Marcella Araújo do Amaral Carneiro

Fenologia, aspectos ecofisiológicos e seleção de linhagens em cultivos no mar de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil

Phenology, ecophysiological aspects and strains selection of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) cultivated in the sea at Rio Grande do Norte State, Brazil

São Paulo

2011

VERSÃO CORRIGIDA – versão original encontra-se disponível no intituto de Biociências da USP

Marcella Araújo do Amaral Carneiro

Fenologia, aspectos ecofisiológicos e seleção de linhagens em cultivos no mar de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil

Phenology, ecophysiological aspects and strains selection of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) cultivated in the sea at Rio Grande do Norte State, Brazil

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Botânica.

Orientadora: Estela Maria Plastino
Coorientadora: Eliane Marinho Soriano

São Paulo
2011

Carneiro, Marcella Araújo do Amaral

Fenologia e cultivo no mar de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil: aspectos ecofisiológicos e seleção de linhagens. 134 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Gracilaria birdiae*; 2. Fenologia; 3. Cultivo no mar; 5. Pigmentos; 4. Fotossíntese I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico essa Tese aos meus pais, Daguia e Amaral, pelo apoio e encorajamento. Ao meu esposo, André, por todo amor, compreensão e companhia ao longo de minha trajetória; e à Letícia, minha filhota querida, fonte de toda minha força e perseverança.

“Há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof[a.] Dra. Estela Maria Plastino pela amizade, dedicação e compreensão. Obrigada pelos ensinamentos!

À Prof[a.] Dra. Eliane Marinho, pela amizade e dedicação durante todos esses anos de convivência e por ter permitido a utilização do Laboratório de Macroalgas Marinhas (DOL-UFRN) como apoio fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada pelas valiosas sugestões!

À minha família por todo o apoio e incentivo que sempre me forneceram; sem vocês eu não teria conseguido!

Ao meu esposo André pelo amor, amizade, compreensão e força nos momentos de desânimos.

À minha querida filha Letícia, por sempre estar disposta a perdoar os vários momentos de ausência e sofrimento pelos quais enfrentamos. Saiba que de agora em diante estaremos sempre juntas!

À Serena pelos momentos alegres e descontraídos e pela transferência gratuita de afeto.

À Universidade de São Paulo e Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela oportunidade de realização desse sonho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo apoio logístico e intelectual ao longo de toda minha vida acadêmica.

Ao CNPq e Ministério da Pesca e Aquicultura pelo apoio financeiro para execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo (Departamento de Bioquímica – IQ/USP), pela amizade e por disponibilizar o PAM durante esse trabalho.

À Aline, Dinaelza e Lígia pelos valiosos ensinamentos sobre o manuseio do PAM e análise dos dados.

A Profa. Dra. Fungyi e à Janaína pelo auxílio na determinação dos teores de 3,6-AG e Sulfato.

Eu não teria realizado nem a metade do que fiz, sem a ajuda de vários amigos do laboratório de Macroalgas Marinhas: Aline, Alex, Liliane, Lucas, Gustavo, Hotência, Victor, Lalinha, Stella Carol e Sérgio. Agradeço a todos vocês, pela amizade e pelo (enorme) auxílio nos trabalhos de campo e laboratório.

Ao Rosário, pela amizade e ajuda nos cultivos em laboratório, mesmo que à distância.
Aos LAMigos que tive a oportunidade de conhecer e conviver, embora por períodos curtos, mas que propiciaram momentos muito agradáveis e inesquecíveis: Amanda, Bia, Cauê, Carol, César, Cíntia Iha, Cíntia Cristina, Daniela K., Daniela M., Daniela R., Fabíola, Fábio, Fádia, Guilherme, Henrique, Janaína, José, Lagosta, Leila, Letícia, Lígia, Luciana, Manú, Mônica, Natália, Nelso, Spoke. Foi muito bom estar com vocês!
Um agradecimento especial à Bia e Lígia que fizeram uma leitura crítica dessa tese e que me ajudaram com os abstracts.
Aos que me acolheram tão bem durante as minhas temporadas super corridas em SP: Taty e Dani; Profa. Estela e D. Guiomar; Manú, Luana e Luciana; Bia (vovó) e Dadá; Cíntia e Lissie – Muito obrigada por tudo!

Em especial, aos meus amigos especiais que estão sempre próximos a mim e que me auxiliaram em vários momentos a reencontrar a paz e tranquilidade, e assim continuar a trilhar no caminho que escolhi...

A todos aqueles que eu não citei, mas que de uma maneira ou de outra, me ajudaram nesta importante etapa de minha vida.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – Introdução Geral 5

1. Introdução 5

1.1. Panorama do cultivo de macroalgas no mundo 5

1.2. Cultivo de algas vermelhas no Brasil 6

1.3. Metodologias adotadas no cultivo de macroalgas 8

1.4. Luz e pigmentos de algas marinhas 9

1.5. Considerações sobre a espécie em estudo - *Gracilaria birdiae* 10

2. Objetivos 12

2.1. Objetivo geral 12

2.2. Objetivos específicos 12

3. Materiais e Métodos 12

3.1. Material biológico 12

3.2. Condições gerais de cultivo em laboratório 13

3.2.1. Manutenção das algas no Laboratório de Algas Marinhas (IBUSP) 13

3.2.2. Manutenção das algas no laboratório de Macroalgas Marinhas da UFRN 14

3.3. Local de estudo 14

3.4. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água 16

3.5. Condições gerais de cultivo no mar 16

3.5.1. Preparação das estruturas de cultivo 16

3.5.2. Preparação e distribuição das mudas por módulo de cultivo 17

3.6. Determinação da massa fresca e taxas de crescimento 18

3.7. Determinação do conteúdo pigmentar 18

3.7.1. Ficobiliproteínas 18

3.7.2. Clorofila *a* e carotenoides totais 19

3.7.3. Espectros de absorção 19

CAPÍTULO 2 – Fenologia de uma população de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) no estado do Rio Grande Do Norte, Brasil 21

ABSTRACT 21

RESUMO 21

1. Introdução 22

2. Materiais e Métodos 23

2.1. Material de estudo – *Gracilaria birdiae* 23

2.2. Local de estudo 24
2.3. Amostragem 24
2.4. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água 25
2.5. Análises estatísticas 26
3. Resultados 26
3.1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água 26
3.2. Frequência dos estádios reprodutivos de *Gracilaria birdiae* 27
3.3. Variação dos comprimentos dos talos de *Gracilaria birdiae* 28
4. Discussão 30
CAPÍTULO 3 – Cultivos no mar (longa duração) de linhagens selecionadas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil: crescimento, composição pigmentar e rendimento e qualidade de polissacarídeos 33
ABSTRACT 33
RESUMO 34
1. Introdução 35
2. Materiais e Métodos 36
2.1. Material biológico 36
2.2. Local de cultivo 37
2.3. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água 37
2.4. Delineamento experimental 37
2.5. Determinação do conteúdo pigmentar 38
2.6. Rendimento e qualidade do polissacarídeo 38
2.6.1. Rendimento 38
2.6.2. 3,6-anidrogalactose 38
2.6.3. Teor de Sulfato 39
2.7. Análises dos dados 39
3. Resultados 40
3.1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água 40
3.2. Cultivo no mar – estação chuvosa 41
3.3. Cultivo no mar – estação seca 43
3.4. Comparação das taxas de crescimento entre as estações chuvosa e seca 45
3.5. Comparação das taxas de crescimento entre as linhagens 48
3.6. Composição pigmentar 49

3.6.1. Ficoeritrina 52
3.6.2. Ficocianina 54
3.6.3. Aloficocianina 56
3.6.4. Clorofila *a* 58
3.6.5. Carotenoides totais 60
3.6. Rendimento e qualidade do polissacarídeo 61
3.6.1. Rendimento do polissacarídeo 62
3.6.2. 3,6-anidrogalactose 63
3.6.3. Teor de Sulfato 64
4. Discussão 66
4.1. Taxas de crescimento 66
4.2. Pigmentos 69
4.3. Rendimento e qualidade de polissacarídeos 72
CAPÍTULO 4 – Cultivos no mar (curta duração) de linhagens selecionadas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil: crescimento, fluorescência da clorofila e composição pigmentar 75
ABSTRACT 75
RESUMO 76
1. Introdução 77
2. Material e Métodos 78
2.3. Local de cultivo 79
2.4. Delineamento experimental 79
2.5. Fluorescência *in vivo* da clorofila 79
2.6. Determinação do conteúdo pigmentar 80
2.7. Análise estatística 81
3. Resultados 81
3.1. Taxas de crescimento 81
3.2. Fluorescência *in vivo* da clorofila 84
3.2.1. Fotossíntese máxima 87
3.2.2. Rendimento quântico efetivo 88
3.2.3. Eficiência fotossintetizante (αETR) 89
3.2.4. Saturação luminosa 90
3.3. Composição pigmentar 92

3.3.1. Ficoeritrina 94
3.3.2. Ficocianina 95
3.3.3. Aloficocianina 97
3.3.4. Clorofila *a* 98
3.3.5. Carotenoides totais 99
4. Discussão 101
4.3. Taxas de crescimento 101
4.4. Fluorescência da clorofila *a* 103
4.5. Pigmentos 104
CAPÍTULO 5 – Considerações Finais 106
RESUMO (GERAL) 115
GENERAL ABSTRACT 116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

1.1. Panorama do cultivo de macroalgas no mundo

As macroalgas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar. Além de fonte de alimentos, algumas espécies podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de ficocoloides, alcançando assim um alto valor no mercado mundial (ARMISÉN, 1995; TRONO JR., 1999; TSENG, 2001). Embora em menor escala, as algas podem também ser utilizadas para outros fins, como por exemplo, no complemento para ração animal (NAIDOO *et al.,* 2006; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2007; ROTHMAN *et al*., 2009), adubo, fertilizantes líquidos e produtos cosméticos e terapêuticos (SILVA *et al*., 1998a, DRUEHL, 2003; CARDOZO *et al*., 2007; ALMEIDA *et al*, 2011) ou como filtros biológicos no tratamento dos resíduos gerados pela aquicultura (MARINHO-SORIANO *et al*., 2002, 2009; NEORI *et al*., 2004; MATOS *et al*., 2006; MARINHO-SORIANO, 2007; ZHOU *et al*., 2006).

A indústria mundial de algas marinhas é responsável por um valor estimado de US$ 7,4 bilhões por ano, sendo 93,8% oriundos da aquicultura e grande parte destinada aos gêneros utilizados diretamente na alimentação humana. Os países do leste e sudeste da Ásia dominam a produção mundial de algas. A China é o maior produtor, sendo responsável por 62,8%, seguida da Indonésia (13,7%), Filipinas (10,6%), República da Coreia (5,9%), Japão (2,9%) e República Democrática Popular da Coreia (2,8%). Em termos de movimentação financeira, o Japão mantém a segunda posição devido ao elevado valor comercial do "nori". Atualmente, a maior produção de algas cultivadas é de *Laminaria japonica* ("kombu") (4,8 milhões de toneladas), seguida de *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp. (3,8 milhões de toneladas), *Undaria pinnatifida* ("wakame") (1,8 milhões de toneladas), *Gracilaria* spp. (1,4 milhões de toneladas) e *Porphyra* spp. ("nori") (1,4 milhões de toneladas) (FAO, 2010).

Dentre os polissacarídeos comercializados, a agarana, a carragenana e o alginato são os que apresentam maior importância econômica, podendo ser utilizados como espessantes, estabilizantes e geleificantes pelos mais diversificados ramos das indústrias alimentícia,

cosmética, têxtil, farmacêutica e biotecnológica (McHugh, 2003; Smit, 2004; Bixler & Porse, 2011).

O ágar é obtido de algumas famílias de algas vermelhas (Rhodophyta) principalmente Gelidiaceae e Gracilariaceae (Lai & Lii, 1997). As principais agarófitas são *Gelidium* e *Gracilaria*. Embora em menor quantidade, outras espécies como *Pterocladia* e *Gelidiella* são também utilizadas na obtenção desse ficocoloide. *Gelidium* e *Pterocladia* são considerados os gêneros que produzem o ágar de melhor qualidade (força de gel - cerca de 600 $g.m^{-2}$), sendo geralmente utilizados em processos biotecnológicos (McHugh, 1991).

Antes da década de 1950, as espécies de *Gracilaria* eram consideradas inadequadas para a exploração comercial por apresentarem um ágar de baixa qualidade. Entretanto, a comercialização de espécies desse gênero foi impulsionada a partir da descoberta do pré-tratamento alcalino, responsável pela conversão das moléculas de L-galactose-6-sulfato em 3,6-anidro-L-galactose e consequentemente aumento da força do gel (McHugh, 1991). Desta forma, cada vez mais espécies de *Gracilaria* são empregadas para produção de ágar. Entretanto, os estoques naturais têm se mostrado insuficientes para suprir a crescente demanda de consumo e a disponibilidade de matéria-prima tem influenciado os preços em todo o mundo. Assim, os cultivos em grande escala passaram a ser a alternativa mais viável para a sustentabilidade dessa indústria. Esse gênero se tornou bastante empregado em cultivos comerciais, sendo responsável por aproximadamente 80% da produção mundial de ágar (Bixler & Porse, 2011). Atualmente, o Chile é o maior fornecedor de *Gracilaria*, representando cerca de 50% da produção mundial. Além do Chile, outros países, como China, Taiwan e Namíbia, vêm se destacando na produção comercial de *Gracilaria*, enquanto que em outras localidades, o interesse em cultivar essas algas vem crescendo cada vez mais (Brasil, Israel, México, Filipinas, África do Sul e Venezuela) (Critchley & Ohno, 1998; Bezerra & Marinho-Soriano, 2010; Gupta *et al.*, 2011).

1.2. Cultivo de algas vermelhas no Brasil

Na década de 70, a explotação descontrolada de agarófitas no nordeste brasileiro provocou uma diminuição drástica das reservas naturais, com o desaparecimento de vários bancos ao longo da costa (Câmara-Neto, 1982). Nessa época, novos incentivos foram criados para realização de experimentos de cultivos no mar em alguns estados do litoral nordestino,

sendo encontrados valores promissores de crescimento para algumas espécies de *Gracilaria* (LIMA *et al*., 1981). No entanto, não foram alcançadas produções em escala comercial, provavelmente por falta de conhecimentos básicos sobre as espécies selecionadas para o cultivo. Desde então, a explotação de espécies para fins comerciais no país se resume à coleta manual de algas dos gêneros *Gracilaria* e *Hypnea*, em particular no trecho do litoral nordestino que se estende do estado do Ceará a Paraíba (OLIVEIRA, 1998; VIDOTI & ROLLEMBERG, 2004).

Recentemente, com incentivos fornecidos pela FAO/OCB, cultivos no mar utilizando espécies de *Gracilaria* em escala piloto foram realizados nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba, sendo observado em alguns casos, elevados valores de crescimento (MARINHO-SORIANO, 2005; BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010). Cultivos de macroalgas foram também realizados no litoral baiano com o intuito de selecionar espécies que apresentassem maior potencialidade, sendo *G. cornea* escolhida como a mais viável para o sistema testado (ACCIOLY & PAULA, 2002; ACCIOLY, 2005). Outros experimentos de cultivo em ambientes diferentes, como estuários e viveiros de camarão, foram realizados com *G. caudata* (MARINHO-SORIANO *et al.,* 2002, 2009a), *G. cervicornis* (CARNEIRO, 2007), *G. domingensis* (CASTELO-PEREIRA *et al.,* 2007) e *G. birdiae* (OLIVEIRA, 2007), no Rio Grande do Norte, indicando boas perspectivas de crescimento, com taxas mais elevadas variando de 2,28%.d^{-1} (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2009b) a 8,8%.d^{-1} (MARINHO-SORIANO *et al.,* 2002).

Com relação ao sul e sudeste do país, estudos com *Kappaphycus alvarezii* foram conduzidos no estado de São Paulo (PAULA *et al*., 1999, 2002; HAYASHI *et al*., 2007a, b) e outros estão em andamento em Santa Catarina (HAYASHI *et al*., 2011). Atualmente, são encontrados cultivos comerciais dessa espécie no estado do Rio de janeiro, nas baías de Ilha Grande e de Sepetiba (REIS *et al*., 2005; CASTELAR *et al*., 2009a, b). Além disso, em Santa Catarina, foram realizados alguns experimentos com o objetivo de avaliar o potencial de cultivo de *G. caudata*, *G. domingensis* e *H. musciformis* no mar (CUNHA *et al*., 1999). Nessa mesma região, foram obtidas excelentes taxas de crescimento para *G. domingensis*, com valores semanais de até 20,21 %.d^{-1} (YOSHIMURA *et al*., 2003).Uma revisão mais detalhada dos experimentos de cultivos realizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil pode ser vista em PELLIZZARI & REIS (2011).

Apesar da existência de estudos e de vários registros positivos sobre o potencial de cultivo na costa brasileira, a implementação dessa atividade em escala comercial não foi ainda efetivada no país. A falta de conhecimento mais detalhado com relação à biologia e ecologia das espécies passíveis de cultivo vem sendo apontada como uma das principais razões do insucesso desses cultivos (OLIVEIRA, 1998; URSI & PLASTINO, 2001).

1.3. Metodologias adotadas no cultivo de macroalgas

Para atingir o cultivo comercial em grande escala, muitos estudos experimentais são necessários, incluindo aqueles relacionados aos aspectos ambientais, ecológicos e biológicos, os quais permitem o desenvolvimento de técnicas mais apuradas de cultivo para cada localidade (WIKFORS & OHNO, 2001; MCHUGH, 2003).

As metodologias adotadas na maioria dos cultivos de *Gracilaria* utilizam a propagação vegetativa (BUSCHMANN *et al*., 2001). Nesses casos, são utilizados fragmentos de algas que são inseridos diretamente em cordas ou em gaiolas e cultivadas no mar, em tanques ou em viveiros (UGARTE & SANTELICES, 1992; WESTERMEIER *et al*., 1993; MARINHO-SORIANO *et al*., 2002, 2009; NAGLER *et al*., 2003). A utilização de fragmentos tem a vantagem de ser relativamente simples e de fácil manejo, no entanto, a reposição das mudas requer quantidades consideráveis de espécimes nativos, sendo necessário o desenvolvimento de um sistema eficaz para a conservação das populações naturais (MARINHO-SORIANO, 2005). Uma maneira de minimizar essa exploração e ao mesmo tempo obter a biomassa necessária para a continuidade do cultivo é pela propagação por meio de esporos (GLENN *et al*., 1996; ALVEAL *et al*., 1997) ou pelo cultivo de linhagens selecionadas e propagadas vegetativamente (SANTELICES, 2001). O cultivo a partir de esporos é bastante promissor (GLENN *et al*., 1998), no entanto, requer pessoal especializado e uma maior tecnologia para obtenção de bons resultados. Desta forma, a seleção de linhagens mais adaptadas ao cultivo mostra-se como uma alternativa prática e viável, podendo ser utilizada pelas comunidades litorâneas, promovendo a sustentabilidade do cultivo. A biotecnologia oferece algumas alternativas práticas para a seleção e melhoramento das linhagens de interesse comercial. O uso da técnica de micropropagação clonal, por exemplo, promove a multiplicação das linhagens de forma rápida e massiva, aumentando os estoques de plantas matrizes e produzindo um grande número de indivíduos uniformes (COLLANTES *et al.*, 1989; 2004).

1.4. Luz e pigmentos de algas marinhas

As macroalgas têm um importante papel na biosfera, uma vez que são produtores primários e responsáveis pela maior parte da produção dos ecossistemas marinhos. Esses organismos estão na base da cadeia alimentar e servem como fonte de alimento e abrigo para diversas espécies de organismos. Por serem organismos bentônicos, as macroalgas estão sujeitas às variações ambientais do local onde ocorrem.

A distribuição dessas algas ao longo da coluna de água pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo, luz, temperatura, nutrientes e variação de salinidade (LÜNING, 1990). Dentre eles, a luz pode ser apontada como sendo o principal fator, uma vez que ela influencia diretamente na eficiência da fotossíntese (LOBBAN & HARRISON, 1997; GAO & XU, 2010).

A luz refere-se à faixa do espectro eletromagnético em que os comprimentos de onda são visíveis ao olho humano e está situada entre a região do ultravioleta e infravermelho. No entanto, existem diferenças entre a sensibilidade espectral do olho humano e dos pigmentos fotossintetizantes das plantas.

Os três grupos de pigmentos envolvidos na fotossíntese das algas são as clorofilas, as ficobiliproteínas e os carotenoides (LÜNING, 1990). Esses pigmentos possuem diferentes picos de absorção, e juntos eles absorvem uma ampla faixa (350 a 700nm) denominada de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (LOBBAN & HARRISON, 1997). A clorofila *a* é o principal pigmento da fotossíntese, sendo encontrada em todas as algas. As outras clorofilas, bem como os demais pigmentos, funcionam como acessórios na fotossíntese, transferindo a energia luminosa absorvida para a clorofila *a*. Além dessa função, as ficobiliproteínas podem também desempenhar um papel importante no crescimento das algas, pois são utilizadas como reserva de nitrogênio (KURSAR *et al.*, 1983). Os carotenoides, por sua vez, estão relacionados a mecanismos de fotoproteção, dissipando o excesso de energia em calor (URSI *et al*., 2003; ANDERSSON *et al*., 2006; SCHUBERT *et al*., 2006).

As concentrações da clorofila *a*, bem como dos pigmentos acessórios, variam de acordo com a espécie e podem ser afetadas pelas variações ambientais. Algumas espécies apresentam estratégias fotobiológicas e podem exibir alterações significativas do conteúdo pigmentar em resposta às diferentes profundidades e condições de luz disponíveis no ambiente (GÓMEZ *et al.,* 2005; FIGUEROA & GÓMEZ, 2001). Essas acomodações do aparato

fotossintetizante das algas estão relacionadas principalmente às variações na quantidade e qualidade da luz recebidas e podem conferir um maior aproveitamento da luz pela alga (BEER & LEVY, 1983; HONSELL *et al.*, 1984; CARNICAS *et al.*, 1999). Neste sentido, para implantação de cultivos com macroalgas, é necessário o conhecimento prévio da profundidade mais adequada, tendo em vista o melhor aproveitamento da luz.

1.5. Considerações sobre a espécie em estudo - *Gracilaria birdiae*

O gênero *Gracilaria* tem sido alvo de vários estudos no mundo, incluindo o Brasil, devido a sua importância econômica. No Brasil, esse gênero está representado por 18 espécies com ampla distribuição, com registros desde a costa do estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul (OLIVEIRA & PLASTINO, 1994). Dentre essas espécies, destaca-se *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira que passou a ser alvo de diversos estudos por ser uma das principais espécies explotadas no nordeste brasileiro para a produção de ágar (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). Trata-se de uma espécie de talo cilíndrico e espermatângios com distribuição do "tipo-*henriquesiana*", que ocorre desde a costa do estado do Ceará, até o Espírito Santo (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). Seu histórico de vida é do tipo *Polysiphonia*, apresentando uma fase haploide (gametófitos) e duas fases diploides (carposporófito e tetrasporófito) (COSTA & PLASTINO, 2001). O tetrasporófito e o gametófito são isomórficos e independentes, enquanto que o carposporófito desenvolve-se sobre o gametófito feminino. Esse carposporófito é protegido por células do gametófito e forma uma estrutura hemisférica facilmente identificada na superfície do talo denominada de cistocarpo. Os esporos diploides (carpósporos) são liberados gradativamente através do orifício presente no cistocarpo (ostíolo). Cada carpósporo pode desenvolver um novo indivíduo diploide (tetrasporófito). Quando fértil esse tetrasporófito produz tetrasporângios, que sofrem meiose, originando os esporos haploides (tetraspóros). A germinação dos tetraspóros resulta em gametófitos masculinos ou femininos (OLIVEIRA & PLASTINO, 1994; KAIN (JONES) & DESTOMBE, 1995) (Figura 1).

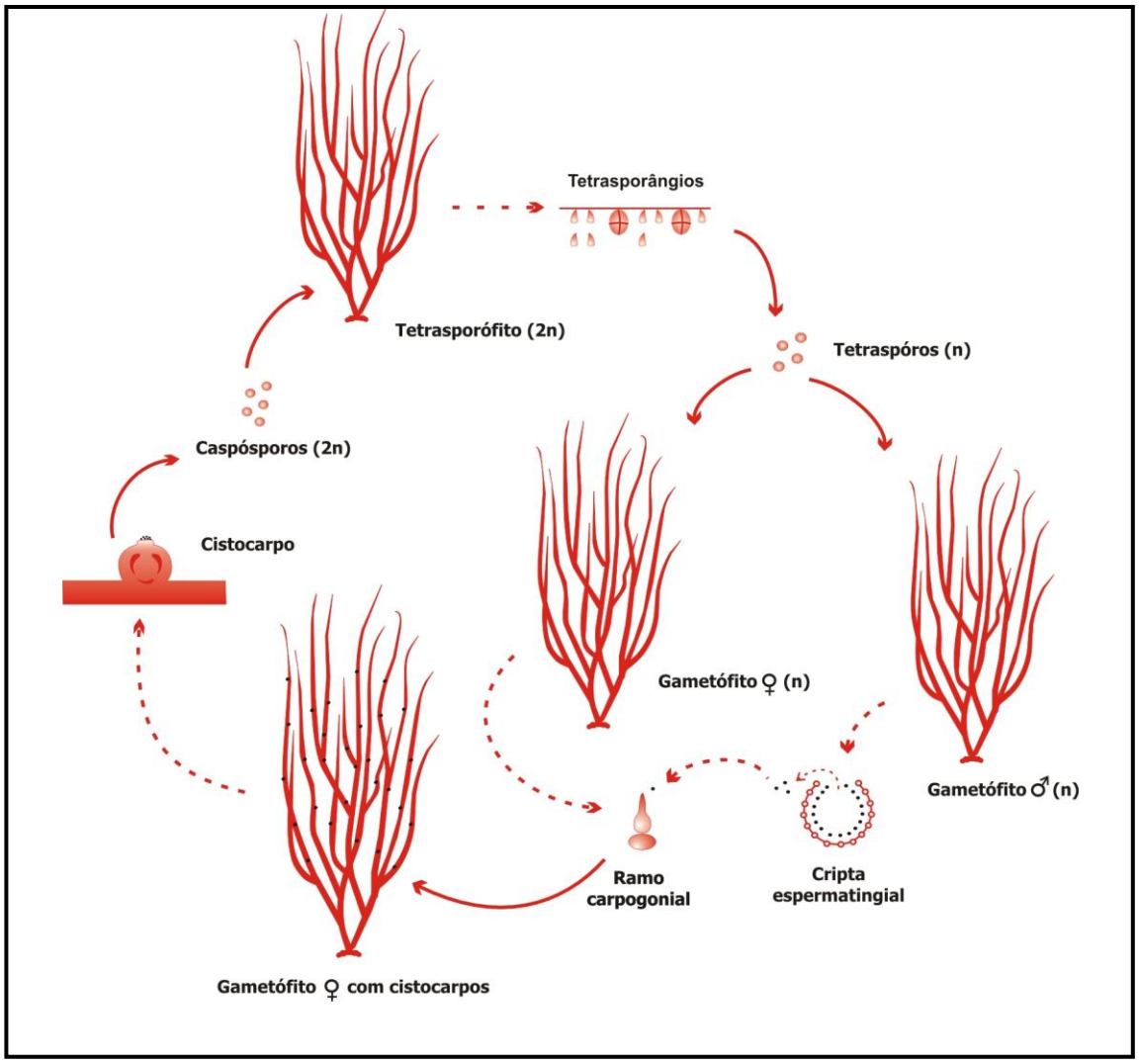

Figura 1. Histórico de vida de *G. birdiae*. Modificado de OLIVEIRA & PLASTINO (1994) E KAIN (JONES) & DESTOMBE (1995).

No ambiente natural, as populações de *Gracilaria birdiae* geralmente exibem as duas fases livres do histórico de vida, sendo, no entanto encontradas diferenças nas proporções entre gametófitos e tetrasporófitos (ARAÚJO, 2005).

Grande parte dos trabalhos realizados em *Gracilaria birdiae* inclui abordagens referentes à diversidade intraespecífica (PLASTINO, 2004). Variantes pigmentares isolados da natureza ou do laboratório vêm sendo caracterizados sob diferentes aspectos: herança de cor e composição pigmentar (COSTA, 2000; COSTA & PLASTINO, 2001, 2011; URSI *et al*., 2003; PLASTINO *et al*., 2004; DONATO, 2005), crescimento (URSI, 2000; URSI & PLASTINO, 2001; PLASTINO *et al*., 2004; BARUFI, 2004; DONATO, 2005), fotossíntese (URSI *et al*., 2003; DONATO, 2005; AYRES, 2010), polissacarídeos (URSI, 2005) e ultra-estrutura (PLASTINO & COSTA, 1999; AYRES, 2010).

Além disso, os efeitos da radiação UV-B foram avaliados em diferentes linhagens selecionadas (AYRES, 2010).

Gracilaria birdiae vem sendo testada em alguns cultivos experimentais em estuários (MARINHO-SORIANO *et al.,* 2006), e em consórcios com camarão (OLIVEIRA, 2007; MARINHO-SORIANO *et al.,* 2009b) e no mar (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010). Esses trabalhos apresentaram taxas de crescimento para a espécie variando entre 3,6 $\%.d^{-1}$ e 7,45 $\%.d^{-1}$.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar aspectos da diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* quando cultivada no mar e propiciar subsídios para possível explotação comercial de linhagens selecionadas. Para melhor atingir esse objetivo, foram monitorados diferentes fatores abióticos na região escolhida, levando-se em conta a sazonalidade. Além disso, uma população local foi monitorada, visando relacionar a sua dinâmica com as variações sazonais.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a dinâmica de uma população de *Gracilaria birdiae* considerando-se o comprimento do talo de seus indivíduos, bem como a frequência de diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófito, plantas cistocárpicas e gametófito masculino).

- Cultivar no mar, em dois períodos diferentes (chuvoso e seco), linhagens de *Gracilaria birdiae* selecionadas, considerando-se três profundidades e avaliando-se: i, crescimento; ii, fotossíntese; iii, conteúdo pigmentar (clorofila *a*, carotenoides totais, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina); e iv, rendimento e qualidade de polissacarídeos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

Para os experimentos de cultivo no mar, foram utilizadas, em triplicata, quatro linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae*: (i) espécimes de coloração vermelha (selvagem) procedentes do Estado do Rio Grande do Norte (*vm*-RN) e (ii) espécimes de

coloração vermelha (selvagem) (*vm*-CE), (iii) marrom-esverdeadas (*me*-CE) e (iv) verde (*vd*-CE) obtidos por propagação vegetativa de talos tetrasporofíticos provenientes do "Banco de germoplasma de algas gracilarioides" do Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM), IBUSP, a partir de cultivos unialgáceos.

As linhagens provenientes do banco de germoplasma foram estabelecidas a partir de plantas originadas de tetrásporos liberados por um espécime de fenótipo selvagem (coloração vermelha - *vm*) coletado em Paracuru, Estado do Ceará, por E.M. Plastino e M. Guimarães em 01/03/1994. As plântulas derivadas desses esporos apresentavam colorações vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) e foram cultivadas separadamente (COSTA & PLASTINO, 2011). A linhagem de coloração verde (*vd*-CE), por sua vez, surgiu de um espécime tetrasporofítico, originado a partir do cruzamento entre gametófitos ♀*vm* e ♂*me*, que diferenciou espontaneamente um ramo de coloração verde (*vd*-CE) (COSTA & PLASTINO, 2011) e posteriormente foi propagado vegetativamente.

A linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) foi obtida de culturas unialgáceas estabelecidas a partir de carpósporos liberados por espécimes (triplicata) coletados na Praia de Rio do Fogo, RN, Brasil por M.A.A. Carneiro Davim em 22/01/2008.

3.2. Condições gerais de cultivo em laboratório

3.2.1. Manutenção das algas no Laboratório de Algas Marinhas (IBUSP)

A água do mar utilizada para manutenção das linhagens no banco de germoplasma do LAM (IBUSP) foi coletada no município de São Sebastião (SP), submetida à dupla filtragem em filtro de pressão (Cuno) com porosidade de 5 a 1 μm e esterilizada por aquecimento em banho-maria durante 60 min, contados a partir do momento de fervura. A salinidade foi de 32 ups. A água do mar foi renovada semanalmente e enriquecida com solução von Stosch modificada (URSI & PLASTINO, 2001), diluída a 12,5%, com acréscimo de nitrato (NO^{3-}) na concentração de 0,250 mM (COSTA, 2005).

As algas foram mantidas em câmaras de cultivo com temperatura de 25°C ± 1 e fotoperíodo de 14h. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi de 70 ± 10 μmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, provinda de lâmpadas fluorescentes "Luz do Dia" (Osram 40 W) e mensurada com um sensor esférico (Li-COR modelo LI-193), conectado a um medidor de quanta (Li-COR modelo LI-185).

A aeração foi empregada por períodos alternados de 30 min. O ar foi fornecido por um compressor radial isento de óleo (Ibram CR-03), sendo inicialmente borbulhado em um frasco contendo água destilada, que serviu como filtro e umidificador.

3.2.2. Manutenção das algas no laboratório de Macroalgas Marinhas da UFRN

As linhagens procedentes do LAM/IBUSP foram transportadas para o Laboratório de Macroalgas Marinhas do Departamento de Oceanografia e Limnologia (DOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em frascos tipo Falcon, preenchidos com água do mar enriquecida (von Stosh 12,5%) (URSI & PLASTINO, 2001). No laboratório, as algas foram transferidas para frascos cônicos. Durante a fase inicial de propagação, os ramos eram mantidos em frascos de 250 ml, sendo posteriormente transferidos para frascos maiores (1000 ml).

A água do mar utilizada foi coletada na praia de Mãe Luiza, Natal (RN) e disponibilizada pelo Centro Tecnológico da Aquicultura, sediado no Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A salinidade foi de 34 ups. A água do mar foi enriquecida com solução von Stosch, diluída a 12,5% (URSI & PLASTINO, 2001). O meio de cultura foi renovado semanalmente. A aeração foi empregada em períodos alternados de 30 minutos e fornecida por um compressor radial isento de óleo (Ibram CR3). A temperatura foi de 26 ± 1°C, e a irradiância de 80 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} provinda de lâmpadas fluorescentes “Luz do Dia” (Osram 40 W). O fotoperíodo adotado foi de 12h. Após um período de propagação de 3 meses, as linhagens foram utilizadas nos experimentos de cultivo no mar.

3.3. Local de estudo

Esse estudo foi realizado na praia de Rio do Fogo, município de Rio do Fogo, estado do Rio Grande do Norte, situada no litoral nordestino do Brasil entre as coordenadas 5°15'41"S - 35°23'11“W (Figura 2). O rio da cidade, denominado Rio do Fogo, deságua próximo ao banco de algas (aprox. 500 m de distância) e, de acordo com o regime de chuvas, é responsável pelas flutuações de salinidade e nutrientes registradas no local. O clima da região é descrito como tropical sub-úmido, sendo identificadas duas estações distintas: (i)

chuvosa, compreendendo o período de março a agosto; e (ii) seca, entre os meses de setembro e dezembro e janeiro a fevereiro.

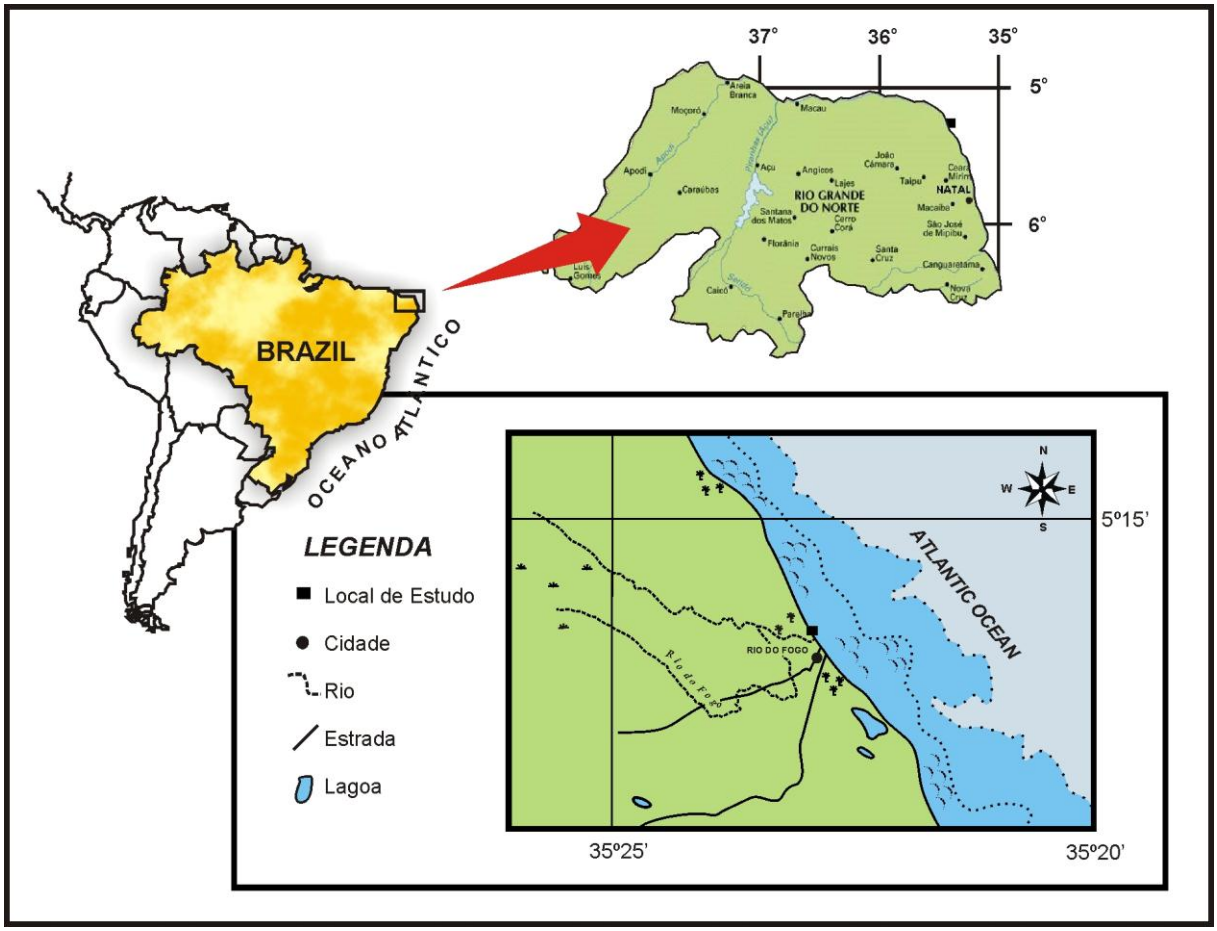

Figura 2. Localização geográfica da praia de Rio do Fogo, litoral norte do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

Essa praia foi escolhida por apresentar características favoráveis para o cultivo de algas. De acordo com MOURA (2007), a praia de Rio do Fogo apresenta uma costa abrigada de correntes e possui famílias que vivenciam a coleta de algas há vários anos. Outro aspecto levado em consideração foram os incentivos gerados pelo Governo Federal (Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) para a criação do Projeto Desenvolvimento de Comunidades Costeiras (DCC), o que facilitou o desenvolvimento dos cultivos de pequeno porte na região e a obtenção da licença ambiental para o cultivo e extrativismo de macroalgas em uma área de 10 hectares.

3.4. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros ambientais (temperatura da água, salinidade, pH e transparência da água) foram registrados em todos os experimentos realizados em campo a partir de uma sonda multiparâmetros (Horiba U-10) e um disco de Secchi. Amostras de água (300 ml) foram coletadas nos locais dos experimentos, fixadas (H_2SO_4 - 2M), filtradas (Whatman GF/3) e congeladas até o momento da análise (SILVA, 2004). O nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN = $NH_4^+ + NO_3^- + NO_2^-$) e o ortofosfato (PO_4^{-3}) foram analisados de acordo com os métodos descritos por STRICKLAND & PARSONS (1972). Dados de precipitação pluviométrica (mm/mês) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e Centro Regional do Nordeste do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Os valores de precipitação correspondem ao acumulado mensal (mm/mês) e os de PAR compreendem às médias diárias dos registros obtidos a cada 30 minutos.

3.5. Condições gerais de cultivo no mar

Ramos propagados a partir de indivíduos pertencentes a cada uma das linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE), verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (três indivíduos por linhagem), foram selecionados para a preparação de mudas utilizadas nos cultivos no mar. Esses cultivos foram realizados em três profundidades diferentes (30, 50 e 80 cm) e em duas estações do ano distintas (chuvosa e seca). Alterações do tempo de permanência das linhagens no mar (curta e longa duração) são apresentadas nos demais capítulos.

