



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

INGRID QUEIROZ DE MIRANDA

ACLIMATAÇÃO DA MACROALGA VERMELHA *Gracilaria birdiae* (PLASTINO & OLIVEIRA) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS VISANDO A ESPORULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS DE CULTIVO

FORTALEZA

2019

INGRID QUEIROZ DE MIRANDA

ACLIMATAÇÃO DA MACROALGA VERMELHA *Gracilaria birdiae* (PLASTINO & OLIVEIRA) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS VISANDO A ESPORULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS DE CULTIVO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientadora: Dra. Ticiane de Brito Lima Holanda

FORTALEZA

2019

INGRID QUEIROZ DE MIRANDA

ACLIMATAÇÃO DA MACROALGA VERMELHA *Gracilaria birdiae* (PLASTINO & OLIVEIRA) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS VISANDO A ESPORULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS DE CULTIVO

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientadora: Dra. Ticiane de Brito Lima Holanda

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ticiane de Brito Lima Holanda

Me. Acrísio José Uchôa Bastos Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Geraldo (*in memoriam*) e Vanusa.

Ao meu esposo Átilla.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida. É o maior mestre que alguém pode conhecer.

À minha Orientadora, Profa. Márjory Lima Holanda Araújo por ter me recebido em sua equipe, pela oportunidade de aprendizagem, por me acalmar nos momentos em que eu achava que os experimentos não iriam dar certo, pela confiança e orientação durante esses anos. Obrigada!

À minha Coorientadora, Ticiania de Brito Lima Holanda pelo acolhimento, por todos os ensinamentos, pela paciência, ajuda nas escritas e apresentações. Minha iniciação científica e esse trabalho não seriam os mesmos sem você. Obrigada por ser minha Coorientadora, não haveria pessoa melhor!

À Profa. Norma Benevides que permitiu o uso de equipamentos e reagentes do seu laboratório, CARBOLEC, contribuído para a realização deste trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP), Asaf, Àurea, George, Cirlânio, Edna, Bruna, Victor, João Neto, Jéssica, Pedro e Gabrielle. Foi um prazer conviver diariamente com vocês durante esse período.

Aos integrantes do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC), Anderson, Pedro, Vitória, João Victor.

Aos meus grandes e inestimáveis amigos de caminhada, Carol, Éwerton e Lucas sem vocês esses anos não seriam os mesmos. Obrigada pelo apoio, pela ajuda, pelos momentos de felicidade partilhados, por todos os abraços nos momentos de desespero, pelas explicações antes das provas, pelas listas de exercícios compartilhadas, pelo “In vai dar certo”. Como diz Voltaire “ Toda a riqueza do mundo não vale bons amigos”.

Aos meus grandes amigos, Tici, Acrísio, Neto e Renata pelos momentos ímpares que vivemos nesses últimos anos da minha graduação. Obrigada pelos conselhos, apoio, risadas, explicações e principalmente pelo divertimento e carinho de vocês. Vocês fizeram esses anos mais leves e felizes.

Aos meus pais Geraldo (*in memoriam*) e Vanusa, a quem dedico todas as minhas conquistas. Meus irmãos Ítalo (*in memoriam*) e Ícaro. Obrigada Deus por colocar tão caprichosamente essas pessoas maravilhosas em minha vida!

À toda a minha família, que sempre me apoiou e ajudou na minha caminhada como ser

humano.

Ao meu esposo Átilla, obrigada por todo amor, companheirismo, dedicação e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis, que não foram raros nesse último ano, me fazendo sempre acreditar que daria tudo certo. Sou grata por cada sorriso seu.

Às minhas gatinhas, Frida e Rosa pelo carinho, descontração e companheirismo nas minhas noites de escrita e estudos.

Aos meus amigos, Matheus, Chris, Bruno, Patrícia, Jackson, João Pedro, Luca e Bia, por todo o apoio nos anos de graduação.

As minhas amigas Márcia e Ana Isa, que foram fundamentais em momentos chaves da minha vida. Amo vocês!

Aos meus amigos “viajadô”, Marcos, Angeline, Leonardo, Luanna, Thiago e Leonardo Filho. Pelos momentos de risada, jogos, viagens e claro muita comida!

À tia Gerarda, obrigada por ter sempre me acolhido como sua segunda filha, por toda a ajuda, carinho e por ter criado um ser tão bondoso como a Ana Carolina, minha irmã!

Ao Gilmar Ferreira, secretário do curso, que sempre me ajudou a resolver todo os problemas possíveis. Obrigada por sempre me escutar e sempre ter palavras positivas mesmo nos cenários mais improváveis.

Agradeço a todos os professores do corpo docente do Bacharelado em Biotecnologia, por me proporcionarem o conhecimento e pelo tanto que se dedicaram a mim.

A Coordenação do curso de Biotecnologia e aos meus colegas de curso.

Ao Programa Integrado de Qualificação Discente e AUG Biotec, pelo aprendizado e experiência de liderança e de trabalho em equipe que pude vivenciar.

À UFC, que disponibilizou o espaço físico para execução do referido trabalho.

Às agências de fomento CAPES e CNPq, pela disponibilização de recursos para realização do trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

“Nada é absoluto. Tudo muda, tudo se move, tudo
gira, tudo voa e desaparece.” (Frida Kahlo)

RESUMO

A macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, descrita por Oliveira e Plastino, é uma espécie presente nas águas tropicais brasileiras, da costa do Ceará até o Espírito Santo. Ela possui grande interesse comercial, principalmente no mercado de espessantes e gelificantes (ágar), devido ao alto valor desse ficocolóide. O objetivo desse trabalho foi estabelecer a aclimação e a adaptação da macroalga marinha vermelha *G. birdiae* sob condições de laboratório, bem como promover a liberação, germinação e fixação de esporos em suporte inerte para cultivo dessa macroalga *in vitro*. Diante disso, foram realizados teste de adaptação da macroalga em diferentes meios de cultivo. Mudanças gametofíticas femininas com cistocarpos maduros, que estavam armazenadas em frascos, liberaram carpósporos no meio MP, os quais foram mantidos em 36 ± 1 de salinidade, 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 14:10 h (luz-escuro), irradiância de 12 ± 5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada LED azul. Os carpósporos que se encontravam coalescentes foram submetidos a técnica de cavitação. Também foi acompanhada a germinação de tetrásporos de *G. birdiae in situ* e realizou-se uma medição quinzenal dos talos em desenvolvimento. Posteriormente foram realizados testes para fixação dos carpósporos em cordas de algodão, polietileno e polipropileno, onde mini-bastidores foram deixados em contato com talos gametófitos femininos de 5 cm contendo 5 cistocarpos maduros/talo. Na primeira semana não houve troca do meio, apenas suplementação com MP e ajuste de salinidade. Após seis semanas de cultivo *G. birdiae* se apresentou adaptada aos meios testados, onde o meio escolhido foi água do mar + VS. A irradiância utilizada durante todo experimento ($12 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \pm 2$) foi favorável ao crescimento e aclimação das mudas. Após 30 dias de cultivo, os carpósporos encontravam-se em estágio de talos eretos (aproximadamente $20\mu\text{m}$) e foram submetidos a cavitação, obtendo efeito positivo na separação, o que não ocorreu de forma eficaz com os carpósporos de 120 dias de cultivo. As medições realizadas com 15, 45 e 60 dias dos talos gametofíticos mostraram um crescimento linear com valores médios de comprimento de $121,8\mu\text{m}$, $567,6 \mu\text{m}$ e $806,2$ respectivamente. Com o passar dos dias, alguns talos gametofíticos se desprenderam da planta-mãe e chegaram a atingir uma média de comprimento de 0,2 cm em 37 dias de cultivo. Durante o processo de fixação dos carpósporos nos mini-bastidores foi relatado uma maior fixação nas cordas de algodão do que nas cordas de polietileno. Já nas cordas de polipropileno, após 15 dias foi observada uma leve camada de pigmentação avermelhada sobre os mini-bastidores. Transcorrido 35 dias de incubação, uma camada mais espessa foi observada a olho nu, decorrente da formação de plântulas. Essas plântulas mediam aproximadamente, $100\mu\text{m}$ e

240µm após 28 e 35 dias, respectivamente. Diante do exposto, podemos afirmar que a fixação e germinação de carpósporos de *G. birdiae* em laboratório se torna uma ferramenta biotecnológica aplicável para o desenvolvimento da maricultura de macroalgas no nordeste do país.

Palavras-chave: Macroalga vermelha. Carpósporos. Tetrásporos. Fixação.

ABSTRACT

The red marine macroalgae *Gracilaria birdiae*, described by Oliveira and Plastino, is a species present in Brazilian tropical waters, from the coast of Ceará to the State of Espírito Santo. It has great commercial interest, mainly in the market of thickeners and gelling agents (agar), due to the high value of this phycocolloid. The aim of this work was to establish the acclimatization and adaptation of the red seaweed *G. birdiae* under laboratory conditions, as well as to foster the release, germination and spore fixation in inert support for in vitro macroalgae cultivation. Therefore, the macroalgae adaptation test was carried out in different culture means. Female gametophyte seedlings with mature cystocarps, which were stored in flasks, released carpospores in PM means, which were maintained at 36 ± 1 salinity, 28 ± 2 ° C, photoperiod 14:10 h (dark light), irradiance of 12 ± 5 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, supplied by blue LED lamp. The carpospores that were coalescing were submitted to cavitation technique. The germination of tetraspores of *G. birdiae* in situ was also monitored and a biweekly measurement of developing stems was performed. Subsequently, tests were carried out to fix the carpospores on cotton, polyethylene and polypropylene ropes, where mini-frames were left in contact with 5 cm female gametophyte stalks containing 5 mature cystocarps / thallus. In the first week, there was no change in the means, only supplementation with MP and salinity adjustment. After six weeks of culture, the *G. birdiae* was adapted to the means tested, where the chosen medium was sea water + VS. The irradiance applied during the whole experiment ($12 \mu\text{mol}$ of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 2$) was favorable to the growth and acclimatization of the seedlings. After 30 days of cultivation, the carpospores were in the stage of standing stems (approximately 20 μm) and were submitted to cavitation, obtaining a positive effect on the separation, which did not occur effectively with carpospores of 120 days of cultivation. The measurements performed with 15, 45 and 60 days of gametophytic stems showed a linear growth with average values of length of 121.8 μm , 567.6 μm and 806.2 respectively. As the days passed, some gametophytic thallus detached from the mother plant and reached an average length of 0.2 cm in 37 days of cultivation. During the carpospores fixation process in the mini-frames, it was reported a greater fixation in the cotton ropes than in the polyethylene ropes. In the polypropylene ropes, after 15 days a light red pigmentation layer was observed on the mini-frames. After 35 days of incubation, a thicker layer was observed by naked eye, due to the formation of seedlings. These seedlings measured approximately 100 μm and 240 μm after 28 and 35 days, respectively. Considering the above, we can state that the fixation and germination of *G. birdiae* carpospores in the laboratory becomes a biotechnological tool applicable to the development of macroalgal

mariculture in the northeast of the country.

