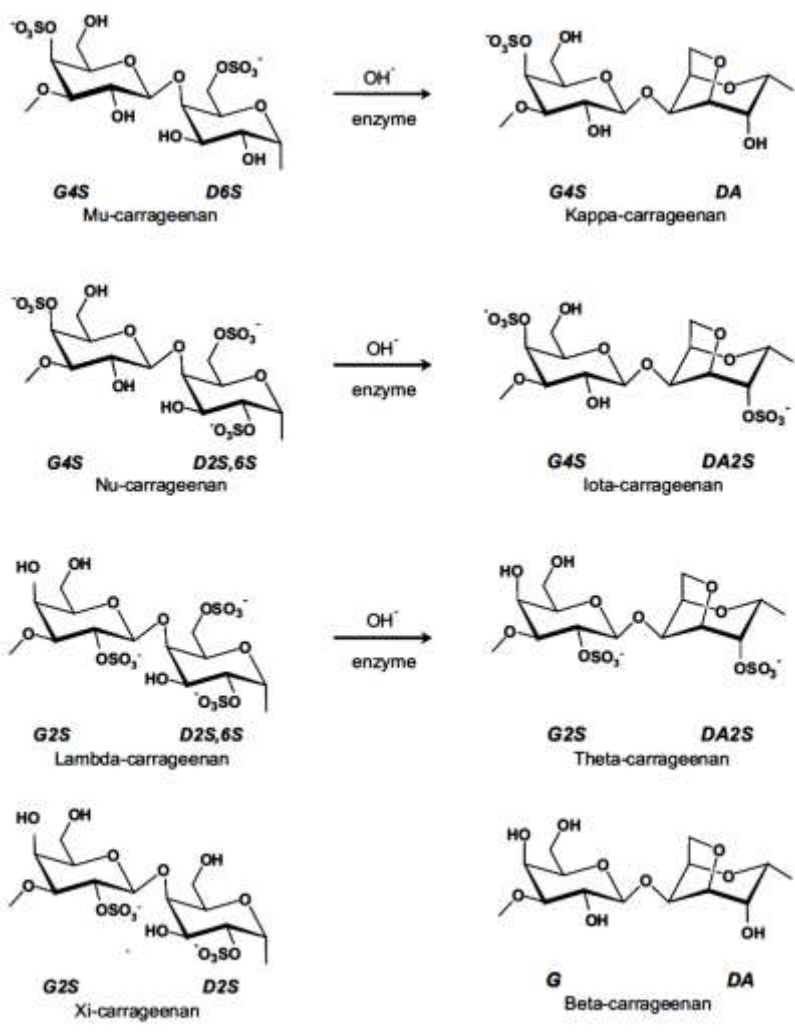


Fig. 1. Idealized units of the main types of carrageenan.

Figura 52 – Moléculas precursoras e finais de diversas carragenanas, adaptado de (Pereira et al. 2009)



**Table 2.** Key peaks in infrared spectra used for identifying the 15 carrageenans presently recognized according to the Greek lettering system and the letter code proposed by Knutsen *et al.* (1994)

Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Bonds	Letter code	Type of carrageenan														
			κ	μ	ι	ν	ο	β	γ	ω	ψ	α	δ	θ	λ	π	ξ
1240	S=O of ester-sulfate		+	++	++	+++	++	-	-	+	+	+	++	+++	++	++	
1070 (shoulder)	C-O of 3,6-anhydrogalactose	DA	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
970-975	Galactose	GiD	+	S	+	S	S	+	S	+	+	S	+	S	+	S	S
930	C-O of 3,6-anhydrogalactose	DA	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
905 (shoulder)	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of 3,6-anhydrogalactose	DA2S	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
890-900	Unsulfated β-D-galactose	GiD	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
867 (shoulder)	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>6</sub> of galactose	GiD6S	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	
845	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>4</sub> of galactose	G4S	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
825-830	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of galactose	GiD2S	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	n
815-820	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>6</sub> of galactose	GiD6S	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	
805	C-O-SO <sub>4</sub> on C <sub>2</sub> of 3,6-anhydrogalactose	DA2S	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

-, absence of peak; +, presence of peak; +++, peak strongly present; s, shoulder; n, narrow peak.

**Figura 53** - Números de onda para a caracterização de carragenanas, adaptado de (Chopin *et al.* 1999)