3.5.1. Preparação das estruturas de cultivo

Foram confeccionados três módulos de cultivo, distribuídos em três profundidades diferentes (30 cm, 50 cm e 80 cm). Esses módulos foram constituídos por três cordas de nylon (8 mm) de 1,2 m, presas pelas extremidades a tubos de PVC de 1 m de comprimento. Os módulos foram mantidos nas diferentes profundidades por meio de flutuadores confeccionados por tubos fechados nas extremidades e amarrados aos módulos por cordas. Para a fixação do sistema ao fundo, foram utilizadas duas âncoras de aproximadamente 10 kg, unidas ao módulo por cordas de nylon (10 mm). As âncoras foram produzidas utilizando

50 cm de tubo de PVC (100 mm) preenchido com cimento e brita, por onde se prendiam 3 cabos de ferro torcidos em forma de garras.

3.5.2. Preparação e distribuição das mudas por módulo de cultivo

Cada linhagem foi representada por três mudas de indivíduos diferentes (repetições). Cada muda foi composta por 10 ápices de 6 - 8 cm de comprimento de um mesmo indivíduo (aproximadamente 1g). Os ápices foram primeiramente amarrados com cordão de algodão e depois com fitilho de cores distintas para posterior identificação das linhagens: branco (*vm*-RN), vermelho (*vm*-CE), dourado (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). Em seguida, cada muda foi inserida em uma bolsa de nylon com malha de 1×1 cm, e essas bolsas foram amarradas às fibras das cordas presentes nos módulos de cultivo. Em cada corda, foram inseridas 5 bolsas, sendo uma delas vazia (sem muda), que foi utilizada para cálculo final de massa fresca das algas. As outras quatro bolsas continham um representante das quatro linhagens utilizadas, totalizando 12 bolsas com algas por módulo. O posicionamento das bolsas no módulo foi realizado de forma aleatória por meio de sorteio e a distância entre elas foi de 15 cm (Figura 3).

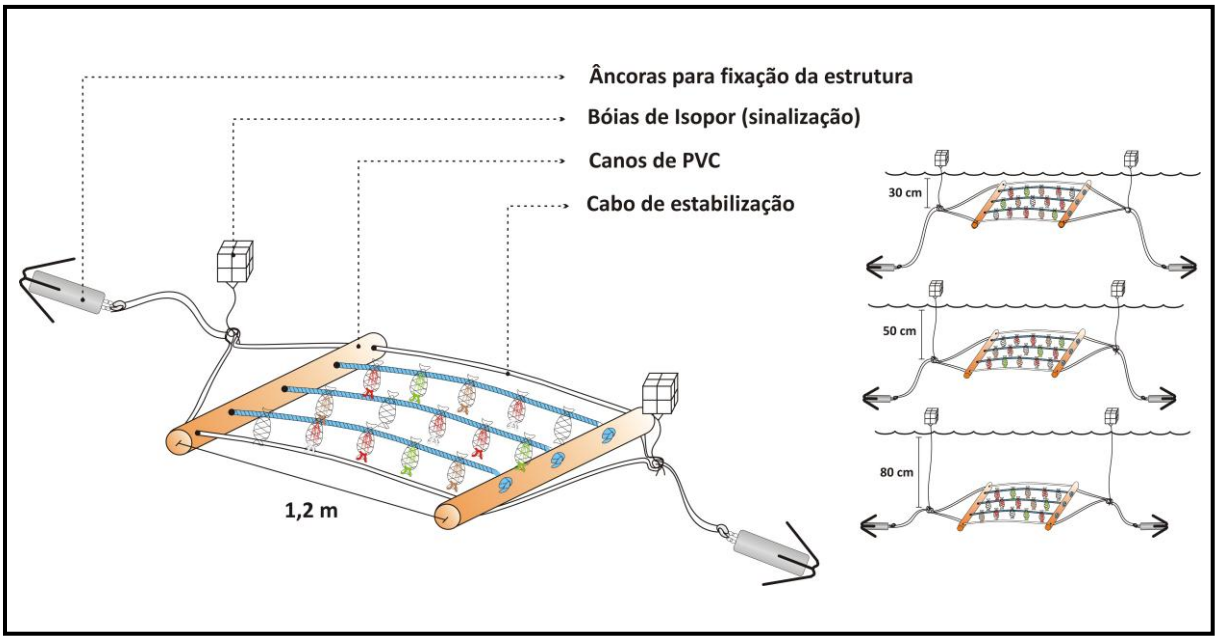

Figura 3. Ilustração no módulo de cultivo utilizado para cada profundidade (30, 50 e 80 cm) durante os cultivos na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil.

3.6. Determinação da massa fresca e taxas de crescimento

A massa fresca de *Gracilaria birdiae* foi determinada por pesagem individual das bolsas em balança digital com precisão de 0,1 g. Para isso, as cordas posicionadas nas três profundidades eram removidas das estruturas de cultivo e as bolsas eram limpas minuciosamente, para remoção das epífitas e sedimentos. A massa fresca final foi calculada a partir da diminuição do valor médio das bolsas vazias. As taxas de crescimento diário (TCs) para cada linhagem foram determinadas com base nos valores de peso úmido das três repetições obtidos no início e ao final de cada período amostral, segundo LIGNELL & PEDERSÉN (1989):

$$TC = [(Pf/Pi)^{1/t} - 1] \times 100,$$

onde, Pf é igual ao peso final (g), Pi é igual ao peso inicial (g) e t é o intervalo de tempo entre as duas medidas (dias).

3.7. Determinação do conteúdo pigmentar

Amostras de 200 mg (massa fresca) de *Gracilaria birdiae,* em triplicata, foram selecionadas e lavadas em água destilada, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. A extração dos pigmentos (ficobiliproteínas, clorofila *a* e carotenoides totais) foi realizada tanto em material cultivado em laboratório, quanto nas algas após os experimentos de cultivo no mar. Para isso, amostras do laboratório foram selecionadas no mesmo dia em que as algas foram transferidas para o cultivo no mar.

3.7.1. Ficobiliproteínas

A metodologia de extração foi baseada em KURSAR *et al.* (1983) com modificações (PLASTINO & GUIMARÃES, 2001). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo em seguida acrescentados 4 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5. A solução obtida foi centrifugada por 20 minutos a 44.000 *g* à 4°C. O sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi transferido para tubos de ensaio, sendo vedados e mantidos no escuro a temperatura de 4 ^{o}C, até a leitura em espectrofotômetro. O sedimentado foi utilizado para determinação da clorofila *a* e carotenoides totais, descritos a seguir.

A determinação da concentração de ficobiliproteínas foi baseada nas equações descritas por KURSAR *et al.* (1983):

$$FE = 155{,}8 \cdot A_{498{,}5} - 40{,}0 \cdot A_{614} - 10{,}5 \cdot A_{651}$$

$$FC = 151{,}1 \cdot A_{614} - 99{,}1 \cdot A_{651}$$

$$AFC = 181{,}3 \cdot A_{651} - 22{,}3 \cdot A_{614}$$

onde, FE = concentração de ficoeritrina, FC = concentração de ficocianina, AFC = concentração de aloficocianina e A_x = absorbância no comprimento de onda x. Os resultados foram padronizados pela massa fresca da amostra, e expressos em $\mu g.g^{-1}$.

3.7.2. Clorofila *a* e carotenoides totais

A extração dos pigmentos lipossolúveis foi realizada utilizando o material sedimentado na centrifugação do extrato de ficobiliproteínas, descrito anteriormente. Esse material foi ressuspendido em 2 ml de N,N-dimetilformamida (DMF 99,8%) e mantido no escuro por 3 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 19.000 *g* à 4°C por 20 minutos. O sobrenadante, contendo a clorofila *a* e os carotenoides totais, foi transferido para tubos de ensaio vedados, que permaneceram no escuro a temperatura de 4 ^{o}C até a leitura em espectrofotômetro (WELLBURN, 1994).

As concentrações de clorofila *a* e carotenoides totais foram baseadas nas equações descritas por WELLBURN (1994) com modificações:

$$Cl\mathit{a} = 11{,}65 \cdot (A_{664} - A_{750})$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 \text{ x } (A_{480} - A_{750}) - 0{,}89\ Cl\mathit{a}}{245},$$

onde, Cl*a* = concentração de clorofila *a* e A_x = absorbância no comprimento de onda x. Os resultados foram padronizados pela massa fresca da amostra, e expressos em $mg.g^{-1}$.

3.7.3. Espectros de absorção

Os espectros de absorção foram obtidos após a leitura em espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A, utilizando-se cubetas de quartzo de percurso óptico de 10 mm. Foram registradas as absorbâncias no intervalo de 400 a 700 nm (UV-visível). A calibragem do aparelho foi realizada com soluções de tampão fosfato para ficobiliproteínas e DMF para a clorofila *a* e carotenoides totais.

CAPÍTULO 2

FENOLOGIA DE UMA POPULAÇÃO DE *Gracilaria birdiae* (GRACILARIALES, RHODOPHYTA) NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

Artigo publicado

CARNEIRO, M.A.A., MARINHO-SORIANO, E. & PLASTINO, E.M. (2011) Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta) in Northeastern Brazil. *Rev. bras. farmacogn*. 21(2): 317 – 322

ABSTRACT

The reproductive phenology and thallus length of *Gracilaria birdiae* were studied over a period of 12 months in a natural bed in Northeastern Brazil. Fertile specimens of *G. birdiae* were observed during the entire study period. Tetrasporophytes were the most common with an annual mean of 80.1 ± 5.6%, followed by cystocarpic plants (9.3 ± 3.4%), male gametophytes (8.3 ± 3.6%) and infertile plants (2.2 ± 3.4%). Only male gametophytes and infertile plants showed a variation in occurrence frequency during the year ($p<0.05$). With respect to thallus length, a distinct seasonal variation was observed for all reproductive stages ($p<0.05$), with the highest values recorded during the rainy season (March to August) and the lowest in the dry season (September to February). The results demonstrate that the size of individuals in this population is significantly affected by the periodic changes in the environment caused by rainfall regimes and hydrodynamism.

RESUMO

A fenologia reprodutiva e o comprimento do talo de *Gracilaria birdiae* foram estudados durante o período de 12 meses em uma população do nordeste do Brasil. Durante todo o período de estudo foram observados exemplares férteis de *G. birdiae.* Os tetrasporófitos foram os mais comuns, com média anual de 80,1 ± 5,6%, seguidos das plantas cistocárpicas (9,3 ± 3,4%), gametófitos masculinos (8,3 ± 3,6%) e plantas inférteis (2,2 ± 3,4%). Somente os

gametófitos masculinos e as plantas inférteis apresentaram variação em sua frequência de ocorrência durante o ano ($p<0,05$). Quanto ao comprimento do talo, foi observada uma distinta variação sazonal para todos os estádios reprodutivos ($p<0,05$), com os valores mais altos registrados durante o período chuvoso (março a agosto) e os mais baixos no período seco (setembro a fevereiro). Os resultados obtidos demonstraram que o tamanho dos indivíduos dessa população é afetado de forma significativa pelas mudanças periódicas do ambiente ocasionadas pelos regimes de chuvas e hidrodinamismo.

1. Introdução

O gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) é amplamente distribuído nas regiões tropicais e temperadas do mundo e está representado por mais de 110 espécies (CRITCHLEY, 1993; OLIVEIRA & PLASTINO, 1994). Esse gênero apresenta uma grande importância econômica em vários países devido ao seu conteúdo de ágar e rápido crescimento (ARMISÉN, 1995; KAIN (JONES) & DESTOMBE, 1995), sendo atualmente responsável por cerca de 80% da produção mundial de ágar (BIXLER & PORSE, 2011). O histórico de vida é do tipo *Polysiphonia*, com semelhanças morfológicas entre as fases gametofítica (n) e tetrasporofítica (2n). No entanto, a ocorrência de diferentes estruturas reprodutivas em um mesmo talo pode ser observada, e está relacionada a falhas mecânicas (germinação *in situ* de tetraspóros), genéticas ou citológicas (OLIVEIRA & PLASTINO, 1994; KAIN (JONES) & DESTOMBE, 1995).

Estudos realizados em populações naturais de *Gracilaria* demonstram uma maior predominância das formas tetrasporofíticas, além de indicar uma menor quantidade de gametófitos masculinos em relação aos femininos (MARINHO-SORIANO *et al.*, 1998, ORDUÑA-ROJAS & ROBLEDO, 2002, POLIFRONE *et al.*, 2006). Essa variação está relacionada principalmente às diferenças nas taxas de sobrevivência e fertilidade dos indivíduos haploides e diploides (RICHERD *et al.*, 1993).

A frequência de ocorrência dos estádios reprodutivos de *Gracilaria* tem sido determinada para várias espécies de regiões geograficamente distintas. Nos trópicos, os indivíduos férteis estão presentes nas populações durante todo o ano, enquanto que nas regiões temperadas os picos de fertilidade se restringem a um ou dois períodos, geralmente quando as temperaturas e irradiâncias são mais elevadas (KAIN (JONES) & DESTOMBE, 1995; ESPINOZA-AVALOS, 2005). Desta forma, algumas espécies de *Gracilaria* possuem estratégias

reprodutivas que permitem a sincronia entre os períodos férteis e as condições ambientais favoráveis para a sua perenidade (MARINHO-SORIANO *et al.*, 1998). No Brasil, estudos sobre a fenologia do gênero *Gracilaria* são relativamente escassos (PINHEIRO-JOVENTINO & BEZERRA, 1980; PLASTINO, 1985; SILVA *et al.,* 1987; ARAÚJO, 2005).

Gracilaria birdiae é uma das principais fontes de ágar do país e ocorre desde o litoral do Estado do Ceará até o Espírito Santo, constituindo bancos de algas perenes com relativa abundância (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). Essa espécie tem sido alvo de vários estudos em laboratório com o intuito de obter informações sobre suas exigências fisiológicas e utilizá-la em cultivos no mar (COSTA & PLASTINO, 2001, 2011; URSI & PLASTINO, 2001; URSI *et al.,* 2003; PLASTINO, 2004; PLASTINO *et al.*, 2004; URSI *et al.*, 2008). Trabalhos relacionados ao cultivo dessa espécie foram realizados em diferentes ambientes, como em viveiros de camarão (MARINHO-SORIANO *et al.,* 2009b; OLIVEIRA, 2007), estuários (MARINHO-SORIANO *et al.,* 2006) e no mar (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010), mostrando taxas de crescimento promissoras variando entre 3,6 $\%.d^{-1}$ e 7,45 $\%.d^{-1}$.

No estado do Rio Grande do Norte, a colheita de *Gracilaria birdiae* é realizada de forma extrativista pelas comunidades litorâneas e desempenha um importante papel na economia local. A coleta é realizada durante todo o ano nos períodos de marés de sizígia, sendo que o curto intervalo entre uma coleta e outra não é suficiente para promover a recuperação completa dos bancos. Desta forma, essa atividade é a principal responsável pela diminuição gradual dos estoques de algas da região, tornando cada vez mais preocupante a situação desses recursos naturais no país.

Esse estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de diferentes estádios reprodutivos, bem como a variação no comprimento do talo de indivíduos de uma população natural de *Gracilaria birdiae* ao longo de um ano e relacioná-los como as mudanças sazonais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material de estudo – *Gracilaria birdiae*

Este estudo foi realizado em uma população de *Gracilaria birdiae*. Essa espécie é encontrada com relativa abundância na região do nordeste brasileiro, sendo atualmente

uma das principais fontes de matéria-prima para extração de ficocoloides (ágar) nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba (Figura 1).

2.2. Local de estudo

Este estudo foi realizado em uma população de *Gracilaria birdiae* encontrada no infralitoral da praia de Rio do Fogo (RN). Essa população está localizada em uma região com poucos registros de colheita extrativista. Os indivíduos de *G. birdiae* encontram-se fixos ao substrato rochoso do tipo arenito-ferruginoso, típico da região, a uma profundidade de 0,0 a 1,2 m durante a maré baixa (altura de 0,0 cm). A descrição do local pode ser visualizada no Capítulo 1, item 3.3.

2.3. Amostragem

O estudo foi realizado durante o período de janeiro a dezembro de 2008 em uma área de aproximadamente 600 m^2 na região do infralitoral. As amostras foram obtidas utilizando um transecto de 10 m sobre o qual foram sorteados 20 pontos aleatórios. O procedimento de coleta foi repetido três vezes em locais diferentes, totalizando 60 pontos amostrados para cada mês. A escolha dos pontos amostrais foi determinada a cada dia de coleta por meio de uma tabela de números aleatórios gerada pelo programa Microsoft® Office Excel 2003. O comprimento de cada indivíduo sorteado foi mensurado *in situ*. Em seguida, foram coletadas amostras de cada exemplar e armazenadas em sacos plásticos para posterior análise em laboratório. Essa análise permitiu a distinção entre os diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos, plantas cistocárpicas e gametófitos masculinos). Plantas cistocárpicas foram identificadas a olho nú pela presença de cistocarpos no talo. Os tetrasporófitos e gametófitos masculinos foram identificados por meio de microscópio estereoscópico, e quando necessário, foram realizados cortes histológicos e visualizados em microscópio ótico. Talos sem a presença de tetrasporângios, conceptáculos espermatangiais e cistocarpos foram considerados como inférteis.

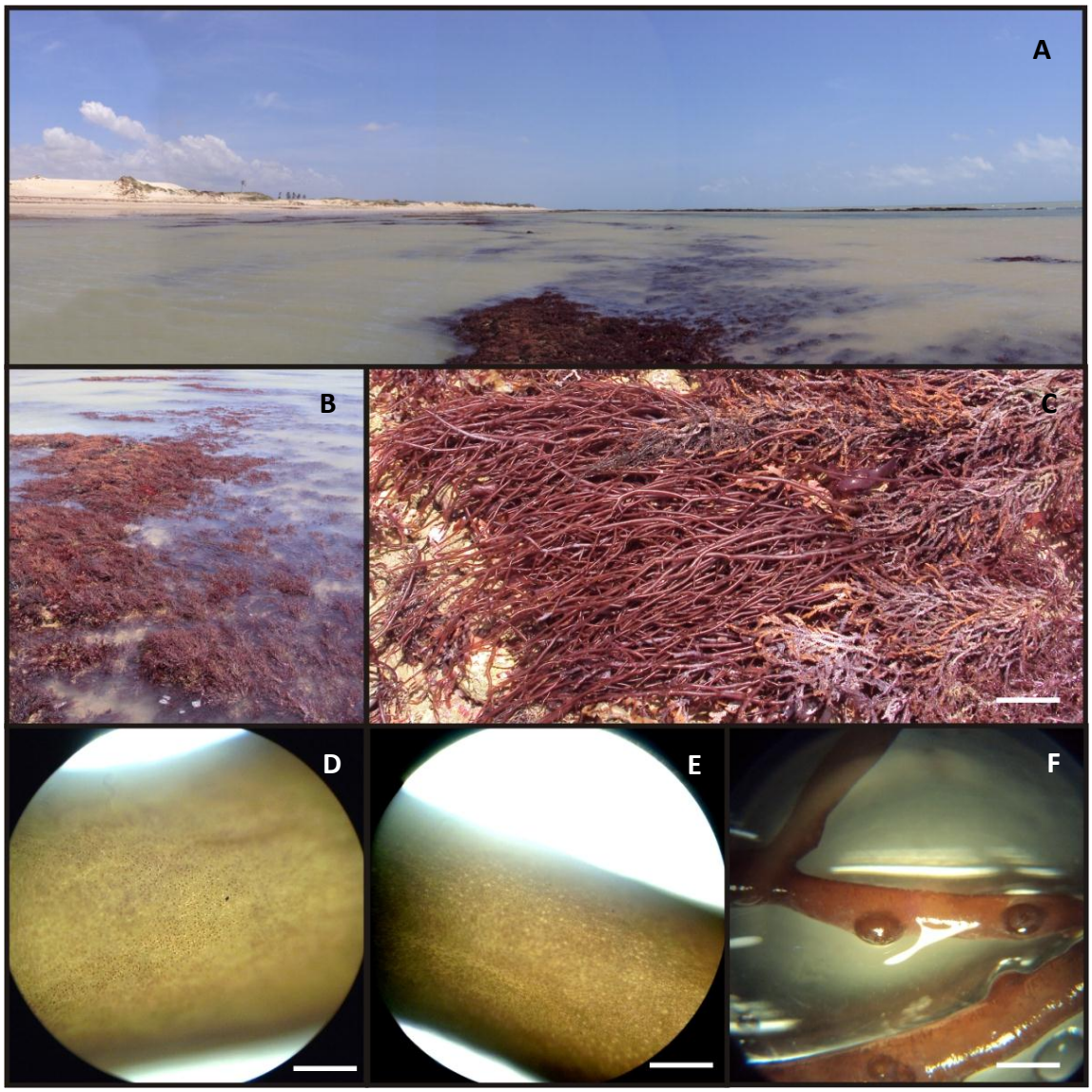

Figura 1. Local de coleta e estádios reprodutivos de *G. birdiae.* **A)** Aspecto panorâmico do banco de *G. birdiae* da praia de Rio do Fogo (RN); **B)** Detalhe do banco; **C)** Aspecto geral de plantas no banco; **D)** Detalhe da superfície de um ramo tetrasporofítico (escala 1 mm); **E)** Detalhe da superfície de um ramo de gametófito masculino (escala 1 mm); **F)** Detalhe da superfície de um ramo gametófito feminino com cistocarpos (escala 2,5mm).

2.4. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura da água, salinidade, pH e transparência da água) foram registrados mensalmente, simultaneamente à coleta das algas. Amostras de água foram coletadas no local para determinação do nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN = NH_4^+ + NO_3^- + NO_2^-) e o ortofosfato (PO_4^{-3}). A obtenção dos dados

climatológicos e determinação dos parâmetros físico-químicos da água obtidos nesse estudo estão descritos no capítulo 1, item 3.4.

2.5. Análises estatísticas

As variações sazonais no comprimento de talo dos indivíduos de diferentes estádios reprodutivos e nos parâmetros ambientais registrados durante este estudo foram analisadas utilizando-se a ANOVA unifatorial. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls foi usado. O teste t-Student foi empregado para identificar as diferenças existentes entre as estações chuvosa (março a agosto) e seca (setembro a fevereiro). A Correlação de Pearson foi utilizada para determinar as relações existentes entre o comprimento de talo e os parâmetros ambientais registrados. A análise da proporção sexual (plantas cistocárpicas x plantas masculinas) foi obtida utilizando-se o teste χ^2. Todas as análises foram realizadas no programa Statistica (versão 7.1).

3. Resultados

3.1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros ambientais registrados durante este estudo apresentaram-se de maneira distinta nas duas estações (chuvosa e seca) (Tabela 1). Os valores médios de temperatura para a estação chuvosa e seca foram de 26,6 ± 0,55^{o}C e 28,7 ± 0,46^{o}C, respectivamente ($t=3,08$; $p<0,05$). A salinidade manteve-se constante durante o período seco com média de 34,8 ± 0,4 ups, enquanto que, durante a estação chuvosa, foi registrada uma redução significativa de 35 ups para 27 ups ($F=2960$; $p<0,05$). A transparência da água esteve negativamente relacionada com a velocidade do vento ($r=-0,92$; $p<0,05$) e apresentou seus valores mais elevados durante o início do ano, sendo registrado o valor máximo em maio (135 cm). Após esse período, houve uma redução considerável, atingindo valores de até 15 cm (setembro). Quanto aos nutrientes, o DIN (NH_4^+ + NO_3^- + NO_2^-) esteve mais elevado durante a estação chuvosa, sendo registrado o valor máximo em abril (9,66 ± 0,07 µmol.L^{-1}). Os valores médios para a estação chuvosa e seca foram de 3,85 ± 3,88 µmol.L^{-1} e 1,49 ± 0,87 µmol.L^{-1}, respectivamente ($t=2,67$; $p<0,05$). O NH_4^+ foi o nutriente que mais contribuiu para a concentração final do DIN, com exceção dos meses de abril (44,8%) e dezembro (24,9%), em que a concentração do NO_3^- foi mais elevada (54,5% e 63,4%,

respectivamente). O NO_2^- foi o que menos contribuiu para o DIN e não apresentou diferenças entre as duas estações (t=0,63; p>0,05). O PO_4^{-3} apresentou variação significativa ao longo do ano (F=34,40; p<0,05), sendo observado o valor mínimo em janeiro (0,08 ± 0,013 µmol.L^{-1}) e o máximo em julho (1,76 ± 0,03 µmol.L^{-1}). Esse nutriente apresentou uma correlação negativa com a transparência da água (r=-0,82; p<0,05) e positiva com a velocidade do vento (r=0,75; p<0,05).

Tabela 1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos (variação e média ± desvio padrão) da água do mar na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, registrados durante as estações chuvosa (período entre março e agosto) e seca (período entre setembro e dezembro e janeiro a fevereiro) de 2008.

	Estação seca		Estação chuvosa		t-value	P
	Mín - Máx	Média ± DesvPad	Mín - Máx	Média ± DesvPad		
Precipitação (mm/mês)	0,2 - 67,8	26,8 ± 23,7	286,3 – 542,0	426,4 ± 89,6	19,46	<0,05*
PAR (µmol.photons.m^{-2}.s^{-1})	1158,9 – 1436,6	1284,2 ± 98,27	416,8 – 1077,2	860,0 ± 235,8	13,01	<0,05*
Vel. Vento (m.s^{-1})	4,74 – 6,00	5,32 ± 0,43	3,14-5,01	4,07 ± 0,80	3,37	<0,05*
Temperatura (^oC)	27,0 -29,0	28,7 ± 0,46	26,0 - 29,0	26,6 ± 0,55	3,08	<0,05*
Salinidade (ups)	34,0 – 35,0	34,8 ± 0,4	27,0 - 35,0	33,3 ± 3,1	2,14	<0,05*
pH	7,6 – 8,7	8,2 ± 0,4	7,5 - 8,3	7,8 ± 0,3	3,15	<0,05*
Transparência (cm)	15,0 – 90,0	47,0 ± 29,4	30,0 - 135,0	79,6 ± 38,9	3,86	<0,05*
NO_2^- (µmol.L^{-1})	0,04 – 0,17	0,11 ± 0,06	0,05 - 0,19	0,10 ± 0,06	0,63	0,535
NO_3^- (µmol.L^{-1})	0,01 – 0,64	0,23 ± 0,30	0,01 – 5,26	1,17 ± 2,05	2,05	<0,05*
NH_4^+ (µmol.L^{-1})	0,25 – 2,34	1,15 ± 0,83	0,60 – 6,48	2,58 ± 2,38	2,54	<0,05*
DIN (µmol.L^{-1})	0,50 – 3,04	1,50 ± 0,87	0,79 – 9,66	3,85 ± 3,88	2,67	<0,05*
PO_4^{-3} (µmol.L^{-1})	0,08 – 1,37	0,64 ± 0,55	0,17 – 1,76	0,71 ± 0,73	0,32	0,753

* variações significativas (p<0,05)

3.2. Frequência dos estádios reprodutivos de *Gracilaria birdiae*

Durante todo o período estudado, foram observados exemplares férteis de *Gracilaria birdiae*. Os tetrasporófitos foram encontrados em maior frequência com média anual de 80,1 ± 5,6% seguidos das plantas cistocárpicas (9,3 ± 3,4%) e gametófitos masculinos (8,3 ± 3,6%). Apenas 2,2 ± 3,4% dos indivíduos amostrados apresentaram-se inférteis (Figura 2).

As frequências registradas tanto para os tetrasporófitos quanto para as plantas cistocárpicas foram semelhantes ao longo do ano (p>0,05), enquanto que os gametófitos

masculinos (máx. 11,7 ± 2,9% e mín. 1,7 ± 2,9%) e as plantas inférteis (máx. 10,0 ± 0,9% e mín. 0,0 ± 0,0%) apresentaram variação significativa ($p<0,05$). A proporção entre as plantas cistocárpicas e os gametófitos masculinos foi de 1:1 na maioria dos meses estudados. Em setembro, a ocorrência de plantas masculinas foi superior às cistocárpicas (♂1,8 : ♀1; χ^2 = 8,16, p=0,004), enquanto que nos meses de fevereiro (♂1 : ♀2; χ^2 = 11,11, p<0,001) e outubro (♂0,1 : ♀1; χ^2 = 66,94, p<0,001) as plantas cistocárpicas estiveram em maior proporção.

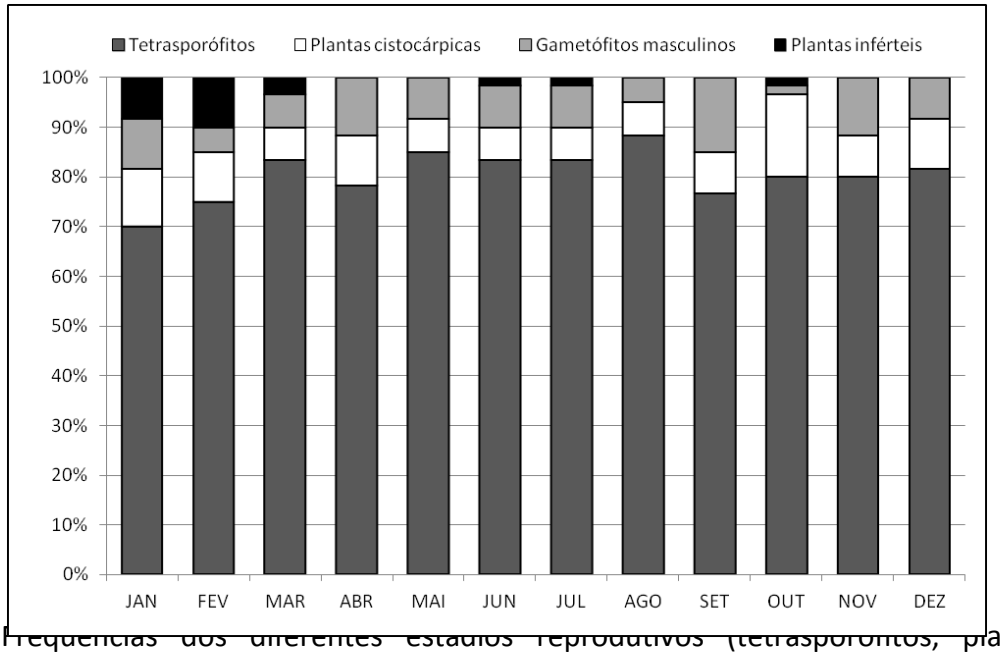

Figura 2. Frequências dos diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos, plantas cistocárpicas e gametófitos masculinos) e plantas inférteis de *G. birdiae* da praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, entre janeiro e dezembro de 2008.

3.3. Variação dos comprimentos dos talos de *Gracilaria birdiae*

Quanto ao comprimento dos talos, foi possível observar em todos os indivíduos dos diferentes estádios férteis uma distinta variação sazonal ($p<0,05$), com valores mais elevados durante o período chuvoso (tetrasporófitos: 41,4 ± 1,7 cm (julho); plantas cistocárpicas: 41,8 ± 5,0 cm (julho); gametófitos masculinos: 37,9 ± 8,7 cm (junho)) (Figura 3 e Tabela 2).

As médias de comprimento de talo para os períodos chuvoso e seco foram de, respectivamente, 38 ± 3,1cm e 28,1 ± 4,1 cm (tetrasporófitos: t=8,05; p<0,001), 35,4 ± 4,2cm e 28,3 ± 5,5cm (plantas cistocárpicas: t=3,60; p=0,001) e 34,6 ± 2,9cm e 22,1 ± 4,6cm (gametófitos masculinos: t=4,52; p<0,001). Os comprimentos dos talos dos três estádios férteis apresentaram correlações positivas com a precipitação (tetrasporófitos: r=0,69,

p<0,05; plantas cistocárpicas: r=0,67, p<0,05; gametófitos masculinos: r=0,83, p<0,05) e negativa com a PAR (tetrasporófitos: r=-0,80, p<0,05; plantas cistocárpicas: r=-0,69, p<0,05; gametófitos masculinos: r=-0,88, p<0,05). O comprimento das plantas inférteis não apresentou diferenças significativas entre os dois períodos (t=0,86; p=0,413), com médias de 21,3 ± 3,2cm e 21,6 ± 4,3cm, para as estações chuvosa e seca, respectivamente.

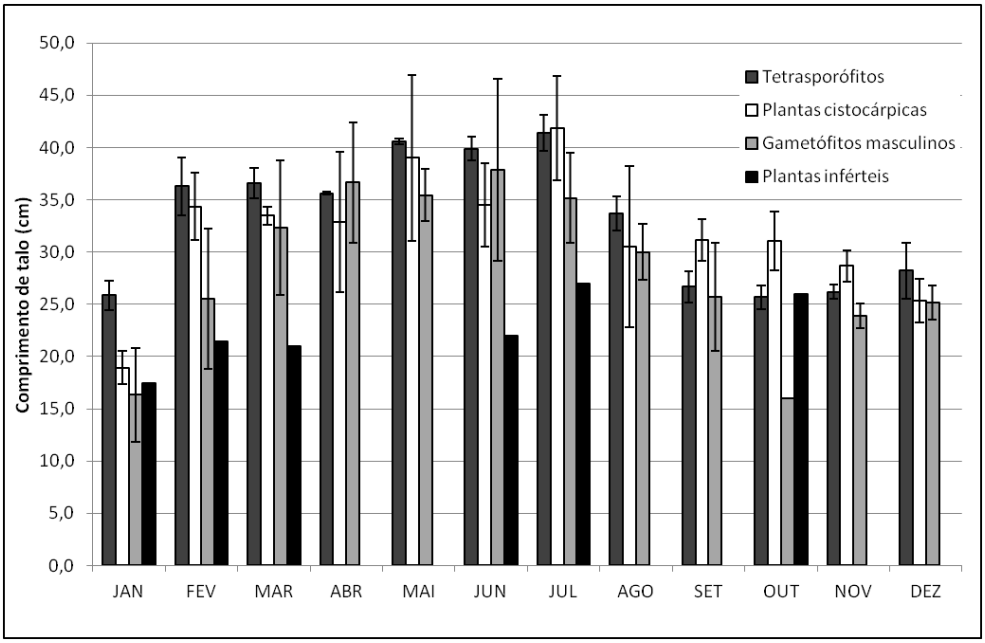

Figura 3. Comprimento médio de talo para os diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófitos, plantas cistocárpicas e gametófitos masculinos) e plantas inférteis de *G. birdiae* da praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, entre janeiro e dezembro de 2008.

Tabela 2. Valores médios (± desvio padrão), mínimos e máximos dos comprimentos de talo (cm) dos diferentes estádios reprodutivos e plantas inférteis de *G. birdiae* da praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, durante os períodos seco e chuvoso de 2008.

	Estação seca		Estação chuvosa		t-value	p
	Mín. - Máx.	Média ± DesvPad	Mín. - Máx.	Média ± DesvPad		
Tetraspórofitos	25,7 - 36,3	28,2 ± 4,1	33,7 - 41,4	38,0 ± 3,1	-8,05	0,000*
Plantas cistocárpicas	18,9 - 34,3	28,3 ± 5,5	30,5 - 41,8	35,4 ± 4,2	-3,60	0,001*
Gametófitos masculinos	16,0 - 25,7	22,1 ± 4,6	30,0 - 37,9	34,6 ± 2,9	-4,52	0,000*
Plantas inférteis	17,4 - 26,0	21,6 ± 4,3	21,0 - 27,0	23,3 ± 3,2	-0,86	0,413

* Diferenças significativas (p<0,05)

4. Discussão

A fertilidade da população de *Gracilaria birdiae* foi evidenciada pela baixa frequência de plantas inférteis (~2%), as quais foram registradas em apenas alguns meses do ano. Os tetrasporófitos foram encontrados em maior quantidade (80,1 ± 5,6%), seguidos das plantas cistocárpicas (9,3 ± 3,4%) e gametófitos masculinos (8,3 ± 3,6%). A dominância da fase tetrasporofítica foi também registrada em populações naturais de várias espécies desse gênero, incluindo *G. bursa-pastoris* e *G. coronopifolia* no Havaí (HOYLE, 1978), *G. cornea* no México (ORDUÑA-ROJAS & ROBLEDO, 2002), *G. damaecornis* na Venezuela (BRITO & SILVA, 2004), *G. gracilis* na Itália (POLIFRONE *et al*., 2006) e *G. gracilis* na Argentina (MARTÍN *et al*., 2011). Estudos sugerem que a dominância de tetrasporófitos na natureza pode estar relacionada à viabilidade dos esporos e a taxa de sobrevivência, uma vez que a taxa de sucesso desses parâmetros é mais pronunciado em estádios diploides do que haploides (DESTOMBE *et al*., 1989). De acordo com YOKOYA & OLIVEIRA (1993), essa dominância advém do fato de que as células diploides são supostamente mais tolerantes às variações ambientais do que as células haploides, o que explicaria a predominância da fase tetrasporofítica em populações naturais.

Ao longo do estudo, a proporção sexual de *Gracilaria birdiae* foi de 1:1 na maioria dos meses estudados, exceto em fevereiro (♂1 : ♀2; χ^2 = 11,11; p<0,001), setembro (♂1,8 : ♀1; χ^2 = 8,16; p = 0,004) e outubro (♂0,1 : ♀1; χ^2 = 66,94 ;p<0,001). O aumento significativo no registro de plantas cistocárpicas durante o mês de outubro pode estar relacionado ao pico de reprodução sexual durante este período, uma vez que no mês anterior foram observadas plantas masculinas em maior proporção (p=0,004). Estudos anteriores mostram que durante os picos de reprodução sexual é possível ocorrer inversão entre as proporções de plantas masculinas e femininas. Esses estudos assinalam também que é comum após o registro de uma alta frequência de plantas masculinas, o aparecimento acentuado de plantas cistocárpicas (KAIN (JONES) & DESTOMBE, 1995; ESPINOZA-AVALOS, 2005). As plantas consideradas inférteis compuseram uma parcela insignificante da população, comparativamente aos outros estádios reprodutivos (tetrasporófitos e gametófitos). No entanto, sua ocorrência era sincronizada bimensalmente, supostamente após a liberação dos esporos, indicando que se tratava de plantas juvenis de outros estádios reprodutivos. Deve-se salientar ainda, que esses indivíduos apresentavam menores comprimentos de talo do que indivíduos férteis.

Em relação ao tamanho dos talos, verificou-se uma clara variação sazonal, com valores mais altos registrados no período chuvoso e os mais baixos no período seco. Esse modelo sazonal foi também observado para outras espécies de *Gracilaria* em regiões tropicais (SILVA *et al*., 1987; LUHAN, 1996; ORDUÑA-ROJAS & ROBLEDO, 2002). Durante o período chuvoso (março – julho), as condições ambientais foram caracterizadas por águas mais ricas em nutrientes, carreados para o mar pelas fortes chuvas registradas nesse período. Esse aporte de nutrientes favoreceu o desenvolvimento luxuriante de *G. birdiae* até o mês de agosto. A diminuição do talo a partir desse mês coincidiu com o aumento da velocidade do vento, ondas, correntes e movimentação do sedimento em direção aos bancos algais. O efeito sinérgico desses fatores no período correspondente a agosto-novembro contribuiu para o soterramento parcial da população de *G. birdiae* e consequentemente para a fragmentação dos talos.

O efeito da carga de sedimento na população de *Gracilaria birdiae* provavelmente dificultou a regeneração do talo e colaborou para a diminuição na taxa de recrutamento, crescimento e sobrevivência dos espécimes. ERIKSSON & JOHANSSON (2003, 2005) apontaram a alta carga de sedimento como um fator negativo para o recrutamento, crescimento e fixação dos esporos. A presença marcante de indivíduos inférteis de pequeno porte em janeiro, após os distúrbios hidrodinâmicos, sugere a restauração da população de *G. birdiae* e demonstra o efeito imperativo das condições ambientais na fenologia reprodutiva dessa população.

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações relevantes sobre os aspectos reprodutivos de uma população natural de *Gracilaria birdiae*, localizada na praia de Rio do Fogo, região Nordeste do Brasil. Esses conhecimentos são importantes para o desenvolvimento de programas de manejo e exploração sustentável desse recurso natural.