Keywords: Red seaweed. Carpospores. Tetraspores. Attachment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida trifásico da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	20
Figura 2	Exemplar de <i>Gracilaria birdiae</i> coletada na Praia de Flecheiras-Trairí, Ceará.....	21
Figura 3	Aplicações dos ficocolóides de macroalgas nos diversos segmentos industriais.....	24
Figura 4	Produção mundial de macroalgas em 2012.....	27
Figura 5	Estrutura para o cultivo de macroalgas em balsa flutuante.....	31
Figura 6	Estruturas de <i>long-line</i> para o cultivo de macroalgas.....	32
Figura 7	Germinação dos carpósporos de <i>G. birdiae</i>	35
Figura 8	Aspectos visuais da muda de <i>G. birdiae</i> submetida ao cultivo sequencial em diferentes comprimentos de onda da luz em laboratório.....	45
Figura 9	Aspecto visual das mudas de <i>G. Birdiae</i> originadas a partir da coalescência de discos basais provenientes da germinação de carpósporos em meio líquido, agitado por aeração e sob incubação em condições controladas de laboratório.....	47
Figura 10	Germinação <i>in situ</i> de tetrásporos de <i>G. birdiae</i> cultivada sob condições de laboratório.....	48
Figura 11	Aspecto visual de mini-bastidores de corda de polipropileno contendo carpósporos da <i>G. birdiae</i> fixados e germinados.....	51
Figura 12	Germinação de carpósporos e formação de plântulas de <i>G. Birdiae</i> sobre mini-bastidores de corda de polipropileno incubados sobre condições controladas de laboratório.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Cinética de crescimento de talos tetrasporófitos de <i>Gracilaria birdiae</i> em meios indefinidos (água do mar, água do mar + von Stoch) e meio definido ASP-12-NTA em laboratório.....	43
Gráfico 2	Viabilidade de mini-bastidores de cordas de algodão e polietileno colonizados por meio da fixação de carpósporos de <i>G. birdiae</i> incubados sob luz branca e luz azul em condições controladas de laboratório.....	49
Gráfico 3	Número médio de carpósporos de <i>G. birdiae</i> fixados em mini-bastidores de cordas de algodão e polietileno incubados sob luz branca e luz azul em condições controladas de laboratório.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produtos obtidos a partir de algas marinhas e aplicados nas indústrias.....	26
Tabela 2	Formulação da solução de Von Stosch (VS) preparada segundo Edwards (1970) e modificada por Yokoya (1996)	38
Tabela 3	Formulação do meio de cultura sintético ASP 12-NTA preparada segundo Iwasaki (1961) e modificado por Yokoya (1996)	38
Tabela 4	Composição do sal marinho <i>Blue Treasure</i> utilizado em laboratório.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Macroalgas Marinhas.....	18
1.2	Importância Ecológica das Algas Marinhas.....	21
1.3	Importância Econômica das Macroalgas Marinhas.....	22
1.4	Cultivo de Macroalgas Marinhas (Algicultura).....	26
1.5	Propagação de Macroalgas <i>in vitro</i>	32
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Geral.....	36
2.2	Específicos.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Macroalga <i>Gracilaria birdiae</i>	37
3.2	Cultivo da Macroalga <i>Gracilaria birdiae</i> em Laboratório.....	37
3.2.1	<i>Meios de cultura</i>	37
3.2.2	<i>Efeito do comprimento de onda da luz</i>	38
3.3	Cultivo de <i>G. birdiae in vitro</i>	39
3.3.1	<i>Germinação de carpósporos</i>	39
3.3.2	<i>Cultivo de talos gametófitos</i>	40
3.4	Fixação de carpósporos de <i>G. birdiae</i> em diferentes materiais de suporte.....	40
3.4.1	<i>Cordas de algodão e polietileno</i>	40
3.4.2	<i>Corda de polipropileno</i>	41
3.5	Análises Estatísticas.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Cultivo da macroalga <i>Gracilaria birdiae</i> em laboratório.....	42
4.1.1	<i>Meios de cultura</i>	42
4.1.2	<i>Efeito do comprimento de onda da luz</i>	43
4.2	Cultivo de <i>G. birdiae in vitro</i>	45
4.2.1	<i>Germinação de carpósporos</i>	45
4.2.2	<i>Cultivo de talos gametófitos</i>	47
4.3	Fixação dos carpósporos de <i>G. birdiae</i> em diferentes materiais de suporte.....	48
4.3.1	<i>Cordas de algodão e polietileno</i>	48
4.3.2	<i>Cordas de polipropileno</i>	50

5	Conclusão.....	52
	Referências.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Macroalgas Marinhas

O termo “alga” vem do latim “planta marinha” engloba diversos grupos vegetais fotossintetizantes, pertencentes a reinos distintos, mas tendo em comum o fato de serem desprovidos de raízes, caules, folhas, flores e frutos. São plantas avasculares, ou seja, não possuem mecanismos específicos de transporte e circulação de fluído, água, sais minerais e outros nutrientes, como ocorre com as plantas mais evoluídas. Não possuem seiva, são portanto, seres com estrutura e organização simples e primitiva. Fazem parte de quatro importantes reinos: Bacteria, Chromista, Protista e Plantae (GUIRY, 2012).

Esses organismos podem ser divididos de acordo com seu tamanho em dois grandes grupos: microalgas e macroalgas, e encontram-se distribuídos por diferentes habitats: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e superfície de vegetais (DE CARVALHO; ROQUE, 2000). Contudo, essa classificação é apenas empírica visto que dentro do mesmo filo podemos encontrar algas dos dois tipos (ELLER *et al.*; 2007). Na verdade, as algas estão presentes em quase todos os lugares onde haja luz para a realização da fotossíntese. Estima-se que existam cerca de 10 milhões de espécies de algas, sendo que a maioria são microalgas (GUALTIERI E BARSANTI, 2006). Podem ainda ser separadas pela cor, mais propriamente pela composição e quantidade de pigmentos fotossintéticos que possuem localizados em estruturas presentes na membrana do tilacóide, os ficobilissomo.

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos, uma vez que outros organismos marinhos necessitam das algas para a obtenção de energia (SAMARAKOON; JEON, 2012). Além disso, são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética global e sua distribuição depende da temperatura e salinidade da água, da intensidade de luz solar, das correntes oceânicas e da concentração de nutrientes na água (EL GAMAL, 2010; MAKKAR *et al.*, 2015).

A classificação das algas é complexa e muitas vezes até mesmo confusa, visto estar em constante transformação. Neste sentido, as macroalgas marinhas, por apresentarem origem polifilética, são, atualmente, classificadas em dois reinos diferentes. As algas verdes e vermelhas pertencem ao Reino Plantae, ao passo que as algas pardas pertencem ao Reino Chromista. Apesar desta divergência, o termo macroalgas marinhas é comum aos três grupos (LIN; QIN, 2014).

As macroalgas podem sobreviver em ambientes de hostis condições devido a diferentes estratégias de adaptação. Sua fisiologia muda devido aos mecanismos necessários de adaptação e, como resultado, as macroalgas produzem diferentes metabólitos para conquistar diferentes ambientes, como: polissacarídeos, ácidos graxos poli-insaturados e florotaninos, os quais estão normalmente envolvidos nos processos metabólicos primário e secundário, é importante para a defesa química desses organismos (CHENG, 2010).

De acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo, elas são classificadas nos seguintes filos (MAKKAR *et al.*, 2015):

- Chlorophyta: possui coloração verde, principalmente, pela predominância das clorofilas “a” e “b”, apesar de também possuir caroteno e xantofila, com predominância de beta-caroteno. Os principais gêneros desse filo incluem *Ulva*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Chaetomorpha* e *Cladophora*.

- Ochrophyta com coloração marrom, principalmente pela presença de ficoxantina. Seus principais gêneros incluem *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Saccharina*, *Macrocystis*, *Nereocystis* e *Sargassum*.

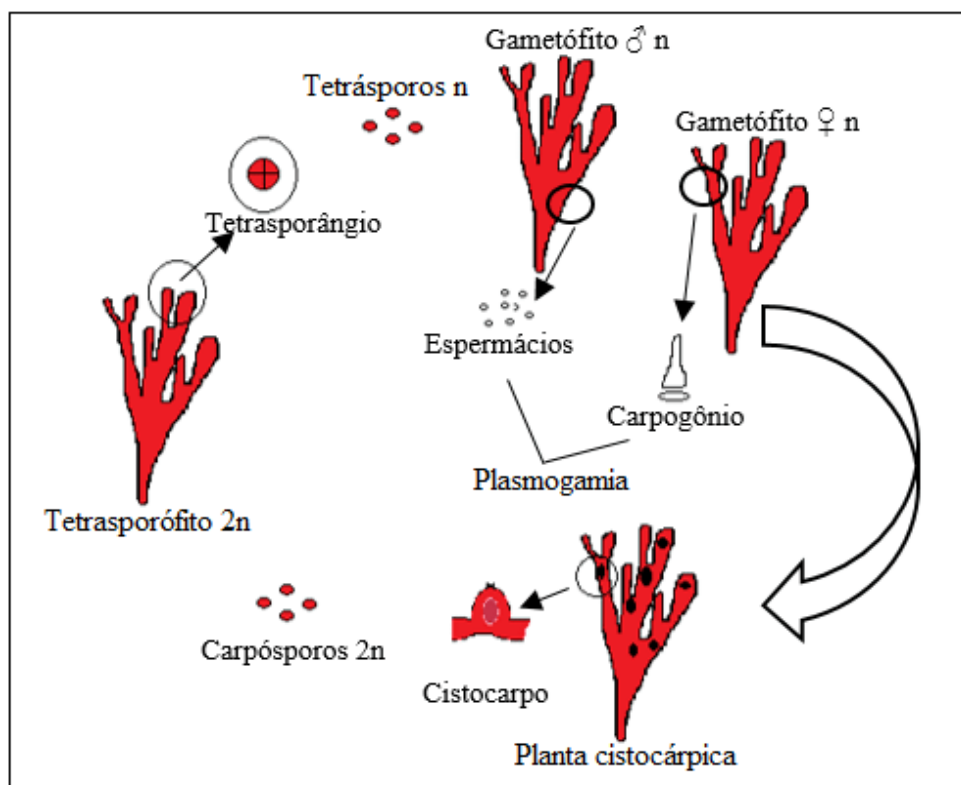
- Rhodophyta possui coloração vermelha devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina. Os principais gêneros incluem *Pyropia*, *Porphyra*, *Chondrus*, *Palmaria* e *Gracilaria*.

O ciclo de vida desses organismos é bastante diversificado, sendo caracterizado pela alternância de gerações e pela presença de reprodução sexuada e assexuada. No caso das espécies de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*, em particular, o ciclo de vida consiste de três fases, duas esporofíticas (diploides) e uma gametofítica (haploide) como mostrado na Figura 1, as quais apresentam indivíduos morfologicamente similares entre si (LIN; QIN, 2014).

De acordo com Byrne *et al* (2002), o gênero *Gracilaria* se caracteriza pela presença de cistocarpos sésseis, presença de células filamentosas nutritivas crescendo desde a base do cistocarpo até o pericarpo mais interno, carpogônio periforme a subsférico e tetrasporângio geralmente cruciado. Os talos são geralmente muito ramificados, de forma cilíndrica ou achatada e uniaxiais (REVIERS, 2006). Possuem ciclo de vida dividido em três fases, das quais duas são diploides (carposporófito e tetrasporófito) e uma haploide (gametófito). A fecundação se dá quando os espermácios (do gametófito masculino) encontram o carpogônio (presente no gametófito feminino) e depositam seu núcleo, que se funde com o núcleo carpogonial, levando à formação de um zigoto diploide. Este zigoto se divide e dá origem aos filamentos gonimoblásticos que, por sua vez, constituem o gonimoblasto. O conjunto de gonimoblastos dá

origem a uma geração dependente do gametófito, o carposporófito. Este carrega o carposporângio, que libera carpósporos (esporos diploides). O cistocarpo é a estrutura que se projeta para fora do talo, circundado por células do gametófito feminino e de onde saem os carpósporos quando se encontra no seu estado maduro. Cada esporo liberado germina e dá origem a um talo diploide (tetrasporófito). Este talo forma tetrasporângios, que têm padrão de divisão cruciada e sofrem meiose, formando quatro células haploides, os tetrásporos. Destes, dois dão origem a gametófitos femininos e dois a gametófitos masculinos, fechando o ciclo (Figura 1) (BOLD; WYNNE, 1985; REVIERS, 2006).