CAPÍTULO 3

CULTIVOS NO MAR (LONGA DURAÇÃO) DE LINHAGENS SELECIONADAS DE *Gracilaria birdiae* (GRACILARIALES, RHODOPHYTA) NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL: CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PIGMENTAR E RENDIMENTO E QUALIDADE DE POLISSACARÍDEOS

ABSTRACT

Gracilaria birdiae Plastino & E.C. Oliveira is the main species exploited for agar production in Brazil; consequently, studies related to the cultivation and selection of more productive strains become extremely necessary. The aim of this work was to compare the growth of *G. birdiae* strains cultivated in the sea (Rio Grande do Norte State, Brazil) at three different depths (30cm, 50cm, and 80cm) and two seasons (rainy and dry). The pigments contents and polysaccharides yield and quality (gel strength and 3,6-anhydrogalactose and sulfate contents) were also evaluated. Four tetrasporophytic strains were used: red (*rd*-CE, *rd*-RN), greenish-brown (*gbw*-CE), and green (*gr*-CE). The experiment was conducted for 120 days and the biomass was obtained monthly. The environmental parameters showed significant differences between the two seasons (rainy/dry). Water transparency and nutrients were most related to changes in growth rates of strains of *G. birdiae*. The cultivation time also influenced the growth rates and the reductions were related to the aging of the talus. The pigment content before and after the cultivation showed significant reductions, particularly during the dry season, being a result of low nutrient availability. The agar yield and content of the 3,6-anhydrogalactose from strains of *G. birdiae* did not show differences between seasons and depths, neither between strains. The sulfate content was highest during the dry season in some depths according to the strain. These results demonstrate that the growth of different strains of *G. birdiae* exhibit favorable prospects for use in small-scale farming found in the region.

RESUMO

Gracilaria birdiae Plastino & E.C. Oliveira é a principal espécie explorada para a produção de ágar no Brasil e estudos relacionados ao seu cultivo e seleção de linhagens mais produtivas tornam-se extremamente necessários. O objetivo deste trabalho foi comparar o crescimento de diferentes linhagens de *G. birdiae* cultivadas no mar (Rio Grande do Norte, Brasil) em três profundidades diferentes (30cm, 50cm e 80cm) e durante dois períodos distintos (chuvoso e seco). O rendimento e qualidade do polissacarídeo (teores de 3,6-anidrogalactose e sulfato) foram também avaliados. Quatro linhagens de plantas tetrasporofíticas foram utilizadas: vermelha (*vm*-CE, *vm*-RN), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). O experimento foi conduzido por 120 dias e a biomassa foi obtida mensalmente. Os parâmetros ambientais mostraram diferenças significativas entre as estações (chuvosa e seca). Dentre eles, a transparência da água e os nutrientes foram os que mais estiveram relacionadas às variações das TCs das linhagens de *G. birdiae*. O tempo de cultivo também influenciou nessas taxas, e as reduções observadas estiveram relacionadas ao envelhecimento do talo. O conteúdo pigmentar antes e após os cultivos apresentou reduções significativas, principalmente durante o período seco, sendo consequência da baixa disponibilidade de nutrientes. O rendimento e os teores de 3,6-anidrogalactose obtidos do ágar das linhagens de *G. birdiae* não apresentaram diferenças entre as estações e profundidades, nem entre as linhagens. O teor de sulfato foi mais elevado durante a estação seca em determinadas profundidades de acordo com a linhagem em questão. Os resultados desse estudo mostram que as TCs das diferentes linhagens de *G. birdiae* apresentam boas perspectivas para serem utilizadas nos cultivos de maior escala localizados na região.

1. Introdução

O gênero *Gracilaria* é uma das principais fontes de matéria prima para produção de ágar, sendo algumas espécies também utilizadas como alimento humano e animal (ZEMKE-WHITE & OHNO, 1999; ARMISÉN, 1995). Atualmente, esse gênero é responsável por 80% da produção mundial de ágar (BIXLER & PORSE, 2011), e o cultivo comercial é realizado em várias regiões do mundo, como na Ásia, América do Sul e África (HURTADO-PONCE, 1990, 1992; BUSCHMANN *et al*., 1995; DAWES, 1995; ANDERSON *et al.,* 1996, 1999).

A explotação de agarófitas no Brasil se resume à coleta manual de espécies do gênero *Gracilaria* que ocorrem no litoral nordeste do país. Durante a década de 70, o extrativismo descontrolado dessas algas provocou uma diminuição drástica das reservas naturais, com o desaparecimento de vários bancos ao longo da costa (CÂMARA-NETO, 1982). Atualmente, esses recursos são limitados, e o desenvolvimento de metodologias apropriadas para o seu cultivo pode auxiliar a sustentabilidade dessa atividade no país e promover a conservação dos estoques naturais.

Gracilaria birdiae é uma das principais espécies de macroalga coletada no nordeste brasileiro para extração de ficocoloides (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). Essa espécie tem sido considerada como candidata para maricultura, por apresentar elevadas taxas de crescimento e boa qualidade de gel. Estudos experimentais de cultivo no mar, no nordeste brasileiro, demonstram que essa espécie pode atingir taxas de crescimento de até 7,45 $\%.d^{-1}$ e apresentar valores de força de gel variando entre 650 e 850 g cm^{-2} (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010). Outros experimentos de cultivo, utilizando *G. birdiae*, foram realizados em locais diferentes, como estuário e efluentes de viveiros de camarão, indicando boas perspectivas de crescimento nesses ambientes, com valores de até 4,8 $\%.d^{-1}$ e 3,6 $\%.d^{-1}$, respectivamente (MARINHO-SORIANO *et al*., 2006, 2009).

A seleção de variantes pigmentares em sistemas de cultivo comercial é comum para alguns gêneros de importância econômica, como *Eucheuma* e *Kappaphycus* (PAULA *et al*., 1999; MUÑOZ *et al.*, 2004; HAYASHI *et al.*, 2007a, b), produtoras de carragenana. Linhagens selecionadas de *Porphyra* spp. e *Laminaria* spp. são também utilizadas na maricultura (LI *et al.,* 1999; YAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al*., 2011).

Variantes pigmentares de *Gracilaria birdiae* têm sido alvo de diversos estudos, com o objetivo de gerar informações básicas sobre a variabilidade intraespecífica e a seleção de

linhagens mais produtivas para cultivos no mar (PLASTINO, 2004). As informações obtidas a partir de cultivos em laboratório demonstraram que essas variantes pigmentares apresentam algumas características distintas das verificadas para as linhagens selvagens, como a composição pigmentar (PLASTINO *et al.,* 2004; COSTA & PLASTINO, 2011), as taxas de crescimento (URSI & PLASTINO, 2001) e a fotossíntese (URSI *et al.,* 2003). Experimentos de cultivo no mar na região sudeste do país (Ubatuba, SP) demonstraram que essas linhagens apresentaram acentuada variação nas taxas de crescimento, com valores entre 0,8 a 4,6 $\%.d^{-1}$ (URSI, 2005). Contudo, esse mesmo estudo sugere que o desempenho dessas linhagens possa ser aumentado, desde que o cultivo seja realizado na região de ocorrência natural da espécie.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, me-*CE*; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas no mar por 120 dias, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm em dois períodos distintos (chuvoso e seco). As taxas de crescimento foram avaliadas mensalmente; o conteúdo pigmentar (clorofila *a,* ficobiliproteínas e carotenos totais) no início e ao final do experimento; e o rendimento e qualidade de polissacarídeos ao final dos experimentos. Os dados obtidos foram analisados levando-se em consideração as variáveis ambientais avaliadas durante os períodos experimentais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

Foram utilizadas quatro linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae*: espécimes de coloração vermelha (selvagem) procedentes do Estado do Rio Grande do Norte (*vm*-RN) e espécimes de coloração vermelha (selvagem) (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE) obtidos por propagação vegetativa de talos tetrasporofíticos provenientes do "Banco de germoplasma de algas gracilarioides" do Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM), IBUSP. As procedências das linhagens utilizadas neste estudo estão descritas no Capítulo 1, item 3.1. As condições gerais de cultivo em laboratório empregadas na manutenção e propagação das linhagens podem ser visualizadas no Capítulo 1, item 3.2.

2.2. Local de cultivo

Os cultivos foram realizados na praia de Rio do Fogo, município de Rio do Fogo (RN). A descrição do local é apresentada com mais detalhes no Capítulo 1, item 3.3.

2.3. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura da água, salinidade, pH e transparência da água) foram registrados mensalmente, simultaneamente à pesagem de massa fresca. Amostras de água foram coletadas no local para determinação do nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN = NH_4^+ + NO_3^- + NO_2^-) e o ortofosfato (PO_4^{-3}). A obtenção dos dados climatológicos e determinação dos parâmetros físico-químicos da água obtidos nesse estudo estão descritos no Capítulo 1, item 3.4.

2.4. Delineamento experimental

Ramos apicais de três indivíduos diferentes (repetições) de cada uma das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) foram cultivados no mar por 120 dias em dois períodos distintos: i, abril a agosto/2009 (chuvoso); e ii, janeiro a maio/2011 (seco). Para isso, foram utilizados três módulos de cultivo, e cada um deles foi posicionado a 30, 50 e 80 cm de profundidade. Os materiais utilizados e a confecção dos módulos são apresentados no Capítulo 1, item 3.5.1. O delineamento amostral utilizado para a distribuição das linhagens nas estruturas de cultivo está representado no Capítulo 1, item 3.5.2. A proposta inicial previa a realização do cultivo durante o período seco entre os meses de outubro/2009 a fevereiro/2010. Entretanto, uma forte ressaca ocasionou a perda de uma das estruturas. Por esse motivo, o novo ciclo de cultivo só foi iniciado em janeiro de 2011, após os períodos de ressaca.

A massa fresca de cada uma das mudas distribuídas nas estruturas de cultivo foi avaliada mensalmente durante 4 meses. A determinação das taxas de crescimento é descrita no Capítulo 1, item 3.6. Ao final dos ciclos de cultivo (120 dias) dos dois períodos (chuvoso e seco), representantes de cada linhagem (três repetições) cultivadas nas três profundidades foram armazenados em caixas de isopor com gelo e transportados para o Laboratório de Macroalgas Marinhas, DOL, UFRN. Após a avaliação da massa fresca, as amostras foram destinadas à quantificação dos pigmentos (Cl*a*, FE, FC, ALC e CT) e ao rendimento e qualidade do polissacarídeo.

2.5. Determinação do conteúdo pigmentar

O conteúdo pigmentar foi avaliado para as 4 linhagens de *Gracilaria birdiae* no início e após os cultivos por 120 dias nas diferentes profundidades e nos dois períodos distintos (chuvoso e seco). Amostras de 200 mg (massa fresca), em triplicata, foram selecionadas e lavadas em água destilada, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, essas amostras foram armazenadas a –70°C até o momento de transportá-las para o Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM), IBUSP, onde foram realizados os procedimentos de extração (ver Capítulo 1, item 3.7).

2.6. Rendimento e qualidade do polissacarídeo

O excedente de massa fresca das quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* proveniente dos cultivos realizados nas três profundidades e nos dois períodos distintos (chuvoso e seco) foi lavado em água corrente para remoção de sedimento e epífitas, e posteriormente seco em estufa a 60 ^{o}C (24h).

2.6.1. Rendimento

A extração do ágar nativo foi realizada de acordo com o método descrito por MARINHO-SORIANO *et al.* (1999), com modificações. Para isso, foram utilizadas 200mg de alga seca e 20 ml da água destilada, que foram submetidos por 1 h a temperatura de 110 ^{o}C em autoclave. O extrato foi filtrado e o resíduo submetido novamente ao procedimento de extração. O gel foi resfriado a temperatura ambiente e em seguida, congelado e mantido a -15 ^{o}C durante a noite. As amostras foram descongeladas e lavadas com água destilada, para remoção das impurezas, sendo colocadas para secar durante 24h a 60 ^{o}C. O rendimento do ágar (%) foi calculado como porcentagem de matéria seca.

2.6.2. 3,6-anidrogalactose

As concentrações de 3,6-anidrogalactose foram determinadas utilizando-se o método colorimétrico descrito por MATSUHIRO (1995). Para isso, 25mg de ágar (seco) foram dissolvidos em 40 ml de água Mili-Q em banho-maria a 80 – 85 ^{o}C (90 - 120 min). As amostras foram resfriadas em banho de gelo e o volume completado para 50 mL com água Mili-Q. Em seguida, 10 mL dessa solução foi diluída com adição de 5 mL de água Mili-Q. Em um tubo Falcon, foram adicionados 2 mL dessa solução diluída, 2 ml de água Mili-Q, 0,5 ml

de timol 5% e 5 ml de cloreto férrico 0,5%. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas em banho-maria (80 ^{o}C) por 13 min e resfriadas em banho de gelo. Após esses procedimentos, foram adicionados às amostras 10 ml de etanol 98%, para finalmente serem analisadas em espectrofotômetro a 635nm. A quantificação de 3,6-anidrogalactose foi calculada utilizando-se uma curva de calibração construída a partir de uma solução padrão de frutose ($C_6H_{12}O_6$) de concentração 250 $\mu g.ml^{-1}$.

2.6.3. Teor de Sulfato

Os teores de sulfato foram determinados utilizando-se o método descrito por CRAIGIE & LEIGH (1978). Para isso, amostras de 30mg de ágar seco foram umedecidas em 100µL de etanol 95% e 500 µL de HCl 0,5N. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas em água fervente por 2h, e o volume completado para 10 mL com água Mili-Q. Posteriormente, essas amostras foram centrifugas em 12.000 rpm durante 15 min em temperatura ambiente. Após esse período, 2 mL do sobrenadante foram dissolvidos em 18 mL de água Mili-Q, 2 mL de HCl 0,5 N e 1 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. As amostras foram homogeneizadas e permaneceram durante 30 min sob temperatura ambiente, para finalmente serem analisadas em espectrofotômetro a 550 nm. A quantificação do sulfato (%) foi calculada utilizando-se uma curva de calibração construída a partir de uma solução padrão de sulfato de sódio (Na_2SO_4) de concentração 3,12 $\mu mol.L^{-1}$.

2.7. Análises dos dados

As taxas de crescimento foram submetidas à análise de variância com medidas repetidas, para verificar possíveis diferenças entre as linhagens, ao longo do tempo (30, 60, 90 e 120 dias) e entre as profundidades (30, 50 e 80 cm). A concentração dos diferentes pigmentos (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT), rendimento do ágar e teores de 3,6-anidrogalactose e sulfato foram submetidos à análise de variância multifatorial para verificar possíveis diferenças entre as linhagens e as profundidades, nas estações chuvosa e seca. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls foi usado. O teste t-Student foi empregado para comparar as concentrações dos diferentes pigmentos (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) antes e após os 120 dias de cultivo nas três profundidades e nas duas estações. Esse teste foi também utilizado para identificar as possíveis diferenças nos parâmetros ambientais entre as estações chuvosa e seca. A Correlação de Pearson foi

utilizada para determinar as relações existentes entre os diferentes parâmetros ambientais. Todas as análises foram realizadas no programa Statistica (versão 7.1).

3. Resultados

3.1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros ambientais registrados durante este estudo apresentaram diferenças significativas entre as estações (chuvosa e seca) (Tabela 1). Os valores médios de temperatura para as estações chuvosa e seca foram de 27,5 ± 1,4^{o}C e 30,0 ± 0,8^{o}C, respectivamente ($t=3,45$; $p<0,05$). A salinidade manteve-se constante durante o período seco com média de 34,6 ± 0,4 ups, enquanto que, durante a estação chuvosa, foi registrada uma redução significativa de 33,5 ups para 23,2 ups ($F=105,29$; $p<0,05$). A transparência da água apresentou seus valores mais elevados durante a estação seca, sendo registradas correlações positivas com PAR ($r=0,82$; $p<0,05$), temperatura ($r=0,77$; $p<0,05$) e salinidade ($r=0,90$; $p<0,05$). Os valores médios de transparência da água obtidos para as estações chuvosa e seca foram 46,0 ± 40,7cm e 95,0 ± 20,3cm, respectivamente ($t=2,41$; $p<0,05$). Quanto aos nutrientes, o DIN (NH_4^+ + NO_3^- + NO_2^-) esteve mais elevado durante a estação chuvosa, sendo registrado o valor máximo em maio/09 (17,24 ± 0,08 µmol.L^{-1}). Os valores médios para a estação chuvosa e seca foram de 7,58 ± 5,56 µmol.L^{-1} e 3,11 ± 2,18 µmol.L^{-1}, respectivamente ($t=3,14$; $p<0,05$). Nos meses de abril e maio/09 (estação chuvosa), o NH_4^+ foi o nutriente que mais contribuiu para a concentração final do DIN (98,8% e 76,8%, respectivamente). Nos meses seguintes, houve uma inversão gradual e a concentração do NO_3^- aumentou, alcançando 58,6%, 70% e 73,7%, nos meses de junho, julho e agosto/09, respectivamente. Durante a estação seca, o NH_4^+ foi o nutriente que mais contribuiu para a concentração final do DIN (entre 85,4% e 93,1%). O NO_2^- foi o que apresentou menor contribuição ao DIN (entre 0,4% e 4,1%), com valores médios de 0,11 ± 0,06 µmol.L^{-1} e 0,04 ± 0,02 µmol.L^{-1} ($t=4,69$; $p<0,05$), nas estações chuvosa e seca, respectivamente. O PO_4^{-3} apresentou valores relativamente baixos, apresentando uma variação de 0,16 ± 0,01 µmol.L^{-1} a 0,37 ± 0,00 µmol.L^{-1}, na estação chuvosa e 0,26 ± 0,01 µmol.L^{-1} a 0,35 ± 0,02 µmol.L^{-1} na estação seca ($t=2,36$; $p<0,05$).

Tabela 1. Dados climatológicos e parâmetros físico-químicos (variação e média ± desvio padrão) da água do mar na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, registrados durante as estações chuvosa (período entre abril e agosto de 2009) e seca (período entre janeiro e maio de 2011).

	Estação chuvosa		Estação seca		*t*-value	P
	Mín - Máx	Média ± DesvPad	Mín - Máx	Média ± DesvPad		
Precipitação (mm/mês)	229,2 – 372,3	321,8 ± 58,1	76,5 – 368,3	229,5 ± 121,3	2,43	<0,05*
PAR (µmol.photons.m^{-2}.s^{-1})	1478,6 – 1953,7	1734,2 ± 236,9	1766,1 – 2127,4	1964,9 ± 147,0	1,85	0,10
Vel. Vento (m.s^{-1})	3,79 – 8,00	5,80 ± 1,55	6,07 – 7,38	6,66 ± 0,63	2,03	<0,05*
Temperatura (^{o}C)	26,5 – 29,0	27,5 ± 1,4	29,0 – 31,0	30,0 ± 0,8	3,45	<0,05*
Salinidade (ups)	33,5 – 23,5	28,5 ± 4,9	34,0 – 35,0	34,6 ± 0,4	2,78	<0,05*
pH	7,5 – 8,6	8,1 ± 0,4	7,6 – 8,2	7,9 ± 0,2	0,87	0,41
Transparência (cm)	10,0 – 95,0	46,0 ± 40,7	70,0 – 125,0	95,0 ± 20,3	2,41	<0,05*
NO_2^- (µmol.L^{-1})	0,05 – 0,21	0,11 ± 0,06	0,02 – 0,07	0,04 ± 0,02	4,69	<0,05*
NO_3^- (µmol.L^{-1})	0,03 – 3,92	2,66 ± 1,62	0,07 – 3,92	0,91 ± 1,68	3,11	<0,05*
NH_4^+ (µmol.L^{-1})	0,68 – 13,24	4,81 ± 5,21	0,96 – 3,82	2,16 ± 1,14	2,08	<0,05*
DIN (µmol.L^{-1})	2,98 – 17,24	7,59 ± 5,56	1,13 – 6,37	3,11 ± 2,18	3,14	<0,05*
PO_4^{-3} (µmol.L^{-1})	0,16 – 0,37	0,24 ± 0,08	0,26 – 0,35	0,29 ± 0,04	2,36	<0,05*

* diferenças significativas (p<0,05)

3.2. Cultivo no mar – estação chuvosa

Durante o período chuvoso, foram observadas diminuições significativas nas taxas de crescimento das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* ao longo do tempo e profundidades (Figura 1, Tabela 2). As TCs variaram de: 5,26±0,07 %.d^{-1} a 1,35±0,19 %.d^{-1} (*vm*-CE); 4,73±0,81 %.d^{-1} a 0,47±0,14 %.d^{-1} (*me*-CE); 3,47±0,87 %.d^{-1} a -0,21±0,27 %.d^{-1} (*vd*-CE); e 1,41±0,51 %.d^{-1} a -0,76±0,19 %.d^{-1} (*vm*-RN). As maiores TCs foram obtidas nos primeiros 30 e/ou 60 dias de cultivo nas profundidades de 30 cm e/ou 50 cm, dependendo da linhagem, enquanto que as menores foram registradas no final do cultivo (120 dias) e nas profundidades de 0,50m e/ou 0,80m, de acordo com a linhagem.

Embora tenham sido utilizadas plantas tetrasporofíticas inférteis, pôde-se constatar em laboratório que ao final do cultivo (120 dias), a maioria dos talos apresentou-se fértil. Esse fato pôde ser observado também nas pesagens das mudas durante o cultivo, pois em algumas ocasiões, foi evidenciada a germinação de tetraspóros *in situ*, a partir do crescimento de pequenos talos gametofíticos epífitos no tetrasporófito.

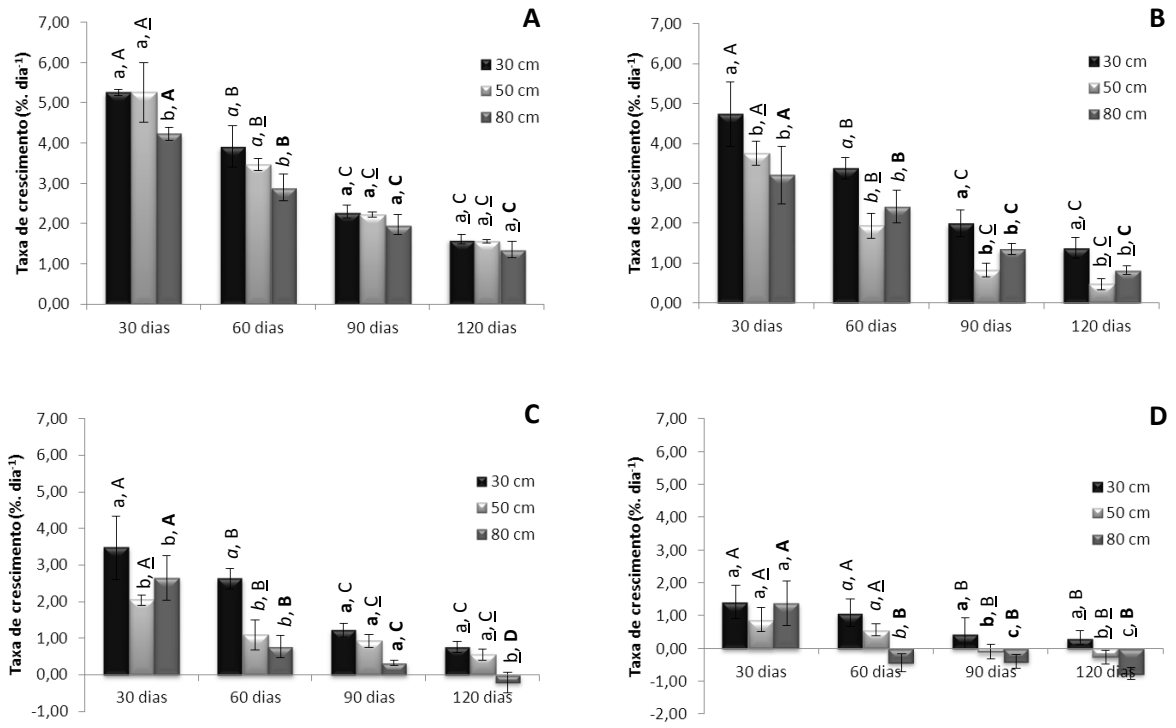

Figura 1. Taxas de crescimento das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 dias, durante a estação chuvosa. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas (p<0,05). Formatações utilizadas (regular, itálico, negrito e sublinhado). Fator PROFUNDIDADE – letras minúsculas; Fator PERÍODO – letras MAIÚSCULAS.

Tabela 2. ANOVA multifatorial com amostras repetidas para as TCs das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante a estação chuvosa. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (tempo e profundidade).

Fonte de variação	gl		*vm*-CE	*me*-CE	*vd*-CE	*vm*-RN
Tempo (A)	1	*F*	217,40	103,59	66,96	28,40
		p	**	**	**	**
Profundidade (B)	2	*F*	15,15	27,62	30,29	17,87
		p	**	**	**	**
A x B	2	*F*	1,94	1,63	3,98	2,99
		p	n.s.	n.s.	**	*

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

Em alguns casos, as linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram TCs semelhantes entre as profundidades. A linhagem vermelha (*vm*-CE) (Figura 1A) apresentou semelhanças nas TCs a 30 e 50 cm de profundidades nos intervalos de 30 e 60 dias de cultivo, sendo superiores às TCs obtidas a 80cm. Nos intervalos de 90 e 120 dias, as TCs dessa linhagem foram semelhantes nas três profundidades.

A linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentou seu melhor desenvolvimento na profundidade de 30 cm (Figura 1B). As TCs obtidas nas profundidades de 50 e 80 cm foram semelhantes em todos os intervalos estudados e inferiores às obtidas em 30 cm.

A linhagem verde (*vd*-CE) apresentou TCs mais elevadas na profundidade de 30 cm e semelhantes entre 50 e 80 cm até 60 dias de cultivo (Figura 1C). No intervalo seguinte, as TCs tornaram-se semelhantes para as três profundidades. Ao final do cultivo (120 dias), as TCs registradas a 80 cm sofreram uma queda significativa, atingindo valores negativos (-0,21 ± 0,27 $\%.dia^{-1}$).

A linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) foi a que apresentou TCs mais baixas, desde o início do cultivo (Figura 1D). Apenas na profundidade de 30 cm foram observadas TCs positivas para essa linhagem durante todos os intervalos de cultivo, enquanto que a 80 cm, somente foi registrada TC positiva nos primeiros 30 dias de cultivo (1,41 ± 0,51 $\%.dia^{-1}$).

As TCs negativas registradas nas linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) foram ocasionadas por perdas de biomassa, que passou a ser inferior ao inóculo inicial. Nessas linhagens, foram constatados sinais de despigmentação e talos quebradiços, o que pode ter favorecido a fragmentação e consequentemente redução de biomassa e TCR.

Nos últimos dias de cultivo (120 dias) foram observados fortes sinais de herbivoria em praticamente todas as linhagens e com perdas significativas de biomassa.

3.3. Cultivo no mar – estação seca

Semelhante ao que ocorreu na estação chuvosa, durante o cultivo na estação seca todas as linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram redução significativa nas TCs ao longo do tempo (Figura 2, Tabela 3). As TCs variaram de: 5,56±0,17 $\%.d^{-1}$ a 1,14±0,07 $\%.d^{-1}$ (*vm*-CE); 4,40±0,48 $\%.d^{-1}$ a 0,80±0,05 $\%.d^{-1}$ (*me*-CE); 4,88±0,67 $\%.d^{-1}$ a 0,68±0,12 $\%.d^{-1}$ (*vd*-CE); e 5,42±0,18 $\%.d^{-1}$ a 1,20±0,19 $\%.d^{-1}$ (*vm*-RN). As maiores TCs foram obtidas nos primeiros 30 e/ou 60 dias de cultivo, nas profundidades de 30 cm e/ou 50 cm, dependendo da linhagem,

enquanto que as menores foram registradas no final do cultivo após 90 e/ou 120 dias e nas profundidades de 0,50m e/ou 0,80m, de acordo com a linhagem.

Durante o cultivo nessa estação, foram também observadas plantas férteis, como já descrito na estação chuvosa.

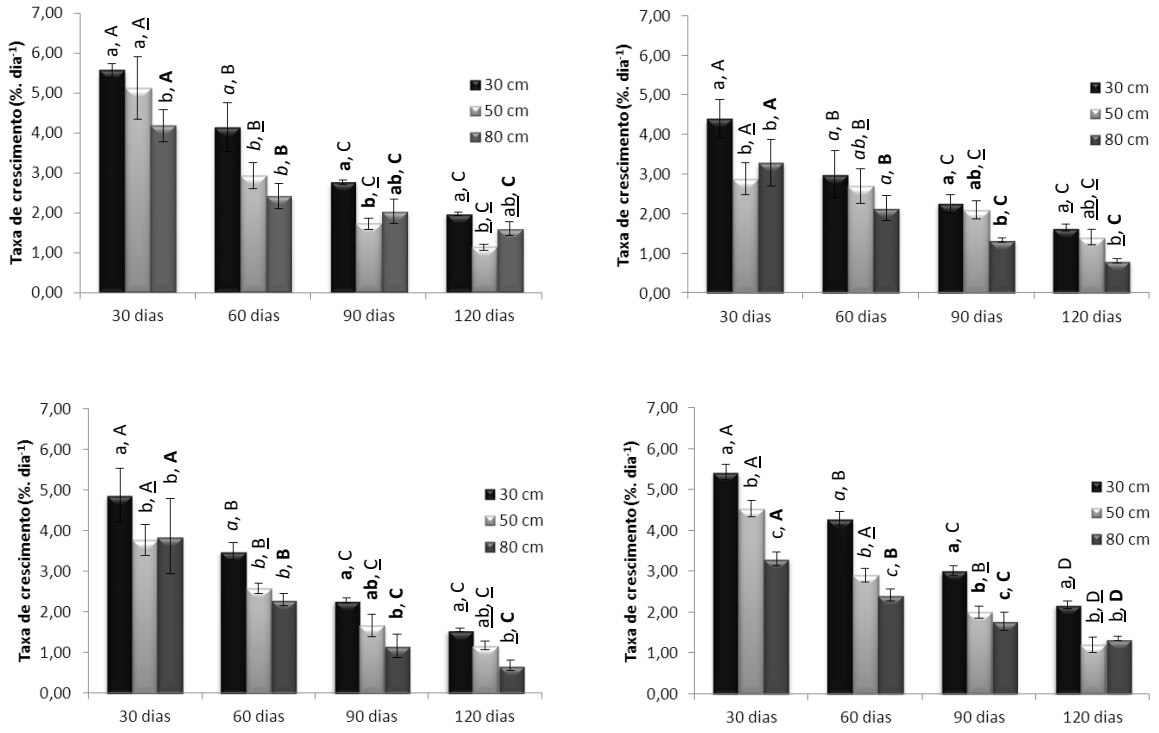

Figura 2. Taxas de crescimento das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 dias, durante a estação seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$). Formatações utilizadas (regular, itálico, negrito e sublinhado). Fator PROFUNDIDADE – letras minúsculas; Fator PERÍODO – letras MAIÚSCULAS.

Tabela 3. ANOVA multifatorial com amostras repetidas para as TCs das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante a estação seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (tempo e profundidade).

Fonte de variação	gl		*vm*-CE	*me*-CE	*vd*-CE	*vm*-RN
Período (A)	1	*F*	153,34	65,14	112,59	517,40
		p	**	**	**	**
Profundidade (B)	2	*F*	29,76	20,55	24,64	276,18
		p	**	**	**	**
A x B	2	*F*	3,36	2,75	0,69	13,88
		p	*	*	n.s.	**

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

As TCs da linhagem vermelha (*vm-CE*) (Figura 2A) apresentou semelhanças entre as profundidades de 30 e 50 cm nos primeiros 30 dias de cultivo, sendo superiores às TCs obtidas a 80cm. Nos intervalos de 60, 90 e 120 dias as TCs registradas a 50 e 80 cm foram similares entre si e inferiores às encontradas na profundidade de 30cm.

A linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentou TCs superiores às demais, apenas no período de 30 dias e na profundidade de 30 cm. Após 60 dias de cultivo, o crescimento foi similar nas três profundidades. Ao final do experimento (90 e 120 dias), as TCs obtidas a 50 cm apresentaram valores intermediários àquelas obtidas nas profundidades de 30 e 80 cm (Figura 2B).

Diferentemente do período chuvoso, as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas na estação seca não apresentaram TCs negativas. Em ambas linhagens, as TCs foram superiores quando cultivadas a 30 cm (Figuras 2C e D). As TCs da linhagem verde (*vd*-CE) foram similares entre 50 e 80 cm durante todo cultivo, enquanto que para a vermelha-nativa (*vm*-RN) o crescimento nessas profundidades só apresentaram semelhanças no último período de cultivo.

3.4. Comparação das taxas de crescimento entre as estações chuvosa e seca

As TCs das linhagens de *Gracilaria birdiae* nas duas estações estudadas foram comparadas utilizando-se as TCs médias obtidas até os 60 dias. Essa decisão foi tomada com base na análise de massa fresca utilizada nos cálculos de TCs. Na maioria dos casos, embora

as TCs tenham reduzido, os valores de massa fresca atingiram o seu valor máximo em 60 dias de cultivo. Ao final do cultivo, foram constatados sinais de herbivoria e, em alguns casos, perdas significativas de biomassa com registros de valores inferiores ao inóculo inicial (120 dias de cultivo). As TCs médias (60 dias) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas nas três profundidades (30, 50 e 80 cm) e nas duas estações, podem ser visualizadas na Tabela 4. A análise de variância multifatorial revelou diferenças significativas nas TCs entre as estações, entre as profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 5).

Tabela 4. Taxas de crescimento médias (%.d^{-1}) (60 dias) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE), verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca.

Profundidades	**30 cm**	**50 cm**	**80 cm**
Estação chuvosa			
vm-CE	4,58 ± 0,95^{a}	4,36 ± 1,26^{a}	3,56 ± 0,95^{a}
me-CE	4,05 ± 0,96^{a}	2,84 ± 1,29^{b}	2,81 ± 0,56^{b}
vd-CE	3,05 ± 0,59^{b}	1,56 ± 0,68^{c}	1,71 ± 1,33^{c}
vm-RN	1,25 ± 0,23^{c}	0,72 ± 0,22^{d}	0,48 ± 1,28^{d}
Estação seca			
vm-CE	4,85 ±0,95^{a}	4,03 ± 1,00^{a}	3,30 ± 0,43^{a}
me-CE	3,70 ± 0,61^{b}	2,79 ± 0,59^{b}	2,71 ± 0,60^{a}
vd-CE	4,19 ± 0,86^{b}	3,18 ± 0,73^{b}	3,09 ± 0,75^{a}
vm-RN	4,86 ± 0,91^{a}	3,72 ± 0,89^{a}	2,86 ± 0,47^{a}

Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as linhagens para cada profundidade, separadamente ($p<0,05$)

Tabela 5. ANOVA multifatorial para as TCs médias (60 dias) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE), verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de Variação	gl	MS	F	*P*
Estação (A)	1	18,88	203,04	**
Profundidade (B)	2	10,06	108,22	**
Linhagem (C)	3	10,46	112,49	**
A x B	2	0,15	1,66	0,20
A x C	3	10,16	108,80	**
B x C	6	0,26	2,76	*
A x B x C	6	0,24	2,51	*

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001)

As TCs da linhagem vermelha (*vm-CE*) e marrom-esverdeada (*me*-CE) não diferiram entre as estações em nenhuma profundidade. Quando comparados os valores para cada estação, as TCs da vermelha (*vm*-CE) foram mais elevadas no cultivo a 30 e 50 cm de profundidade durante a estação chuvosa e a 30 cm na estação seca. As menores taxas foram registradas na profundidade de 80 cm em ambas estações (Figura 3A).

Com relação à linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), as TCs foram superiores na profundidade de 30 cm e semelhantes a 50 e 80 cm, nas duas estações (Figura 3B). Apenas as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram diferenças nas TCs entre as estações. Em ambas linhagens, as TCs foram superiores quando cultivadas durante o período seco e a 30 cm de profundidade. Para essas linhagens, as menores taxas foram registradas nas profundidades de 50 e/ou 80 cm, nas duas estações do ano (Figuras 3C e D).

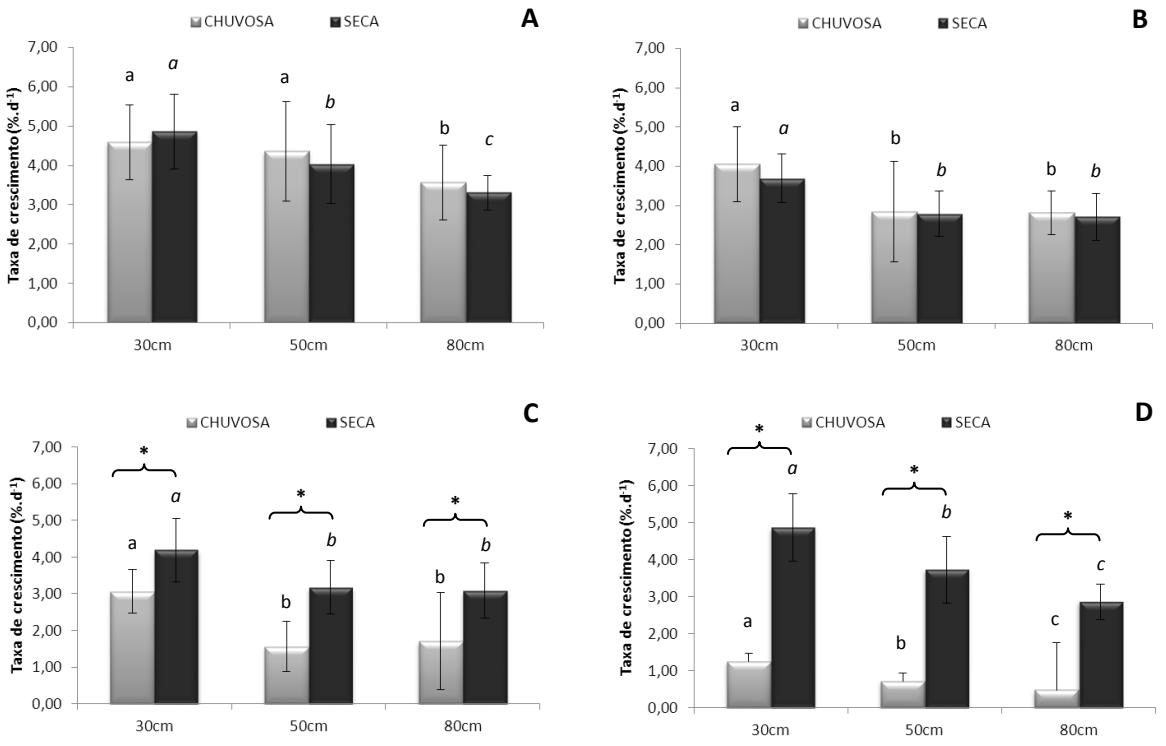

Figura 3. Taxas de crescimento médias (60 dias) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação (estilo de fonte) sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre as profundidades ($p<0,05$) e o símbolo (*) indica diferenças significativas entre as estações (chuvosa e seca).

3.5. Comparação das taxas de crescimento entre as linhagens

Quando comparadas as TCs entre as linhagens, essas apresentaram diferenças significativas em determinadas situações. Durante o período chuvoso, as TCs das quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* diferiram entre si, em todas as profundidades (Tabela 4). A linhagem vermelha (*vm*-CE) apresentou TCs mais elevadas quando comparadas às demais, em todas as profundidades, com exceção à marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivada a 30 e 50 cm, nas quais exibiram TCs semelhantes à vermelha (*vm*-CE).

As TCs da linhagem marrom-esverdeada foram maiores do que as da verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-CE), nas três profundidades. Entre essas duas últimas, as TCs foram mais elevadas na linhagem verde (*vd*-CE), nas três profundidades.

No período seco, apenas as TCs obtidas a 80 cm foram similares para as quatro linhagens. As linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram também TCs semelhantes nas demais profundidades. Ambas as linhagens, quando cultivadas a 30 e 50 cm, exibiram TCs superiores às linhagens marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). Entre essas duas últimas, as TCs foram semelhantes nas três profundidades (Figura 3).

3.6. Composição pigmentar

As concentrações dos diferentes pigmentos (ficoeritrina, FE; ficocianina, FC; aloficocianina, AFC; clorofila *a*, Cl*a*; e carotenoides totais, CT) extraídos das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) antes do início do cultivo no mar (laboratório) podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6. Conteúdos pigmentares (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) obtidos antes do início dos cultivos no mar.

	FE	FC	AFC	Cl*a*	CT
***vm*-CE**	480,5 ± 6,63[a]	132,8 ± 35,23[a]	69,5 ± 3.42[a]	178,3 ± 17,45[a]	31,1 ± 1,25[a]
***me*-CE**	488,2 ± 20,81[a]	160,1 ± 16,46[a]	79,3 ± 2,54[b]	171,6 ± 14,18[a]	28,4 ± 3,04[a]
***vd*-CE**	161,0 ± 19,19[b]	215,8 ± 27,41[b]	83,4 ± 8,08[b]	176,7 ± 17,64[a]	28,3 ± 3,05[a]
***vm*-RN**	335,7 ± 26,17[c]	67,8 ± 2,56[c]	44,2 ± 4,42[c]	157,9 ± 22,11[a]	27,1 ± 3,81[a]

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as linhagens para cada pigmento separadamente

As concentrações das ficobiliproteínas (ficoeritrina, FE; ficocianina, FC; e aloficocianina, AFC) analisadas a partir das plantas obtidas antes do início dos cultivos no mar (laboratório) apresentaram concentrações diferentes em determinadas situações (tabela 6). As concentrações de FE da linhagem vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) foram similares. Ambas as linhagens exibiram concentrações superiores à verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN), tendo essa última, apresentado valores intermediários.

Quanto à FC extraída das plantas do laboratório, a linhagem verde (*vd*-CE) foi a que apresentou as concentrações mais elevadas das quatro linhagens. As linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) exibiram valores intermediários e a vermelha-nativa (*vm*-RN) as menores concentrações.

Com relação à AFC extraída das plantas do laboratório, as concentrações mais elevadas foram registradas para as linhagens marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE), com valores intermediários para a vermelha (*vm*-CE) e menores para a vermelha-nativa (*vm*-RN).

As concentrações de Cl*a* (F = 0,79; p = 0,532) e CT (F = 1,02; p = 0,435) extraídas das plantas do laboratório foram semelhantes entre as linhagens.

A composição pigmentar (FE, FC, AFC, Cla e CT) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentou diferenças significativas quando comparados os valores obtidos antes do início dos cultivos e os registrados após 120 dias, nas três profundidades (30, 50 e 80 cm) e nas estações chuvosa e seca (Tabela 7). Contudo, alguns dos pigmentos extraídos de indivíduos cultivados a 80 cm não apresentaram essas diferenças. Essas exceções foram encontradas nas linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) as quais não apresentaram variações nas concentrações de AFC e Cl*a* antes e após 120 dias de cultivo em ambas estações (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os valores de conteúdo pigmentar (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) obtidos no início dos cultivos no mar (LAB) e após 120 dias de cultivo na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, Brasil, durante as estações chuvosa e seca.

		CHUVOSA				SECA			
Pigmentos		***vm*-CE**	***me*-CE**	***vd*-CE**	***vm*-RN**	***vm*-CE**	***me*-CE**	***vd*-CE**	***vm*-RN**
FE	*t*	110,03	23,68	12,00	18,99	46,90	30,12	10,62	9,26
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
FE	*t*	110,81	35,92	8,91	16,57	13,52	22,91	7,74	14,43
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
FE	*t*	91,97	29,07	10,32	16,91	28,44	32,08	8,76	7,80
(LAB x 80 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
FC	*t*	5,72	10,89	12,60	16,31	4,13	8,45	12,05	9,31
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
FC	*t*	5,91	14,84	11,79	26,44	4,72	7,32	10,37	22,47
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
FC	*t*	5,91	14,45	12,18	18,27	5,58	14,13	11,77	3,18
(LAB x 80 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
AFC	*t*	12,60	12,32	6,11	4,02	10,18	23,34	7,99	3,92
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
AFC	*t*	23,92	10,20	4,05	3,71	12,76	23,22	4,70	5,11
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
AFC	*t*	19,31	8,79	2,63	1,09	4,38	15,89	2,64	2,15
(LAB x 80 cm)	P	*	*	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	n.s.
Cl*a*	*t*	6,72	7,45	4,93	6,84	3,52	3,21	4,83	3,57
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
Cl*a*	*t*	6,45	5,82	5,80	6,42	2,75	4,20	4,61	2,84
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
Cl*a*	*t*	4,34	9,66	2,59	2,21	4,26	5,60	2,61	3,21
(LAB x 80 cm)	p	*	*	n.s.	n.s.	*	*	*	*
CT	*t*	23,97	12,06	12,22	10,60	5,11	5,54	5,09	4,31
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
CT	*t*	32,01	11,29	11,76	10,40	8,15	7,06	4,16	3,29
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	*	*	*	*	*
CT	*t*	32,01	12,03	10,95	9,09	10,76	6,60	2,75	1,72
(LAB x 80 cm)	p	*	*	*	*	*	*	n.s.	n.s.

* diferenças significativas (p<0,05); n.s. não-significativo

As interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagens), avaliadas para os diferentes pigmentos (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) extraídos das linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas por 120 dias no mar são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. ANOVA multifatorial para a composição pigmentar (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de variação	gl		FE	FC	ALC	Cl*a*	CT
Estação (A)	1	F	240,52	15,13	2,60	19,37	511,87
		p	**	*	n.s.	**	**
Profundidade (B)	2	F	2,91	0,69	18,01	100,80	3,65
		p	n.s.	n.s.	**	**	*
Linhagem (C)	3	F	85,01	2,87	20,93	5,05	3,63
		p	**	*	**	*	*
A x B	2	F	6,36	0,41	23,58	4,19	1,34
		p	*	n.s.	**	*	n.s.
A x C	3	F	34,93	2,83	30,44	3,80	3,13
		p	**	*	**	*	*
B x C	6	F	27,28	10,24	25,39	7,68	3,82
		P	**	**	**	**	*
A x B x C	6	F	22,12	6,97	15,28	1,28	1,84
		P	**	**	**	n.s.	n.s.

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

3.6.1. Ficoeritrina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de ficoeritrina (FE) das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 8).

As concentrações de FE verificadas na linhagem vermelha (*vm*-CE) apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, em todas as profundidades testadas (Figura 4A), sendo mais elevadas no período seco. Os maiores valores foram verificados a 50 cm de profundidade, durante o período seco, e os menores, nessa mesma profundidade, durante o período chuvoso.

Para a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), foram também constatadas diferenças na concentração de FE entre as duas estações e em todas as profundidades testadas (Figura 4B). Os valores mais elevados foram obtidos durante o período seco, com exceção ao registrado para a profundidade de 30 cm, em que a concentração foi mais elevada no período chuvoso.

A linhagem verde (*vd*-CE) não apresentou diferenças nas concentrações de FE entre as estações chuvosa e seca, em nenhuma das profundidades testadas (Figura 4C). Durante o período chuvoso, os maiores valores foram registrados a 50 e 80 cm, enquanto que no período seco, esses valores foram registrados a 50 cm.

As concentrações de FE para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN), apresentaram diferenças significativas entre as estações nas profundidades de 30 e 80 cm (Figura 4D), sendo que os valores mais elevados ocorreram na estação seca, nos indivíduos cultivados a 80 cm.

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de FE em determinadas situações. Durante o período chuvoso, a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivada a 30 cm apresentou os valores mais elevados de FE em relação às outras linhagens cultivadas nessa mesma profundidade, que por sua vez, apresentaram valores semelhantes entre si. Na profundidade de 50 cm, a vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentou concentrações de FE mais elevadas do que as demais linhagens, que por sua vez, apresentaram valores semelhantes entre si. A 80 cm, as concentrações de FE foram semelhantes entre as linhagens.

No período seco, nos cultivos a 30 cm, as concentrações de FE registradas para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) foram mais elevadas do que as registradas para as demais linhagens, na mesma profundidade. As linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentaram valores intermediários, e a verde (*vd*-CE) foi a mais deficiente em FE. Para os cultivos a 50 cm, a linhagem vermelha (*vm*-CE) apresentou concentrações mais elevadas do que as demais linhagens; a marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram valores intermediários, e a verde (*vd*-CE) exibiu as concentrações mais baixas desse pigmento (Figura 4). Nos cultivos a 80 cm, a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentou concentrações de FE mais elevadas do que as demais linhagens, com valores intermediários para a vermelha (*vm*-CE) e menores para verde (*vd*-CE).

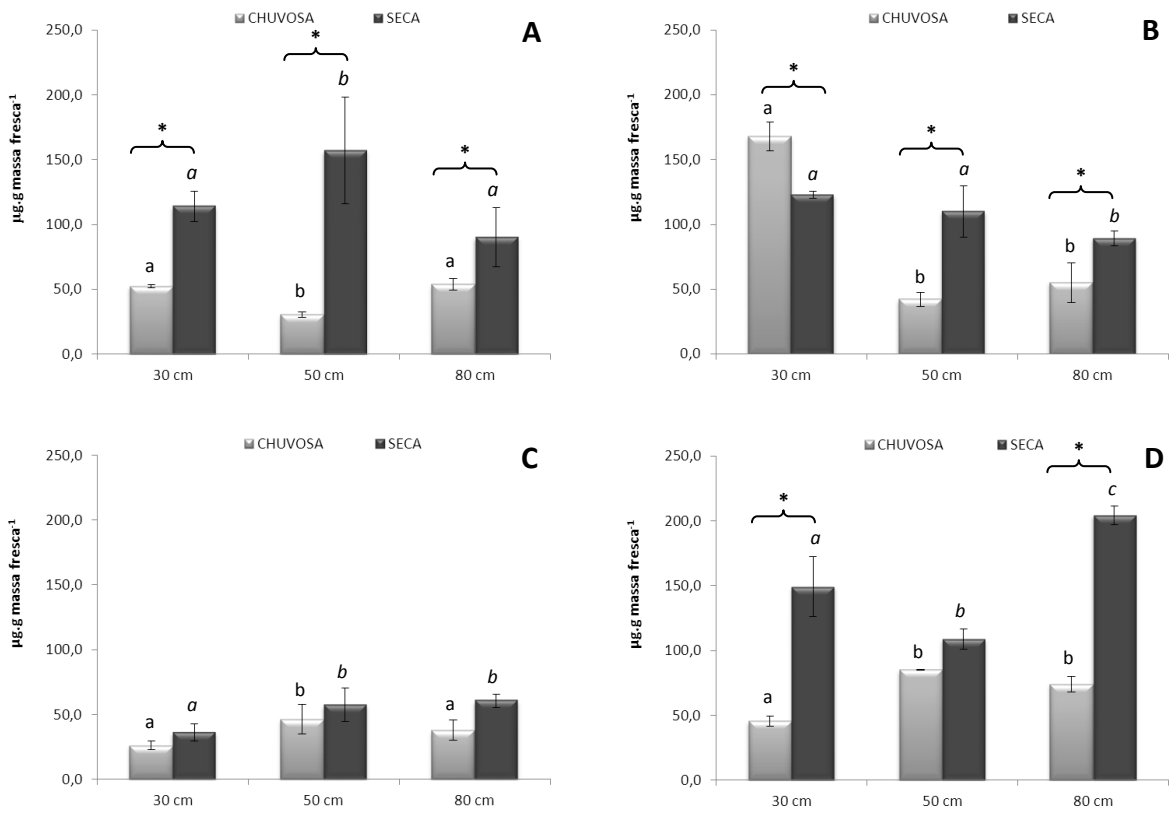

Figura 4. Concentração de ficoeritrina (FE) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as profundidades, e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.6.2. Ficocianina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações ficocianina (FC) das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 8).

Quando comparadas as duas estações, podemos observar que as concentrações de FC para a linhagem vermelha (*vm*-CE) não apresentaram diferenças significativas (Figura 5 A). Durante a estação chuvosa, as concentrações de FC para essa linhagem foram semelhantes entre as profundidades, enquanto que na estação seca, foram registradas concentrações mais elevadas de FC nos indivíduos cultivados a 30 e 50 cm de profundidade.

Para linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), não foram constatadas diferenças significativas na concentração de FC entre as duas estações (Figura 5B). Durante o período

chuvoso, os maiores valores de FC para essa linhagem foram observados na profundidade de 30 cm, enquanto que na estação seca, as concentrações mais elevadas foram registradas a 30 e 50 cm.

A linhagens verde (*vd*-CE) não apresentou diferenças nas concentrações de FC entre as estações e nem entre as profundidades (Figura 5C).

A vermelha-nativa (vm-RN), apresentou o valor mais elevado na estação seca, a 80 cm de profundidade (Figura 5D). As demais concentrações foram consideradas semelhantes.

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de FC em determinadas situações. Durante o período chuvoso, a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), cultivada a 30 cm, apresentou as concentrações de FC mais elevadas do que as demais cultivadas na mesma profundidade, que por sua vez, não diferiram entre si. Nas profundidades de 50 e 80 cm, as quatro linhagens apresentaram concentrações de FC semelhantes.

No período seco, a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada a 80 cm apresentou valores mais elevados de FC em relação as demais linhagens cultivadas na mesma profundidade (Figura 5). As demais linhagens apresentaram valores semelhantes entre si.

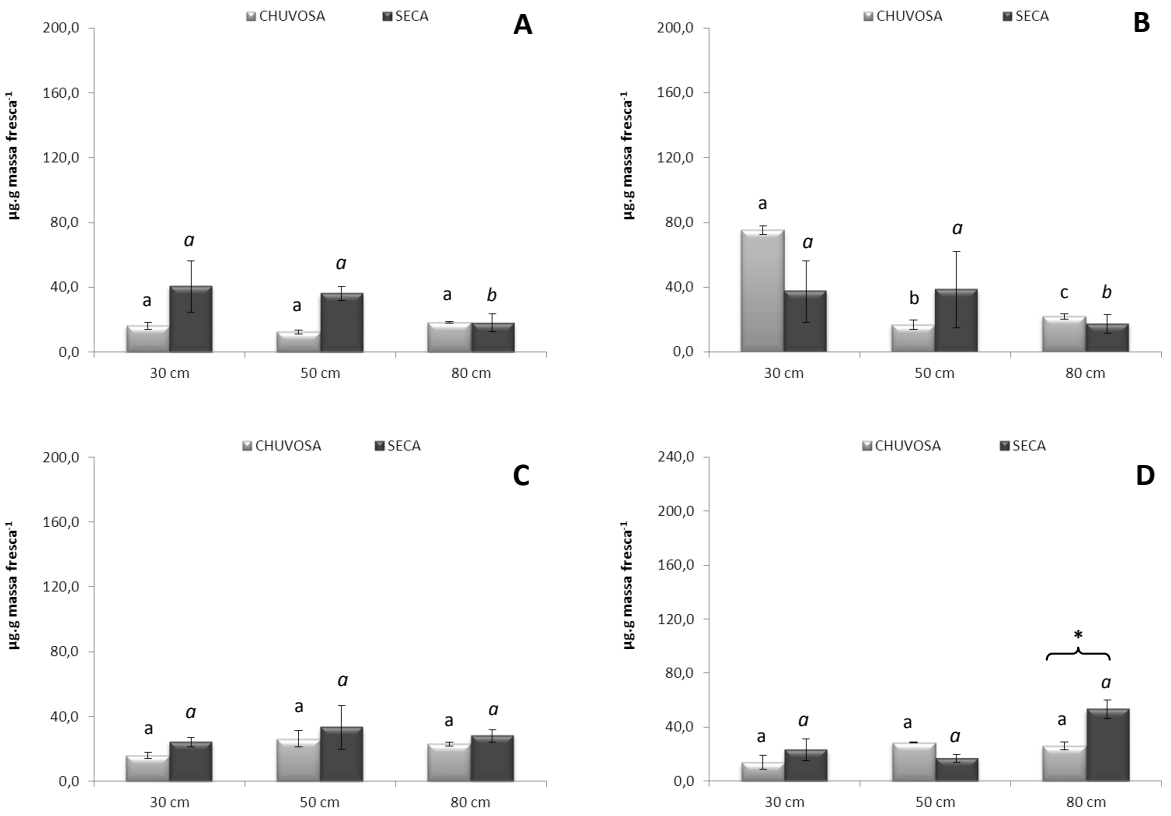

Figura 5. Concentração de ficocianina (FC) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as profundidades, e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.6.3. Aloficocianina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações aloficocianina (AFC) das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 8).

Quando comparadas as estações chuvosa e seca, as concentrações de AFC registradas na linhagem vermelha (*vm*-CE) foram semelhantes nas profundidades de 30 e 80 cm. Na profundidade de 50 cm as concentrações de AFC foram mais elevadas na estação seca (Figura 6A). Não houve diferenças significativas de AFC entre as profundidades durante essa estação.

Para linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), foram constatadas diferenças na concentração de AFC entre as duas estações, apenas na profundidade de 30 (Figura 6B),

sendo registrados valores mais elevados durante a estação chuvosa. Durante a estação seca, os valores de AFC registrados na profundidade de 50 cm, foram mais baixos do que aqueles obtidos a 30 e 80 cm.

A linhagem verde (*vd*-CE) não apresentou diferenças entre as profundidades durante o cultivo na estação chuvosa. Na estação seca, os valores mais elevados foram registrados a 80 cm e semelhantes nas demais profundidades (Figura 6C).

Para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN), foram registradas diferenças significativas nas concentrações de AFC entre as estações chuvosa e seca, nas profundidades de 50 e 80 cm (Figura 6D). Durante a estação chuvosa, as concentrações mais elevadas foram obtidas nos indivíduos cultivados a 50 cm, enquanto que na estação seca, os maiores valores foram verificados a 80 cm de profundidade.

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de AFC em algumas situações. Durante o período chuvoso, a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), cultivada a 30 cm, apresentou as concentrações de AFC mais elevadas do que as demais linhagens cultivadas na mesma profundidade. As demais linhagens apresentaram valores semelhantes entre si. Nos cultivos a 50 cm, as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram as concentrações de AFC mais elevadas, enquanto que a marrom-esverdeada (*me*-CE) exibiu valores intermediários e a vermelha (*vm*-RN), as concentrações mais baixas. Na profundidade de 80 cm, as concentrações de AFC foram semelhantes nas quatro linhagens.

No período seco, as linhagens cultivadas a 30 cm apresentaram concentrações de AFC semelhantes entre si. A linhagem verde (*vd*-CE) cultivada a 50 cm apresentou as concentrações de AFC mais elevadas do que as demais linhagens cultivadas na mesma profundidade, que por sua vez, apresentaram valores similares. Na profundidade de 80 cm, as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram valores semelhantes entre si e mais elevados do que as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE). Por sua vez, essas duas últimas apresentaram concentrações de AFC similares.

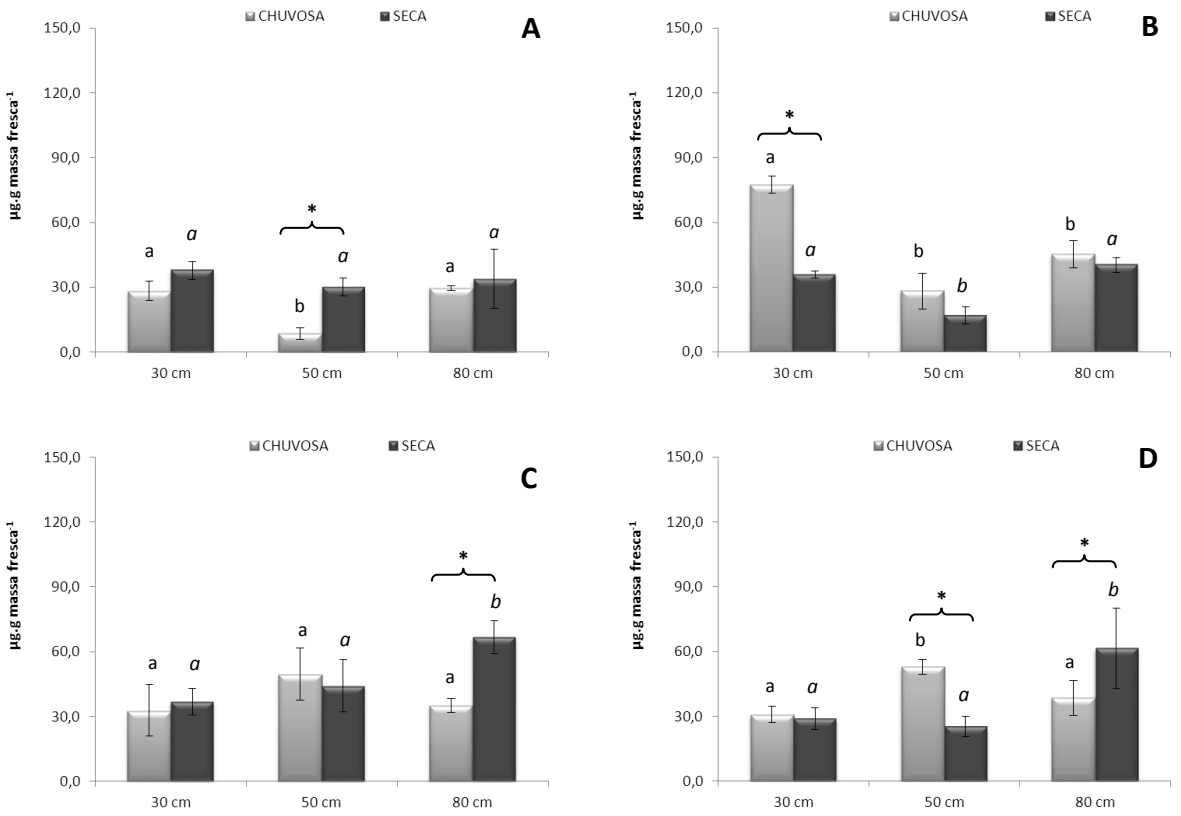

Figura 6. Concentração da aloficocianina (AFC) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades, e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.6.4. Clorofila *a*

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de Clorofila *a* das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 8).

Quando comparadas as estações, as concentrações da Cl*a* verificadas na linhagem vermelha (*vm*-CE) foram mais elevadas durante o cultivo no período seco a 30 e 50 cm de profundidade, enquanto que a 80 cm, não houve diferenças significativas entre as duas estações (Figura 7A). Durante o período chuvoso, a concentração de Cl*a* para essa linhagem foi maior nos indivíduos cultivados a 80 cm, enquanto que durante o período seco, não houve diferenças entre as profundidades.

Para a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), foram constatadas diferenças na concentração de Cl*a* entre as duas estações, apenas no cultivo a 30 cm, sendo o valor mais elevado obtido durante o período seco (Figura 7B). A concentração desse pigmento foi mais baixa nos indivíduos cultivados a 80 cm de profundidade nos dois períodos.

A linhagem verde (*vd*-CE) não apresentou diferenças nas concentrações de Cl*a* entre as estações chuvosa e seca, em nenhuma das profundidade testadas, sendo registrados valores mais elevados nos indivíduos cultivados a 80 cm em ambas estações (Figura 7C).

Para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN), foram registradas maiores concentrações de Cl*a* na estação seca, sendo os valores mais elevados registrados na profundidade de 80 cm (Figura 7D).

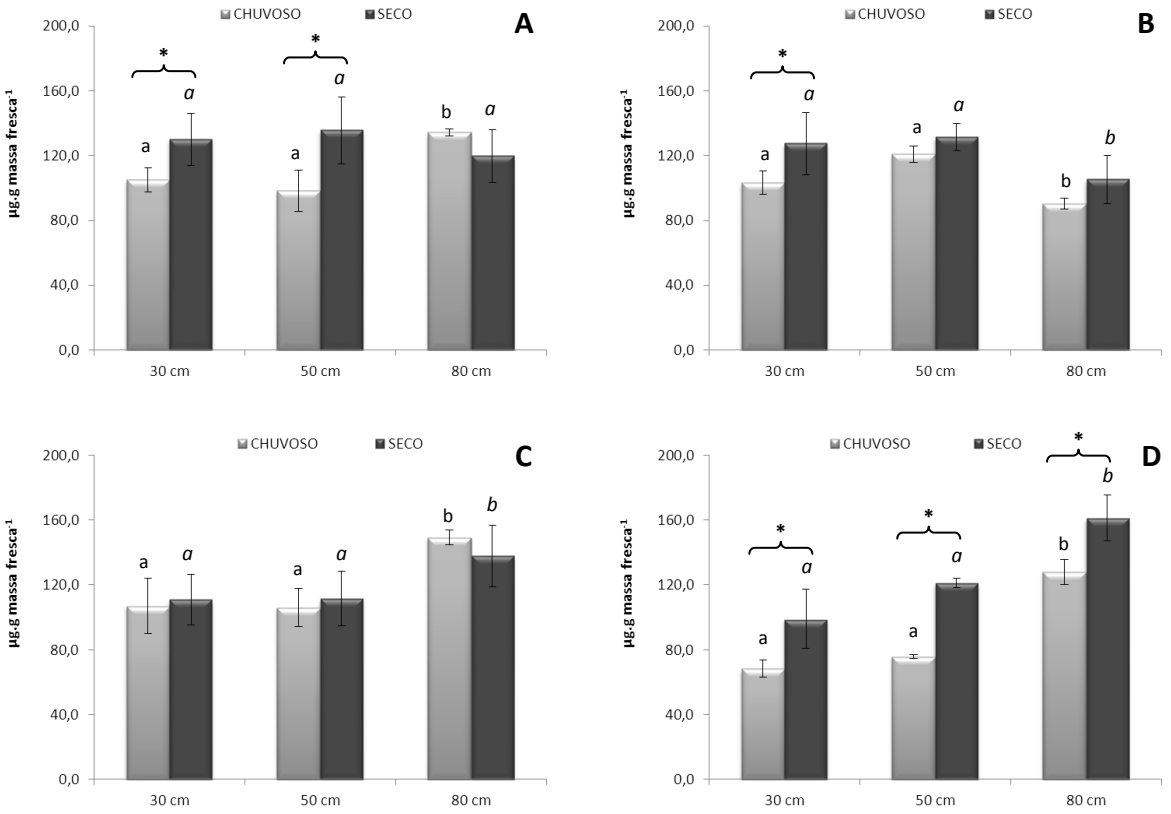

Figura 7. Concentração da clorofila *a* (Cl*a*) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades, e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de Cl*a* em determinadas situações (Tabela 7). Durante o período chuvoso, as concentrações de Cl*a* registradas nas profundidades de 30 e 50 cm foram menores para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) e similares entre as demais. No cultivo a 80 cm, as concentrações de Cl*a* foram menores para a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) e similares entre as demais.

No período seco, as concentrações de Cl*a* foram semelhantes entre as linhagens quando cultivadas à 30 e 50 cm. Na profundidade de 80 cm, as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN), apresentaram valores mais elevados do que quando comparadas às concentrações da vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) na mesma profundidade (Figura 7).

3.6.5. Carotenoides totais

As concentrações de CT das quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, em todas as profundidades estudadas (Tabela8). Essas concentrações foram mais elevadas durante o período seco (Figura 8). Durante esse período, apenas a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentou as concentrações de CT distintas entre as profundidade, com valores maiores a 80 cm, intermediários a 50 cm e menores a 30 cm (Figura 8A).

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de CT em algumas situações. Durante o período chuvoso, não houve diferenças entre as linhagens em nenhuma profundidade. No período seco, as concentrações de CT foram semelhantes entre as linhagens quando cultivadas a 30 e 50 cm. Na profundidade de 80 cm, as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN), apresentaram concentrações de CT mais altas do que as registradas para as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) na mesma profundidade (Figura 8).

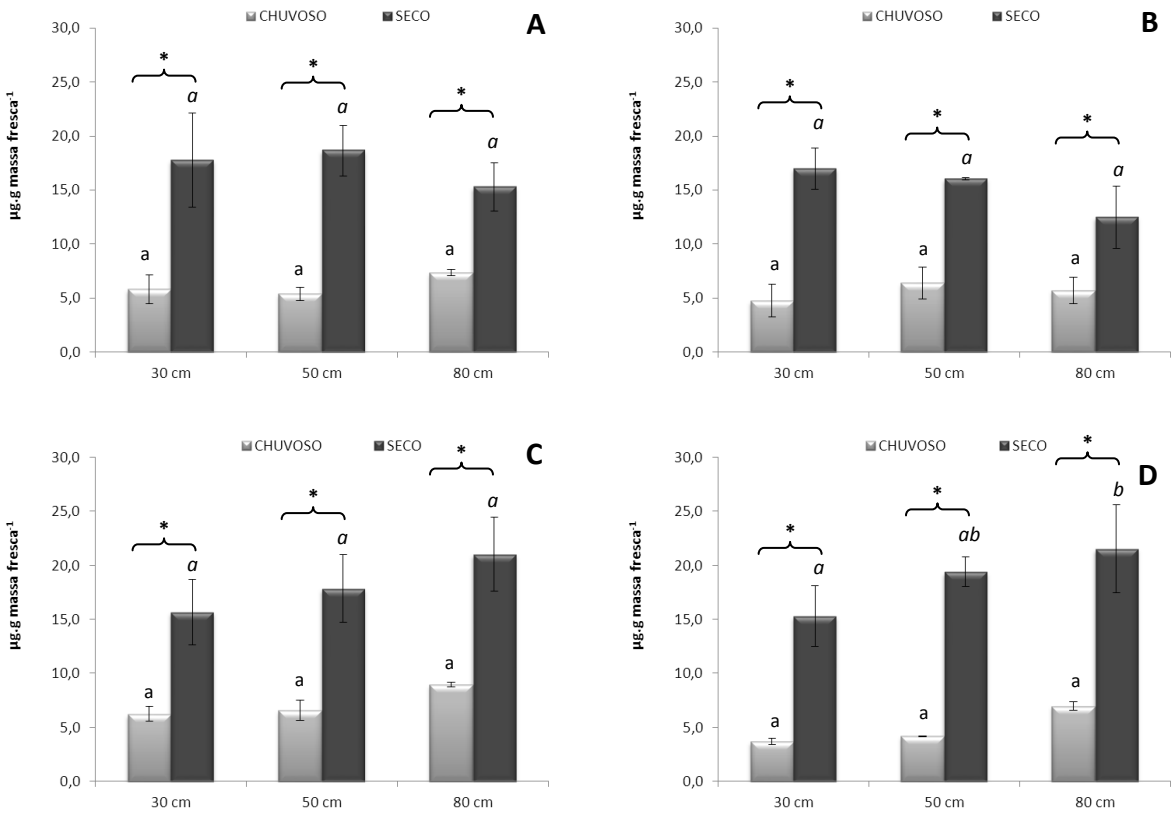

Figura 8. Concentração de carotenoides totais (CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades, e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.6. Rendimento e qualidade do polissacarídeo

As interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagens), avaliadas para o rendimento e teores de 3,6-anidrogalactose e sulfato do polissacarídeo são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. ANOVA multifatorial para o rendimento e teores de 3,6-anidrogalactose (3,6-AG) e sulfato (SO_4) do polissacarídeo extraído das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, na durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de variação	gl		Rendimento	3,6-AG	SO_4
Estação (A)	1	F	3,73	0,53	89,80
		p	n.s.	n.s.	**
Profundidade (B)	2	F	2,29	3,31	0,92
		p	n.s.	*	n.s.
Linhagem (C)	3	F	1,33	0,82	13,65
		p	n.s.	n.s.	**
A x B	2	F	0,75	22,12	12,32
		p	n.s.	**	**
A x C	3	F	1,80	11,88	10,26
		p	n.s.	**	**
B x C	6	F	2,11	1,96	14,93
		p	n.s.	n.s.	**
A x B x C	6	F	0,64	5,72	8,19
		p	n.s.	**	**

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

3.6.1. Rendimento do polissacarídeo

O rendimento do ágar extraído das quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* não apresentou diferenças significativas entre os períodos chuvoso e seco, em nenhuma das profundidades (Tabela 9, Figura 9). Quando comparadas as linhagens, não foram constatadas diferenças significativas entre elas.

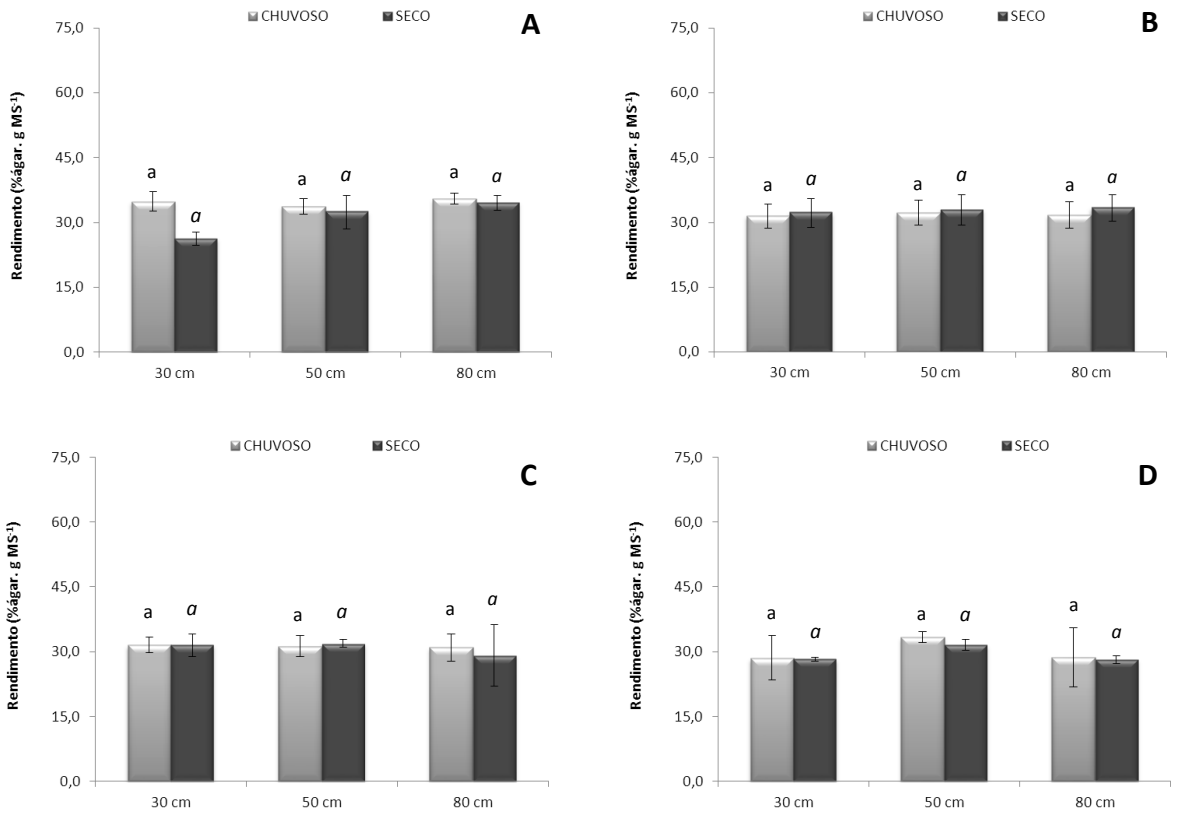

Figura 9. Rendimento do ágar extraído das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Letras semelhantes com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam valores similares (p>0,05) entre as profundidades. Não houve diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca (p>0,05).

3.6.2. 3,6-anidrogalactose

As diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* não apresentaram diferenças significativas nos teores de 3,6-AG, quando comparadas as estações chuvosa e seca, em nenhuma das profundidades testadas (Tabela 9, Figura 10), com exceção da linhagem verde (*vd*-CE), que apresentou valores mais elevados no período seco, nos cultivos a 80 cm (Figura 10C).

Quando comparadas as linhagens, a verde (*vd*-CE) cultivada a 80 cm apresentou os valores de 3,6-AG mais baixos em relação às linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (Figura 10). As demais linhagens apresentaram valores semelhantes entre si.

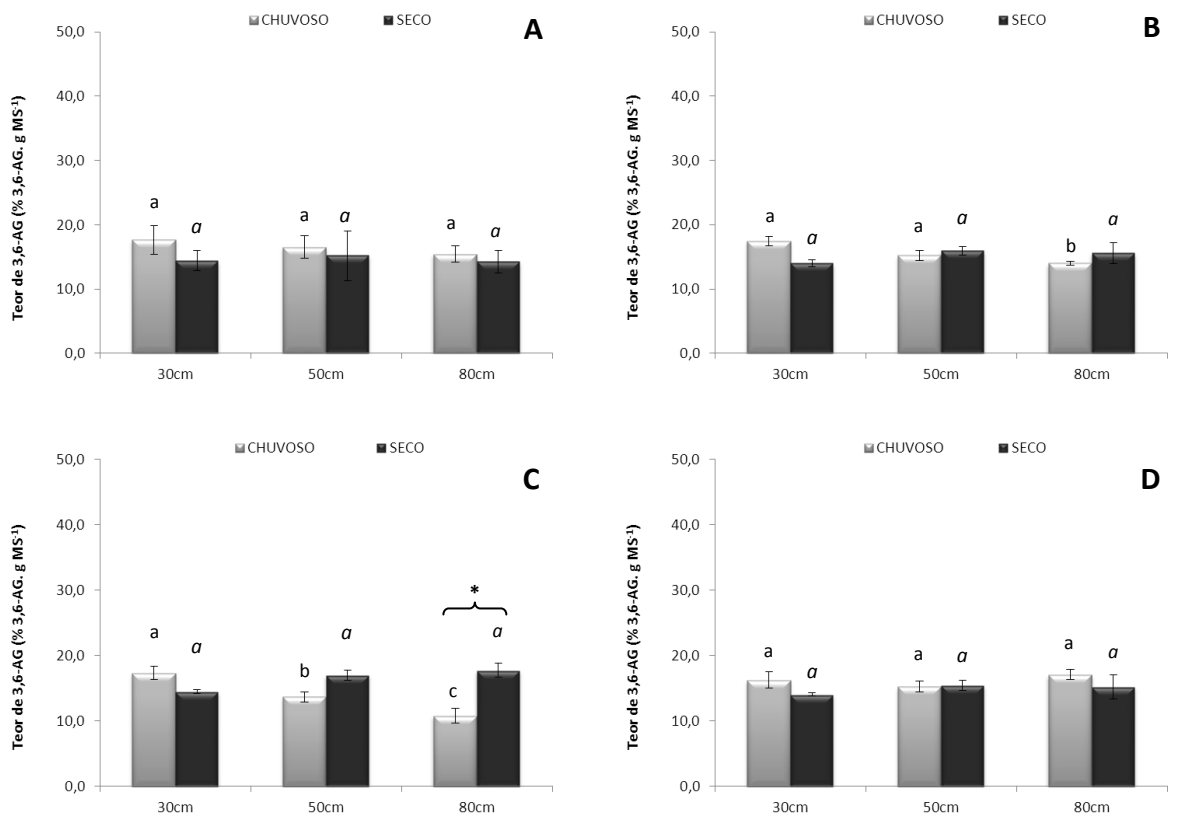

Figura 10. Teores de 3,6-anidrogalactose (3,6-AG) (%) do ágar extraído das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.6.3. Teor de Sulfato

Quando comparadas as estações chuvosa e seca, as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentaram teores de sulfato mais elevados na estação seca na profundidade de 30 cm; nas demais profundidades os valores foram semelhantes (Figuras 11A e B). Na linhagem verde (*vd*-CE), os teores de sulfato foram maiores na estação seca nas profundidades de 50 e 80 cm (Figura 11C), enquanto que para vermelha-nativa (*vm*-RN), foram a 30 e 50 cm (Figura 11D), nessa mesma estação.

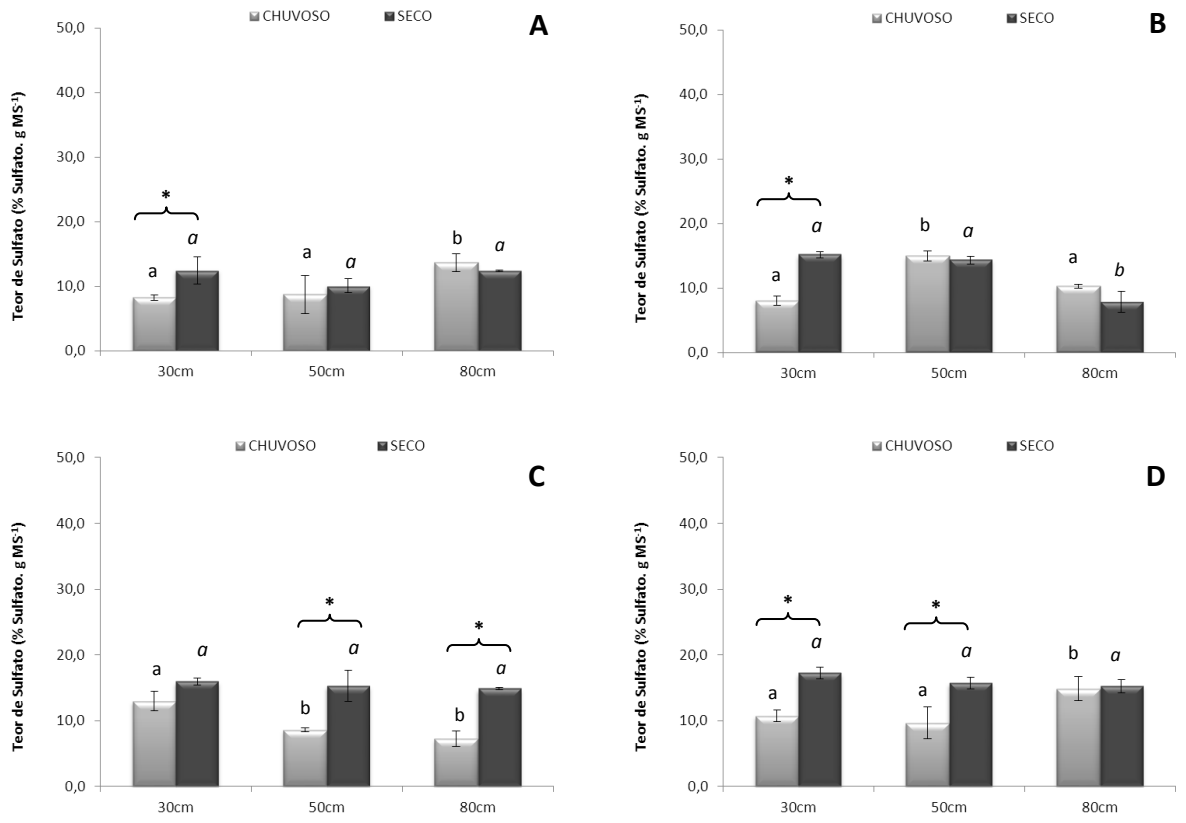

Figura 11. Teores de sulfato (%) do ágar extraído das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C), e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

Quando comparadas as linhagens durante o período chuvoso, elas apresentaram teores de sulfato semelhantes entre si, com exceção para: i) a linhagem verde (vd-CE) cultivada a 30 cm, que apresentou valores superiores às demais linhagens; ii) a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivada a 50 cm, que apresentou teores de sulfato superiores às demais linhagens; iii) as linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas a 80 cm, que apresentaram valores de sulfato semelhantes entre si, porém superiores aos registrados para a marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE).