Figura 1: Ciclo de vida trifásico da macroalga *Gracilaria birdiae*.



Fonte: (Miguel Peña H. et al., 2016)

A espécie *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) foi descrita por Oliveira e Plastino (1984) e ocorre nas águas tropicais brasileiras, da costa do Ceará até o Espírito Santo (Figura 2). Possui a característica de exibir um talo cilíndrico e conceptáculos espermtangiais do tipo henriquesiana muito comum na costa Nordeste do Brasil. Possui córtex com duas camadas de células subquadradas e uma médula com cinco camadas de células largas, um proeminente ostíolo; gonimoblastos em forma de cúpula desenvolvido a partir de uma alta fusão

celular; células tubulares nutritivas fundidas com células da base do cistocarpo e raramente com pericarpo externo (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

Figura 2: Exemplar de *Gracilaria birdiae* coletada na Praia de Flecheiras-Trairí, Ceará.



Reino: Plantae
Divisão: Rhodophyta
Classe: Florideophyceae
Ordem: Gracilariales
Família: Gracilariaceae
Gênero: *Gracilaria* Greville
Espécie: *Gracilaria birdiae*

Fonte: Lima-Holanda, 2016.

Um aspecto interessante nos estudos realizados com as espécies de *Gracilaria* é a ocorrência natural de variantes pigmentares. A ocorrência de variantes pigmentares na natureza foi referida para a espécie *G. birdiae*, Plastino, Ursi e Fujii (2004) estudaram as características pigmentares, herança de coloração e as taxas de crescimento das variantes cromáticas dessa espécie.

1.2 Importância ecológica das macroalgas marinhas

As macroalgas marinhas desempenham importante papel ecológico. Devido à sua atividade fotossintética, esses organismos são os produtores primários de matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos e, portanto, muitos organismos marinhos, sejam vertebrados, invertebrados, detritívoros ou decompositores, dependem diretamente das algas para sobreviver. Exemplos dessa dependência primária encontram-se nas associações de algas com corais, alguns protozoários, microrganismos marinhos e esponjas. Ademais, elas também são responsáveis pela estruturação dos ecossistemas aquáticos, formando os bancos e florestas naturais, cinturões de algas entremarés e recifes de algas calcárias (WAALAND; STILLER; CHENEY, 2004; BOLD; WYNNE, 1985). Além de ser indispensável em qualquer estudo que

busca compreender a biodiversidade costeira e seus processos, segundo Chopin (2009), as macroalgas fazem parte da base da cadeia alimentar servindo de alimento para herbívoros e, indiretamente, para carnívoros. São chamadas de “produtores primários de oxigênio e de matéria orgânica em ambientes costeiros, em virtude da sua atividade fotossintética”. Ressaltando que a atividade fotossintética das macroalgas também contribui com a fixação de CO₂ atmosférico e a redução dos gases de efeito estufa.

Nos últimos anos, a conservação da biodiversidade transformou-se em um dos eixos centrais da questão ambiental (HANNIGAN, 2006). Durante muito tempo, a biomassa algácea utilizada nos mais diversos setores foram provenientes dos estoques naturais. No entanto, a colheita intensiva e desordenada levou a uma queda considerável das populações nativas, em particular aquelas de potencial econômico. No início da década de 1970, ficou evidente que a maior parte das macroalgas era retirada dos bancos naturais e que o cultivo era a melhor alternativa de alimentar a produção (NAYLOR, 1976). A coleta das macroalgas dos bancos naturais, que no início era realizada nas áreas entre marés, tem sido agora realizada com o auxílio de pequenas embarcações a centenas de metros da praia (BEZERRA, 2008).

1.3 Importância econômica das macroalgas marinhas

Segundo Estevam (2016), há milênios as macroalgas marinhas são consumidas pelos povos orientais como parte de sua dieta alimentar, por serem fontes de uma variedade de compostos nutritivos, tais como carotenóides, vitaminas, proteínas, minerais e ácidos graxos essenciais.

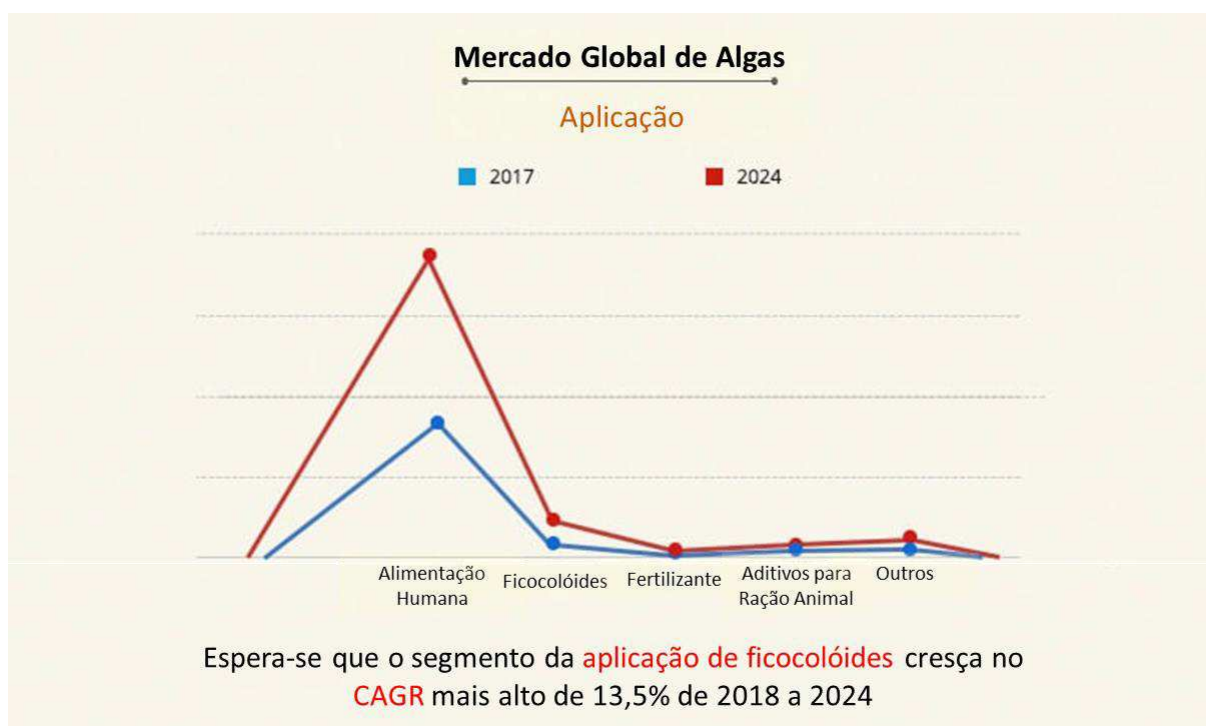
Registros da utilização das algas marinhas como fonte de hidrocolóides datam de meados do século XVII, quando a propriedade gelificante do ágar, extraído com água quente a partir de algas vermelhas, foi descoberta no Japão. Extratos da carragenófita “Irish Moss” (*Chondrus crispus* Stackhouse) tornaram-se populares no século XIX, e o início da produção comercial de alginatos ocorreu somente a partir de 1930. O uso industrial de ficocolóides expandiu rapidamente após a Segunda Guerra Mundial, mas foi limitado pela disponibilidade de matéria-prima (HAYASHI, 2007).

Atualmente, diversos insumos industriais podem ser obtidos a partir de algas marinhas (Figura 3) e aplicados como aditivos alimentares, têxteis, químicos, farmacêuticos, biotecnológicos, dentre outros (EL GAMAL; 2010). As algas também têm sido utilizadas como fontes de nutrientes para ração animal (LIMA, 2017; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2007), plantas atuando como bioestimulantes, e produtos cosméticos (UTHIRAPANDI, 2018;

CASCAREJO 2018). Além disso, são aplicadas em fármacos (vermífugos, anestésicos, antipiréticos, remédios para tosse e cicatrizantes) (RODRIGUEZ, 2018), como filtros biológicos no tratamento dos resíduos gerados pela aquicultura (HENRY-SILVA 2018; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2009; MARINHO-SORIANO, 2007) e na remediação de metais pesados (BUGS, 2018). Os pigmentos de algas marinhas também possuem aplicações comerciais, por exemplo, as ficobiliproteínas, por serem moléculas fluorescentes, são utilizadas em alguns imunoenaios. Também são utilizados em cosméticos e na indústria de alimentos (Tabela 1). Brito, (2017) aplicou a ficoeritrina extraída da macroalga *Solieria filiformis* como corante em formulações de iogurte de morango. O mercado de corantes destinados a alimentos projeta 3,75 bilhões de dólares para 2022, com grande tendência e participação dos pigmentos naturais (MARKETS & MARKETS, 2017 *apud* ARYEE; AGYEI; AKANBI, 2018). Vale ressaltar que o valor comercial de ficobiliproteínas está correlacionado ainda com o grau de pureza e aplicação desses pigmentos. Outros pigmentos, como os carotenoides, possuem propriedade antioxidante e as clorofilas, que além de serem utilizadas geralmente como corantes naturais de alimentos e bebidas, apresentam, também, algumas atividades biológicas (HAMED *et al.*, 2015). A utilização dos pigmentos de algas na alimentação começou na aquicultura de peixe.

Um dos setores da economia das macroalgas marinhas que mais recebe investimentos é a indústria de ficocolóides, polissacarídeos extraídos da parede celular de algas vermelhas e marrons que têm a capacidade de se ligar a moléculas de água para formar géis e estabilizar emulsões. Devido a essa propriedade, os ficocolóides são de grande interesse para a indústria agroalimentar (onde são utilizados como espessantes e emulsificantes, por exemplo), farmacêutica (como laxante e agente de dispersão de comprimidos), biotecnológica (uso em géis de eletroforese, microesferas de cromatografia, meio de cultura para aplicações microbiológicas), de cosméticos, têxtil e de papel. Dentre os mais importantes, destacam-se o alginato, fibra solúvel extraída de algas pardas, a carragenana e o ágar, fibras insolúveis extraídas de algas vermelhas (HAMED *et al.*, 2015; REVIERS, 2006). O alginato encontra sua principal aplicação na indústria alimentícia, mas também ocupa um lugar importante na indústria têxtil, por melhorar o desempenho das tintas utilizadas nas impressões, facilitando a aderência desses materiais sobre os tecidos e na indústria de papel, permitindo a melhoria das propriedades de impressão.

Figura 3: Aplicações dos ficocolóides de macroalgas nos diversos segmentos industriais



Fonte: Adaptado de MARKETS & MARKETS (2017).

Legenda: (CAGR): Taxa de crescimento anual.

As espécies de macroalgas pertencentes ao gênero *Gracilaria* compreendem algumas das macroalgas mais valiosas para a economia no mundo inteiro (MANTRI *et al.*, 2009). Mas além do ágar, também são encontrados muitos outros metabólitos bioativos em *Gracilaria*, sendo relatada a presença de uma grande variedade de lipídios, lactonas e terpenos em espécies como *G. crassa*, *G. coronopifolia*, *G. dura*, *G. longa*, *G. asiatica* e *G. confervoides*, o que tem tornado o gênero um alvo de estudo de muitos pesquisadores na busca por novas moléculas com propriedades medicinais (ALMEIDA *et al.*, 2011)

A espécie *G. birdiae*, além de ser uma importante agarófita, é também fonte de polissacarídeos sulfatados (PS), compostos que têm atraído o interesse da indústria farmacêutica por suas diversas atividades biológicas. Estudos com PS dessa espécie têm sido realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Carboidratos e Lectinas de Algas Marinhas (CARBOLEC) da Universidade Federal do Ceará. Vanderlei (2012) analisou as atividades antiviral e anti-inflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da alga *G. birdiae*, obtendo resultados positivos e sendo o primeiro relato de um polissacarídeo sulfatado de alga marinha com atividade anti-inflamatória regulada pela via heme oxigenase. Já Souza *et al* (2015) analisaram o rendimento de dois métodos de precipitação, características estruturais e atividade dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. cornea*, e posteriormente Coura *et al* (2015) relataram

os mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória desse polissacarídeo em ratos, obtendo resultados positivos e promissores.