Para o período seco, as linhagens que apresentaram diferenças entre si foram: i) as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas a 30 cm (período seco), que embora tenham apresentado valores semelhantes entre si, foram superiores aos registrados para a vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE); ii) a linhagem vermelha (*vm*-CE)

cultivada a 50 cm (período seco), que apresentou os menores teores de sulfato quando comparada às demais linhagens; e iii) a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivada a 80 cm (período seco), que apresentou os menores teores de sulfato quando comparada às demais linhagens.

4. Discussão

4.1. Taxas de crescimento

O tempo de cultivo foi um dos fatores que mais influenciou nas variações das taxas de crescimento (TCs) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae*. Todas as linhagens apresentaram reduções significativas nessas taxas ao longo do tempo, nos dois períodos estudados e em todas as profundidades.

A redução nas TCs observada com o aumento no tempo de cultivo pode ser relacionada principalmente ao envelhecimento do talo, comum em sistemas de cultivo que utilizam propagação vegetativa para produção de mudas. Sabe-se que durante o período fértil as algas canalizam energia acumulada para os processos reprodutivos, reduzindo as taxas de crescimento (DEWREEDE & KLINGER, 1988; SANTELICES & VARELA, 1995; MATHIESON & GUO, 1992). A redução dessas taxas após a diferenciação de estruturas reprodutivas já foi observada em espécies de *Gracilaria*, como *G. chilensis* (SANTELICES & VARELA, 1995), *G. domingensis* (GUIMARÃES *et al*., 1999) e *G. tenustipitata* (BARUFI *et al.,* 2010). No presente estudo, embora tenham sido utilizadas plantas tetrasporofíticas inférteis, pôde-se constatar que após o longo período de cultivo no mar, a maioria dos talos apresentou-se fértil. Esse fato pôde ser observado também nas pesagens das mudas durante o cultivo, pois em algumas ocasiões, foi evidenciada a germinação de tetraspóros *in situ*, a partir do crescimento de pequenos talos gametofíticos epífitos no tetrasporófito. A germinação *in situ* foi relatada para *G. birdiae* durante a elucidação de seu histórico de vida em laboratório (COSTA & PLASTINO, 2001). Registros de germinação *in situ* na natureza foram também realizados para essa espécie (ARAÚJO, 2005).

As TCs das algas cultivadas no mar podem variar dependendo das condições ambientais. Os parâmetros que mais influenciam no crescimento dessas algas estão relacionados à luz, nutrientes, temperatura, movimento da água e salinidade (KIRST, 1989; LOBBAN & HARRISON, 1997). Nesse estudo, a maioria dos parâmetros ambientais avaliados

apresentou diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca. Dentre eles, os baixos valores de salinidade e de transparência da água, registrados durante o período chuvoso, podem ser considerados os fatores que mais influenciaram negativamente o crescimento de algumas linhagens de *Gracilaria birdiae* nesse período. De acordo com McLachlan & Bird (1986) as espécies de *Gracilaria* apresentam uma ampla faixa de tolerância à salinidade, entretanto, o nível de salinidade para o crescimento ótimo é específico para cada espécie. Experimentos de cultivo com *G. birdiae* em ambientes estuarinos demonstraram que as TCs foram reduzidas devido às variações de salinidade (Marinho-Soriano *et al.,* 2006).

A baixa transparência da água registrada no período chuvoso na praia de Rio do Fogo esteve relacionada à elevada concentração de material particulado carreado para o mar pelas fortes chuvas. Esse evento, além de ter reduzido a irradiância disponível para os indivíduos de *Gracilaria birdiae* nas diferentes profundidades de cultivo, proporcionou a deposição de material particulado sobre os seus talos. Possivelmente, essa deposição dificultou a captação de luz, e consequentemente, reduziu a fotossíntese e o crescimento de algumas linhagens, particularmente a verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-CE). Aguilar-Rosas *et al.* (2000) relatam que a redução na sobrevivência de *G. pacifica*, em cultivo no México, foi causada pelo acúmulo de sedimento sobre as algas, sendo observando sinais de decomposição e desprendimento dos talos. Observações similares foram reportadas para cultivos de *G. parvispora* (Nelson *et al.,* 2001) e *G. caudata* (Marinho-Soriano *et al.,* 2002) em ambientes com elevadas concentrações de material particulado na água. Dados relacionados à fotossíntese das diferentes linhagens de *G. birdiae* e as diferenças obtidas durante as estações chuvosa e seca serão discutidos no próximo capítulo.

A análise realizada com base nas TCs obtidas até os 60 dias, indicou que as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha (*vm*-RN) apresentaram diferenças marcantes nos dois períodos de cultivo. As TCs dessas linhagens foram significativamente menores durante o período chuvoso. Os baixos valores de crescimento registrados podem estar relacionados à difícil aclimatação às condições adversas encontradas durante o período chuvoso. Durante esse período, foram registradas TCs negativas ocasionadas por perdas de biomassa, que passou a ser inferior ao inóculo. Nessas linhagens, foram constatados sinais de despigmentação e talos quebradiços, o que poderia ter favorecido a fragmentação e consequentemente redução de biomassa e taxas de crescimento. De acordo com Correa *et al.* (1996), essas

características podem estar associadas a substâncias oxidantes produzidas pelas próprias algas em resposta ao estresse fisiológico. As menores taxas nesse período, foram obtidas nos cultivos com a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN), com valores entre 0,48 – 1,25%.d^{-1}.

As linhagens que apresentaram melhores desempenhos durante o período chuvoso foram a vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivadas a 30 e/ou 50 cm de profundidade, com TCs variando entre 4,05 – 4,59%.d^{-1}. Essas linhagens parecem possuir uma maior capacidade de sobreviver sob essas condições e aproveitar melhor as elevadas concentrações de nutrientes, em especial o NH_4^+, disponíveis durante esse período. Essas linhagens mantiveram as TCs semelhantes às observadas durante a estação seca.

Durante o período seco, as TCs apresentaram valores mais homogêneos entre as linhagens. As TCs mais elevadas nesse período foram obtidas nos cultivos a 30 cm em todas as linhagens, e que apresentaram valores que oscilaram entre 3,70 - 4,86%.d^{-1}. A linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentou TCs semelhantes à vermelha (*vm*-CE) e superiores à marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE) nas profundidades de 30 e 50 cm. Além disso, na profundidade de 80 cm, as quatro linhagens apresentaram TCs semelhantes durante essa estação.

A maioria das TCs registrada nesse estudo esteve dentro da variação reportada para algumas espécies de *Gracilaria* cultivadas no mar (tabela 10). Valores de crescimento entre 0,8 e 4,4% foram registrados em cultivos anteriores para linhagens gametófiticas de *Gracilaria birdiae* em Ubatuba (SP). Nesse experimento, as TCs foram semelhantes entre as linhagens vermelha (*vm*-CE) e verde (*vd*-CE), as quais foram ligeiramente superiores à marrom-esverdeada (*me*-CE) (URSI, 2005). Cultivos experimentais com a linhagem tetrasporofítica de *G. birdiae* do Rio Grande do Norte (*vm*-RN) registraram TCs máximas de até 7,45 %.d^{-1}, sendo no entanto, registrados valores médios de crescimento semelhantes entre as estações chuvosa (4,4 %.d^{-1}) e seca (4,3 %.d^{-1}) (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010). Esses autores observaram correlações positivas entre as TCs dessa espécie e as concentrações de NH_4^+ na água. A importância dos nutrientes nitrogenados para o melhor desenvolvimento de espécies de *Gracilaria* em sistemas de cultivo foi reportada em alguns estudos realizados no mar (DAWES, 1995; ANDERSON *et al.*, 1999), em estuários (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2006) e na aquicultura integrada (ABREU *et al.*, 2009).

Tabela 10. Taxas de crescimento obtidas para diferentes espécies de *Gracilaria*.

Espécie	Local	TCR (%.d^{-1})	Referência
G. birdiae	Brasil	0,48 – 4,86	Presente estudo
G. birdiae	Brasil	4,3 - 7,45	BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010
G. birdiae	Brasil	0,8 – 4,4	URSI, 2005
G. chilensis	Chile	1,8 - 4,6	SANTELICES *et al.*, 1993
G. gracilis	Namíbia	0,8 - 4,15	DAWES, 1995
G. dentata	Venezuela	3,82 ± 0,4	GÓMEZ & MILLÁN, 1997

4.2. Pigmentos

A composição pigmentar das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* antes do início do cultivo no mar apresentaram valores mais elevados de FE em relação às demais ficobiliproteínas, com exceção à linhagem verde (*vd*-CE) que apresentou as concentrações de FC superiores à FE (Tabela 6). A linhagem verde (*vd*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentaram concentrações mais elevadas de AFC em relação às demais. A deficiência de FE observada na linhagem verde (*vd*-CE) corrobora estudos anteriores (COSTA & PLASTINO, 2001, 2011; DONATO, 2005; URSI, 2005). Quantidades mais elevadas de FC registradas para a linhagem verde (*vd*-CE) e menores concentrações de AFC para a linhagem vermelha (*vm*-CE) foram também observadas por URSI (2005). Para outras espécies de *Gracilaria,* as concentrações mais baixas de FE e concentrações FC e AFC semelhantes ou superiores, são observadas para variantes verdes quando comparadas aos tipos selvagens (KURSAR *et al.,* 1983; GUIMARÃES *et al.*, 2003). De acordo com DONATO (2005), a diferenciação quanto ao balanço das ficobiliproteínas entre as linhagens *G. birdiae*, explica a variação fenotípica observada.

Embora a linhagem verde (*vd*-CE) tenha apresentado deficiência de FE, a baixa concentração desse pigmento não afetou o seu crescimento, principalmente durante o cultivo no período seco, onde as TCs foram semelhantes às observadas para as linhagens marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN), as quais apresentaram concentrações iniciais de FE mais elevadas. Resultados semelhantes foram observados para variantes cromáticas de *G. tikvahiae* que apresentaram deficiência na FE, mas cresceram normalmente em relação às selvagens (RAMUS & VAN DER MEER, 1983).

O conteúdo pigmentar observado antes e após o cultivo (120 dias) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae*, nas três profundidades e nas duas estações, apresentou reduções significativas (Tabela 6 e 7). Em alguns casos, apenas os indivíduos da linhagem verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivados a 80 cm não apresentaram essas diferenças para a concentração de AFC. Além disso, quando comparada às concentrações obtidas antes e após o cultivo por 120 dias, a AFC foi a que apresentou reduções menos pronunciadas dentre às ficobiliproteínas analisadas. O caráter conservativo da AFC pode estar relacionado à sua localização mais interna nos ficobilissomos, sendo dessa forma, menos susceptível às modificações influenciadas pelos fatores externos (GANTT, 1990).

O suprimento de nitrogênio tem importante efeito na concentração das ficobiliproteínas, uma vez que esses pigmentos podem também atuar como *pools* de nitrogênio (BIRD, 1982; GANTT, 1990). De acordo com RYTHER *et al.* (1981), quando as reservas de nitrogênio são exauridas, as algas vermelhas iniciam a degradação de seus pigmentos e cessam o crescimento. Nessas circunstâncias, a FE por se localizar mais externamente no ficobilissomo é considerada a ficobiliproteína mais acessível (GANTT, 1990). Desta forma, a perda de cor pode ser resultado do uso desses pigmentos no metabolismo celular para síntese de proteínas a partir do nitrogênio disponibilizado (LAPOINTE, 1981). Assim, a coloração do talo deve ser mais precisamente um indicador dos níveis internos de N, do que da condição de iluminação a que a alga está submetida (LAPOINTE *et al*., 1976; RAMUS, 1983; MIZUTA *et al.,* 2002). Nesse estudo, todas as linhagens apresentaram TCs reduzidas nos últimos dias de cultivo e a despigmentação foi visível, indicando a utilização dos pigmentos como fonte de N.

As concentrações de Cl*a* e CT antes do início do cultivo no mar apresentaram valores semelhantes entre as linhagens (Tabela 6). Resultados similares para os conteúdos de Cl*a* foram obtidos em estudos anteriores para as mesmas linhagens de *Gracilaria birdiae* em indivíduos tetrasporófiticos (DONATO, 2005; AYRES, 2010) e gametófiticos (COSTA & PLASTINO, 2011). As concentrações de CT semelhantes para todas as linhagens registradas nesse estudo corroboram trabalhos anteriores para as mesmas linhagens tetrasporofíticas de *G. birdiae* (DONATO, 2005; AYRES, 2010). Após o cultivo (120 dias), as concentrações de Cl*a* e CT apresentaram reduções significativas em todas as linhagens, com apenas algumas exceções para as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas a 80 cm. As diferenças

entre as concentrações desses pigmentos antes e após o cultivo foram mais pronunciadas durante o período chuvoso, em todas as profundidades, especialmente para os CT. Esse fato pode ser consequência da aclimatação do aparato fotossintetizante às baixas condições de luz existentes no local. Esses resultados corroboram dados obtidos para *Cladophora vagabunda* e *Gracilaria tikvahiae* (DENAULT *et al.,* 2000) submetidas a baixas irradiâncias, em que houve reduções significativas de Cl*a* e CT.

De acordo com CARNICAS *et al.* (1999), essa aclimatação está relacionada ao *pool* de zeaxantina, um carotenoide que além de atuar como pigmento acessório, atua como pigmento fotoprotetor. Desta forma, quando a irradiância é diminuída, o *pool* de zeaxantina é reduzido. Em contraste, quando a irradiância é elevada, as concentrações desse pigmento acessório são rapidamente elevadas em resposta à aclimatação para maior captação de luz, atuando dessa forma, como pigmento fotoprotetor. Esse fenômeno também conhecido como "ciclo das xantofilas" consiste na conversão de violaxantina em anteraxantina e finalmente zeaxantina, sob condições de excesso de energia luminosa; o processo inverso ocorre em baixas irradiâncias (YOUNG & FRANK, 1996; CARNICAS *et al*., 1999). A ocorrência do "ciclo das xantofilas" em linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas de *G. birdiae* foi proposta, uma vez que essas linhagens apresentaram as três xantofilas participantes do ciclo (URSI *et al.*, 2003; DONATO, 2005). Além disso, URSI *et al.* (2003) registraram para linhagens gametofíticas de *G. birdiae* elevadas concentrações de zeaxantina quando submetidas à altas irradiâncias.

No presente estudo, as concentrações dos CT foram mais elevadas durante o período seco, quando comparadas ao chuvoso. Durante a estação seca, as algas estiveram mais expostas à radiação solar, o que possivelmente influenciou nas concentrações desses pigmentos. Embora não tenham sido registradas diferenças entre os valores de radiação PAR nos dois períodos, a transparência da água apresentou valores mais elevados no período seco, o que favoreceu uma maior incidência de luz sobre as algas. Variações na composição desses pigmentos como efeito de mudanças nos níveis de irradiância têm sido estudadas por vários autores (TALARICO & MARANZANA, 2000; FIGUEROA *et al*., 2003; CARNICAS *et al.,* 1999; ANDERSSON *et al.*, 2006). Esses estudos apontam para um aumento nas concentrações de carotenoides em algas cultivadas sob irradiâncias elevadas.

4.3. Rendimento e qualidade de polissacarídeos

As linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas nas diferentes profundidades e durante as estações chuvosa e seca não apresentaram diferenças significativas dos valores de rendimento de polissacarídeo. Embora as comparações com dados da literatura sejam complexas, devido principalmente à grande variedade de métodos de extração, verificou-se que os valores de rendimento das diferentes linhagens de *G. birdiae* obtidos nesse estudo são maiores do que os registrados por URSI (2005) para as linhagens gametofíticas de *G. birdiae* e por BEZERRA & MARINHO-SORIANO (2010) para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) (Tabela 11). A variação observada possivelmente esteve relacionada ao método de extração alcalino utilizado por eles. Geralmente, espécies de *Gracilaria* produzem ágar de baixa qualidade, principalmente devido à alta concentração de sulfato. Desta forma, o tratamento alcalino pode promover a melhoria nas propriedades químicas e físicas do gel, devido à conversão das moléculas de L-galactose-6-sulfato em 3,6-anidro-L-galactose. Entretanto, esse método apresenta como desvantagem, a redução do rendimento de ágar (FREILE-PELEGRÍN & MURAÑO, 2005; FREILE-PELEGRÍN & ROBLEDO, 1997; ORDUÑA-ROJAS *et al.*, 2008). Resultados similares e em alguns casos superiores aos obtidos no presente estudo podem ser observados para outras espécies de *Gracilaria* submetidas ao método de extração de ágar nativo (Tabela 11). MARINHO-SORIANO & BOURRET (2003) encontraram valores de rendimento variando entre 19 e 30,5 % para *G. gracilis* e 23 a 36 % para *G. bursa-pastoris*. Estudos posteriores mostraram valores de rendimento para *G. dura* variando entre 32 e 35% (MARINHO-SORIANO & BOURRET, 2005). O rendimento de ágar nativo foi também obtido para *G. cervicornis* e *G. cornea* [como *Hydropuntia cornea*], com valores variando de 11 a 20% e entre 29 e 41%, respectivamente (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2001).

Quanto aos teores de 3,6-anidrogalactose (3,6-AG), os valores encontrados podem ser considerados baixos em relação aos reportados na literatura para outras espécies de *Gracilaria* (Tabela 11). Diferente do que foi observado para o rendimento, os teores de 3,6-AG parecem não apresentar diferença com o uso da extração alcalina. Os valores de 3,6-AG registrados no presente estudo foram semelhantes aos obtidos para as linhagens gametofíticas de *G. birdiae* utilizando-se o método de extração alcalina (URSI, 2005; Tabela 11). FREILE-PELEGRÍN & MURAÑO (2005) não registraram diferenças significativas nos teores de 3,6-AG entre o ágar nativo e o obtido após extração alcalina de *G. cervicornis, G. blodgettii e*

G. crassissima. Esse fato foi também observado para *G. domingensis,* que apresentou valores semelhantes de 3,6-AG no ágar nativo e nas amostras submetidas ao tratamento alcalino a frio (YOSHIMURA, 2006) (Tabela 11). As semelhanças encontradas nos teores de 3,6-AG para os diferentes tratamentos podem estar relacionadas à posição do sulfato na molécula. Segundo DUCKWORTH *el al.* (1971), para que o tratamento alcalino seja efetivo é necessário que o sulfato esteja localizado no C-6 da molécula (α-L-galactose-6-sulfato) para que ocorra a reação com a hidroxila do C-3, formando um anel de 3,6-anidro e consequentemente a liberação do grupo sulfato.

Em relação ao teor de sulfato (SO_4), os valores registrados nesse estudo (7,2 – 17,2%) foram mais elevados do que os teores encontrados para as linhagens gametofíticas de *G. birdiae* (URSI, 2005), bem como para outras espécies utilizando a extração alcalina (Tabela 11). Para *G. domingensis,* no entanto, os valores de sulfato foram semelhantes, mesmo após o tratamento alcalino, e a redução dos teores de sulfato somente foi alcançada após o pré-tratamento alcalino a quente (YOSHIMURA, 2006). Em relação aos teores de sulfato obtidos a partir da extração do ágar nativo, no presente estudo foram encontrados valores aproximados aos registrados por ORDUÑA-ROJAS *et al.* (2008) para *G. vermiculophylla* (6,3 – 13,9%). De acordo com esses resultados, podemos supor que a elevada concentração de sulfato do gel esteja relacionada ao método de extração empregado nesse estudo. Os altos teores de sulfato promovem a redução da força do gel, uma vez que dificultam a formação das hélices conforme ocorre a gelificação do gel. Por esse motivo, os tratamentos alcalinos são empregados para diminuir a quantidade de sulfato das moléculas. Devido à reduzida biomassa obtida no final dos cultivos, o método alcalino não pôde ser realizado.

Tabela 11. Rendimento e teores de 3,6-anidrogalactose (3,6-AG) e sulfato (SO_4) de diferentes espécies de *Gracilaria*.

Espécie	Rendimento	3,6-AG	SO_4	Referência
G. arcuata	17,2 ± 0,9	28,5 ± 0,2	4,2 ± 0,3	MONTAÑO *et al.*, 1999
G. birdiae	**26,3 – 35,5**	**10,8 – 17,7**	**7,2 – 17,2**	**Presente estudo**
*G. birdiae**	20 – 22,8	18,5 – 19,3	2,7 – 3,3	URSI, 2005
*G. birdiae**	15 - 22	-	-	BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010
G. bursa-pastoris	23 - 36	IR	IR	MARINHO-SORIANO & BOURRET, 2003
G. cervicornis	11 – 20	-	-	MARINHO-SORIANO *et al.*, 2001
G. chilensis	20 – 22	-	-	MARTINEZ & BUSCHMANN, 1996
*G. cornea**	14,5 – 22,1	32,6 – 45,4	1,53 – 4,25	FREILE-PELEGRÍN & ROBLEDO, 1997
G. cornea [*Hydropuntia cornea*]	29 - 41	-	-	MARINHO-SORIANO *et al.*, 2001
G. dura	32 - 35	IR	IR	MARINHO-SORIANO & BOURRET, 2005
G. domingensis	35,4	8,8	10,9	YOSHIMURA, 2006
*G. domingensis**	3,9 – 24,7	9,5 – 11,4	4,44 – 7,18[a]	YOSHIMURA, 2006
*G. firma**	23,5 ± 2,4	28 ± 2,5	n.p.	ARAÑO *et al.,* 2000
*G. gracilis**	12,7 – 18,7	36,6 – 53,8	2,1 – 3,3	MOLLET *et al.*, 1998
G. gracilis	19 – 30,5	IR	IR	MARINHO-SORIANO & BOURRET, 2003
G. longissima	15,0 – 46,2	n.p.	1,9 – 11,9	ORDUÑA-ROJAS *et al.*, 2008
*G. sp.**	14,7 ± 1,6	25,2 ± 2,0	n.p.	ARAÑO *et al.,* 2000
G. tenuistipitata	32,9 ± 2,4	34,0 ± 0,1	3,9 ± 0,2	MONTAÑO *et al.*, 1999
G. vermiculophylla	11,6 – 45,7	n.p.	6,3 – 13,9	ORDUÑA-ROJAS *et al.*, 2008

* extração alcalina; IR – determinação por infra-vermelho; [a] pré-tratamento alcalino a quente; n.p. - dados não-publicados.

CAPÍTULO 4

CULTIVOS NO MAR (CURTA DURAÇÃO) DE LINHAGENS SELECIONADAS DE *Gracilaria birdiae* (GRACILARIALES, RHODOPHYTA) NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL: CRESCIMENTO, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E COMPOSIÇÃO PIGMENTAR

ABSTRACT

This work evaluated the growth rates, pigments contents and photosynthesis of *Gracilaria birdae* strains cultivated for 30 days in the sea (Rio Grande do Norte State, Brazil), at three different depths (30cm, 50cm, and 80cm) and two seasons (rainy and dry). Four tetrasporophytic strains were used: red (*rd*-CE, *rd*-RN), greenish-brown (*gbw*-CE), and green (*gr*-CE). Different strains of *G. birdiae* showed, in most cases, similar growth rates between the seasons. Although, higher values have been recorded during the rainy season. The green strain (*gr*-CE) grown at 50 cm was an exception, with growth rates higher in the dry season. The pigment content of different strains of *G. birdiae* decreased significantly during dry season, being the result of higher irradiance, characteristic of this period. The values of maximum photosynthesis (ETR_{max}) and saturation irradiance (I_k) obtained in strains of *G. birdiae* were distinct between seasons, with lower values during the rainy season. These values were related to photoacclimation at lower light conditions. During the dry season, when the strains were exposed to higher irradiances, lower values of I_k and ETR_{max} were verified, suggesting them as shade plants.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as taxas de crescimento, conteúdo pigmentar e atividade fotossintetizante de diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas no mar por 30 dias (Rio Grande do Norte, Brasil), em três profundidades diferentes (30cm, 50cm e 80cm) e durante dois períodos distintos (chuvoso e seco). Quatro linhagens de plantas tetrasporofíticas foram utilizadas: vermelha (*vm*-CE e *vm*-RN), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). As TCs das linhagens de *G. birdiae* apresentaram, na maioria vezes, valores semelhantes entre as estações, embora em alguns casos, valores mais elevados tenha sido registrados durante a estação chuvosa. A linhagem verde (*vd*-CE) cultivada a 50 cm foi uma exceção, com TCs mais elevadas na estação seca. O conteúdo pigmentar das diferentes linhagens de *G. birdiae* apresentaram reduções significativas durante a estação seca, sendo consequência da maior irradiância, característico dessse período. Os valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) e irradiância de saturação (I_k) obtidos nas diferentes linhagens de *G. birdiae* foram distintos entre as estações, com valores mais baixos durante o período chuvoso. Esses valores estiveram relacionados à fotoaclimatação das linhagens às condições de baixa luminosidade. Mesmo no período seco, quando as linhagens de *G. birdiae* estiveram sujeitas a maiores irradiâncias, os valores de $ETR_{máx}$ e I_k foram considerados baixos (< 200 $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$), caracterizando-as como plantas de "sombra".

1. Introdução

As algas desenvolveram ao longo de sua evolução vários pigmentos capazes de absorver as radiações solares disponíveis. Esses pigmentos são representados por três grupos: as clorofilas (*a, b, c* e *d)*, as ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) e os carotenoides (carotenos e xantofilas) (LOBBAN & HARRISON, 1997). As algas vermelhas utilizam as ficobiliproteínas (pigmentos acessórios) para absorver a energia luminosa em comprimentos de onda específicos (ficoeritrina ≅ 565μm; ficocianina ≅ 610μm; e aloficocianina ≅ 650μm), retransmitindo-a para o pigmento principal, a clorofila *a* (≅ 450μm). Outro papel importante conferido aos pigmentos acessórios, em especial aos carotenoides, é o de promover a proteção do aparato fotossintetizante quando as algas se encontram expostas a elevadas intensidades luminosas (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1996; URSI *et al.,* 2003; ANDERSSON *et al.,* 2006).

Geralmente, a composição pigmentar nas algas é resultado das respostas às mudanças nas condições ambientais. Desta forma, a maioria das algas (fotófilas e ciáfilas) é capaz de aclimatar o seu aparato pigmentar à disponibilidade de luz (KAKINUMA *et al.,* 2006; GÓMEZ *et al.,* 2005). Vários autores têm estudado as relações entre o teor de pigmentos e a capacidade de realização da fotossíntese pelas algas vermelhas (CARNICAS *et al.,* 1999; TALARICO & MARANZANA, 2000), sendo este assunto, objeto de diversas controvérsias. Alguns autores afirmam que o conteúdo pigmentar nas algas é regulado apenas pela intensidade luminosa (RAMUS et al., 1976; SKRIPTSOVA & YAKOVLEVA, 2002), enquanto que outros afirmam que a qualidade da luz (composição espectral) é responsável por essa regulação (LÓPEZ-FIGUEROA & NIELL, 1990; MERCADO *et al.,* 2002). Neste sentido, RAMUS *et al.* (1976) afirmam que as mudanças observadas na composição pigmentar das macroalgas com a profundidade são em sua maioria aclimatações às baixas intensidades luminosas e não uma mudança no espectro de absorção.

A variação quantitativa nos pigmentos é muito complexa e não depende somente da luz como também de outros fatores como a temperatura, salinidade, aspectos nutricionais e provavelmente do histórico de vida da alga (KAKINUMA *et al.,* 2006; NYGÅRD & EKELUND, 2006). LAPOINTE *et al*. (1984) observaram que a interação entre a luz e a temperatura afetava o teor de ficoeritrina e clorofila *a* e por consequência, alterava a capacidade fotossintetizante das algas. Diversos estudos indicam correlações entre a disponibilidade de nitrogênio e o

conteúdo pigmentar, em particular da ficoeritrina que funciona como uma reserva de nitrogênio (DEBOER, 1981; PINCHETTI *et al.,* 1998). Desta forma, uma perda de coloração das algas vermelhas pode ser atribuída a uma mobilização do nitrogênio presente nos pigmentos para o uso em outras vias metabólicas ou a uma fotodestruição desses pigmentos pela luz.

O conhecimento dos efeitos da radiação solar sobre a capacidade fotossintetizante das macroalgas e a sua importância sobre as estratégias de cultivo têm sido registrados por alguns autores (AGUIRRE-VON-WOBESER *et al.,* 2000; CABELLO-PASINI *et al.,* 2000; FIGUEROA *et al.,* 2003). Medidas de taxas de crescimento bem como de taxas de fotossíntese têm sido de grande importância na avaliação de cultivos no mar.

A determinação da fotossíntese em algas apresenta várias dificuldades devido aos diferentes mecanismos de fotoaclimatação e aos complexos sistemas de regulação encontrados nesses organismos. O desenvolvimento de metodologias não-invasivas tem levado à obtenção de medidas rápidas e precisas do *status* fisiológico de várias espécies de plantas, incluindo as macroalgas, e a sua utilização tem se tornado uma importante ferramenta para avaliar o funcionamento do aparato fotossintetizante sob diferentes condições naturais e artificiais (FRANKLIN & BADGER, 2001; CHALOUB *et al.*, 2010; FIGUEROA & KOBEE, 2010). Atualmente, vários autores sugerem que as medidas de fluorescência da clorofila é uma ferramenta eficiente e rápida para acessar o desempenho fisiológico de macroalgas *in situ* (BEER *et al.,* 2000; GÓMEZ *et al.*, 2004), podendo ser utilizada para monitorar os sistemas de cultivo diretamente no campo (CABELLO-PASINI *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2009), reduzindo o estresse causado pela transferência das algas para análise em laboratório (HÄDER *et al.*, 1997).

Esse estudo teve como objetivo avaliar as taxas de crescimento, o conteúdo pigmentar e atividade fotossintetizante de diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, me-*CE*; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) cultivadas no mar por 30 dias, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm em dois períodos distintos (chuvoso e seco).

2. Material e Métodos

Foram utilizadas quatro linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae*: espécimes de coloração vermelha (selvagem) procedentes do Estado do Rio Grande do Norte (*vm*-RN) e espécimes de coloração vermelha (selvagem) (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde

(*vd*-CE) obtidos por propagação vegetativa de talos tetrasporofíticos provenientes do "Banco de germoplasma de algas gracilarioides" do Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM), IBUSP. As procedências das linhagens utilizadas neste estudo estão descritas no Capítulo 1, item 3.1. As condições gerais de cultivo em laboratório empregadas na manutenção e propagação das linhagens podem ser visualizadas no Capítulo 1, item 3.2.

2.3. Local de cultivo

Os cultivos foram realizados na praia de Rio do Fogo, município de Rio do Fogo (RN). A descrição do local é apresentada com mais detalhes no Capítulo 1, item 3.3.

2.4. Delineamento experimental

Ramos apicais de três indivíduos diferentes (repetições) de cada uma das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, me-*CE*; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) foram cultivados no mar por 30 dias em dois períodos distintos: i, novembro a dezembro/2009 (seco); e ii, junho a julho/2011 (chuvoso). Para isso, foram utilizados três módulos de cultivo, e cada um deles foi posicionado a 30, 50 e 80 cm de profundidade. Os materiais utilizados e a confecção dos módulos são apresentados no Capítulo 1, item 3.5.1. O delineamento amostral utilizado para a distribuição das linhagens nas estruturas de cultivo está representado no Capítulo 1, item 3.5.2.

A massa fresca de cada uma das mudas distribuídas nas estruturas de cultivo foi avaliada ao final dos 30 dias de experimento. A determinação das taxas de crescimento é descrita no Capítulo 1, item 3.6. Após o período de cultivo (30 dias), em ambas estações (chuvosa e seca), três indivíduos diferentes (repetições) de cada linhagem, cultivados nas três profundidades foram utilizados para a obtenção das medidas de fluorescência *in vivo* da clorofila. Representantes de cada linhagem (três repetições) foram armazenados em caixas de isopor com gelo e transportados para o Laboratório Macroalgas Marinhas, DOL, UFRN. Após a avaliação da massa fresca, as amostras foram destinadas para quantificação dos pigmentos (Cl*a*, FE, FC, ALC e CT).

2.5. Fluorescência *in vivo* da clorofila

Medidas de fluorescêcia *in vivo* da clorofila foram obtidas a partir do fluorímetro submersível Walz Diving-PAM ("Pulse Amplitude Modulation"). Três ápices de um mesmo

indivíduo de cada linhagem de *Gracilaria birdiae* foram dispostos próximos a extremidade da fibra ótica, por meio de um pegador magnético, e organizados de modo que não houvesse sobreposição. Foi selecionada a opção de curvas rápidas de luz ("light curve") do equipamento e empregado 8 níveis de irradiância (0 - 649 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}). O tempo de exposição dos ápices em cada irradiância foi de 20s, intercalados por pulso de saturação de 0,8s, de aproximadamente 6100 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}. Os dados obtidos foram utilizados para construção de curvas de Fotossíntese x Irradiância (FI). O rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) foi fornecido pelo equipamento, sendo calculado de acordo com GENTY *et al.* (1989). A estimativa do fluxo de elétrons no aparato fotossintetizante foi obtida a partir dos cálculos das taxas de transporte de elétrons (do inglês, ETR, *eletron transport rate*), segundo SCHREIBER *et al*. (1994, 1995):

$$ETR = \Delta F/F_m' \times PAR \times 0{,}15 \times 0{,}5$$

onde, $\Delta F/Fm'$ é o rendimento quântico efetivo obtido nas diferentes intensidades de PAR (irradiância) e os fatores 0,15 e 0,50, referem-se a absortância utilizada para Rhodophyta (GRZYMSKI *et al.*, 1997; FIGUEROA *et al.,* 2003; KORBEE *et al.*, 2005) e a quantidade de fótons associados ao fotossistema II (PSII) (SCHREIBER *et al.,* 1994, 1995), respectivamente.

As curvas foram geradas com base nos valores de ETR calculados como descritos acima. Os parâmetros fotossintetizantes, tais como $ETR_{máx}$ e eficiência fotossintetizante (αETR) foram estimados com base na função não-linear de JASSBY & PLATT (1976):

$$ETR = ETR_{máx} \cdot \tanh (\alpha ETR \cdot I_s/ETR_{máx})$$

onde, ETR é a taxa de transporte de elétrons, mencionada anteriormente; $ETR_{máx}$ é a ETR saturada; tanh é a função tangente hiperbólica; αETR é a eficiência fotossintetizante (inclinação da curva F x I) e I_s é a irradiância incidente.

A Irradiância de saturação (I_k) foi calculada como a razão entre $ETR_{máx}$ /αETR. As curvas obtidas foram ajustadas de acordo com WEBB *et al*. (1974).

2.6. Determinação do conteúdo pigmentar

O conteúdo pigmentar foi avaliado para as 4 linhagens de *Gracilaria birdiae* no início e após os cultivos nas diferentes profundidades e nos dois períodos distintos (chuvoso e seco). Amostras de 200 mg (massa fresca), em triplicata, foram selecionadas e lavadas em água destilada, sendo removido o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, essas

amostras foram armazenadas a −70°C até o momento de transportá-las para o Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM), IBUSP, onde foram realizados os procedimentos de extração (ver Capítulo 1, item 3.7).

2.7. Análise estatística

As taxas de crescimento, concentrações dos pigmentos (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) e os parâmetros fotossintetizantes obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila ($\Delta F/F_m'$, ETR_{max}, αETR e I_K) foram submetidos à análise de variância multifatorial, para constatação de possíveis diferenças entre as linhagens e as profundidades, durante as estações chuvosa e seca. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls foi utilizado. Todas as análises foram realizadas no programa Statistica (versão 7.1).

3. Resultados

3.1. Taxas de crescimento

As taxas de crescimento (TCs) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas por 30 dias nas três profundidades (30, 50 e 80 cm) e nas duas estações (chuvosa e seca), podem ser visualizadas na Tabela 1. A análise de variância multifatorial revelou que as (TCs) apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as profundidades e entre as linhagens (Tabela 2).

Tabela 1. Taxas de crescimento (%.d^{-1}) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, vm-RN) cultivadas por 30 dias, na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca.

Profundidades	**30 cm**	**50 cm**	**80 cm**
Estação chuvosa			
vm-CE	5,16 ± 0,32^{a}	4,43 ± 0,09^{a}	4,90 ± 0,20^{a}
me-CE	5,18 ± 0,47^{a}	6,56 ± 0,52^{b}	4,14 ± 0,34^{ab}
vd-CE	3,51 ± 0,61^{b}	3,60 ± 0,51^{c}	3,56 ± 0,37^{b}
vm-RN	5,69 ± 0,69^{a}	3,91 ± 1,04^{a}	4,66 ± 0,30^{a}
Estação seca			
vm-CE	3,30 ± 0,15^{a}	4,26 ± 0,42^{a}	3,84 ± 0,25^{a}
me-CE	2,71 ± 0,41^{a}	4,47 ± 0,21^{a}	3,77 ± 0,27^{a}
vd-CE	3,20 ± 0,07^{a}	4,47 ± 0,38^{a}	3,42 ± 0,37^{a}
vm-RN	2,55 ± 0,16^{a}	4,61 ± 0,43^{a}	3,80 ± 0,23^{a}

Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as linhagens para cada profundidade, separadamente (p<0,05)

Tabela 2. ANOVA multifatorial para as TCs das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, vm-RN) cultivadas por 30 dias, na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de Variação	**gl**	**F**	***P***
Estação (A)	1	79,35	**
Profundidade (B)	2	17,39	**
Linhagem (C)	3	14,88	**
A x B	2	30,63	**
A x C	3	13,06	**
B x C	6	6,81	**
A x B x C	6	6,63	**

** diferenças altamente significativas (p<0,05)

As linhagens vermelha (*vm*-CE) e a vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram TCs mais elevadas durante a estação chuvosa, quando comparadas as TCs observadas na estação seca, nas profundidades de 30 e 80 cm (Figura 1A e D). As TCs registradas para a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) foram também superiores durante a estação chuvosa, embora essas taxas maiores tenham sido observadas nas profundidades 30 e 50 cm (Figura 1B). A linhagem verde (*vd*-CE) apresentou respostas distintas das demais, sendo registradas diferenças significativas entre as estações apenas nos indivíduos cultivados a 50 cm, com valores mais elevados durante a estação seca (Figura 1C).

Quando comparadas as linhagens, foi constatado que durante o período chuvoso, elas apresentaram diferenças entre si em algumas situações (Tabela 1). A vermelha (*vm*-CE) apresentou TCs semelhantes à vermelha-nativa (*vm*-RN) em todas as profundidades, sendo mais baixas do que a marrom-esverdeada (*me*-CE) apenas na profundidade de 50 cm. Ainda em relação à vermelha (vm-CE), as TCs foram superiores à verde (*vd*-CE), na profundidade de 30 e 80cm. Quanto à linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), foram registrados valores superiores à verde (*vd*-CE) nos cultivos a 30 e 50 cm e à vermelha-nativa (*vm*-CE) a 50 cm de profundidade. A linhagem vermelha-nativa (*vm*-CE) apresentou também valores superiores à verde (*vd*-CE) nos cultivos à 30 cm. No período seco, todas as linhagens apresentaram semelhanças nas TCs, quando comparadas as mesmas profundidades (Tabela 2).