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), a indústria mundial de algas marinhas foi responsável por um valor estimado de US\$ 7,4 bilhões no ano de 2010. Já no ano de 2016 o valor gerado pelo setor foi de US\$ 11,7 bilhões, produzindo 30,1 milhões de toneladas de algas. A maior parte desse volume foi destinada a alimentação humana direta, a outra foi para a produção de compostos como ficocolóides, proteína e alimentação animal (FAO 2010; FAO 2016;). Estima-se que o mercado comercial de algas marinhas seja responsável por US \$ 14,08 bilhões em 2018. Estima-se que atinja US \$ 21,11 bilhões em 2023, em uma taxa de crescimento anual de 8,4% (MARKETS & MARKETS, 2017).

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” (FAO; 2010).

Por outro lado, na maioria dos países ocidentais, as algas marinhas não fazem parte da dieta tradicional. Na América do Sul, os únicos países onde as algas são consumidas regularmente são o Chile, Peru e algumas Ilhas do Caribe, onde algumas espécies são encontradas à venda em feiras e mercados (OLIVEIRA, 1997).

A indústria de algas marinhas é dinâmica e responde às pressões de demanda que influenciam preços e áreas de cultivo no mundo. Entretanto, as populações naturais têm-se mostrado insuficientes para atender a demanda de consumo, pois a exploração tem levado a um rápido declínio dos bancos naturais.

Espécies pertencentes ao gênero *Gracilaria* são cada vez mais empregadas para a produção do ágar alimentício. Este gênero encontra-se amplamente distribuído ao redor do mundo, com mais de 100 espécies descritas (OLIVEIRA & PLASTINO, 1984).

Tabela 1: Produtos comerciais formulados com compostos extraídos de algas marinhas

Classificação	Produto	Composto/Alga	Marca
Cosméticos e Higiene	Sabonete em barra	Extrato bruto <i>Fucus vesiculosus</i>	Yes
	Sabonete líquido	Extrato bruto <i>Fucus vesiculosus</i>	cosméticos
	Hidratante corporal	Extrato de algas	Fiorucci
	Óleo pós banho	Algas pardas	Yes
	Sabonete esfoliante	Algas Calcárias	Adcos
	Espuma cremosa	Algas pardas	Adcos
	Creme para pentear	Extrato bruto/ <i>Gracilaria</i>	Adcos
	Máscara capilar	Extrato bruto/ <i>Gracilaria</i>	Adcos
	Xampu sólido	Extrato bruto/ <i>Hypnea</i>	Crescenew
	Condicionador sólido	Carragenana	Crescenew
	Gelatina de banho	<i>Fucus vesiculosus</i>	Crescenew
	Máscara facial	Carragenana/ <i>Chondus crispus</i>	Lush
	Tônico facial	Extrato bruto <i>Fucus vesiculosus</i>	Lush
	Spray modelador de cabelo	Extrato bruto <i>Fucus vesiculosus</i>	Lush
	Demaquilante	Carragenana/ <i>Chondus crispus</i>	Lush
		Extrato de algas	Vult
Alimentos	Balas de algas marinhas	Ágar	Sweet Jelly
	<i>Snacks</i> (salgadinho)	Alga desidratada	Sea's Gift
	Bebida láctea	Carragenana	Nestle
	Sorvete	Carragenana	Nestlé
Suplemento alimentar	Fibras	<i>Gracilaria</i>	AlgaSlim
	Ágar-ágar	Ágar/ <i>Gracilaria confervoides</i>	Tiajaru
	Cálcio	<i>Lithothamnium sp</i>	Litholife
Alimentos para animais	Patês	Carragenana	Pedigree
	Ração	Extrato de algas	
Ciência e Saúde	Ágar microbiológico	Ágar	Sigma
	Bioestimulante de plantas	Bioestimulante e Fertilizante	Extrato Bruto <i>Ascophyllum nodosum</i>

Fonte: Adaptado de Dantas, 2018

1.4 Cultivo de macroalgas marinhas (Algicultura)

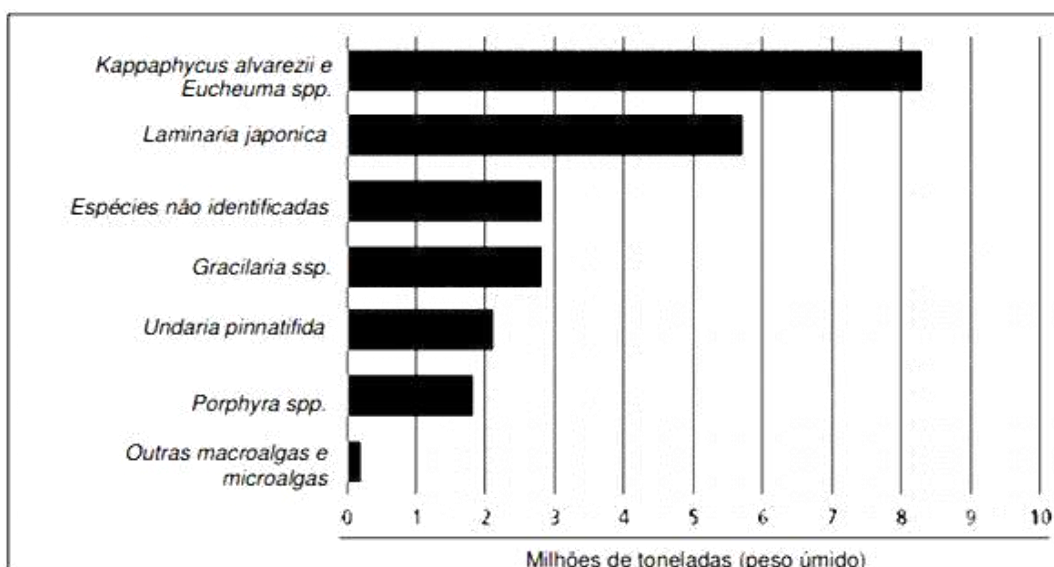
Macroalgas marinhas vêm sendo cultivadas tradicionalmente em países orientais há séculos, com destaque para o Japão, China e Coreia (HAYASHI, 2007). Devido à crescente demanda por material algal para alimentação e indústria e, como consequência dessa demanda, os esforços para diminuir a sobre-exploração das fontes naturais, o cultivo de macroalgas marinhas sofreu uma rápida expansão desde meados do século XX entre muitos continentes, mais precisamente no Sudeste da Ásia, na América do Sul e no Leste da África. Entre as

principais espécies cultivadas mundialmente destacam-se as ocofitas *Saccharina* spp. (formalmente conhecida como *Laminaria*) e *Undaria* spp. e as rodófitas *Porphyra* spp., *Eucheuma* spp., *Kappaphycus* spp. e *Gracilaria* spp. (HAYASHI, 2007; LOUREIRO; GACHON; REBOURS, 2015; YANG *et al.*, 2015).

O gênero *Gracilaria greville* (Gracilariaceae, Rhodophyta) é composto por cerca de 330 espécies, das quais 186 são taxonomicamente aceitas. Seus representantes são geralmente vermelhos, verdes ou marrons esverdeados e distribuídos em mares tropicais e subtropicais (ALMEIDA *et al.*, 2011; BOLD; WYNNE, 1985). O gênero *Gracilaria* é o preferido para extração de ágar com grau alimentício (BIXLER; PORSE, 2011).

Os principais países produtores de macroalgas concentram-se na Ásia (China, Indonésia, Filipinas, Coreia do Sul, Japão e Coreia do Norte), principalmente devido aos hábitos seculares de consumo (MCHUGH 2003; FAO 2014; RADULOVICH *et al.* 2015). Em 2012, a soma do que foi produzido apenas na China e na Indonésia correspondeu a 81,4% da produção mundial. No entanto, um crescente interesse em produzir grandes quantidades de macroalgas tem surgido em outros países, uma vez que esta atividade tem sido reconhecida como economicamente importante para países em desenvolvimento (MAZARRASA *et al.* 2014). Segundo a FAO (2014), em 2010 a produção de *Kappaphycus alvarezii* uma espécie de alga vermelha, ultrapassou a produção de *Kelps* (Figura 4).

Figura 4: Produção mundial de macroalgas em 2012.



Na América Latina, somente o Brasil, o México, a Argentina e o Peru foram relatados como produtores de macroalgas, porém somente o Chile atingiu o patamar de produção em larga escala capaz de abastecer o mercado interno e o externo (HAYASHI *et al.* 2014; RADULOVICH *et al.* 2015). Vale ressaltar, que apesar do cultivo em larga escala ainda há relatos de coleta de macroalgas em bancos naturais do Chile para atender a demanda mundial (REBOURS *et al.* 2014). Nesse país, entre 1980 e 2009, foram colhidas e coletadas aproximadamente 1,2 milhões de toneladas de macroalgas úmidas, o que o tornou o oitavo maior produtor do mundo (MAZARRASA *et al.* 2014). Tal produção é justificada pelo desenvolvimento de métodos de propagação e ao conhecimento básico de aspectos essenciais da ecologia e da fisiologia das macroalgas aliados à gestão conjunta dos maricultores e do governo chileno (REBOURS *et al.* 2014).

No Brasil, diversos experimentos de cultivo de algas marinhas têm sido realizados e estimulados pela demanda de mercado por agaranas e carragenanas. Foram realizados experimentos diretamente no mar e em tanques fechados, com espécies de algas vermelhas nativas dos gêneros *Gracilaria greville*, *Hypnea* J.V. Lamouroux, *Pterocladia* Santelices & Hommersand, *Solieria* J. Agardh e *Agardhiella* F. Schmitz, desenvolvidos nos Estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Diversos aspectos limitantes foram verificados nesses experimentos, destacando-se a produção e/ou taxas de crescimento, variáveis sazonais, epifitismo e herbívora. As perspectivas para o litoral brasileiro dependem de uma série de estudos, incluindo a avaliação de áreas potenciais mais favoráveis ao cultivo comercial (PAULA & PEREIRA 1998, PAULA 2001, ACCIOLY 2004).

No sudeste do Brasil, vários estudos focaram na viabilidade e nos métodos de cultivo de espécies nativas de *Gracilaria* e *Hypnea*, mas também da espécie exótica *Kappaphycus alvarezii*. Esta região é a única onde há cultivo em escala comercial, porém não supre a demanda nacional por biomassa algal. No sul do Brasil, a maior parte dos estudos investigaram o potencial de cultivo de espécies de *Ulva* e *Monostroma* (PELLIZZARI & REIS 2011; HAYASHI & REIS 2012).

Na região Nordeste brasileira as espécies de *Gracilaria* e outras macroalgas vermelhas foram sobre-exploradas, em detrimento dos bancos naturais, pela indústria de ágar, ocasionando uma grande redução da biomassa algácea ao longo da costa nordestina (MARINHO-SORIANO 2005). É relevante salientar que quanto à preocupação com a depleção dos bancos naturais de espécies de *Gracilaria*, Miranda (2000) indicou que em alguns bancos do litoral nordestino

havia sinais claros de sobre-exploração, causado pelo manejo inadequado. Esse fato comprometeu e tem comprometido a sustentabilidade desta atividade na região (MARINHO-SORIANO 2005; CARNEIRO *et al.* 2011). Contudo, esta retirada dos estoques naturais ainda continuou a representar uma parcela significativa da renda de comunidades costeiras (BEZERRA E MARINHO-SORIANO 2010) justificando a implementação de cultivos experimentais de macroalgas, com pioneirismo no Brasil (CÂMARA NETO 1987; MARINHO-SORIANO *et al.* 2002, 2006, 2009, 2015; ALVES, 2016;). Os estudos de Accioly & Paula (2002) e Accioly (2005) contribuíram com uma análise de espécies de macroalgas vermelhas do litoral baiano com potencial econômico demonstrando a viabilidade de *G. cornea* e de *G. domingensis* para o cultivo. Levantamento semelhante também foi realizado por Macchiavello e colaboradores (1999), porém o conhecimento sobre a diversidade brasileira de macroalgas ainda permanece incipiente.

No litoral do Ceará, o cultivo de espécies de *Gracilaria* vem sendo realizado em parceria com a comunidade pesqueira, mostrando altas taxas de crescimento e boas perspectivas para expansão (TEIXEIRA *et al.*, 2002). O cultivo comercial de *G. birdiae* utilizando *long-line* em regime de mar aberto vem sendo realizado através da Associação dos Produtores de Algas de Flecheiras e Guajirú (APAFG) na praia de Flecheiras, município de Trairí, Ceará há alguns anos, onde a biomassa algácea é comercializada, embora em pequena escala. As taxas de crescimento, utilizando a técnica de *long-line*, mostraram-se satisfatórias com uma média de 5,0% (ALVES, 2016), além disso, estudos com esporulação também têm sido realizados a fim de verificar a viabilidade da técnica (LOPES, 2008). Em Itapipoca, Ceará, um projeto de cultivo de algas no assentamento de Maceió também vem sendo executado no intuito de desenvolver a economia local (GOMES; ESMERALDO, 2014). Estes dados mostram o potencial do Nordeste, em especial do Ceará, em abrigar possíveis cultivos comerciais de macroalgas marinhas, sendo estas nativas da própria região. Marinho-Soriano *et al* (2009) analisaram a capacidade de *G. birdiae* para remoção dos nutrientes de efluentes da aquicultura, com resultados que demonstraram alta e notável capacidade de remoção podendo ser usada como filtro biológico na criação de camarões.

Apesar da existência de inúmeros estudos sobre a viabilidade de sistemas de cultivo de macroalgas ao longo da costa brasileira e o registro de resultados positivos sobre o potencial de cultivo, cabe salientar que no Brasil existe apenas um sistema de cultivo de macroalgas em escala comercial, o da empresa Algasbras, situada no estado do Rio de Janeiro.

Apesar do cultivo, a exploração dos recursos marinhos se deu de forma extrativista e de pesca artesanal por muito tempo (CHOPIN, 2009). Essa exploração extrativista

indiscriminada dos bancos naturais tem impactado negativamente algumas espécies de macroalgas (TITLYANOV & TITLYANOVA, 2010) e a algicultura se torna uma alternativa para a proteção de bancos naturais e da biodiversidade marinha (HAFTING *et al.*, 2012). A sustentabilidade da indústria de macroalgas reside em grande parte nos cultivos, uma vez que os bancos naturais não são suficientes para atender à crescente demanda que tem sido verificada nas últimas décadas, principalmente para a produção de ficocolóides e para o uso na alimentação (CRITCHLEY, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000, FAO, 2016).

Exemplos do declínio dos bancos naturais são encontrados na exploração de *Euchema* spp. e *Kappaphycus* spp. nas Filipinas e na Tanzânia e de *Gracilaria* spp. no Chile e no litoral Nordeste do Brasil (HAYASHI, 2007; SALLES, 2006).

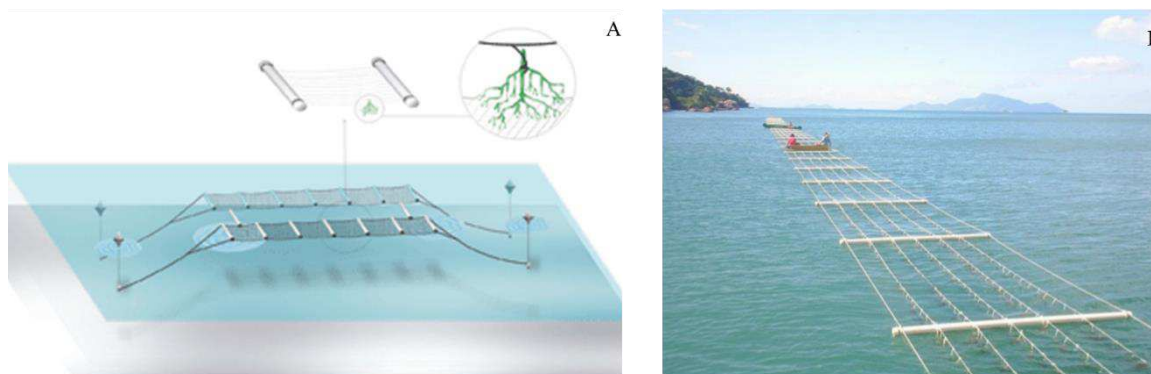
Para mitigar o efeito da exploração sobre os bancos naturais, o cultivo de macroalgas vem sendo expandido e os fatores determinantes para o sucesso da algicultura são a escolha da área de cultivo e da espécie a ser cultivada. O cultivo de espécies endêmicas é facilitado e favorece a produtividade de biomassa algácea, uma vez que elas não necessitam de aclimação ou adaptação ao ambiente. Por outro lado, quando a espécie é exótica outros fatores como salinidade, temperatura, movimentos da alga e da água, firmeza do fundo do mar, diversidade e quantidade de luz solar também devem ser considerados para o sucesso do cultivo (MCHUGH, 2003).

Os sistemas de produção de macroalgas podem ser extensivos ou intensivos e realizados no mar (*in shore*) ou em tanques (*off shore*). O cultivo no mar não permite o controle dos parâmetros físico-químicos e sofre com os efeitos da sazonalidade. A técnica de cultivo de macroalgas mais utilizada é simples e antiga, denominada de balsa flutuante com corda única (SRFR- Single Rope Floating Raft), a qual tem se mostrado adequada para o cultivo desses organismos em áreas amplas, com maior profundidade e pouca movimentação de água. Este método consiste em cultivar as algas em uma estrutura maré (Figura 5) que permanece na superfície por meio de bóias, subindo e descendo de acordo com as mudanças da (FOSCARINI; PRAKASH, 1990).

As balsas podem ser construídas com diversos materiais: bambu, tubos de PVC e madeiras duráveis na água do mar. Também são necessárias cordas, nas quais serão inseridos os talos das algas. A balsa deve ser ancorada no fundo do mar. Quando as algas começam a crescer, a estrutura torna-se mais pesada e afunda. Para contornar esse problema, devem ser inseridos flutuadores. Este método tem como vantagem a possibilidade de ser utilizado tanto em águas rasas como em águas profundas. Tanto a montagem da estrutura como a implementação do cultivo podem ser realizados em terra. Outra vantagem é que a balsa pode

ser movimentada de acordo com a necessidade, além de poder ser construída com a madeira disponível na região. No entanto, a estrutura pode afundar ou quebrar durante o mau tempo e pode ser danificada pela passagem de barcos a motor. Outra desvantagem é a necessidade do uso de materiais flutuantes, o que encarece o processo (FOSCARINI; PRAKASH, 1990).

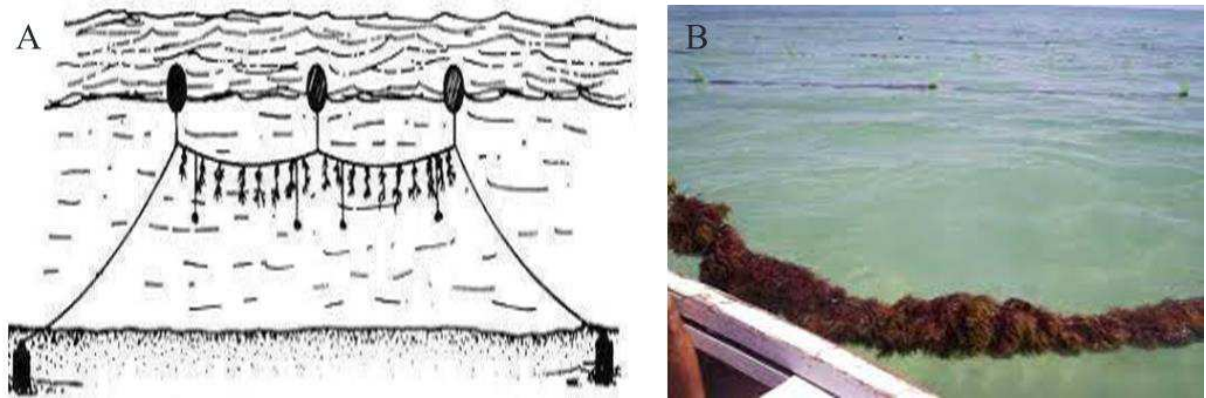
Figura 5: Estrutura para o cultivo de macroalgas em balsa flutuante (A e B).



Fonte: Adaptado de SEPÚLVEDA (2016).

Contudo, para águas mais movimentadas, essa técnica foi considerada inadequada e sofreu modificações passando a ser chamada de *long-line*. Este é semelhante ao método da balsa flutuante, pois as algas também são colocadas em uma corda que está suspensa por bóias (Figura 6). Porém, neste método a corda é mais espessa e está ligada a flutuadores de plástico ou de bambu fixados com intervalos de 4 a 5 metros e ancorada em cada extremidade (FOSCARINI; PRAKASH, 1990). Assim, a estrutura *long-line* consiste, basicamente, de uma linha mestra que possui comprimento e diâmetro variáveis com bóias colocadas nas extremidades e em toda a extensão da linha. A fixação é feita por meio de cordas presas em âncoras que são colocadas nas extremidades da linha mestra (LELIS, 2006). Esta estrutura permite que a luz incidente seja aproveitada ao máximo, além de proporcionar um controle mais fácil do epifitismo (SHACKLOCH; DOLY, 1983 apud LELIS, 2006). Outra vantagem é que a estrutura *long-line* pode ser colocada em quase todo lugar e, se houver necessidade, o cultivo pode ser movimentado (FOSCARINI; PRAKASH, 1990). Como estas estruturas podem ser instaladas tanto em regiões abertas e profundas, como em baías e enseadas, este sistema é muito utilizado para o cultivo de espécies marinhas de grande valor comercial e exploradas economicamente (LELIS, 2006). As desvantagens deste método são: o cultivo e a coleta não podem ser facilmente realizados em terra, o que demanda grande quantidade de mão de obra; a estrutura pode ser danificada pela passagem de barcos a motor; é necessário o uso de materiais para flutuação e as cordas têm custo elevado (FOSCARINI; PRAKASH, 1990).

Figura 6: Estruturas de *long-line* para o cultivo de macroalgas (A e B)



Fonte: Adaptado de FACCINI (2007)

Em virtude desses fatores, as técnicas de algicultura vêm sendo aprimoradas por meio de estudos conduzidos em laboratório (ASK & AZANZA, 2002) e em TANQUES (BULBOA *et al.* 2013), bolsões submersos (CAMACHO & MONTAÑA, 2012), *raceways*, no mar e em costões rochosos utilizando estruturas de cultivo como bastidores de PVC (Policloreto de vinila) (BEZERRA & MARINHO-SORIANO, 2010) e redes tubulares (ASK & AZANZA, 2002). Vale ressaltar que as técnicas citadas envolvem a etapa de plantio de mudas obtidas do banco natural. Outras técnicas são fundamentadas na esporulação natural, nas quais as estruturas de cultivos são colonizadas com esporos algáceos, e na propagação vegetativa ou clonal, na qual pequenos fragmentos de macroalga presos a estruturas como cordas e redes dão origem a indivíduos inteiros. Essas técnicas evitam a depredação dos bancos naturais e oferecem a possibilidade de selecionar linhagens mais adequadas para o cultivo (SALLES, 2006).