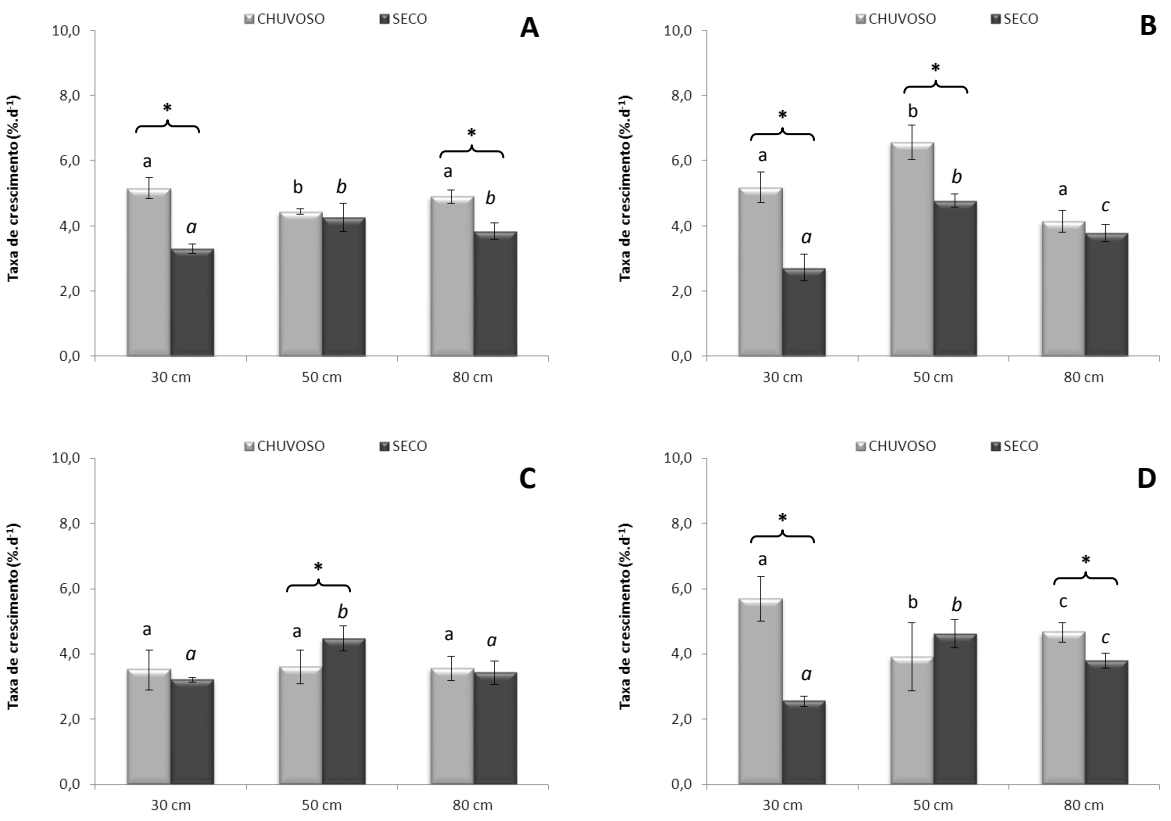

Figura 1. Taxas de crescimento das diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.2. Fluorescência *in vivo* da clorofila

Os perfis das curvas de fotossíntese estimadas por meio das taxas de transporte de elétrons (ETR) em irradiâncias crescentes estão representados na Figura 2. A partir dessas curvas, foi possível obter os parâmetros da fotossíntese ($ETR_{máx}$, $\Delta F/F_m'$, αETR, I_k) das linhagens de *Gracilaria birdiae* e identificar as diferenças em relação às profundidades e as estações (Tabela 3). Os parâmetros fotossintetizantes obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros fotossintetizantes ($ETR_{máx}$, $\Delta F/F_m'$, αETR, I_k) obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila nas diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, vm-RN) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca.

Estações/	**CHUVOSA**			**SECA**		
Profundidades	**30 cm**	**50 cm**	**80 cm**	**30 cm**	**50 cm**	**80 cm**
***vm*-CE**						
ETR_{Max}	1,79 ± 0,70	1,08 ± 0,12	1,46 ± 0,33	3,10 ± 0,94	2,53 ± 1,02	2,32 ± 0,32
Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$)	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,54 ± 0,06	0,58 ± 0,02	0,59 ± 0,02
Eficiência fotossintetizante (αETR)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Saturação luminosa (I_k)	121,2 ± 38,82	53,5 ± 6,73	56,4 ± 7,90	129,4 ± 24,58	173,3 ± 6,35	130,4 ± 13,81
***me*-CE**						
ETR_{Max}	1,30 ± 0,09	2,43 ± 0,55	1,67 ±0,25	4,16 ± 0,62	3,11 ± 0,67	3,83 ± 1,06
Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$)	0,60 ± 0,00	0,58 ± 0,03	0,63 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,57 ± 0,06	0,61 ± 0,02
Eficiência fotossintetizante (αETR)	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
Saturação luminosa (I_k)	78,7 ± 8,30	96,3 ± 8,77	53,1 ± 7,73	181,6 ± 34,27	177,2 ± 14,71	173,7 ± 17,41
***vd*-CE**						
ETR_{Max}	1,39 ± 0,06	1,77 ± 0,36	2,41 ± 0,45	4,59 ± 0,57	6,55 ± 2,01	4,54 ± 1,58
Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$)	0,60 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,61 ± 0,03
Eficiência fotossintetizante (αETR)	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Saturação luminosa (I_k)	58,2 ± 6,88	67,0 ± 14,78	88,8 ± 19,65	148,8 ± 23,3	155,2 ± 19,6	140,5 ± 38,7
***vm*-RN**						
ETR_{Max}	1,10 ± 0,30	1,32 ± 0,35	1,32 ±0,21	4,59 ± 0,57	5,47 ± 0,52	3,46 ± 0,95
Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$)	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,62 ± 0,04	0,56 ± 0,06
Eficiência fotossintetizante (αETR)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Saturação luminosa (I_k)	39,8 ± 8,13	55,2 ± 13,72	58,9 ± 5,25	175,3 ± 40,10	197,0 ± 13,65	88,3 ± 10,54

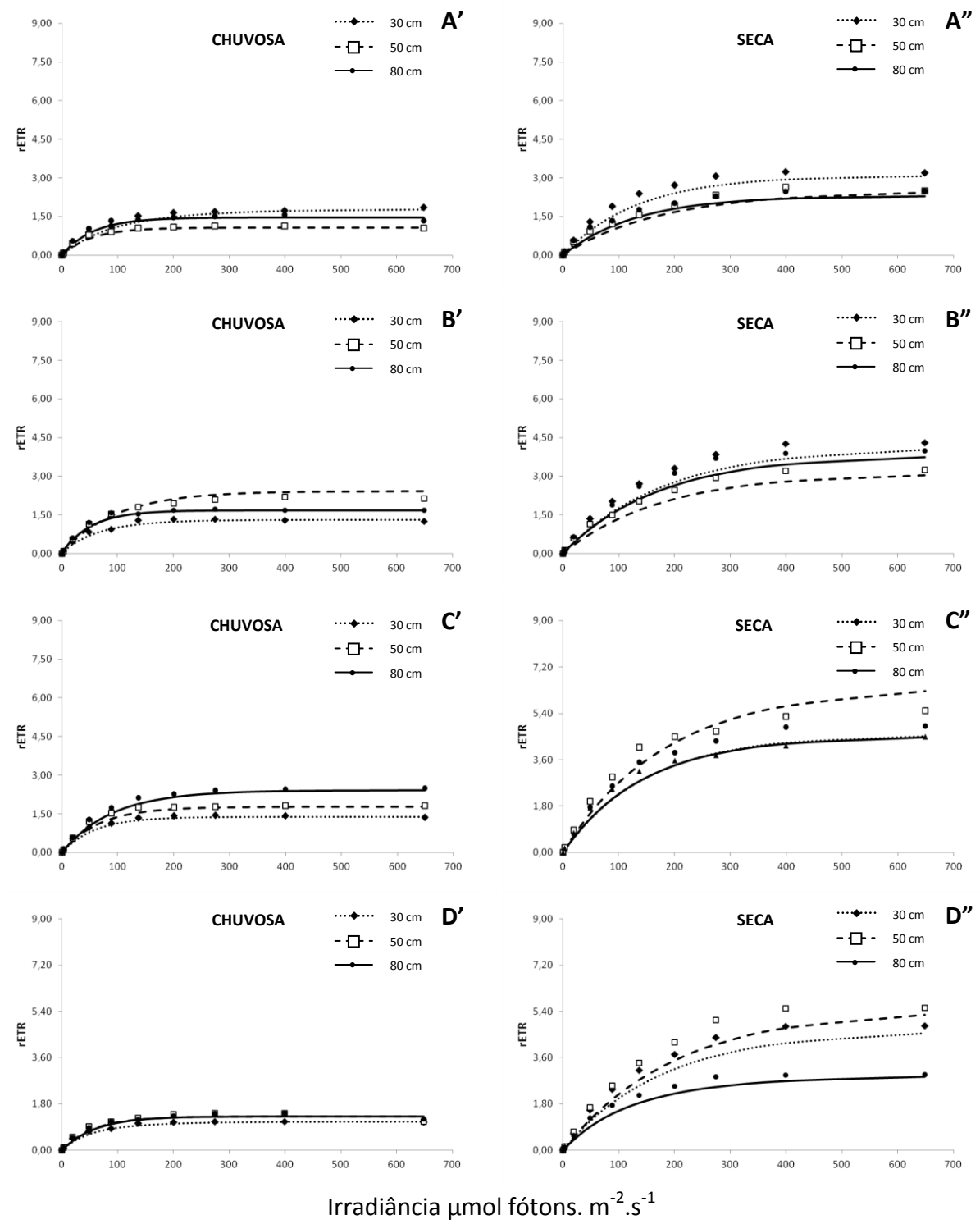

Figura 2. Curvas de fotossíntese estimadas com base nos valores de ETR e irradiâncias crescentes para as diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa (‘) e seca (“).

Tabela 4. ANOVA multifatorial para os parâmetros fotossintetizantes ($ETR_{máx}$, $\Delta F/F_m'$, αETR, I_k) obtidos a partir da fluorescência *in vivo* da clorofila nas diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE e vermelha-nativa, vm-RN) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de variação	gl		$ETR_{máx}$	$\Delta F/Fm'$	αETR	I_k
Estação (A)	1	F	173,19	0,56	0,27	245,00
		p	**	n.s.	n.s.	**
Profundidade (B)	2	F	3,50	1,68	0,99	6,32
		p	*	n.s.	n.s.	*
Linhagem (C)	3	F	8,13	4,33	11,29	3,42
		p	**	*	**	*
A x B	2	F	1,96	4,51	4,54	4,10
		p	n.s.	*	*	*
A x C	3	F	9,16	2,74	5,70	2,52
		p	**	n.s.	*	n.s.
B x C	6	F	2,00	2,36	1,71	2,02
		p	n.s.	*	n.s.	n.s.
A x B x C	6	F	2,42	0,95	0,68	5,84
		p	*	n.s.	n.s.	**

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

3.2.1. Fotossíntese máxima

A análise de variância multifatorial revelou que os valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 4). Quando comparadas as estações, foram observados valores mais elevados de $ETR_{máx}$ na estação seca do que os obtidos na estação chuvosa para: i) a linhagem vermelha (vm-CE) na profundidade de 50 cm (Figura 3A); ii) a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) nas profundidades de 30 cm e 80 cm (Figura 3B); e iii) as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) em todas as profundidades (Figuras 3C e D).

Quando comparadas as linhagens, verificou-se que durante a estação chuvosa, cada uma delas apresentou valores de $ETR_{máx}$ semelhantes nas três profundidades, com exceção à linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), que apresentou valores mais elevados apenas para os indivíduos cultivados a 50 cm (p<0,05). Na estação seca, as linhagens não diferiram entre

si, com exceção à linhagem verde (*vd*CE) cultivada a 50 cm, que apresentou valores mais elevados do que as demais linhagens nessa mesma profundidade.

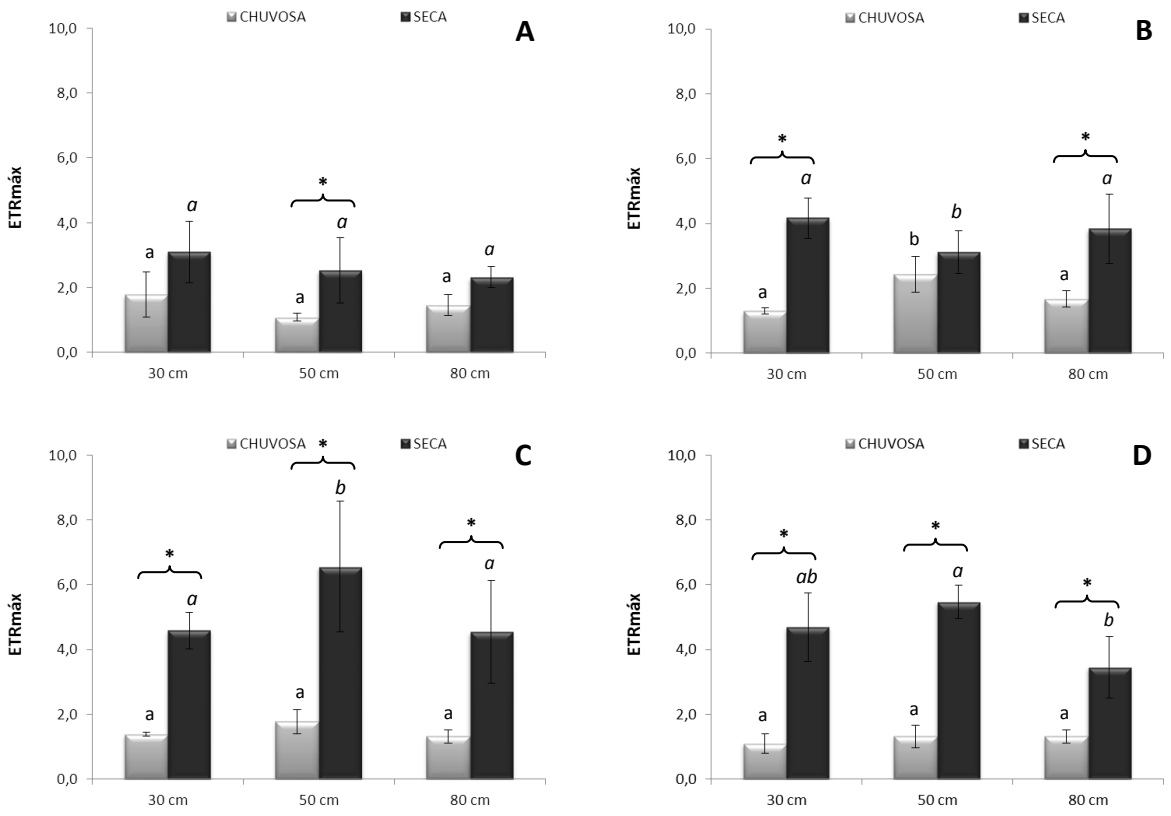

Figura 3. $ETR_{máx}$ das diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.2.2. Rendimento quântico efetivo

A análise de variância multifatorial revelou que os valores de rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN), quando comparadas as estações (chuvosa e seca) e as profundidades (30, 50 e 80 cm) (Tabela 4; Figuras 4 A, B, C e D). As linhagens também não diferiram entre si.

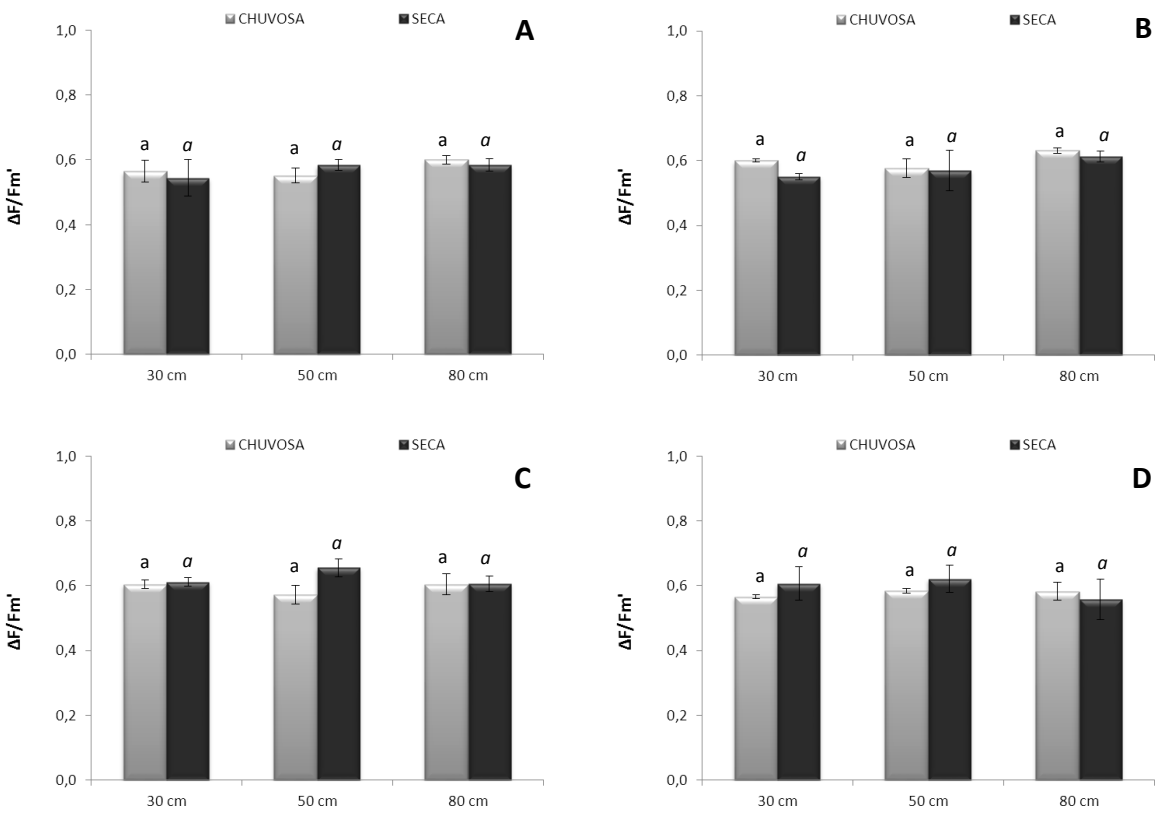

Figura 4. Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) das diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Letras semelhantes com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam valores similares ($p>0,05$) entre as profundidades. Não houve diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca ($p>0,05$).

3.2.3. Eficiência fotossintetizante (αETR)

Semelhante ao observado para o $\Delta F/F_m'$, não foram registradas diferenças significativas da eficiência fotossintetizante (αETR) em nenhuma das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN), quando comparadas as estações (chuvosa e seca) e as profundidades (30, 50 e 80 cm) (Tabela 4; Figuras 4 A, B, C e D). As linhagens também não diferiram entre si.

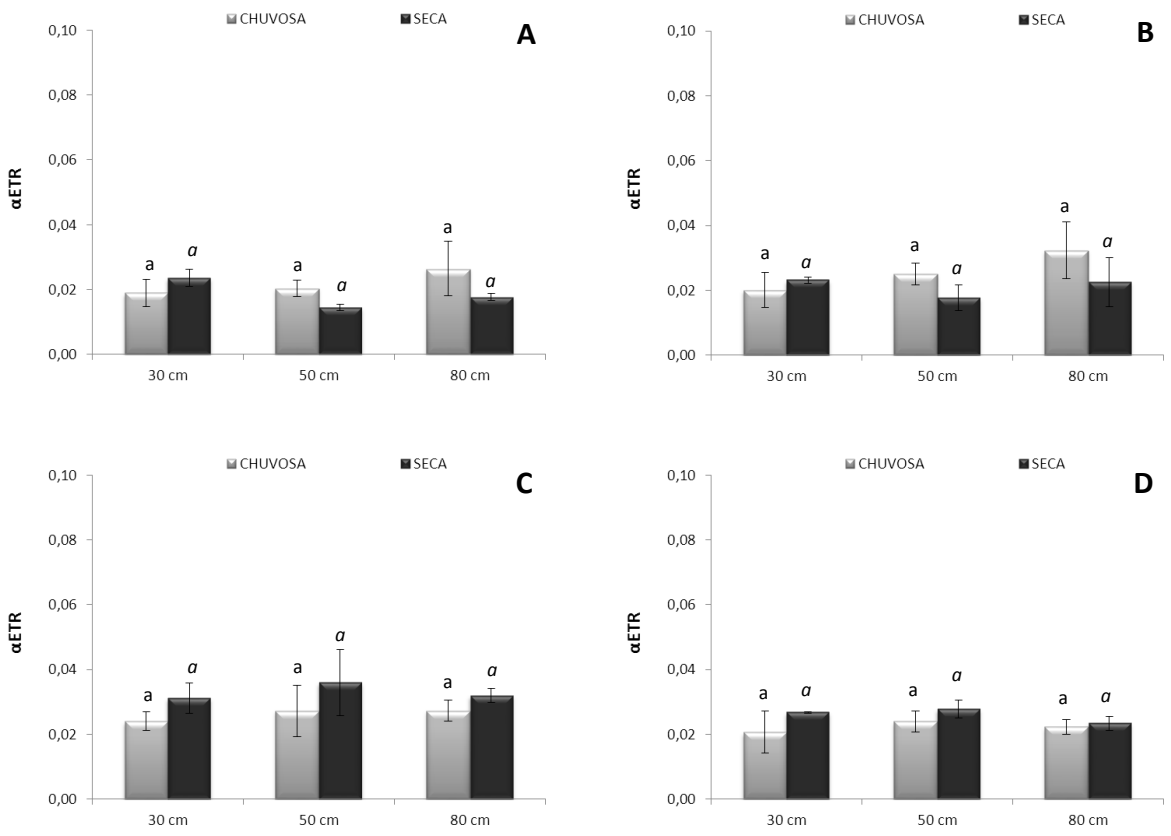

Figura 5. Eficiência fotossintetizante (αETR) das diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm-CE*) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Letras semelhantes com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam valores similares (p>0,05) entre as profundidades. Não houve diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca (p>0,05).

3.2.4. Saturação luminosa

A análise de variância multifatorial revelou que os valores de saturação luminosa (I_k) apresentaram diferenças significativas entre as estações chuvosa e seca, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens (Tabela 4). Quando comparadas as estações, foram observados valores mais elevados de I_k na estação seca do que os obtidos na estação chuvosa para: i) a linhagem vermelha (*vm*-CE) nas profundidades de 50 e 80 cm (Figura 6A); ii) a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) nas três profundidades (Figura 6B); e iii) as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) nas profundidades de 30 e 50 cm (Figuras 6C e D).

Quando comparadas as linhagens, foi constatado que durante o período chuvoso, as linhagens apresentaram valores de I_k semelhantes, com exceção à linhagem vermelha (*vm*-CE) que apresentou valores mais elevados do que nas linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apenas nos cultivos a 30 cm.

Para o período seco, as diferentes linhagens de *G. birdiae* apresentaram também valores semelhantes em todas as profundidades, com exceção à linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivada a 80 cm, que apresentou valor mais elevado do que o obtido pela vermelha-nativa (*vm*-RN) na mesma profundidade.

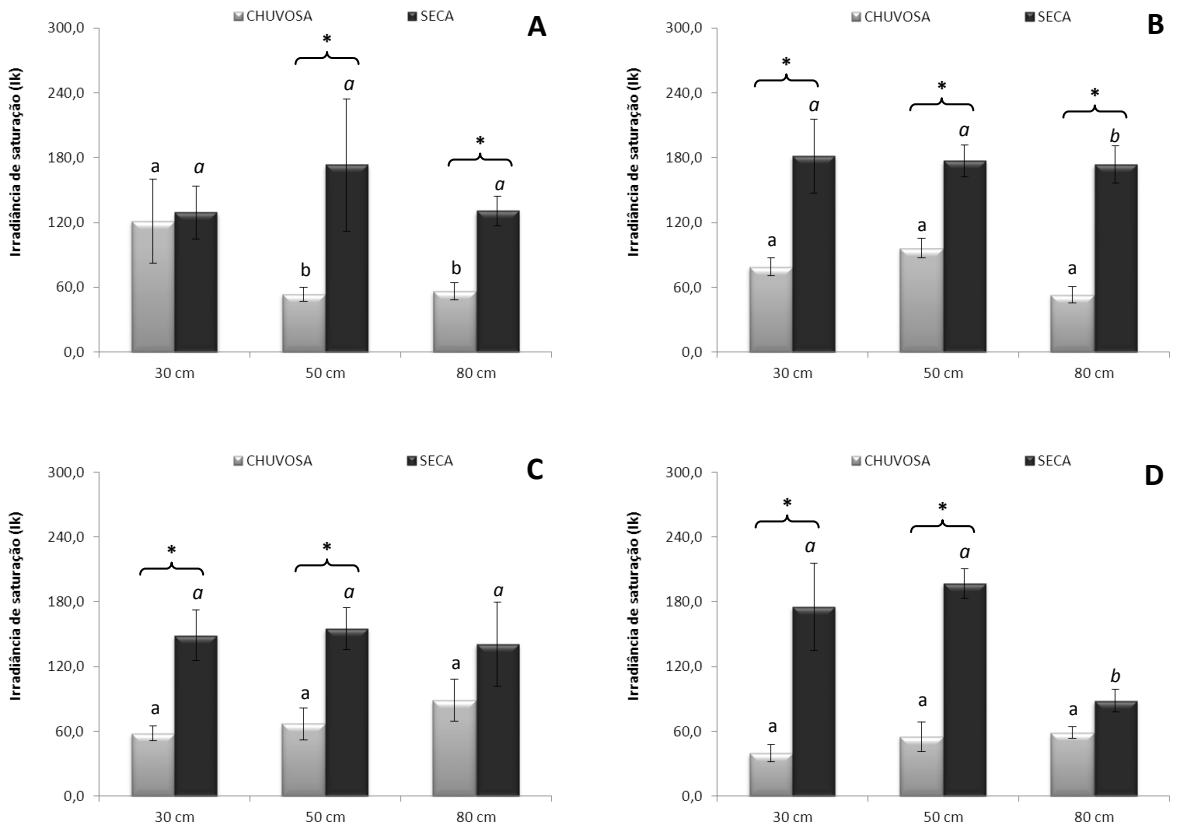

Figura 6. Irradiância de saturação (I_k) das diferentes linhagens de *G. birdiae*, vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.3. Composição pigmentar

As concentrações dos diferentes pigmentos (ficoeritrina, FE; ficocianina, FC; aloficocianina, AFC; clorofila *a*, Cl*a*; e carotenoides totais, CT) extraídos das linhagens de *Gracilaria birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) antes do início do cultivo no mar (laboratório) podem ser visualizadas no item 3.6., Capítulo 3.

A composição pigmentar (FE, FC, AFC, Cla e CT) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentou reduções significativas quando comparados os valores obtidos antes do início dos cultivos e os registrados após 30 dias de cultivo, nas três profundidades (30, 50 e 80 cm) e nas estações chuvosa e seca (Tabela 5). Contudo, durante o período chuvoso, semelhanças entre as concentrações antes e após o cultivo, foram registradas para: i) a FE na linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada a 80 cm; ii) a FC na linhagem vermelha (*vm*-CE) cultivada a 50 e 80 cm; iii) a AFC para as linhagens verde (*vd*-CE) cultivada a 30 cm e vermelha-nativa (*vm*-RN) a 80 cm; iv) a Cl*a* nas quatro linhagens cultivadas a 30 cm, as linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (RN) a 50 cm e as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) a 80 cm; e v) os CT nas quatro linhagens cultivadas a 30 cm, nas linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) a 50 cm e na marrom-esverdeada (*me*-CE) a 80 cm (Tabela 5).

Durante o período seco, semelhanças entre as concentrações antes e após o cultivo, foram registradas para: i) a FC na linhagem vermelha-nativa a 30 cm; ii) a AFC para a linhagem verde (*vd*-CE) cultivada a 30 cm; iii) a Cl*a* para vermelha-nativa (*vm*-RN) a 80 cm; e iv) o CT para as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (vm-RN) a 80 cm (Tabela 5).

Em algumas situações (Tabela 5) foram registrados, após 30 dias de cultivo, concentrações mais elevadas de: i) FE na linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada nas profundidades de 30 e 50 cm (período chuvoso); ii) FC na linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) nas três profundidades (período chuvoso); iii) AFC na vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada nas profundidades de 30 (dois períodos) e 80 cm (período chuvoso) e iv) Cl*a* e CT nas linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas a 80 cm (período chuvoso).

Tabela 5. Comparação entre os valores de conteúdo pigmentar (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, *vm*-RN) obtidos no início dos cultivos no mar (LAB) e após 30 dias de cultivo na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, Brasil, durante as estações chuvosa e seca.

		CHUVOSA				SECA			
Pigmentos		***vm*-CE**	***me*-CE**	***vd*-CE**	***vm*-RN**	***vm*-CE**	***me*-CE**	***vd*-CE**	***vm*-RN**
FE	*t*	8,40	15,66	9,50	-4,59	59,21	28,83	6,09	9,33
(LAB x 30 cm)	p	*	**	**	*	**	**	*	**
FE	*t*	5,62	24,80	10,19	-3,15	58,36	28,74	5,04	7,52
(LAB x 50 cm)	p	*	**	**	*	**	**	*	*
FE	*t*	3,90	25,11	10,01	-1,08	67,58	21,14	11,69	10,33
(LAB x 80 cm)	p	*	**	**	n.s.	**	**	**	**
FC	*t*	2,98	7,58	5,96	-5,77	4,79	13,47	10,25	1,07
(LAB x 30 cm)	p	*	*	*	*	*	**	**	n.s.
FC	*t*	0,28	4,76	8,73	-4,17	4,85	11,46	7,69	10,47
(LAB x 50 cm)	p	n.s.	*	**	*	*	**	*	**
FC	*t*	2,27	5,44	8,66	-3,62	5,37	11,40	10,79	23,69
(LAB x 80 cm)	p	n.s.	*	**	*	*	**	**	**
AFC	*t*	5,76	5,33	0,14	-3,66	11,79	26,07	1,81	-4,98
(LAB x 30 cm)	p	*	*	n.s.	*	**	**	n.s.	*
AFC	*t*	6,00	4,14	6,64	2,63	11,33	3,60	2,83	4,20
(LAB x 50 cm)	p	*	*	*	n.s.	**	*	*	*
AFC	*t*	12,13	6,26	6,70	-4,11	9,56	33,77	12,53	9,80
(LAB x 80 cm)	P	**	*	*	*	**	**	**	**
Cl*a*	*t*	0,19	0,24	1,99	1,35	5,07	9,64	5,85	4,32
(LAB x 30 cm)	p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s	*	**	*	*
Cl*a*	*t*	2,00	5,00	5,14	0,57	4,06	6,00	2,87	4,01
(LAB x 50 cm)	p	n.s.	*	*	n.s.	*	*	*	*
Cl*a*	*t*	1,49	0,12	-6,24	-5,87	8,73	3,18	3,57	1,26
(LAB x 80 cm)	p	n.s.	n.s.	*	*	**	*	*	n.s.
CT	*t*	0,77	0,30	1,79	1,24	6,32	7,06	3,06	3,77
(LAB x 30 cm)	p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*	*
CT	*t*	1,45	4,27	4,51	0,66	14,72	8,87	3,84	6,73
(LAB x 50 cm)	p	n.s.	*	*	n.s.	**	**	*	*
CT	*t*	2,98	1,33	-4,07	-5,02	32,45	3,19	1,90	0,04
(LAB x 80 cm)	p	*	n.s.	*	*	**	*	n.s.	n.s.

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001) n.s. não-significativo

As interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagens), avaliadas para os diferentes pigmentos (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) extraídos das linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas por 30 dias no mar são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. ANOVA multifatorial para a composição pigmentar (FE, FC, AFC, Cl*a* e CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae* (vermelha, *vm*-CE; marrom-esverdeada, *me*-CE; verde, *vd*-CE; e vermelha-nativa, vm-RN) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Resultados dos efeitos isolados e interações entre as variáveis independentes (estação, profundidade e linhagem).

Fonte de variação	gl		Cl*a*	FE	FC	ALC	CT
Estação (A)	1	F	148,50	824,21	606,08	39,50	194,67
		p	**	**	**	**	**
Profundidade (B)	2	F	100,44	3,04	22,72	34,86	59,59
		p	**	n.s.	**	**	**
Linhagem (C)	3	F	16,93	426,04	7,54	12,44	9,69
		p	**	**	**	**	**
A x B	2	F	21,23	3,44	3,85	3,71	7,35
		p	**	*	*	*	*
A x C	3	F	7,44	194,45	9,25	8,34	17,30
		p	**	**	**	**	**
B x C	6	F	34,29	4,87	11,46	4,07	31,19
		p	**	**	**	*	**
A x B x C	6	F	3,58	3,14	15,77	5,17	1,65
		p	*	*	**	**	n.s.

* diferenças significativas (p<0,05); ** diferenças altamente significativas (<0,001); n.s. não-significativo

3.3.1. Ficoeritrina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de ficoeritrina (FE) apresentaram diferenças significativas entre as estações e entre as linhagens (Tabela 6).

Quando comparadas as estações, as concentrações de FE foram mais elevadas no período chuvoso para: i) as linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) em todas as profundidades (Figuras 7A e D) e ii) a linhagem marrom-esverdeada (*me*-CE), nas profundidades de 30 e 50 cm (Figura B). Para a verde (*vd*-CE), não foram observadas diferenças nas concentrações desse pigmento, em nenhuma das profundidades (Figura 7C).

Quando comparadas as linhagens, a vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram valores semelhantes entre si, tanto no período chuvoso quanto no seco. Esses valores foram superiores às concentrações registradas para a marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE) nas três produndidades.

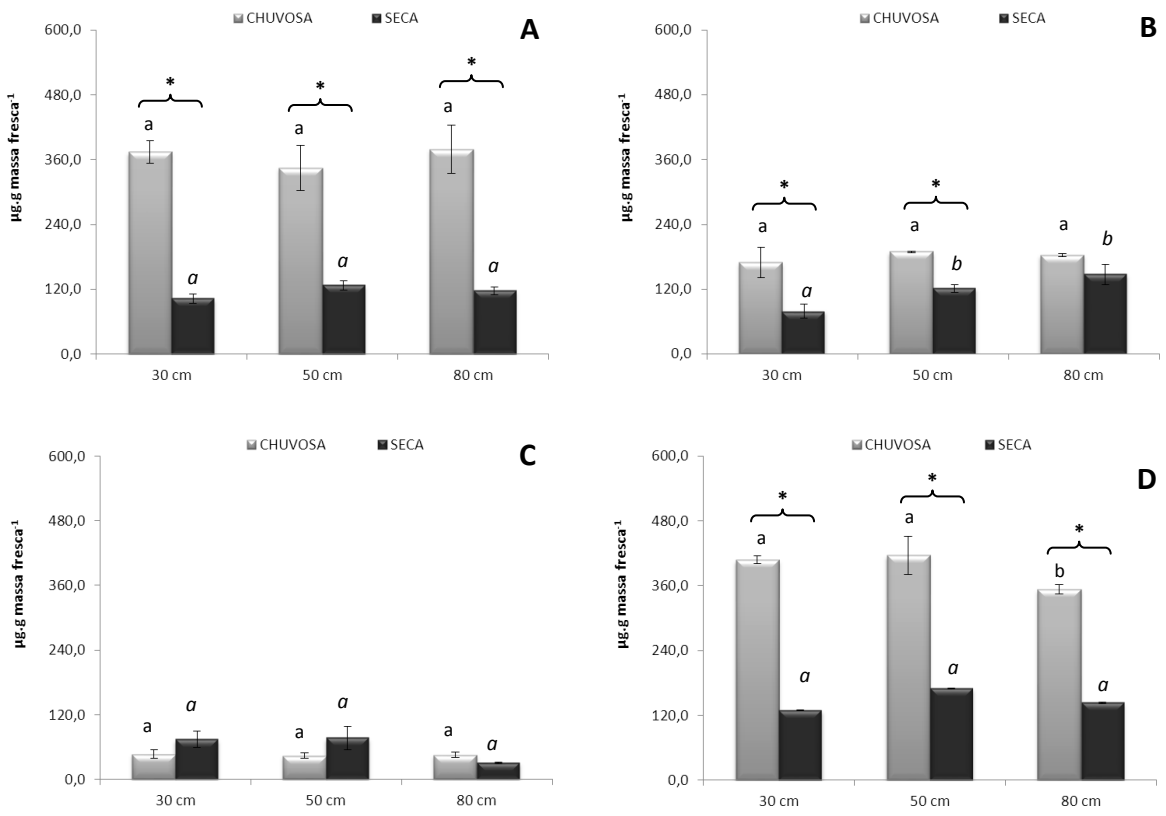

Figura 7. Concentração da ficoeritrina (FE) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.3.2. Ficocianina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de ficocianina (FC) apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as profundidades e entre as linhagens (Tabela 6).

Quando comparadas as estações, as concentrações de FC das linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) foram mais elevadas na estação chuvosa, em todas as profundidades (Figuras 8A, B, D). Na linhagem verde (*vd*-CE), esses valores foram mais elevados na estação chuvosa apenas nas profundidades de 30 e 80 cm, sendo semelhantes a 50 cm (Figura 8C).

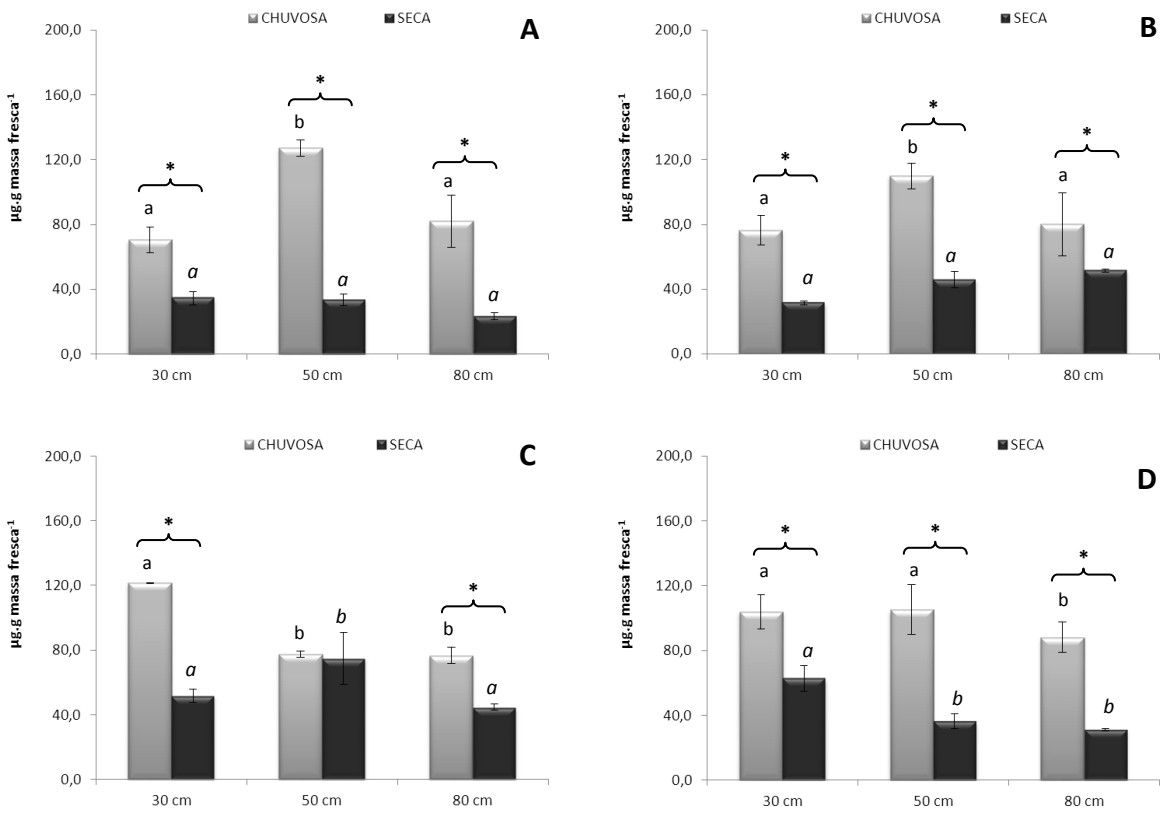

Figura 8. Concentração da ficocianina (FC) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de FC em determinadas situações. Durante o período chuvoso, as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) apresentaram concentrações FC semelhantes em todas as profundidades (Figuras 8A e B). Nos cultivos a 30 cm, a linhagem verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (vm-RN) apresentaram valores semelhantes entre si e mais elevados do que os registrados para as demais linhagens. A linhagem vermelha (*vm*-CE) cultivada a 50 cm apresentou concentrações de FC maiores do que a verde (*vd*-CE) e a vermelha-nativa (*vm*-RN) nessa mesma profundidade. A 80 cm, as linhagens apresentaram valores de FC semelhantes entre si (Figura 8).