1.5 Propagação de macroalgas *in vitro*

A propagação de espécies vegetais, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das vertentes da biotecnologia que permite a produção massiva de organismos em um curto período de tempo. As técnicas foram iniciadas há mais de um século e evoluíram bastante desde então (AHMED; TAHA, 2012; YOKOYA; YONESHIGUE-VALENTIN, 2011).

Para macroalgas marinhas, o primeiro relato de sucesso com a técnica de

propagação *in vitro* data de 1978, quando Chen & Taylor descreveram a cultura axênica da região medular da rodófito *Chondrus crispus* (YOKOYA; YONESHIGUE-VALENTIN, 2011). Na década seguinte (1980-1990), os esforços concentraram-se no estabelecimento de técnicas básicas para os procedimentos de rotina de cultivo e alguns estudos foram direcionados para a indução de calos (REDDY *et al.*, 2008).

Aplicações biotecnológicas mais robustas na área de propagação de macroalgas marinhas envolvem o isolamento e a regeneração de talos inteiros a partir de protoplastos e a engenharia de bioprocessos visando a produção de biocombustíveis e de compostos bioativos de alto valor para as indústrias farmacêutica e nutracêutica. Exemplos destas abordagens são relatados por Rorrer e Cheney (2004), que exploram dois elementos necessários para a tecnologia de bioprocessos de macroalgas marinhas: o desenvolvimento da cultura de tecidos e o desenho do fotobiorreator para uma espécie modelo, *Agardhiella subulata*. Outros exemplos são dados por Yeong, Khalid e Phang (2008), que isolaram e regeneraram protoplastos de *Gracilaria changii* em talos juvenis visando aplicações em bioprocessos, por Bodian e colaboradores (2013), que produziram protoplastos da carragenófito *Chondracanthus acicularis* e por Yeong e colaboradores (2014), que cultivaram explantes de *G. changii* em fotobiorreatores.

A propagação de macroalgas marinhas encontra hoje maior aplicabilidade no fornecimento de mudas obtidas a partir de calos ou protoplastos para a maricultura. Entretanto, abordagens moleculares como a transformação genética visando a produção em larga escala de compostos de alto valor agregado para a indústria vêm encontrando seu espaço no cenário atual da biotecnologia de algas (LIN; QIN, 2014; QIN; LIN; JIANG, 2012). Diversos trabalhos descrevem estudos com a cultura de tecidos de espécies de *Gracilaria*, visando principalmente aplicações na maricultura. Exemplos podem ser encontrados para *G. verrucosa* (GUSEV *et al.*, 1987; KACZYNA; MEGNET, 1993), *G. tenuistipitata* e *G. perplexa* (YOKOYA, N. S.; WEST, J. A.; LUCHI, 2004), *G. birdiae* (LOPES, 2008) e *G. dominguensis* (RAMLOV; PLASTINO; YOKOYA, 2009).

Uma espécie que têm recebido bastante atenção com relação a estudos em propagação *in vitro* é a carragenófito *Kappaphycus alvarezii*. Esta macroalga é encontrada naturalmente na região do Indo-Pacífico e, devido sua importância para a maricultura, foi introduzida no Brasil no ano de 1995, tendo cultivo comercial estabelecido no Rio de Janeiro desde 1998 (HAYASHI, 2007; HAYASHI *et al.*, 2014). Entretanto, ainda são encontrados poucos relatos na literatura para essas abordagens e para um número reduzido de espécies.

A propagação de macroalgas *in vitro* também pode ser realizada por meio da

liberação e germinação de esporos algáceos. Relatos na literatura mostram o tempo de liberação de carpósporos sendo 14 dias para a espécie *Calithamnion cordatum* (O'KELLY; BACA, 1984), 10 dias para *Gigartina canaliculata* (PACHECO-RUIZ; GARCÍA-ESQUIVEL; ANGUILAR-ROSAS, 1989), 30 dias para *Gracilaria verrucosa* (OZA; KRISHNAMURTHY, 1967) e *G. edulis* (RAMA RAO; THOMAS, 1974) e 25 dias para *Gracilaria corticata* (JOSEPH; KRISHNAMURTHY, 1977). A contagem de carpósporos liberados também foi relatada na literatura por Mantri e colaboradores (2009) para *G. dura* [808 carpósporos cistocarpo⁻¹], Michetti; Martín; Leonardi (2013) para *G. gracilis* [1.194 carpósporos cistocarpo⁻¹], Umamaheswara Rao (1976) para *G. corticata* [4.911 carpósporos cistocarpo⁻¹] e Mal; Subbaramaiah (1990) para *G. edulis* [4.205 carpósporos cistocarpo⁻¹].

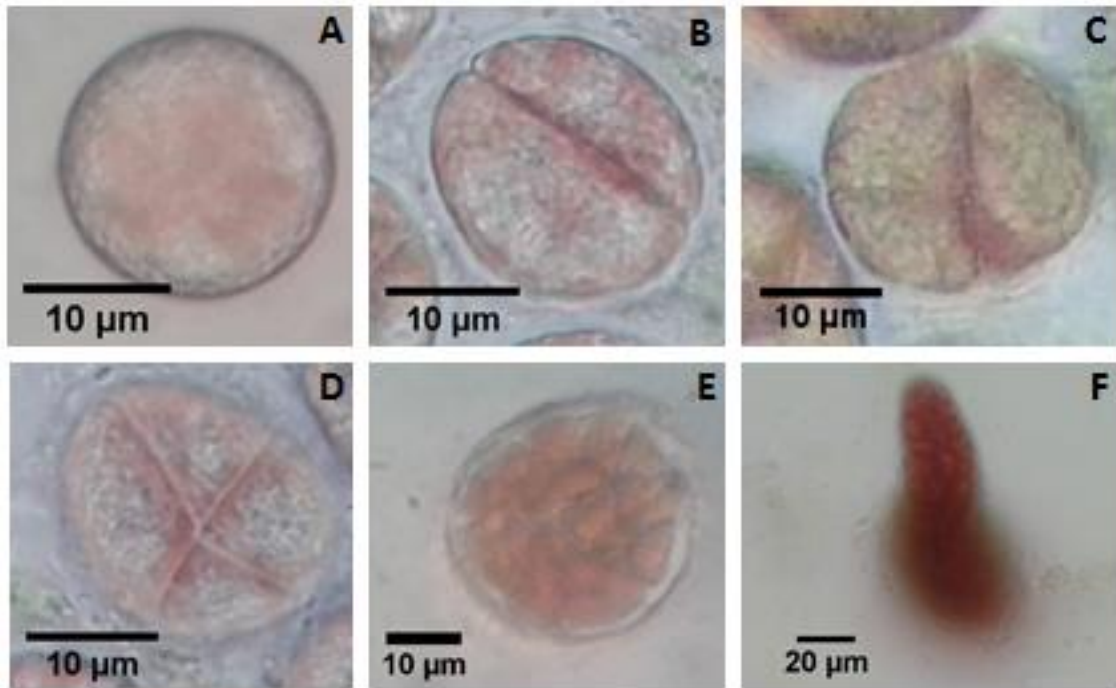
De acordo com Lefebvre; Destombe e Godin (1987), em geral, até 6.000 carpósporos podem ser liberados a partir de um cistocarpo maduro de *Gracilaria*. Lima-Holanda (2016) relatou 4.495 carpósporos liberados por cistocarpo de *G. birdiae* em 15 dias e foi maior que os números relatados por Mantri *et al* (2009) para *G. dura* de 2.959, Infante e Candia (1988) para *Gracilaria chilensis* de 60 a 2.900, Orduña-Rojas e Robledo (1999) para *G. cornea* de 2.500 e por Oza (1975) para *G. corticata* de 200 a 250.

Os carpósporos liberados pelo gênero *Gracilaria* apresentaram 20 µm de diâmetro (ORDUÑA-ROJAS; ROBLEDO, 1999) e a germinação desses carpósporos foi descrito por Yokoya; Oliveira (1993), Orduña-Rojas e Robledo (1999) e Lima-Holanda (2016), onde foram relatadas quatro etapas de desenvolvimento do carpósporos até a formação do disco basal que deu origem ao microtalo (plântula) ereto (Figura 7F). Os estágios de germinação dos carpósporos de *G. gracilis* até a formação dessas plântulas foram descritos também por Michetti, Martín e Leonardi (2013). A formação dos plântulas de *G. birdiae*, *in vitro*, ocorreu em 23 dias (LIMA-HOLANDA, 2016) bem como os resultados para *G. cornea*, *G. dura* e *G. gracilis* ocorreram nos períodos de 17 a 21, 15 a 20 e 30 dias, respectivamente (MAIA, 2016; ORDUÑA-ROJAS; ROBLEDO, 1999; MICHETTI; MARTÍN; LEONARDI, 2013 e MANTRI *et al.*, 2009).

O tamanho dos esporos é considerado como um fator determinante nas suas taxas de sedimentação. Esporos pequenos tendem a decantar mais lentamente que esporos grandes. Isso pode ter uma grande influência para a dispersão, já que esporos que afundam mais rápido tendem a permanecer mais próximos à planta parental, enquanto que os esporos que demoram mais para afundar podem alcançar distâncias maiores (CLAYTON, 1992). Trabalhos mais recentes apontam que em ambientes costeiros, geralmente é a turbulência, mais do que as velocidades de sedimentação, que controla o tempo em que os propágulos de algas vão demorar

para alcançar um substrato (GAYLORD *et al.*, 2002).

Figura 7- Germinação dos carpósporos de *G. birdiae* liberados espontaneamente e mantidos em meio ASP12-NTA sob condições de $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 14:10 h (claro / escuro) e temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ *in vitro*.



Fonte: Lima-Holanda (2016).

Legenda: (A) Carp\u00f3sporo recém-liberado; (B) Est\u00e1gio bicelular, dentro de 24-36 h ap\u00f3s a libera\u00e7\u00e3o; (C, D) Est\u00e1gios tri e tetra celular, respectivamente, observados ap\u00f3s 2-3 dias da libera\u00e7\u00e3o; (E) Disco multicelular observado ap\u00f3s 4-5 dias da libera\u00e7\u00e3o ; (F) Microtalo tetraspor\u00f3fito cil\u00edndrico ereto observado ap\u00f3s 20-23 dias da libera\u00e7\u00e3o.

Engel e Destombe (2002) em um estudo com *Gracilaria* do norte da Fran\u00e7a, demonstraram que a fertilidade das algas pode variar de acordo com o ambiente onde ocorrem e que algas de regi\u00f5es com menor hidrodinamismo apresentam menor taxa de fecunda\u00e7\u00e3o do que as algas de locais com maior hidrodinamismo. Conclui-se que a fertilidade \u00e9 diferente porque em ambientes com maior movimentação da mar\u00e9 \u00e9 maior a probabilidade de encontros entre os gametas. A diferen\u00e7a de fertilidade relacionada \u00e0 influ\u00eancia da mar\u00e9 pode significar uma tend\u00eancia adaptativa das esp\u00e9cies a ambientes espec\u00edficos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer a aclimatação e a adaptação da macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* sob condições de laboratório, bem como promover a liberação, germinação e fixação de esporos em suporte inerte para cultivo dessa macroalga *in vitro*.

2.2 Específicos

- ✓ Coletar e identificar os talos carposporófitos e tetrasporófitos da alga *G. birdiae* na praia de Flecheiras-CE;
- ✓ Estabelecer o cultivo de *G. birdiae* em condições de laboratório;
- ✓ Avaliar o efeito do comprimento de onda da luz incidente sobre o crescimento da macroalga *G. birdiae*;
- ✓ Estabelecer condições para a germinação dos carpósporos de *G. birdiae* em meio líquido no laboratório;
- ✓ Avaliar a influência dos tipos de suporte para a fixação dos carpósporos de *G. birdiae* em estruturas de cultivo em laboratório.

3. Materiais e Métodos

3.1 Macroalga *Gracilaria birdiae*

A alga marinha vermelha da espécie *Gracilaria birdiae* foi cultivada por meio da técnica de *long-line* na Praia de Flecheiras, município de Trairí, Ceará (03°13'06" S e 39°16'47" W) pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) a 200 metros da costa. Talos carposporófitos e tetrasporófitos foram colhidos e armazenados em recipiente térmico para transporte até o Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos (BioAP) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, onde foram limpas com o auxílio de uma escova e água corrente para a remoção de epífitas, areia e incrustantes.

3.2 Cultivo da macroalga *Gracilaria birdiae* em laboratório

3.2.1 Meios de cultura

Com o objetivo de se estabelecer o melhor meio de crescimento e manutenção dos talos de *G. birdiae* no laboratório, 1 talo tetrasporófito (0,15 g) foi transferido para frascos Schott contendo 80 mL de dois meios indefinidos (1 e 2) e um definido (3), sendo: 1) água do mar filtrada em tecido de nylon (H₂O_m); 2) água do mar enriquecida com solução de Von Stosch meia força (VS/2), proposta por Edwards (1970) e modificada por Yokoya (1996), segundo formulação mostrada na Tabela 2 e denominada H₂O_m + VS, e 3) meio ASP 12-NTA segundo formulação mostrada na Tabela 3. A água do mar foi coletada na Praia de Flecheiras e transportada até o laboratório em garrações de 20 L à temperatura ambiente. Os meios 1 e 2 foram adicionados de dióxido de germânio (GeO₂) 1mg/L para evitar a proliferação de diatomáceas. A salinidade dos meios foi mantida em 36 ± 1. As condições de cultura da macroalga no laboratório foram temperatura de 28 ± 2 °C, intensidade de luz de 12 ± 5 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpada LED branca posicionada sobre os frascos a uma distância de 12 cm e aeração constante. Após 15 dias de cultivo, os talos foram transferidos para frascos de 250 mL, para não limitar o crescimento da alga e cultivados por 30 dias. Os meios de cultura dos talos foram substituídos e a pesagem dos talos aconteceram a cada 7 dias, o experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 2 – Formulação da solução de Von Stosch (VS) preparada segundo Edwards (1970) e modificada por Yokoya (1996).

Componentes	Concentração (mM)
NaNO ₃	0,50
Na ₂ -glicerofosfato.xH ₂ O*	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0001
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,010
Tiamina.HCl	0,059**
Biotina	4,1 x 10 ⁻⁶ **
Cianocobalamina	1 x 10 ⁻⁶ **

Fonte: Adaptado de RAMLOV (2007).

Legenda: (*) Neste trabalho, a fonte de fosfato original (Na₂HPO₄.12H₂O 30 μM, inorgânica) foi substituída por uma fonte orgânica (Na₂-glicerofosfato.xH₂O 25 μM), que também pode ser utilizada como fonte de carbono. (***) Composição equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970). Alíquota de 4mL/L utilizada para VS meia força (VS/2).

Tabela 3 – Formulação do meio de cultura definido ASP 12-NTA preparada segundo Iwasaki (1961) e modificado por Yokoya (1996).

Componentes	Quantidade para 1 L de meio
NaCl	28,0 g
KCl	0,7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5 g
NaNO ₃	0,1 g
K ₃ PO ₄	10,0 mg
Na ₂ -glicerofosfato.xH ₂ O	10,0 mg
Ácido nitrilotriacético (NTA)	0,1 g
TRIS*	1,0 g
Tiamina.HCl**	100,0 μg
Biotina	1,0 μg
Cianocobalamina	1,0 μg
Metais-traço PII	1,0 mL
Metais-traço SII	1,0 mL

Fonte: Adaptado de RAMLOV (2007).

Legenda: (*) pH ajustado para 7,8; (**) Foi adicionado tiamina.HCl, segundo McLachlan (1973) e retirado o Na₂SiO₃.9H₂O

3.2.2 Efeito do comprimento de onda da luz

Para avaliar o aspecto visual e a adaptação da macroalga *G. birdiae* aos diferentes comprimentos de onda da luz incidente no cultivo, uma muda foi cultivada em Meio Padrão (MP) preparado no laboratório a partir da dissolução de 4,38 g de sal marinho (*Blue Treasure*, densidade a 24°C = 1024 – 1026, pH 8,10 a 8,50) em 1 L de água destilada, como mostrado na Tabela 4, enriquecido com solução de von Stosch e acrescido de nitrato de sódio (NaNO₃)

50mg/L, fosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,48mg/L e GeO₂ na concentração de 1 mg/L, para evitar o crescimento de diatomáceas. A salinidade do meio foi mantida em 36 ±, o pH foi ajustado para 7,8 e a aeração permaneceu constante a uma vazão de 6 L de ar/min. A densidade de cultivo da macroalga foi de 50,0 ± 2,0g/L e as condições de cultura no laboratório foram temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz-escuro), irradiância de 12 ± 5 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpada LED branca por 31 dias, após esse período o frasco foi submetido a LED azul por 7 dias, dispostas lateralmente a uma distância de 12 cm dos frascos. As medidas de salinidade foram realizadas em refratômetro portátil (RHB 90). A substituição do meio foi realizada semanalmente.

Tabela 4: Composição do sal marinho *Blue Treasure* utilizado no cultivo da *Gracilaria birdiae* em laboratório.

Componente	Concentração (mg/L)
KH	7 - 11
Na ⁺	9.500 – 10.000
Mg ²⁺	1.330 – 1.450
K ⁺	360 - 400
Ca ²⁺	380 - 420
Sr ²⁺	9,00 – 10,00
Rb ²⁺	0,11 – 0,13
Fe	0,06 – 0,20
Li ⁺	0,14 – 0,16
Cl ⁻	17.300 – 17.800
So ₄ ²⁻	2.260 – 2.550
Br ⁻	20 - 40

3.3 Cultivo de *G. birdiae* *in vitro*

3.3.1. Germinação de carpósporos

Para avaliar o aspecto visual de mudas da macroalga *G. birdiae* obtidas em meio líquido por meio da germinação de esporos obtidos no laboratório, carpósporos foram transferidos para frascos Schott contendo o meio MP (salinidade = 36 ± 1), GeO₂ 1mg/L e

aeração constante de 6L de ar/min. Os frascos foram incubados a temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 14:10 h (luz-escuro), irradiância de 5 ± 1 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada LED azul e o cultivo foi mantido por 12 meses.

Após 30 e 120 dias de cultivo, os carpósporos coalescidos foram submetidos a cavitação utilizando ondas sonoras para agitar as partículas em uma solução visando a separação dos esporos. O equipamento utilizado foi uma Cuba Ultrasônica da marca Cristofóli, no qual as amostras foram submetidas a 3 ciclos de cavitação durante 8 minutos em uma frequência de 50 Hertz.

3.3.2 Cultivo de talos gametófitos

Para avaliar o crescimento e a manutenção da macroalga sob condições de laboratório, 10 talos gametófitos originários da germinação de tetrásporos *in situ* e *in vitro* foram transferidos para um frasco Schott contendo 180 mL de meio MP, GeO_2 1mg/L, e salinidade 36 ± 1 . As condições de cultura dos talos foram temperatura 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz-escuro), irradiância de 12 ± 5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada LED azul e aeração constante de 6L de ar /min. A troca do meio e a medição dos talos foram realizadas a cada 7 e 15 dias, respectivamente e o cultivo foi mantido por 45 dias.

3.4 Fixação de carpósporos de *G. birdiae* em diferentes materiais de suporte

3.4.1 Cordas de algodão e polietileno

Para promover e avaliar a fixação de carpósporos de *G. birdiae* em diferentes materiais de suporte, 10 Frascos Baby contendo 180 mL de meio MP, suplementado com GeO_2 1mg/L e salinidade 36 ± 1 receberam miniaturas de estruturas de cultivo denominadas de bastidores. Tais estruturas foram produzidas utilizando lâminas de vidro (microscopia) envolvidas por cordas constituídas de diferentes materiais: 1) algodão (torcida, 1,80 m, espessura de 2mm - AL) e 2) polietileno (trançada, 1,30 m, espessura 3 mm - PL). Talos gametófitos femininos de aproximadamente 5 cm contendo 5 cistocarpos maduros, foram adicionados nos frascos e mantidos sob incubação a temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz-escuro), irradiância de 12 ± 5 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada LED na luz branca (LB) e na luz azul (LA). O experimento foi realizado em quintuplicata e uma

análise no microscópio de luz foi feita semanalmente para a observação da fixação dos carpósporos.

3.4.2 Corda de polipropileno

Para promover e avaliar visualmente a fixação de carpósporos de *G. birdiae* em suporte de polipropileno, 3 frascos Baby contendo 180ml de MP, suplementado com GeO_2 1mg/L e salinidade 36 ± 1 receberam uma estrutura de cultivo em miniatura denominado mini-bastidor, confeccionado com uma lâmina de vidro (microscopia) envolvida com 1,10 m de corda trançada de polipropileno de 3mm de espessura. Os mini-bastidores foram previamente escovados, lavados com água corrente e mantidos imersos em água do mar durante 10 dias e posteriormente mergulhados nos frascos na presença de um talo gametófito feminino de aproximadamente 5 cm contendo 5 cistocarpos maduros. Os frascos foram incubados a temperatura de 28 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz-escuro), aeração de 6 L/min, irradiância de 90 ± 10 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada LED na luz branca e os meios foram substituídos a cada 7 dias. O experimento foi realizado em triplicata e uma análise microscópica foi feita semanalmente para a observação da fixação dos carpósporos.

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como médias \pm (Desvio Padrão). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o método de análise de variância *two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Turkey. Considerou-se significativos os valores com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 7.01 para Windows, GraphPad Software (La Jolla, California, USA).