Durante o período seco, as quatro linhagens apresentaram concentrações semelhantes de FC, exceto para: i) a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada a 30 cm,

que apresentou concentrações mais elevadas do que a vermelha (*vm*-CE); ii) a linhagem verde (*vd*-CE) cultivada a 50 cm, que apresentou maiores concentrações do que as demais linhagens; e iii) a marrom-esverdeada (*me*-CE) a 80 cm, que apresentou maiores concentrações do que a linhagem vermelha (*vm*-CE) e foi semelhante às demais.

3.3.3. Aloficocianina

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de aloficocianina (AFC) das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as profundidades e entre as linhagens (Tabela 6).

Quando comparadas as estações, as concentrações de AFC foram semelhantes na maioria das linhagens. Entretanto, concentrações de AFC mais elevadas na estação chuvosa foram registradas para as linhagens: i) vermelha (*vm*-CE) cultivada a 50 cm (Figura 9A); ii) marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE), a 80 cm (Figura 9B e C) e iii) vermelha-nativa (*vm*-RN) a 50 e 80 cm (Figura 9D).

Quando comparadas as linhagens, a verde (*vd*-CE) e a vermelha-nativa (*vm*-RN) apresentaram concentrações semelhantes entre si e superiores às linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE), durante o período chuvoso. Essas duas últimas apresentaram semelhanças nas concentrações de AFC.

Durante o período seco, as concentrações de AFC apresentaram semelhanças entre as linhagens com exceção para: i) a verde (*vd*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivadas a 50 cm, que apresentaram concentrações de AFC mais elevadas do que as linhagens vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivadas na mesma profundidade; e ii) a verde (*vd*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada a 30 cm, que apresentou valores mais elevados do que os registrados para a vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE).

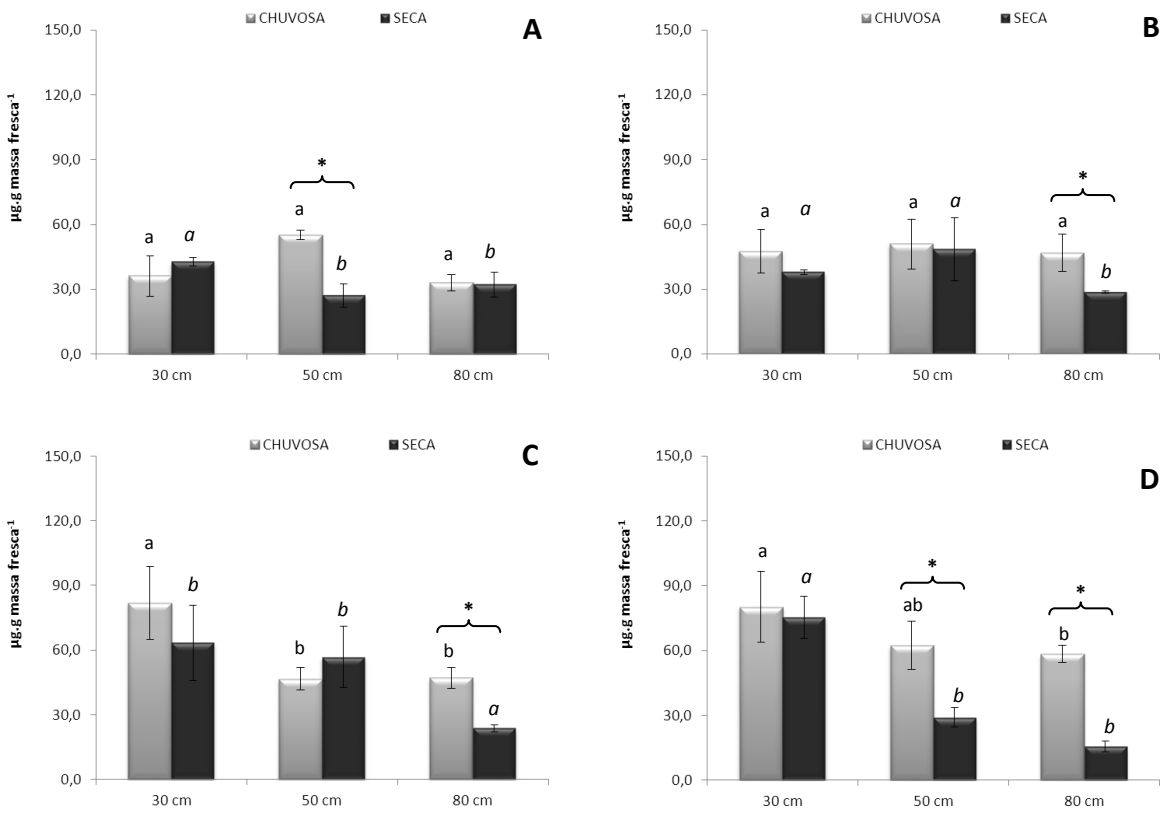

Figura 9. Concentração da aloficocianina (AFC) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

3.3.4. Clorofila *a*

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de Clorofila *a* das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as diferentes profundidades e entre as linhagens de *Gracilaria birdiae* (Tabela 6).

Quando comparadas as estações, as concentrações da Cl*a* das linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE) apresentaram diferenças significativas entre as estações nas profundidades de 30 e 80 cm, sendo os maiores valores registrados na estação chuvosa (Figuras 10A, B e C). Para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN), as concentrações de Cl*a* foram mais elevadas na estação chuvosa nas profundidades de 50 e 80 cm (Figura 10D).

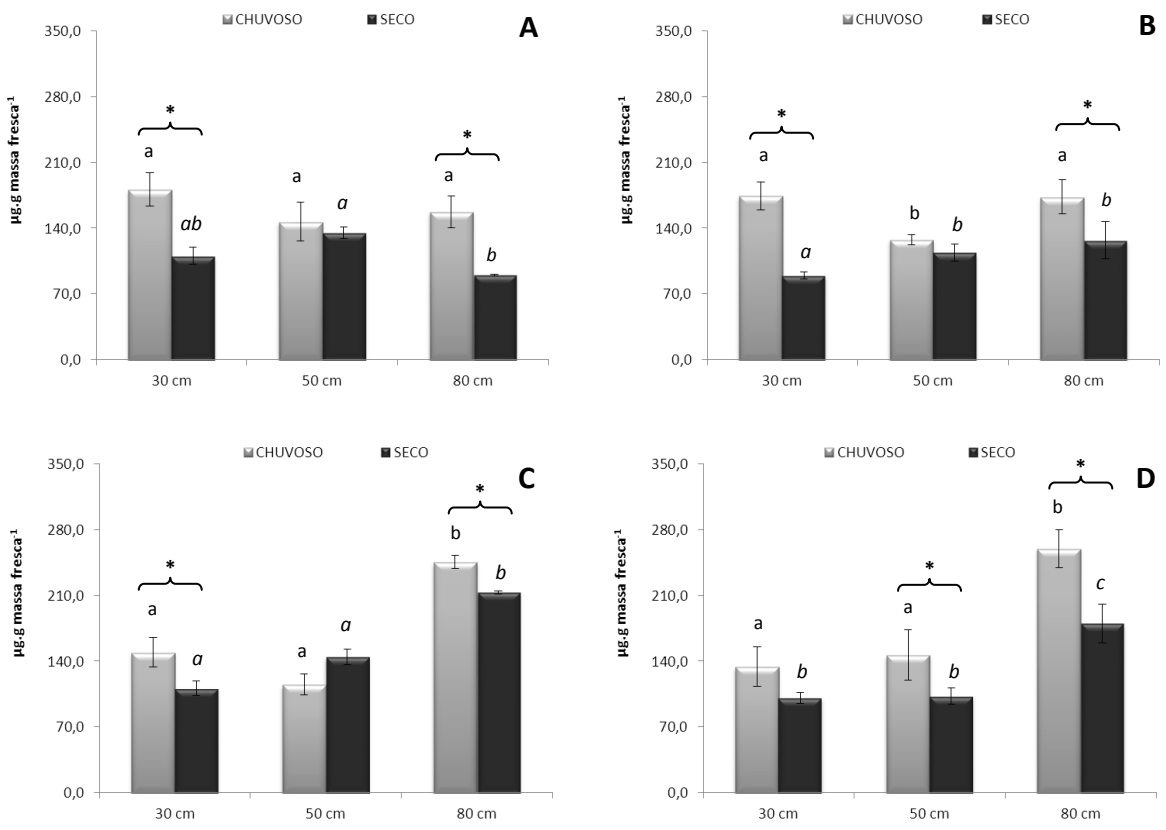

Figura 10. Concentração de clorofila *a* (Cl*a*) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

Quando comparadas as linhagens, foram registradas semelhanças entre as concentrações de Cl*a*, exceto para: i) a vermelha-nativa (*vm*-RN) a 30 cm, no período chuvoso, que apresentou valores mais baixos do que os registrados para às demais linhagens cultivadas na mesma profundidade; e ii) a vermelha-nativa (*vm*-RN) e verde (*vd*-CE) a 80 cm, em ambos períodos, que apresentaram valores mais elevados do que para a vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) (Figura 10).

3.3.5. Carotenoides totais

A análise de variância multifatorial revelou que as concentrações de carotenoides totais (CT) das diferentes linhagens apresentaram diferenças significativas entre as estações, entre as profundidades e entre as linhagens (Tabela 6).

Quando comparadas as estações, as concentrações de CT da linhagem vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) foram maiores na estação chuvosa do que na seca, em todas as profundidades estudadas (Figuras 11A e B). A linhagem verde (*vd*-CE) não apresentou diferenças significativas nas concentrações de CT entre as estações, em nenhuma das profundidades (Figura 11C) e foram mais elevadas nos cultivos a 80 cm de profundidade. As concentrações de CT obtidas na linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) foram maiores na estação chuvosa, nas profundidades de 50 e 80 cm (Figura 11D).

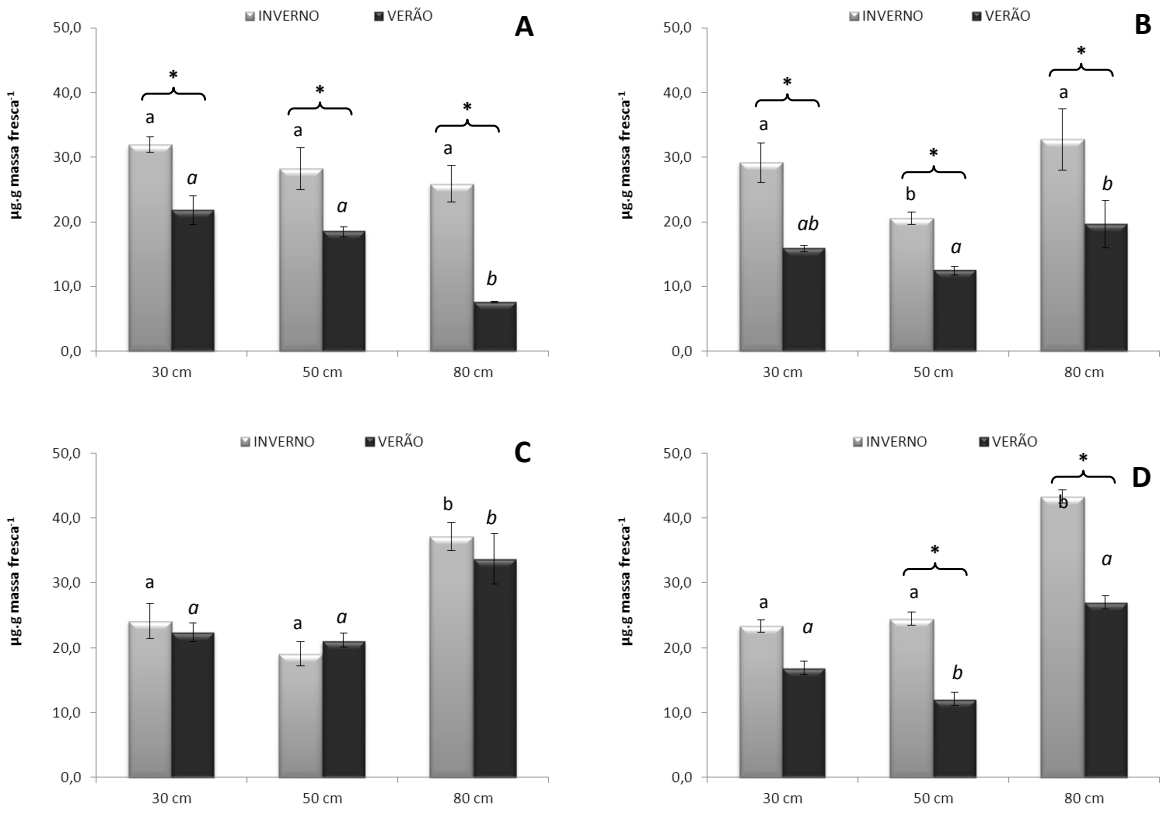

Figura 11. Concentração de carotenoides totais (CT) das diferentes linhagens de *G. birdiae,* vermelha (*vm*-CE) (A), marrom-esverdeada (*me*-CE) (B), verde (*vd*-CE) (C) e vermelha-nativa (*vm*-RN) (D) cultivadas por 30 dias na praia de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil, nas profundidades de 30, 50 e 80 cm, durante as estações chuvosa e seca. Diferentes letras com mesma formatação sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre as profundidades e o símbolo (*) indica diferença significativa entre as estações (chuvosa e seca).

Quando comparadas as linhagens, foram detectadas diferenças entre as concentrações de CT em algumas situações. Durante o período chuvoso, as linhagens vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE) cultivadas a 30 cm apresentaram

concentrações de CT mais elevadas do que a verde (*vd*-CE) e a vermelha-nativa (*vm*-RN), na mesma profundidade. Nos cultivos a 50 cm, os valores de CT foram maiores para a linhagem vermelha (*vm*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN) do que para a marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). A linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) cultivada a 80 cm apresentou as concentrações de CT mais elevadas do que as demais linhagens cultivadas na mesma profundidade (Figura 11).

Durante o período seco, as concentrações de CT para as linhagens cultivadas a 30 cm foram semelhantes. Na profundidade de 50 cm, as linhagens vermelha (*vm*-CE) e verde (*vd*-CE) apresentaram concentrações mais elevadas do que a marrom-esverdeada (*me*-CE) e a vermelha-nativa (*vm*-RN). As concentrações de CT da linhagem vermelha (*vm*-CE) cultivada a 80 cm foram mais baixas do que de todas as demais linhagens na mesma profundidade.

4. Discussão

4.3. Taxas de crescimento

As taxas de crescimento em espécies do gênero *Gracilaria* podem variar dependendo das condições ambientais as quais estão expostas (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010). Os parâmetros que mais influenciam no crescimento dessas algas estão relacionados à luz, nutrientes, temperatura, movimento da água e salinidade (KIRST, 1989; LOBBAN & HARRISON, 1997). As TCs das quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram diferenças entre as estações chuvosa e seca em determinadas profundidades (Figura 1). Quando essas diferenças foram identificadas, os valores mais elevados foram registrados durante a estação chuvosa, em praticamente todas as linhagens, com exceção à verde (*vd*-CE). Essa linhagem apresentou os valores mais elevados na profundidade de 50 cm, durante a estação seca. Além disso, a linhagem verde (*vd*-CE) apresentou as TCs mais baixas na estação chuvosa, quando comparada com as demais, com valores entre 3,51 ± 0,61%.d^{-1} a 3,60 ± 0,51%.d^{-1}. Entretanto, na estação seca, essas taxas foram semelhantes entre as linhagens, quando comparadas para cada profundidade separadamente (Tabela 2).

Os valores mais elevados de crescimento registrados no período chuvoso em relação ao seco, para a maioria das linhagens de *Gracilaria birdiae* podem estar relacionados à maior concentração de nutrientes disponíveis durante esse período, que é lixiviado para o mar pelas fortes chuvas. Resultados similares foram encontrados por BEZERRA & MARINHO-SORIANO

(2010) para a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) no mesmo local de cultivo. Embora esses autores tenham encontrado valores de crescimento semelhantes nas estações chuvosa (4,4%.d^{-1}) e seca (4,3%.d^{-1}), o pico de crescimento (7,45%.d^{-1}) coincidiu com o período em que a concentração de NH_4^+ na água foi mais elevada. Correlações positivas entre as TCs e a concentração de NH_4^+ foram encontradas, mostrando a influência desse nutriente sobre a produtividade dessa espécie. RIVERS & PECKOL (1995) verificaram que o crescimento de *G. tikvahiae* foi estimulado com o aumento da disponibilidade de N no ambiente. Segundo esses autores, durante o período de verão, o N torna-se um fator limitante para o crescimento dessa espécie, sendo registradas reduções desse nutriente no conteúdo interno da alga. Diminuições das taxas de crescimento e concentrações de N e ficoeritrina no talo de *G. tikvahiae* foram também registradas em experimentos com baixa concentração de N no meio (LAPOINTE & DUKE, 1984).

A deficiência da linhagem verde (*vd*-CE) em atingir TCs semelhantes às demais durante o período chuvoso pode estar relacionada à baixa concentração de FE presente nessa linhagem. Além disso, estudos anteriores sobre a atividade da enzima nitrato redutase e assimilação de nitrogênio de linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* reportam valores mais baixos para a variante verde (*vd*-CE) em relação às demais linhagens (DONATO, 2005). Considerações sobre as variações dos pigmentos registradas nesse estudo para as diferentes linhagens de *G. birdiae* serão discutidas nos próximos itens.

Durante o período seco, as TCs registradas para as quatro linhagens de *Gracilaria birdiae* foram semelhantes entre si. Entretanto, as linhagens apresentaram diferenças entre as profundidades sendo registrados valores mais baixos na profundidade de 30 cm (Figura 1). Esse desempenho pode ter sido influenciado pelos diferentes níveis de irradiância que incidiram sobre as algas nas diferentes profundidades, e que possivelmente promoveram a acomodação do aparato fotossintetizante, resultando em melhores TCs a 50 cm. Durante esse período, os níveis de irradiância sobre as algas foram superiores na profundidade de 30 cm, o que pode ter causado algum dano ao aparato fotossintetizante das diferentes linhagens. A luz é a fonte essencial para a realização da fotossíntese, no entanto, a energia solar em excesso, pode causar a fotoinibição ou até mesmo fotodestruição dos pigmentos. Para evitar esses danos, os organismos são capazes de acomodar o seu conteúdo pigmentar de acordo com a variação da irradiância no ambiente (LÜNING, 1990; CARNICAS *et al.*, 1999).

Nesse sentido, a aclimatação para níveis de luz saturante, resulta na diminuição dos níveis de pigmentos, que por sua vez irá influenciar diretamente nas variações do crescimento e capacidade fotossintetizante (RIVERS & PECKOL, 1995). As respostas fotossintetizantes, bem como a composição pigmentar registradas nesse estudo, serão discutidas nos itens a seguir.

4.4. Fluorescência da clorofila *a*

Nesse estudo, as linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) e irradiância de saturação (I_k) distintos entre as estações, com valores mais baixos durante a estação chuvosa, quando se observaram as maiores TCs. Como visto nos capítulos anteriores, durante o período chuvoso, a quantidade de material particulado na água foi bastante elevada, e a transparência foi muito baixa. Como consequência, a disponibilidade de luz para as algas cultivadas nesse período foi bem menor. Entretanto, mesmo no período seco, quando as linhagens de *G. birdiae* estiveram sujeitas a maiores irradiâncias, os valores de I_k não ultrapassaram 200 µmol.fótons.m^{-2}.s^{-1}. Esses valores sugerem adaptação das diferentes linhagens de *G. birdiae* a condições de baixa irradiância, podendo ser consideradas como "plantas de sombra". De acordo com LÜNING (1990), algas que apresentam taxas de saturação luminosa (I_k) em torno de 500 µmol. fótons.m^{-2}.s^{-1} podem ser consideradas como plantas típicas de "sol", enquanto que valores entre 60 e 150 µmol.m^{-2}.s^{-1}, caracterizam as algas de "sombra".

Os baixos valores de $ETR_{máx}$ e I_k obtidos durante o período chuvoso sugerem a adaptação das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* a essas condições de baixa irradiância. Em geral, os valores de I_k são aceitos como uma medida para definir o *status* da aclimatação para organismos fotossintetizantes (SCHUBERT *et al.*, 2006). Vários estudos relatam que plantas aclimatadas a irradiâncias mais baixas apresentam uma capacidade fotossintetizante reduzida e baixa irradiância de saturação (GANZON-FORTES, 1997; SILVA *et al.*, 1998b; GÓMEZ *et al.,* 2005). Um deles trata de *G. chilensis*, que pode ser considerada como sendo uma espécie adaptada à sombra por apresentar elevado conteúdo pigmentar (Cl*a* e ficobiliproteinas), baixos valores de I_k (60 a 170 µmol. fótons.m^{-2}.s^{-1}) e reduções nas taxas de fotossíntese devido à diminuição da irradiância (GÓMEZ *et al.,* 2005). Diferenças entre as taxas de fotossíntese e valores de I_k foram reportadas para populações de *Gelidella acerosa* localizadas em ambientes com níveis de irradiâncias distintos (GANZON-FORTES, 1997). Nas plantas de médiolitoral superior (elevada irradiância) as taxas de fotossíntese e irradiâncias

de saturação foram superiores às registradas para as plantas localizadas em poças de marés e no infralitoral superior (baixa irradiância).

No presente estudo, a aclimatação das diferentes linhagens a níveis mais elevados de irradiância foi também observada. Durante a estação seca os níveis de irradiância que atingiram as algas foram superiores aos registrados no período chuvoso e como consequência, os valores de $ETR_{máx}$ e I_k foram também mais elevados. Resultados similares foram encontrados por FIGUEROA *et al*. (2006) para *G. cornea*, sendo registrado o aumento dos valores de $ETR_{máx}$ quando as algas eram transferidas para um ambiente com elevados níveis de irradiância. Entretanto, no presente estudo, os níveis de irradiância não foram suficientes para causar fotoinibição em nenhuma das linhagens de *G. birdiae*. As semelhanças nos valores de ΔF/Fm' reforçam essas observações. Em algas marinhas e vegetais superiores, é comum aceitar que o rendimento quântico efetivo (ΔF/Fm') diminui em resposta as altas irradiâncias, como consequência da fotoinibição (HÄDER *et al.*, 1997; CABELO-PASINI *et al.*, 2000). Valores de ΔF/Fm' semelhantes entre linhagens de *G. birdiae* (*vm*-CE, *me*-CE e *vd*-CE) foram também obtidos em estudos anteriores durante experimentos em laboratório (DONATO, 2005), enquanto que reduções nesses valores foram observadas para essas mesmas linhagens após a exposição à radiação UV-B (AYRES, 2010).

A atividade fotossintetizante de linhagens gametofíticas e tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* provenientes do estado do Ceará (*vm*-CE, *me*-CE e *vd*-CE) foram previamente avaliadas por outros autores, porém em laboratório (URSI *et al.,* 2003; DONATO, 2005). Nesses trabalhos, a linhagem verde (*vd*-CE) apresentou valores de $ETR_{máx}$ e I_k mais elevados do que os registrados para vermelha (*vm*-CE) e marrom-esverdeada (*me*-CE). Nos cultivos realizados no presente trabalho, essas diferenças não foram observadas, com exceção de plantas da linhagem verde (*vd*-CE) cultivadas na estação seca, a 50 cm de profundidade, que apresentaram valores de $ETR_{máx}$ mais elevados que nas demais linhagens. Variações nesses parâmetros são esperadas, uma vez que as condições de cultivo são bastante distintas das utilizadas em laboratório.

4.5. Pigmentos

A composição pigmentar das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* observada antes e após o cultivo por 30 dias, nas três profundidades e nas duas estações, apresentou na maioria das vezes, reduções nos valores, dependendo do pigmento e da linhagem em

questão. Durante a estação chuvosa, a linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) foi a única que não apresentou reduções nas concentrações dos diferentes pigmentos, apresentando valores semelhantes e as vezes até superiores aos registrados antes do cultivo. As demais linhagens, em geral, apresentaram reduções nas concentrações de pigmentos na estação chuvosa quando comparadas às verificadas antes do cultivo. Entretanto, na estação seca, as reduções nas concentrações dos diferentes pigmentos foram mais pronunciadas, e apenas em alguns casos foram registradas concentrações semelhantes ou superiores às obtidas antes dos cultivos. Possivelmente, esses resultados são consequência da maior irradiância a que estiveram submetidos os cultivos durante essse período. Maiores irradiâncias podem ter estimulado a atividade fotossintetizante, que possivelmente foi inibida pela quantidade de nutrientes, especialmente os baixos valores de N na água do mar. Esse fato pode ter ocasionado a fotodestruição dos pigmentos. Os valores mais elevados nas concentrações dos diferentes pigmentos registrados após o cultivo por 30 dias na estação chuvosa, quando comparados à estação seca, provavelmente foram decorrentes da menor irradiância a que as algas foram submetidas nesse período.

As concentrações mais elevadas de pigmentos verificadas nas diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* durante a estação chuvosa podem ser consideradas como uma estratégia fotobiológica da espécie à baixa irradiância do ambiente. Elevadas concentrações de pigmentos foram também observadas para *G. cornea* como resultado da utilização de nutrientes presentes em altas concentrações no ambiente e o efeito da elevada turbidez da água registrada durante a estação fria (ORDUÑA-ROJAS & ROBLEDO 2002). Vários autores sugerem que a aclimatação para os limites de luz resultam em um aumento dos níveis de pigmentos acessórios, na tentativa de maximizar a captação de luz, disponíveis em quantidades mínimas (RAMUS & VAN DER MEER, 1983; RIVERS & PECKOL, 1995; GÓMEZ *et al.*, 2005). Trabalhos anteriores sugerem que a capacidade fotossintetizante esteja relacionada à composição pigmentar, que por sua vez está relacionada à irradiância (LAPOINTE & DUKE, 1984; DENAULT *et al.*, 2000).

Durante o período chuvoso, a composição pigmentar das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentou valores mais elevados de FE em relação às demais ficobiliproteínas. A única exceção refere-se à linhagem verde (*vd*-CE), que apresentou concentrações mais elevadas de FC em relação aos demais pigmentos. A deficiência em FE e

valores de FC e AFC semelhantes ou superiores aos de FE são característicos para a linhagem verde de *G. birdiae*, e já haviam sido relatados em estudos anteriores (COSTA & PLASTINO, 2001, 2011; DONATO, 2005; URSI, 2005).

Considerando-se que as maiores TCs na maioria das linhagens de *G. birdiae* tenham sido registradas durante a estação chuvosa, podemos supor que os pigmentos desempenharam de forma eficiente o seu papel de transferir energia necessária para o crescimento. Esse fato pode ser reforçado a partir das comparações entre as TCs mais baixas registradas para a linhagem verde (*vd*-CE), deficiente em FE, e as demais linhagens. De acordo com YOKOYA *et al.* (2007), os baixos valores de crescimento verificados para uma variante verde de *Hypnea musciformis* em relação à uma linhagem marrom estiveram relacionados à deficiência em FE, uma vez que não foi detectado esse pigmento na variante verde.

Deve-se ressaltar que durante o período seco, as concentrações de FE e FC foram consideravelmente mais baixas do que as registradas na estação chuvosa em todas as linhagens de *Gracilaria birdiae*. Possivelmente, a redução desses pigmentos acessórios afetou o desempenho das linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (*vm*-RN), as quais apresentaram, em algumas profundidades, TCs mais baixas. Entretanto, a linhagem verde (*vd*-CE), embora deficiente em FE, parece ter sido favorecida no período seco, pois suas TCs foram semelhantes às observadas nas demais linhagens.

Sabe-se que as ficobiliproteínas, além de atuarem como pigmentos acessórios para a captação de energia para fotossíntese, são utilizadas também como reservas de nitrogênio. Dessa forma, esses pigmentos são a principal fonte, quando a demanda por N é superior à disponibilidade no ambiente. Nessas circunstâncias, a FE, por estar localizada mais externamente no ficobilissomo, é considerada a ficobiliproteína mais acessível (GANTT, 1990). Como visto anteriormente, o período seco foi caracterizado por apresentar concentrações mais baixas de nutrientes no ambiente. Dessa forma, podemos supor que as reduções nas concentrações de FE e FC observadas para as diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae,* ocorreram porque esses recursos foram consumidos no metabolismo, na tentativa de suprir a baixa disponibilidade de N no ambiente. A pequena variação nas concentrações de AFC observada para as quatro linhagens de *G. birdiae* está relacionada à sua localização, mas

interna nos ficobilissomos, sendo dessa forma, menos susceptível às modificações causadas por fatores externos (GANTT, 1990).

As linhagens vermelha (*vm*-CE), marrom-esverdeada (*me*-CE) e vermelha-nativa (vm-RN) apresentaram, em geral, uma redução nas concentrações de CT em todas as profundidades, na estação seca, quando comparadas às concentrações observadas na estação chuvosa. Entretanto, a linhagem verde (*vd*-CE) manteve os mesmos níveis de CT, independentemente das estações ou profundidade. Possivelmente esse fato contribuiu para a manutenção das TCs da linhagem verde (*vd*-CE) em valores semelhantes aos verificados para as demais linhagens na estação seca.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gracilaria birdiae é uma das principais espécies de macroalga coletadas no nordeste brasileiro para extração de ficocoloides (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002). No litoral do Rio Grande do Norte, a colheita dessa alga é realizada de forma extrativista pelas comunidades litorâneas do estado e desempenha um importante papel na economia dessas populações. No entanto, o curto intervalo entre uma coleta e outra não é suficiente para promover a recuperação dos bancos, sendo esta atividade responsável pela diminuição gradual dos estoques de algas da região. Desta forma, novos incentivos visando o manejo adequado das populações naturais e o desenvolvimento de metodologias apropriadas para o cultivo em escala comercial dessa espécie são de extrema necessidade.

A procura por linhagens de algas que apresentem maiores taxas de crescimento e qualidade de ágar tem aumentado nos últimos anos. No Brasil, estudos relacionados à diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* incluem abordagens sobre as principais questões fisiológicas de diferentes linhagens selvagens e variantes de cor, visando obter a base científica necessária para auxiliar na seleção de espécimes mais produtivos e sua viabilidade em cultivos no mar.

Dentro desse contexto, no presente estudo, foram investigados aspectos da diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* relacionados ao crescimento, pigmentos, fotossíntese e polissacarídeos durante cultivos experimentais no mar. Além disso, uma população de *G. birdiae* foi monitorada, visando relacionar a sua dinâmica com as variações sazonais.

FENOLOGIA DE *Gracilaria birdiae*

A população de *Gracilaria birdiae* selecionada para o estudo fenológico apresentou-se fértil durante o ano todo, com baixa frequência de indivíduos inférteis (~2%). Os tetrasporófitos foram encontrados em maior quantidade, seguidos das plantas cistocárpicas e gametófitos masculinos. A maior dominância da fase tetrasporofítica pode estar relacionada à viabilidade e as taxas de sobrevivência dos carpósporos, embora isso não tenha sido avaliado experimentalmente para essa população.

A proporção sexual de *G. birdiae* foi de 1:1 na maioria dos meses estudados, com poucas exceções. As variações observadas nessa proporção, possivelmente, estiveram relacionadas aos picos de reprodução sexuada, com valores mais elevados de plantas masculinas, em determinado período, seguido de maior ocorrência de plantas cistocárpicas no mês seguinte. Os indivíduos inférteis ocorreram na população de forma sincronizada após períodos bimensais, supostamente quando ocorria a liberação de esporos.

Em relação ao tamanho dos talos, verificou-se uma clara variação sazonal, com valores mais elevados registrados no período chuvoso e os menores no período seco. Esse modelo sazonal é comum para outras espécies de *Gracilaria* de regiões tropicais e parecem estar relacionados às elevadas concentrações de nutrientes que são carreados para o mar pelas fortes chuvas registradas nesse período. Além disso, a redução no tamanho do talo coincidiu com o período em que há o aumento da velocidade do vento, ondas, correntes e movimentação do sedimento em direção aos bancos algais. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram o efeito imperativo das condições ambientais na fenologia reprodutiva dessa população, fornecendo informações relevantes sobre os aspectos reprodutivos dessa espécie.

CULTIVO NO MAR DE LINHAGENS DE *Gracilaria birdiae*

Nos experimentos de cultivo no mar, foram constatadas TCs mais elevadas durante o período chuvoso quando comparado ao seco, e nas profundidades de 30 e 50 cm para a maioria das linhagens de *Gracilaria birdiae*. O desenvolvimento mais acentuado de *G. birdiae* durante o período chuvoso foi também discutido no estudo de fenologia dessa espécie (Capítulo 2) e pode estar relacionado às elevadas concentrações de nutrientes disponíveis durante esse período.

Durante o experimento de cultivo de longa duração (120 dias) constatou-se o efeito negativo do tempo de cultivo para as diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae.* As reduções nas TCs observadas com o aumento no tempo de cultivo estiveram relacionadas principalmente ao envelhecimento do talo, sendo registrada a diferenciação de estruturas reprodutivas na maioria deles. Em algumas ocasiões, foi evidenciada a germinação de tetraspóros *in situ*, a partir do crescimento de pequenos talos gametofíticos sobre as algas cultivadas. Além do tempo de cultivo, outros fatores como salinidade e transparência da água, podem ter também influenciado de forma negativa as TCs. A baixa transparência da

água registrada no período chuvoso no local de cultivo esteve relacionada à elevada concentração de material particulado carreado para o mar pelas fortes chuvas. Esse evento, além de ter reduzido a irradiância disponível para os indivíduos cultivados, proporcionou a deposição de material particulado sobre os seus talos. Possivelmente, essa deposição dificultou a captação de luz, e consequentemente, reduziu a fotossíntese e o crescimento ao longo do período de cultivo.

A avaliação nas TCs obtidas nos primeiros 60 dias de cultivo indicou variações marcantes para as linhagens verde (*vd*-CE) e vermelha (*vm*-RN), quando comparadas as estações chuvosa e seca, sendo semelhantes para as demais linhagens. Durante o período chuvoso, foram constatados nessas linhagens (*vd*-CE e *vm*-CE) sinais de despigmentação e talos quebradiços, o que poderia ter favorecido a fragmentação e consequentemente redução de biomassa e taxas de crescimento. Entretanto, no experimento de cultivo de curto prazo (30 dias) realizado para a avaliação da fotossíntese (Capítulo 4), as TCs dessas linhagens (*vd*-CE e *vm*-RN) foram mais homogêneas entre as estações chuvosa e seca. Além disso, não apresentaram regiões esbranquiçadas nem enfraquecimento dos talos. Esses dados ajudam a reforçar a ideia de que essas linhagens sofreram algum de estresse fisiológico durante a estação chuvosa no experimento de longa duração.

Considerando que as reduzidas TCs da linhagem vermelha-nativa (*vm*-RN) obtidas durante o experimento de cultivo de longa duração (Capítulo 3) tenha sido consequência de fatores imprevisíveis (estresse fisiológico ou doença), foi possível verificar, a partir das TCs obtidas no experimento de curto prazo (Capítulo 4), que essa linhagem apresentou também TCs mais elevadas durante o período chuvoso, com valores semelhante às demais linhagens.

Apenas a linhagem verde (*vd*-CE) pareceu apresentar um melhor desempenho durante o período seco, com TCs mais elevadas, e em alguns casos, semelhantes às demais linhagens (Capítulo 3 e 4). Esse resultado pode ser consequência da composição pigmentar dessa linhagem. Foram observadas para essa linhagem, nos dois experimentos (curta e longa duração), baixas concentrações de FE em relação às demais linhagens. Por ela ser deficiente em FE é de se esperar que apresente uma menor eficiência em absorver a luz em condições de menor irradiância, quando comparada às demais linhagens. Portanto, parece estar mais adaptada a locais mais iluminados, já que durante o período seco, a irradiância recebida nos cultivos foi maior devido, entre outros aspectos, à transparência da água.

O conteúdo pigmentar observado antes e após os cultivos (30 e 120 dias) das diferentes linhagens de *Gracilaria birdiae*, nas três profundidades e nas duas estações, apresentou reduções significativas. Comparando os dois experimentos de cultivo, observou-se que quanto maior o tempo de cultivo, maior foi a degradação dos pigmentos. Possivelmente, por serem compostos ricos em nitrogênio, foram utilizados no metabolismo das algas para atividades fundamentais do metabolismo. Durante o período seco, essa redução foi mais pronunciada uma vez que a disponibilidade de nutrientes foi bem mais baixa do que quando comparada ao período chuvoso. Além disso, verificou-se que a FE, por se localizar mais externamente no ficobilissomo, foi o primeiro pigmento a ser consumido quando as necessidades internas passaram a ser maiores do que a disponibilidade de nutriente no meio. Por outro lado, a AFC, por estar localizada mais internamente no ficobilissomo, foi o pigmento que menos sofreu alterações quanto ao seu conteúdo, apresentando-se menos sensível às modificações do ambiente.

Com relação à clorofila *a* e aos carotenoides totais, foram observadas diferenças entre os cultivos a longo e curto prazos. No primeiro, as concentrações desses pigmentos, em especial os CT, foram menores durante a estação seca em todas as linhagens, sendo consequência da aclimatação do aparato fotossintetizante às condições de luz existentes no local. Com relação ao experimento de curta duração, os valores mais baixos foram observados na estação seca e, na maioria dos casos, nos cultivos mais próximos da superfície.

RENDIMENTO E QUALIDADE DO POLISSACARÍDEO DAS LINHAGENS DE *Gracilaria birdiae*

As linhagens de *Gracilaria birdiae* cultivadas nas diferentes profundidades e durante as estações chuvosa e seca não apresentaram diferenças significativas dos valores de rendimento de polissacarídeo e teores de 3,6-anidrogalactose. Verificou-se, no entanto que quando comparados aos valores obtidos nos estudos anteriores para as linhagens de *G. birdiae* utilizando-se o método de extração alcalina (URSI, 2005), os rendimentos obtidos no presente trabalho (extração nativa) foram superiores (Capítulo 3). Quanto ao 3,6-anidrogalactose, não foram registradas diferenças entre os valores reportados por estudos anteriores para essas linhagens. Em relação ao teor de sulfato, os valores registrados nesse estudo foram mais elevados do que os teores encontrados para as linhagens gametofíticas de *G. birdiae*, bem como para outras espécies utilizando-se a extração alcalina. De acordo

com esses resultados, podemos supor que a elevada concentração de sulfato do gel pode estar relacionada ao método de extração empregado nesse estudo.

FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A DAS LINHAGENS DE *Gracilaria birdiae*

Informações relacionadas ao uso de medidas de fluorescência para a obtenção dos parâmetros fotossintetizantes nas macroalgas têm aumentado consideravelmente na última década (FIGUEROA *et al*., 2006). Esse método está sendo mundialmente aceito para acessar de forma fácil, eficiente e rápida, o desempenho fisiológico das algas nos ambientes naturais (*in situ*) (BEER *et al*., 2000; GÓMEZ *et al.*, 2004; LAMOTE *et al.*, 2007; ABREU *et al*., 2009) e em sistemas de cultivo (CABELLO-PASINI *et al.*, 2000). No presente trabalho (Capítulo 4), as linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) e irradiância de saturação (I_k) distintos entre as estações, com valores mais baixos durante a estação chuvosa. Como visto anteriormente, durante o período chuvoso a quantidade de material particulado no local de cultivo é bastante elevada, e a transparência é muito baixa. Como consequência, a disponibilidade de luz para as algas cultivadas nesse período foi bem menor. Os baixos valores de $ETR_{máx}$ e I_k obtidos durante esse período sugerem a adaptação das diferentes linhagens a essas condições de baixa irradiância. Mesmo no período seco, quando as linhagens de *G. birdiae* estiveram sujeitas a maiores irradiâncias, os valores de $ETR_{máx}$ e I_k foram considerados baixos (< 200 $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$). Esses atributos sugerem às linhagens de *G. birdiae* características de plantas de "sombra", o que estaria compatível com os níveis de irradiância observados nos ambientes submersos em que essa espécie é mais abundante, como verificado no estudo da populacional (Capítulo 1).

TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTOS ÀS COMUNIDADES LITORÂNEAS

A partir dos resultados obtidos durante o desenvolvimento dessa tese dos resultados e incentivos gerados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) para a criação do Projeto Desenvolvimento de Comunidades Costeiras (DCC) foi possível realizar a transferência de vários conhecimentos para a comunidade pesqueira da praia de Rio do Fogo, Município Rio do Fogo (RN). Atualmente, o pessoal responsável pelo extrativismo dos bancos de *Gracilaria birdiae* compreendem melhor as variações sazonais existentes no local e assim, podem realizar a colheita de forma mais racional e sustentável. Além disso, acreditamos que com as

informações obtidas durante esse trabalho, seja possível implantar o cultivo de linhagens mais produtivas, e aumentar, desta forma, a produtividade dos cultivos em pequena escala existentes no local.

RESUMO (GERAL)

Gracilaria birdiae Plastino & E.C. Oliveira é uma das principais espécies de agarófitas coletadas no nordeste brasileiro. Devido a sua importância econômica, novos incentivos visando o manejo adequado das populações naturais e a seleção de linhagens mais produtivas para o cultivo em escala comercial dessa espécie são de extrema necessidade. Para atingir esses objetivos, o presente trabalho avaliou primeiramente a fenologia reprodutiva e o tamanho dos indivíduos de uma população natural de *G. birdiae* localizada na praia de Rio do Fogo, estado do Rio Grande do Norte, Brasil, durante 12 meses. Em seguida, foram investigados aspectos da diversidade intraespecífica de *Gracilaria birdiae* cultivadas no mar em três profundidades diferentes de cultivo (30, 50 e 80 cm) e em dois períodos distintos (chuvoso e seco). Para os experimentos de cultivo, foram utilizadas quatro linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae*: espécimes de coloração vermelha (*vm*-CE e *vm*-RN), marrom-esverdeada (*me*-CE) e verde (*vd*-CE). Foram desenvolvidos cultivos de curta (30 dias) e longa (120 dias) duração para a obtenção de informações relacionadas ao crescimento, pigmentos, fotossíntese e polissacarídeos dessas linhagens. A população de *G. birdiae* selecionada para o estudo fenológico apresentou-se fértil durante o ano todo, com baixa frequência de indivíduos inférteis. Além disso, observou-se que o tamanho dos indivíduos dessa população é influenciado pelas mudanças periódicas do ambiente ocasionadas pelos regimes de chuvas e hidrodinamismo. Durante os experimentos de cultivo no mar, os parâmetros ambientais mostraram diferenças significativas entre as estações (chuvosa e seca). Dentre eles, a transparência da água e os nutrientes foram os que mais estiveram relacionados às variações das TCs das linhagens de *G. birdiae*. O tempo de cultivo também influenciou nessas taxas, e as reduções observadas durante o cultivo de longa duração estiveram relacionadas ao envelhecimento do talo. De maneira geral, as TCs mais elevadas foram registradas durante o período chuvoso, nas profundidades de 30 e 50 cm. O conteúdo pigmentar antes e após os cultivos apresentou reduções significativas, principalmente durante o período seco, sendo consequência da baixa disponibilidade de nutrientes. O rendimento e os teores de 3,6-anidrogalactose obtidos do ágar das linhagens de *G. birdiae* não apresentaram diferenças entre as estações e profundidades, nem entre as linhagens. O teor de sulfato foi mais elevado durante a estação seca em determinadas profundidades de acordo com a linhagem em questão. As linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentaram valores de fotossíntese máxima ($ETR_{máx}$) e irradiância de saturação (I_k) distintos entre as estações, com valores mais baixos durante a estação chuvosa. Esses valores estiveram relacionados à fotoaclimatação das linhagens às condições de baixa luminosidade e sugerem às linhagens de *G. birdiae* características de plantas de "sombra".

GENERAL ABSTRACT

Gracilaria birdiae Plastino & E.C. Oliveira is the main agarophyte harvested in northeastern Brazil. Due to its economic importance, new incentives for appropriate management of natural bads and the selection of more productive strains for mariculture are extremely necessary. Therefore, this study first evaluated the reproductive phenology and size of individuals from a natural population of *G. birdiae* located at Rio do Fogo beach, Rio Grande do Norte state, Northeast, Brazil, for 12 months. Subsequently, we investigated aspects of intraspecific diversity of *G. birdiae* cultivated in the sea at three different depths (30, 50 and 80 cm) and two seasons (rainy and dry). Four strains of tetrasporophytic plants were used: red (*rd*-CE, *rd*-RN), greenish-brown (*gbw*-CE), and green (*gr*-CE). Short (30 days) and long (120 days) cultivations were developed to obtain information related to growth, pigments, photosynthesis and polysaccharides of these strains. The natural population of *G. birdiae* selected for the phenological study presented fertile individuals throughout the year, with low frequency of infertile individuals. In addition, we observed that the size of the individuals was influenced by seasonal changes of the environment caused by the rains and hydrodynamics. During the cultivation experiments, the environmental parameters showed significant differences between seasons (rainy and dry). Water transparency and nutrients were most related to variations in growth rates of *G. birdiae* strains. The length of the cultivation period also influenced these rates, and reductions observed during the long-term (120 days) were related to the aging of the thallus. In general, highest growth rates were recorded during the rainy season, at depths of 30 and 50 cm. The pigment content before and after the cultivation had significant reductions, particularly during the dry season, as a result of low nutrient availability. The yield and levels of 3,6-anhydrogalactose obtained from agar of *G. birdiae* strains did not differ between seasons and depths, neither between strains. The sulfate content was highest during the dry season in some depths, according to strain involved. *G. birdiae* strains showed values of ETR_{max} and I_k distinct between seasons, with lower values during the rainy season. These values were related to photoacclimation at lower light conditions and suggest to *G. birdiae* strains characteristics of shade plants.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.H., VARELA, D.A., HENRIQUEZ, L., VILLARROEL, A., YARISH, C. SOUSA-PINTO, I. & BUSCHMANN, A.H. 2009. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E.C. Oliveira: productivity and physiological performance. *Aquaculture* 293: 211–220.

ACCIOLY, M.C. 2005. Esforços para estabelecer cultivos artesanais de macroalgas marinhas na Bahia. In: Anais da X Reunião Brasileira de Ficologia. Salvador 2004. Rio de Janeiro, Museu Nacional. Série Livros 10. pp. 107-114.

ACCIOLY, M.C. & PAULA, E.J. 2002. Seleção de rodofíceas com potencial econômico para cultivo na região do baixo-sul baiano. In: Anais da IX Reunião Brasileira de Ficologia. Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo. Sociedade Brasileira de Ficologia & Fundação Ecossistemas do Espírito Santo. pp. 107.

AGUILAR-ROSAS, R., CRUZ-CAMPAS, M.E. & TRUJILLO-ORTIZ, A. 2000. Crescimento de *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta) en el Estero de Punta Banda, Baja Califórnia, México. *Hidrobiológica* 10: 74-79.

AGUIRRE-VON-WOBESER E., FIGUEROA F.L. & CABELLO-PASINI A. 2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *Journal of Applied Phycology* 12: 159–168.

ALMEIDA, C.L.F., FALCÃO, H.S., LIMA, G.R.M., MONTENEGRO, C.A., LIRA, N.S., ATHAYDE-FILHO, P.F., RODRIGUES, L.C., SOUZA, M.F.V., BARBOSA-FILHO, J.M. & BATISTA, L.M. 2011. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 4550-4573.

ALVEAL, K., ROMO, H., WERLINGER, C. & OLIVEIRA, E.C. 1997. Mass cultivation of the agar-producing *Gracilaria chilensis* Rhodophyta from spores. *Aquaculture* 148: 77–83.

ANDERSON, R. J., LEVITT, G. J. & SHARE, A. 1996. Experimental investigations for the mariculture of *Gracilaria* in Saldanha Bay, South Africa. *Journal of Applied Phycology* 8: 421–430.

ANDERSON, R. J., SMIT, A.J. & LEVITT, G. J. 1999. Upwelling and fish-factory waste as nitrogen sources for suspended cultivation of *Gracilaria gracilis* in Saldanha Bay, South Africa. *Hydrobiologia* 398/399: 455–462.

ANDERSSON, M., SCHUBERT, H., PEDERSÉN, M. & SNOEIJS, P. 2006. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology* 149: 653–665.

ARAÑO, K.G., TRONO JR, G.C., MONTAÑO, N.E, HURTADO, A.Q. & VILLANUEVA, R.D. 2000. Growth, agar yield and quality of selected agarophyte species from the Philippines. *Botanica Marina* 43: 517–524.

ARAÚJO, P. 2005. *Ecologia populacional de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta) na Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Paraíba, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia, Recife, 95 p. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

ARMISÉN, R. 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 231–243.

AYRES, L. M. 2010. *Efeitos da radiação UV-B em variantes cromáticas de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura.* Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 146 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARUFI, J.B. 2004. *Efeitos da luz na reprodução, no crescimento e no conteúdo pigmentar de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta).* Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo, 112 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARUFI, J.B., OLIVEIRA, E.C., PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, M.C. 2010. Life history, morphological variability and growth rates of the life phases of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta: Gracilariales) in vitro. *Scientia Marina* 74(2): 297-303.

BEER, S. & I. LEVY 1983. Effects of Photon fluence rate and light spectrum composition on growth, photosynthesis and pigment relations in *Gracilaria* sp. *Journal of Phycology* 19: 516-522.

BEER, S., LARSSON, C., PORYAN O. & AXELSSON, L. 2000. Photosynthetic rates of *Ulva* (Chlorophyta) measured by pulse was amplitude modulated (PAM) fluorometry. *European Journal of Phycology* 35: 69–74.

BEZERRA, A.F. & MARINHO-SORIANO, E. 2010. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass and Bioenergy* 34: 1813-1817.

BIRD, N.L., L.C.M. CHEN, & J. MCLACHLAN. 1982. Effects of temperature, light and salinity on growth in culture of *Chodrus crispus, Furcellaria lumbricalis, Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales, Rhodophyta), and *Fucus serratus* (Fucales Phaeophyta). *Botanica Marina* 22(8): 521-528.

BIXLER, H.J. & PORSE, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23: 321–335.

BRITO, L.L. & SILVA, S.T. 2004. Fases reproductivas de *Gracilaria damaecornis* J. Agardh (Gracilariaceae: Rhodophyta). *Bol Inst Oceanogr Venezuela Univ Oriente* 43: 33–36.

BUSCHMANN, A.H., WESTERMEIER, R. & RETAMALES, C.A., 1995. Cultivation of *Gracilaria* on the sea-bottom in southern Chile: a review. *Journal of Applied Phycology* 7: 291–301.

BUSCHMANN, A.H., CORREA J.A., WESTERMEIER R., HERNANDEZ-GONZALEZ M.C. & NORAMBUENA R. 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203–220.

CABELLO-PASINI, A., AGUIRRE-VON-WOBESER, E. & FIGUEROA, F.L. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor culture systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57: 169–178.

CÂMARA-NETO C. 1982. Cultivo de agarófitas. Uma perspectiva econômica para o litoral do Nordeste. *Série Ciência & Tecnologia* 23p.

CARDOZO, K.H.M., GUARATINI, T., BARROS, M.P., FALCÃO, V.R., TONON, A.P., LOPES, N.P., CAMPOS, S., TORRES, M.A., SOUZA, A.O., COLEPICOLO, P. & PINTO, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 146: 60–78.

CARNEIRO, M.A.A. 2007. *Estudo do crescimento, eficiência de biofiltração e cinética de absorção de nutrientes ($N\text{-}NH_4^+$, $N\text{-}NO_3^-$ e $P\text{-}PO_4^{-3}$) da macroalga Gracilaria cervicornis (Turner) J. Agardh.* Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Bioecologia, Natal, 75 p. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

CARNICAS, E., JIMÉNEZ, C. & NIELL, F.X., 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 50: 149-158.

CASTELAR, B., REIS, R.P. & BASTOS, M. 2009a. Contribuição ao programa de monitoramento ambiental da maricultura de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva (Rhodophyta-Solieriaceae) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Acta Bot Brasil* 23: 613-617.

CASTELAR, B., REIS, R.P., MOURA, A. & KIRK, R. 2009b. Invasive potential of off the south coast of Rio de Janeiro state, Brazil: a contribution to environmentally secure cultivation in the tropics. *Botanica Marina* 52: 283-289.

CASTELO-PEREIRA, D., CARNEIRO-DAVIM, M.A.A., FREIRE, A.R.S. & MARINHO-SORIANO, E. 2007. Crescimento e produção da macroalga *Gracilaria domingensis* cultivada em consórcio com camarão. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 987-989.

CHALOUB, R.M., REINERT, F., NASSAR, C.A.G., FLEURY, B.G., MANTUANO, D.G. & LARKUM, A.W.D. 2010. Photosynthetic properties of three Brazilian seaweeds. *Revista Brasileira de Botânica* 33(2): 371-374.

COLLANTES, G., MELLO, C. & CANDIA, A. 1989. Seaweeds Clonal Micropropagation. *In*: OLIVEIRA E.C. & KAUTSKY N. (eds). *Cultivation of Seaweeds in Latin America*. Universidade de São Paulo, São Paulo. 121-126.

COLLANTES, G., MELO, C. & CANDIA, A. 2004. Micropropagation by explants of *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan and Oliveira. *Journal of Applied Phycology* 16: 203-213.

CORREA, J.A. 1996. Diseases in seaweeds: An introduction. *Hydrobiologia* 326/327: 87-88.

COSTA, V.L. 2000. *Caracterização genética, reprodutiva e pigmentar de uma linhagem selvagem e duas variantes cromáticas de Gracilaria sp. (Gracilariales, Rhodophyta).* Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 79 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, V.L. 2005. *Diversidade intraespecífica em gametófitos de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): Efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura.* Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 100 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, V.L. & PLASTINO, E.M. 2001. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 483–490.

COSTA, V.L. & PLASTINO, E.M. 2011. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 23: 599-605.

CRAIGIE, J.S., LEIGH, C. 1978. Carrageenans and agars. In: HELLEBUST, J.A., CRAIGIE, J.S. (eds) *Handbook of Phycological Methods*. Cambrige University Press, Cambrige, pp. 109–131.

CRITCHLEY, A.T. 1993. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): An economically important agarophyte. In: OHNO M & CRITCHLEY AT (eds.) *Seaweed Cultivation and Marine Rancing*. Yokosuka: JICA, p. 89–112.

CRITCHLEY, A.T. & OHNO, M. 1998. Seaweed Resources of the World. *Japan International Cooperation Agency*, Yokosuka. pp. 431.

CUNHA, S.R., PAZETO, F.D., CRESTANI, D.E.V., LIMA, G.B., NASCIMENTO, J., SANT'ANNA, F., MANZONI, G.C., MAREZI, A.W.C. & MAFRA, L.L. 1999. Potencial de crescimento de macroalgas cultiváveis presentes na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, SC): avaliação preliminar. *Notas técnicas Facimar* 3: 17-25.

DAWES, C. P., 1995. Suspended cultivation of *Gracilaria* in the sea. *Journal of Applied Phycology* 7: 303–313.

DEWREEDE, R. & KLINGER, T. 1988. Reproductive strategies in algae. In: LOVETT-DOUST, J. & LOVETT-DOUST, L. (eds), *Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies*. Oxford University Press, Oxford, p. 267-284.

DEBOER J.A. 1981. Nutrients. In: LOBBAN C.S. & WYNNE M.J. (Eds) *The biology of seaweeds*. University of California, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 356-391.

DEMMING-ADAMS, B. & ADAMS, W.W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in plant science* 1: 21-26.

DENAULT, M., STIEVE, E & VALIELA, I. 2000. Effects of Nitrogen Load and Irradiance on Photosynthetic Pigment Concentrations in *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* in Estuaries of Waquoit Bay. *The Biological Bulletin* 199: 223-225

DESTOMBE, C., VALERO, M., VERNET, P. & COUVET D. 1989. What controls haploid–diploid ratio in the red alga*, Gracilaria verrucosa*? *Journal of Evolutionary Biology* 2: 317–338.

DONATO, R. 2005. *Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato.* Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 98p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

DRUEHL, L.D. 2003. *Pacific Seaweeds – A guide to common seaweeds of the west coast*. Madeira Park: Harbour Pub. pp. 250.

DUCKWORTH, M., HONG, K.C. & YAPHE, W. 1971. The agar polysaccharides os *Gracilaria* species. *Carbohydrate Research* 18: 1-9.

ERIKSSON, B.K. & JOHANSSON, G. 2003. Sedimentation reduces recruitment success of *Fucus vesiculosus* in the Baltic Sea. *European Journal of Phycology* 38: 217–222.

ERIKSSON, B.K. & JOHANSSON, G. 2005. Effects of sedimentation on macroalgae: species-specific responses are related to reproductive traits. *Oecologia* 143: 438–448.

ESPINOZA-AVALOS, J. 2005. Fenología de Macroalgas Marinas. *Hidrobiológica* 15: 109-122.

FAO, 2010. *The state of world fisheries and aquaculture.* Rome, FAO. 197 p.

FIGUEROA, F.L. & GÓMEZ, I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *Journal of Applied Phycology* 13: 235–248.

FIGUEROA, F.L. & KORBEE, N. 2001. Interactive effects of UV radiation and nutrients on ecophysiology: vulnerability and adaptation to climate change. In: ISRAEL A., EINAV R., SECKBACH J. (Eds.) *Seaweeds and their role in globally changing environments,* Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology pp. 157-182.

FIGUEROA, F.L., CONDE-ÁLVAREZ & GÓMEZ, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Research* 75: 259–275.

FIGUEROA, F.L., SANTOS, R., CONDE-ALVAREZ, R., MATA, L., GÓMEZ-PICHETI, J.L., MATOS, J., HUOVINEN, P., SCHUENHOFF, A. & SILVA, J. 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Botanica Marina* 49: 275–282.

FRANKLIN, L.A. & BADGER, M.R. 2001. A comparison of photosynthetic electron transport rates in macroalgae measured by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and mass spectrometry. *Journal of Phycology* 37: 756–767

FREILE-PELEGRÍN, Y. & ROBLEDO, D., 1997. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán, México. *Journal of Applied Phycology* 9: 533–539.

FREILE-PELEGRÍN, Y. & MURAÑO, E. 2005. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresource Technology* 96: 295–302.

GANTT, 1990. Pigmentation and photoacclimation. In: COLE, K.M. & SHEATH, K.G. (eds). *Biology of the red algae.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 203-221.

GANZON-FORTES, 1997. Influence of tidal location on morphology, photosynthesis and pigments of the agarophyte, *Gelidiella acerosa*, from Northern Philippines. *Journal of Applied Phycology* 9: 525–532.

GAO, K. & XU, J. 2010. Ecological and Phycological responses of macroalgae to solar and UV radiation. In: Israel A., Einav R., Seckbach J. (Eds.) *Seaweeds and their role in globally changing environments,* Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. pp. 183-198.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M. & BAKER, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92.

GLENN, E., MOORE, D., FITZSIMMONS, K. & AZEVEDO, C. 1996. Spore culture of the edible red seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta). *Aquaculture* 142: 59– 74.

GLENN, E.P., MOORE, D., BROWN, J.J., TANNER, R., FITZSIMMONS, K., AKUTIGAWAB, M. & NAPOLEAN, S. 1998. A sustainable culture system for *Gracilaria parvispora* Rhodophyta using sporelings, reef growout and floating cages in Hawaii. *Aquaculture* 165: 221–232.

GÓMEZ, A. & MILLÁN, J. 1997. Cultivo experimental de *Gracilaria dentata* Agardh y de *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et Oliveira) (Rhodophyta: Gigartinales) em la Isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biologia Marina y Oceanografia* 32 (2): 137-144.

GÓMEZ, I, LÓPEZ-FIGUEROA, F., ULLOA, N., MORALES, V., LOVENGREEN, C., HUOVINEN, P. & HESS, S. 2004. Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. *Marine ecology progress series* 270: 103–116.

GÓMEZ, I., FIGUEROA, F.L., HUOVINEN, P., ULLOA, N. & MORALES, V. 2005. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture* 244: 369-382.

GRZYMSKI, J., JOHNSEN, G. & SAKSHUG, E. 1997 The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red and green macroalgae. *Journal of Phycology* 33: 408–414.

GUIMARÃES, M., PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.

GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology*. 38(2): 165-169.

GUPTA, V., BAGHEL,R.S., KUMAR, M., KUMARI, P., MANTRI, V.A., REDDY, C.R.K. & JHA, B. 2011. Growth and agarose characteristics of isomorphic gametophyte (male and female) and

sporophyte of *Gracilaria dura* and their marker assisted selection. *Aquaculture* 318: 389–396.

HÄDER, D.P., KUMAR, H.D., SMITH, R.C. & WORREST, R.C., 1997. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 53-68.

HAYASHI, L., OLIVEIRA, E.C., BLEICHER-LHONNEUR, G., BOULENGUER, P., PEREIRA, R.T.L., VON SECKENDORFF, R., SHIMODA, V.T., LEFLAMAND, A., VALLÉE, P. & CRITCHLEY, A.T. 2007a. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Applied Phycology* 19: 505–511.

HAYASHI, L., PAULA, E.J., CHOW, F. 2007b. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *Journal of Applied Phycology* 19: 393–399.

HAYASHI, L., FARIA, G.S.M., NUNES, B.G., ZITTA, C.S., SCARIOT, L.A., ROVER, T., FELIX, M.R.L. & BOUZON, Z.L. 2011. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. *Journal of Applied Phycology* 23: 439–447.

HONSELL, E., KOSOVEL, V. & TALARICO, L. 1984. Phycobiliprotein distribution in Rhodophyta: Studies and interpretations on the basis of tbeir absorption spectra. *Botanica Marina* 27: 1-6

HOYLE, M.D. 1978. Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 35: 273–283.

HURTADO-PONCE, A.Q. 1990. Vertical rope cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) using vegetative fragments. *Botanica Marina* 33: 477-482.

HURTADO-PONCE, A.Q. 1992. Growth of *Gracilariopsis heteroclada* (Zhang et Xia) Zhang et Xia in a floating net cage as influenced by Lates calcarifer Bloch. In: 2nd RP-USA Phycology Symposium, 6-10 January 1992, Cebu City, Philippines.

JASSBY, A.D. & PLATT, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 21: 540–547.

KAIN (JONES), J.M. & DESTOMBE, C. 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 269–281.

KAKINUMA, M., COURY, D.A., KUNO, Y., ITOH, S., KOZAWA, Y., INAGAKI, E., YOSHIURA, Y. & AMANO, H. 2006. Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Marine Biology* 149: 97–106.

KIRST, G.O. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 21-53.

KORBEE PEINADO, N., P. HUOVINEN, F.L. FIGUEROA & J. AGUILERA 2005. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species. *Mar. Biol.* 146: 645–654.

KURSAR, T.A., VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red algae *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Phisiology* 73: 353-360.

LAI, M.-F. & LII, C.-Y. 1997. Rheological and thermal characteristics of gel structures from various agar fractions. *International Journal of Biological Macromolecules* 21: 123-130.

LAMOTE, M., JOHNSON, L.E. & LEMOINE, Y., 2007. Interspecific differences in the response of juvenile stages to physical stress: fluorometric responses of fucoid embryos to variation in meteorological conditions. *Journal of Phycology* 43: 1164–1176.

LAPOINTE, B. E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth rate, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foliifera var. angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 17: 90-95.

LAPOINTE, B.E. & DUKE, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *Journal of Phycology* 20: 488-495.

LAPOINTE, B. E., L. D. WILLIAMS, J. C. GOLDMAN & J. H. RYTHER. 1976. The mass outdoor culture of macroscopic marine algae. *Aquaculture* 8: 9-20.

LAPOINTE, B. E., TENORE, K. R. & DAWES, C. J. 1984. Interactions between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales, Rhodophyta). I. Growth, photosynthesis and respiration. *Marine Biology* 80: 161–170.

LI, D., ZHOU, Z., LIU, H. & WU, C. 1999. A new method of *Laminaria japonica* strain selection and sporeling raising by the use of gametophyte clones. *Hydrobiologia* 398/399:473–476

LIGNELL, A. & PEDERSÉN, M. 1989. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and Gracilaria verrucosa (Rhodophyta). *Botanica Marina* 32: 219-227.

LIMA, A.M., CÂMARA-NETO, C., OLIVEIRA, E.C. & ARAÚJO, R.A. 1981. Cultivo experimental de *Hypnea musciformis* e *Gracilaria* sp. em áeras protegidas por antigas linhas de costa (recifes) no litoral do Rio Grande do Norte. In: *Projeto Algas.* Estado do Rio Grande do Norte. Série: Brasil. SUDENE. *Estudos de pesca* 9: 97-107.

LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1997. *Seaweed ecology and physiology.* Cambridge, Cambridge University Press. 366 pp.

LÓPEZ-FIGUEROA, F. & NIELL, F.X. 1990. Effects of light quality on clorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. *Marine Biology* 104: 321-327.

LUHAN, M.R.J. 1996. Biomass and reproductive states *of Gracilaria heteroclada* Zhang et Xia collected from Jaro, central Philippines. *Bot Mar 39:* 207–211.

LÜNING, K. 1990. Seaweeds their Environment, Biogeography and Ecophysiology, Wiley–Interscience, New York, 527 pp.

MCLACHLAN, J. & BIRD, C.J. 1986. *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquatic Botany,* 26: 27-49.

MARINHO-SORIANO, E. 2005. Cultivo experimental de *Gracilaria* no Rio Grande do Norte. pp. 115-124. In: Anais da X Reunião Brasileira de Ficologia. Salvador 2004. Rio de Janeiro, Museu Nacional. Série Livros 10.

MARINHO-SORIANO, E. 2007. Seaweed biofilters: An environmentaly friendly solution. World *Aquaculture* 38 (3): 31-33.

MARINHO-SORIANO, E. & BOURRET, E., 2003. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae Rhodophyta). *Bioresource Technology* 90: 329–333.

MARINHO-SORIANO, E. & BOURRET, E. 2005. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresource Technology* 96: 379-382.

MARINHO-SORIANO, E., LAUGIER, T., DE CASABIANCA, M.L. 1998. Reproductive strategy of two *Gracilaria* species, *G. bursa-pastoris* and *G. gracilis*, in a Mediterranean Lagoon (Thau, France). *Botanica marina* 41: 559–564.

MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E., DE CASABIANCA, M.L. & MAURY, L. 1999. Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. *Bioresource Technology* 67: 1-5.

MARINHO-SORIANO, E., SILVA, T.S.F. & MOREIRA, WS.C. 2001. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicor*nis and *Hydropuntia cornea* from Brazil. *Bioresource Technology* 77: 115-120.

MARINHO-SORIANO, E., MORALES, C. & MOREIRA, W.S.C. 2002. Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil. *Aquaculture Research* 33: 1081-1086.

MARINHO-SORIANO, E., MOREIRA, W.S.C. & CARNEIRO, M.A.A. 2006. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. *Aquaculture International* 14: 327-336.

MARINHO-SORIANO, E., CAMARA, M.R., CABRAL, T.M. & CARNEIRO, M.A.A. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research* 38: 182-187.

MARINHO-SORIANO, E., PANUCCI, R.A., CARNEIRO, M.A.A., PEREIRA, D.C. 2009a. Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bioresource Technology* 100: 6192–6198.

MARINHO-SORIANO, E., NUNES, S.O., CARNEIRO, M.A.A. & PEREIRA, D.C. 2009b. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass and Bioenergy* 33*:* 327-331.

MARTÍN, L.A., ZAIXSO, A.L.B. & LEONARDI, P.I. 2011. Biomass variation and reproductive phenology of *Gracilaria gracilis* in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *Journal of Applied Phycology* 23: 643-654.

MARTINEZ, L.A. & BUSCHMANN, A.H. 1996. Agar yield and quality of *Gracilaria chilensis* (Gigartinales, Rhodophyta) in tank culture using fish effluents. *Hydrobiologia* 326/367: 341-345.

MATHIESON, A. C. & GUO, Z. 1992. Patterns of fucoid reproductive biomass allocation. *British Phycological Journal* 27: 271-292.

MATOS, J., COSTA, S., RODRIGUES, A., PEREIRA, R. & SOUSA PINTO, I. 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture* 252: 31–42.

MATSUHIRO, B. 1995. Aislamiento y caracterización de ficocoloides. In: ALVEAL, K., FERRARIO, M.E., OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (eds.) Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp 658–674.

McHugh, D.J. 2002. Prospects for seaweed production in developing countries. *FAO Fisheries Techinical Paper*, 968. Rome, 28 p.

McHugh, D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Techinical Paper,* 441. Rome, 105 p.

McHugh, D.J. 1991. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221: 19-29.

Mercado, J., Sánchez, P., Carmona, R. & Niell, F.X. 2002. Limited acclimation of photosynthesis to blue light in the seaweed *Gracilaria tenuistipitata*. *Physiologia Plantarum* 114: 491–498.

Mollet, J.C., Rahoui, A. & Lemoine, Y. 1998. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis, Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *Journal of Applied Phycology* 10: 59–66.

Mizuta, H., Shirakura, Y. & Yasui, H. 2002. Relationship between phycoerythrin and nitrogen content in *Gloiopeltis furcata* and *Porphyra yezoensis*. *Algae* 17(2): 89-93.

Montaño, N.E., Villanueva, R.D. & Romero, J.B. 1999. Chemical characteristics and gelling properties of agar from two Philippine *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 11(1): 27-34.

Moura, E.A. 2007. *Potencialidade de cultivo de macroalgas no litoral do rio gande do norte (NE, Brasil): Uma perspectiva de interação de dados ambientais em sistema de informação geográfica.* Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Bioecologia, Natal, 50 p. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

Muñoz, J.; Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. 2004. Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, Mexico. *Aquaculture* 239: 161-177.

Nagler, P.L., Glenn, E.P., Nelson, S.G. & Napolean, S. 2003. Effects of fertilization treatment and stocking density on the growth and production of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in cage culture at Molokai, Hawaii. *Aquaculture* 219: 379–391.

Naidoo, K., Maneveldt, G., Ruck, K. & Bolton, J.J. 2006. A comparison of various seaweed-based diets and formulated feed on growth rate of abalone in a land-based aquaculture system. *Journal of Applied Phycology* 18: 437-443.

NELSON, S.G., GLENN, E.P., CONN, J., MOORE, D, WALSH, T. & AKUTAGAWA, M. 2001. Cultivation of *Gracilaria parvispora* Rhodophyta in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: a two-phase polyculture system. *Aquaculture* 193: 239–248.

NEORI A., CHOPIN, T., TROELL, M., BUSCHMANN, A.H., KRAEMER, G.P., HALLING, C., SHPIGEL, M. & YARISH, C. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231: 361-391.

NYGÅRD, C.A. & EKELUND, N.G.A. 2006. Photosynthesis and UV-B tolerance of the marine alga *Fucus vesiculosus* at different sea water salinities. *Journal of Applied Phycology* 18: 461–467.

OLIVEIRA, E.C. 1998. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY, A.T. & OHNO, M. (eds.) Seaweed resources of the world. JICA, Yokosuka, pp. 366-371.

OLIVEIRA, E.C. & PLASTINO, E.M. 1994. Gracilariaceae. In: AKATSUKA, I. (ed.) *Biology of Economic Algae*. The Hague: SPB Academic Publishing, pp. 185-226.

OLIVEIRA, V.P. 2007. *Influência da profundidade e dos parâmetros ambientais sobre o desenvolvimento de Gracilaria birdiae (Rhodophyta, Gracilariales) em viveiros de camarão*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Bioecologia, Natal, 54 p. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

ORDUÑA-ROJAS, J. & ROBLEDO, D. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, México. II. Biomass assessment and reproductive phenology. *Botanica Marina* 45: 459–464.

ORDUÑA-ROJAS, J., GARCÍA-CAMACHO, K.Y., OROZCO-MEYER, P., RÍOSMENA-RODRÍGUEZ, R., PACHECO-RUIZ, I., ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J.A., MELING-LÓPEZ, A.E. 2008. Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 20: 169–175.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L. & OHNO, M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *Journal of Applied Phycology* 11: 111-121.

PAULA, E.J., PEREIRA, R.T.L., OHNO, M., 2002. Growth rate of carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *Phycological Research* 50: 1–9.

PELLIZZARI, F. & REIS, R.P. 2011. Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern Brazilian Coast. *Revista brasileira de farmacognosia* 21 (2): 305-312.

PINCHETTI, J.L.G., FERNÁNDEZ, L.C., DÍEZ, P.M. & REINA, G.G. 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 10: 383–389.

PINHEIRO-JOVENTINO, F. & BEZERRA, C.L.F. 1980. Estudo de fenologia e regeneração de *Gracilaria domingensis* Sonder (Rhodophyta - Gracilariaceae), no estado do Ceará. *Arquivos de Ciências do Mar 20:* 33-41.

PLASTINO, EM 1985. *As espécies de Gracilaria (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP - aspectos biológicos e fenologia*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo, 124 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

PLASTINO, E.M. 2004. *Diversidade intraespecífica em algas gracilarioides*. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo. São Paulo.

PLASTINO, E.M. & COSTA, V.L. 1999. Ultrastructure of vegetative branches of the red macroalgae *Gracilaria* sp. (Gracilariales). *Acta Microscopica* 8: 793-794.

PLASTINO, E.M. & GUIMARÃES, M. 2001. Diversidad intraespecífica. In: K.V. ALVEAL & T.J. ANTEZANA (eds.). Sustentabilidad de la Biodiversidad. Concepción, Universidad de Concepción. pp. 19-27.

PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South Atlantic with terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia* 41: 389–96.

PLASTINO, E.M., URSI, S. & FUJII, M.T. 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 45-52.

POLIFRONE, M., MASI, F.D. & GARGIULO, G.M. 2006. Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). *Aquaculture* 261: 1003–1013.

RAMUS, J., BEALE, S.I., MAUZERALL, D. & HOWARD, K.L. 1976. Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology* 37: 223-229.

RAMUS, J. & VAN DER MEER, J.P. 1983. A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. *Journal of Phycology* 19: 86-91.

REIS, R.P., BARROS-BARRETO, M.B., CALDEIRA, A.Q. & MIRANDA, A.P.S. 2005. Cultivo de algas vermelha de interesse comercial na Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. pp. 287-

300. In: Anais da X Reunião Brasileira de Ficologia. Salvador 2004. Rio de Janeiro, Museu Nacional. Série Livros 10.

RICHERD, S., DESTOMBE, C., CUGUEN, J. & VALERO, M. 1993. Variation of reproductive success in a haplo–diploid red alga, *Gracilaria verrucosa*: effects of parental identities and crossing distance. *American Journal of Botany* 80: 578–584.

RIVERS, J.S. & PECKOL, P. 1995. Interactive effects of nitrogen and dissolved inorganic carbon on photosynthesis, growth, and ammonium uptake of macroalgae, *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae*. *Marine Biology* 121: 747-753.

ROTHMAN, M.D., ANDERSON, R.J., BOOTHROYD, C.J.T., KEMP, F.A. & BOLTON, J.J. 2009. The gracilarioids in South Africa: long-term monitoring of a declining resource. *Journal of Applied Phycology* 21: 47–53.

RYTHER, J.H., CORWIN, N., DEBUSK, T.A. & WILLIAMS, L.D. 1981. Nitrogen uptake and storage by the red alga, *Gracilaria tikvahiae* (McLaughlin, 1979). *Aquaculture* 26: 107–115.

SANTELICES, B. 2001. Implications of clonal and chimeric-type thallus organization on seaweed farming and harvesting. *Journal of Applied Phycology* 13: 153–160.

SANTELICES, B. & VARELA, D. 1995. Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: Effects of size, reproductive state and position along the axis. *Journal of Applied Phycology* 7: 501-506.

SANTELICES, B.; WESTERMEIER, R. & BOBADILHA, M. 1993. Effects of stock loading and plant distance on the growth and production of *Gracilaria chilensis* in rope culture. *Journal of Applied Phycology 5*: 517-524.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.D. & CALDWELL, M.M. (Eds.) *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin, Springer, pp.49-70.

SCHREIBER, U., T. ENDO, H. MI & K. ASADA. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36: 873–882.

SCHUBERT, N., GARCÍA-MENDOZA, E., PACHECO-RUIZ, I. 2006. Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology* 42: 1208–1216.

SILVA, A.B., PASQUAL, M., MOREIRA, M.A., MARCIEL, A.L.R., CAVALCANTE-ALVES, J.M., PEREIRA, A.B. 1998a. Aclimatação de brotações de abacaxi (*Ananas comosus* L.) produzidas *in vitro*: ação de Agromix®, húmus e Kelpak®. *R. Un. Alfenas* 4: 107-110.

SILVA, J., SANTOS, R., SERÔDIO, J. & MELO, R.A. 1998b. Light response curves for *Gelidium sesquipedale* from different depths, determined by two methods: O_2 evolution and chlorophyll fluorescence. *Journal of Applied Phycology* 10: 295–301.

SILVA, C.A.R., 2004. Análises físico-químicas de sistemas marginais marinhos. Editora Interciência, Rio de janeiro. 118 p.

SILVA, R.L., PEREIRA, S.M.B., OLIVEIRA, E.C. & ESTON, V.R. 1987. Structure of a bed of *Gracilaria* spp (Rhodophyta) in northeastern Brazil. *Botanica Marina* 30: 517-523.

SKRIPTSOVA, A.V. & YAKOVLEVA, I.M. 2002. The influence of variations in irradiance upon morphology in an unattached form of *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft during field cultivation, South Primorye, Russia. *Aquatic Ecology* 36: 511–518.

SMIT, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245–262.

STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis.* Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 310p.

TALARICO, L. & MARANZANA, G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56: 1–11.

TRONO JR., G.C. 1999. Diversity of the seaweed flora of the Philippines and its utilization. *Hydrobiologia* 398/399: 1-6.

TSENG, C.K. 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology* 13: 375–380.

UGARTE, R. & SANTELICES, B. 1992. Experimental tank cultivation of *Gracilaria chilensis* in central Chile. *Aquaculture* 101: 7-16.

URSI, S. 2000. *Crescimento in vitro de Gracilaria sp. (Gracilariales, Rhodophyta): análise da diversidade intraespecífica.* Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 84 p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

URSI, S. 2005. *Diversidade intraespecífica de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes.* Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 121p. Universidade de São Paulo. São Paulo.

URSI, S. & PLASTINO, E.M. 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587–94.

URSI, S., PEDERSEN, M., PLASTINO, E.M. & SNOEIJS, P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997–1007.

URSI, S., GUIMARÃES, M. & PLASTINO, E.M. 2008. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). *Acta Botanica Brasilica* 22(3): 891-896.

VIDOTI, E.C. & ROLLEMBERG, M.C.E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova* 27: 139-145.

WEBB, W.L.; NEWTON, M. & D. STARR. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia*, 17: 281- 291.

WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of Chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiology* 144: 307-313.

WESTERMEIER, R., GÓMEZ, I. & RIVERA, P.J. 1993. Suspended farming of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maulín, Chile. *Aquaculture* 113: 215-229.

WIKFORS, G.H. & OHNO M. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *Journal of Phycology* 37: 968–974

YAN, X.H., LV, F, LIU, C.J. & ZHENG, Y.F. 2010. Selection and characterization of a high-temperature tolerance strains of *Porphyra haitanensis* Chang *et* Zhang (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 22: 511–516.

YOKOYA, N. & OLIVEIRA, E.C. 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *The Japanese Journal of Phycology* 41: 283-293.

YOKOYA, N.S., NECCHI, O., MARTINS, A.P., GONZALEZ, S.F. & PLASTINO, E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19: 197–205.

YOSHIMURA, C.Y. 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), São Paulo. 163p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

YOSHIMURA, C.Y., CUNHA, S.R. & OLIVEIRA, E.C. 2003. Avaliação da viabilidade de cultivo em campo de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) na Armação do Itapocoroy,

Penha, SC., 211-226p. In: BRANCO, JO & MARENZI, A.W.C. (org.). Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudos de caso em Penha, SC. Editora da Univali, Itajaí, SC.

YOUNG, A.J. & FRANK, H.A. 1996. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 36: 3–15.

ZHANG, T., SHEN, Z., XU, P., ZHU, J., LU, Q., SHEN, Y., WANG, Y., YAO, C., LI, J., WANG, Y. & JIANG, H. 2011. Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*. *Journal of Applied Phycology*, online first. DOI: 10.1007/s10811-011-9708-x.

ZEMKE-WHITE, W.L & OHNO, M.J. 1999. World seaweed utilization: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11: 369–376.

ZHOU, Y., YANG, H., HU, H., LIU, Y., MAO, Y., ZHOU, H., XU, X. & ZHANG, F. 2006. Bioremediation potential of the macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China. *Aquaculture* 10: 252: 276.