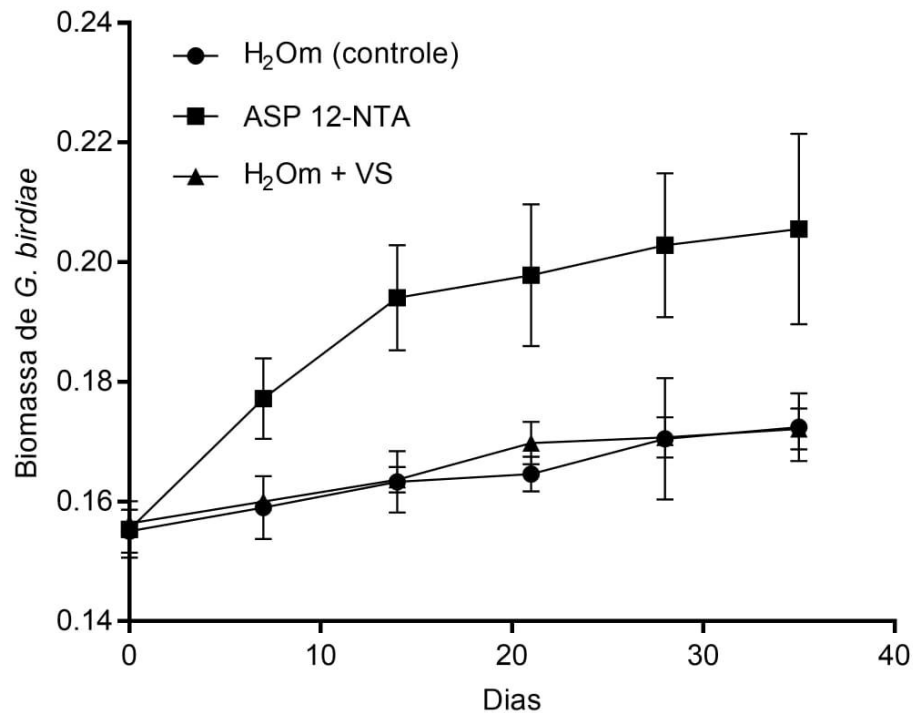
4 Resultados e Discussão

4.1 Cultivo da macroalga *Gracilaria birdiae* em laboratório

4.1.1 Meios de cultura

A cinética de crescimento da macroalga nos diferentes meios de cultura H₂O_m, H₂O_m + VS e ASP 12-NTA sob condições de laboratório pode ser observada no Gráfico 1. O espécime de *G. birdiae* se apresentou visualmente adaptado nos diferentes meios e às condições estabelecidas no laboratório após seis semanas de cultivo, uma vez que não foi observada perda de biomassa ou coloração nos talos. Os talos cultivados em H₂O_m + VS apresentaram uma biomassa similar aos cultivados em H₂O_m, com um baixo crescimento após 35 dias e uma biomassa final de 0,17 g ± 0,005. Já os talos cultivados em meio definido ASP 12-NTA apresentaram um maior crescimento, com biomassa média final de 0,21 g ± 0,015. Esses resultados sugerem que os meios H₂O_m e H₂O_m + VS combinados às condições estabelecidas no laboratório podem ser utilizados para manutenção de *G. birdiae* em cultivo *in vitro*, não visando o seu crescimento. Ramlov, (2007) utilizou um meio formulado com água do mar enriquecida com VS/2 para obtenção de calos da alga *Gracilaria domingensis* com sucesso. Lopes (2008) promovendo a cultura de tecidos com a espécie *G. birdiae* utilizou o meio ASP 12-NTA para manutenção da espécie em laboratório. Apesar do meio ASP 12-NTA contribuir para o crescimento de *G. birdiae* em laboratório, o seu alto custo impossibilita o seu uso em uma maior escala., sendo restrito à métodos que utilizam pequenos volumes em laboratório. Desta forma, os meios H₂O_m e H₂O_m + VS foram mais indicados para o cultivo em maior escala, porém alterações nos parâmetros de cultivo devem ser considerados para a promoção do crescimento de *G. birdiae*.

Gráfico 1: Cinética de crescimento de talos tetrasporófitos de *Gracilaria birdiae* em meios indefinidos (água do mar, água do mar + Von Stoch) e meio definido ASP-12-NTA em laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora

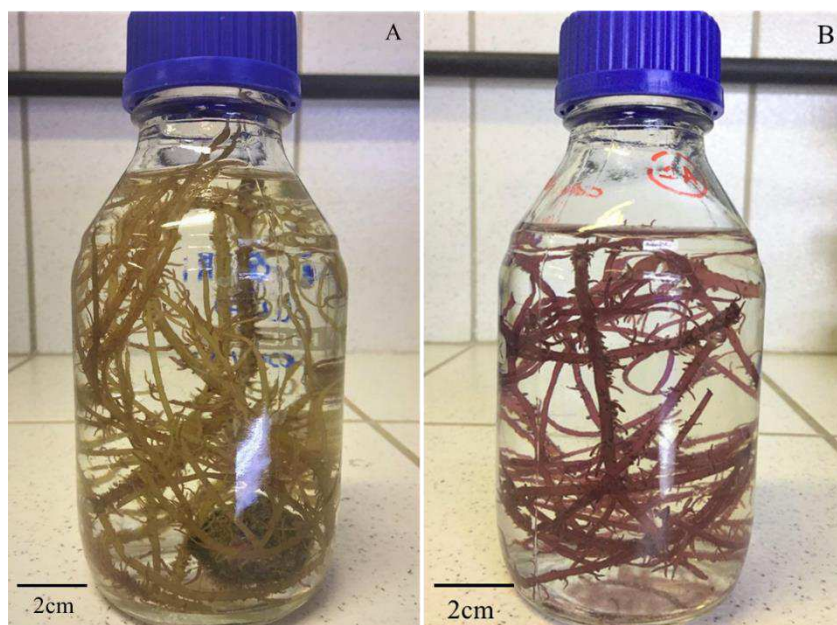
Legenda: Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo de Turkey ($p < 0,05$), onde H₂Om e H₂Om + VS indicam inexistência de diferença significativa.

4.1.2 Efeito do comprimento de onda da luz

O aspecto visual da muda da macroalga vermelha *G. birdiae* após cultivo sequencial sob luz branca e luz azul e condições controladas de laboratório está mostrado na Figura 8. Após 31 dias de cultivo sob luz branca a muda apresentou coloração amarelo esverdeado, característica de mudas cultivadas na superfície do mar, condição na qual a macroalga é submetida a uma elevada incidência de luz solar. Por outro lado, ao submeter a mesma muda à luz azul por 45 dias, houve uma evidente alteração da cor da muda algácea para vermelho, mostrando a relevante capacidade da macroalga *G. birdiae* em se adaptar às mudanças de comprimento de onda da luz do ambiente. No mar, as macroalgas são constantemente submetidas a estresses ambientais, dentre eles a dinâmica das marés que altera o comprimento da coluna de água sobre as macroalgas e portanto, o comprimento de onda da luz capaz de

alcançar esses organismos. Esse resultado também sugere que a espécie *G. birdiae* cultivada para fins de extração de pigmentos vermelhos devem ser mantidas em maiores profundidades, onde a luz branca seja “filtrada” pela coluna de água, disponibilizando o comprimento de onda da luz azul. Ao passo que a obtenção de biomassa algácea dessa espécie para fins de extração de ágar seja cultivada em estruturas localizadas na superfície do mar, na qual há promoção do crescimento. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Barufi (2015), onde utilizando diferentes comprimentos de onda (branco, verde, vermelho e azul) para talos de *G. birdiae* ocorreu a maior incidência de pigmentos e mais elevada densidade de ficobilissomos na luz azul. Entretanto, em relação a biomassa da muda exposta a luz branca, foi observada uma maior incidência de ramificações e germinação *in situ* gerando novos talos. Resultado similar foi relatado por Barufi (2015) que cultivando *G. birdiae* sob luz branca e verde observou maior taxa de crescimento em relação a macroalga cultivada em luz vermelha e azul, independente do fotoperíodo. A irradiância utilizada durante todo experimento ($12 \mu\text{mol de fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) foi favorável ao desenvolvimento das mudas de *G. birdiae* em ambos os tratamentos. Esses resultados corroboraram com os descritos por Polifrone, De Mais e Gargiulo (2006), os quais realizaram pesquisas com a espécie *G. gracilis*, e utilizaram fotoperíodo de 14:10 h (claro / escuro) com irradiância entre 10 e 15 $\mu\text{mol de fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, obtendo mais formações de discos multicelulares no período de germinação de tetrásporos e maior crescimento apical dos talos. O gênero *Gracilaria greville* (Rhodophyta) tem sido considerado o mais atrativo para a maricultura integrada devido, principalmente, a sua ampla tolerância a variações nos parâmetros ambientais (DAWES; ORDUÑA-ROJAS; ROBLEDO, 1999).

Figura 8: Aspectos visuais da muda de *G. birdiae* submetida ao cultivo sequencial em diferentes comprimentos de onda da luz em laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A: Após 31 dias de luz branca e B: Após 45 dias de luz azul.

4.2 Cultivo de *G. birdiae* *in vitro*

4.2.1 Germinação de carpósporos

Os carpósporos obtidos sob condições de laboratório se apresentaram envolvidos por uma massa mucilaginosa, que pode estar relacionada com a fixação dos carpósporos ao substrato. A aderência inicial dos carpósporos de macroalgas vermelhas é mediada pela mucilagem adesiva produzida durante a esporogênese (CHAMBERLAIN; EVANS, 1973; PUESCHEL, 1979; DELIVOPOULOS; TSEKOS, 1986), a qual tem uma função adicional de proteção da célula até o momento da fixação e deposição da parede celular (MCBRIDE; COLE, 1971; AVANZINI, 1989; BOUZON; OURIQUES; OLIVEIRA, 2006).

Após 30 dias de cultivo em meio líquido sob agitação promovida pela aeração, foram observados em microscópio óptico plântulas de comprimento médio de 20 μm , eretos, porém coalescidos formando pequenas mudas dispersas no meio. Diante desses resultados, é possível sugerir que a massa mucilaginosa que envolveu os carpósporos não prejudicou o processo germinativo, mas favoreceu a coalescência dos discos basais para geração das

pequenas mudas. Foi observada ainda uma contaminação fúngica sobre as mudas, que não impediu o crescimento dos plântulas. A germinação dos carpósporos de *G. birdiae* observada nesse trabalho está de acordo com o processo de germinação descrito para outras espécies de *Gracilaria* (YOKOYA; OLIVEIRA, 1993; ORDUÑA-ROJAS; ROBLEDO, 1999), no qual foi observado a coalescência de discos basais. Após 120 dias de cultivo, foi observado o crescimento dos plântulas, apresentando comprimento médio de 39 μm , com ramificações primárias e distribuídos nas mudas originadas pela coalescência dos discos basais dos carpósporos germinados. A coalescência dos discos basais observados após a germinação dos carpósporos de *G. birdiae* corroboraram com os comportamentos de cultivo de outras espécies de rodofíceas como *Chrysiomenia wrightii* (ZHAO *et al.*, 2010), *G. gracilis* (MICHETTI; MARTÍN; LEONARDI, 2013) e *G. cornea* (MAIA, 2016). Segundo alguns autores, a coalescência de discos basais pode contribuir para o assentamento de mudas e para a sustentação dos talos juvenis, facilitando a adesão da macroalga aos diferentes suportes presentes no ambiente marinho (HARPER, 1985; KAIN; DESTOMBE, 1995; SANTELICES; CORREA; ISABEL, 1996). Em relação ao crescimento dos plântulas, foi observado um comprimento médio inferior ao relatado por Lima-Holanda (2016), após 66 dias (0,9 cm) para *G. birdiae*. Tal diferença pode ser atribuída à coalescência dos discos basais (Figura 9), uma vez que os carpósporos que se encontraram na parte mais central das coalescências permaneceram em fase germinativa de disco multicelular.

As mudas de *G. birdiae*, originadas pela coalescência dos discos basais após 30 dias de cultivo foram separadas em menores aglomerações quando submetidas a cavitação promovendo o crescimento de talos de forma individual. Já as mudas com 120 dias de cultivo, não foram separadas quando submetidas ao mesmo procedimento, revelando uma maior compactação e ligação dos discos basais. Segundo Medina (2015) os carpósporos não-coalescente tem uma maior taxa de crescimento. Essa taxa diminui a medida que aumenta o número de carpósporos coalescentes. Outro fator relatado por Medina (2015) é que essa coalescência auxilia de forma significativa a sobrevivência dos carpósporos, principalmente quando submetidos a estresse.

Figura 9: Aspecto visual das mudas de *G. Birdiae* originadas a partir da coalescência de discos basais provenientes da germinação de carpósporos em meio líquido, agitado por aeração e sob incubação em condições controladas de laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

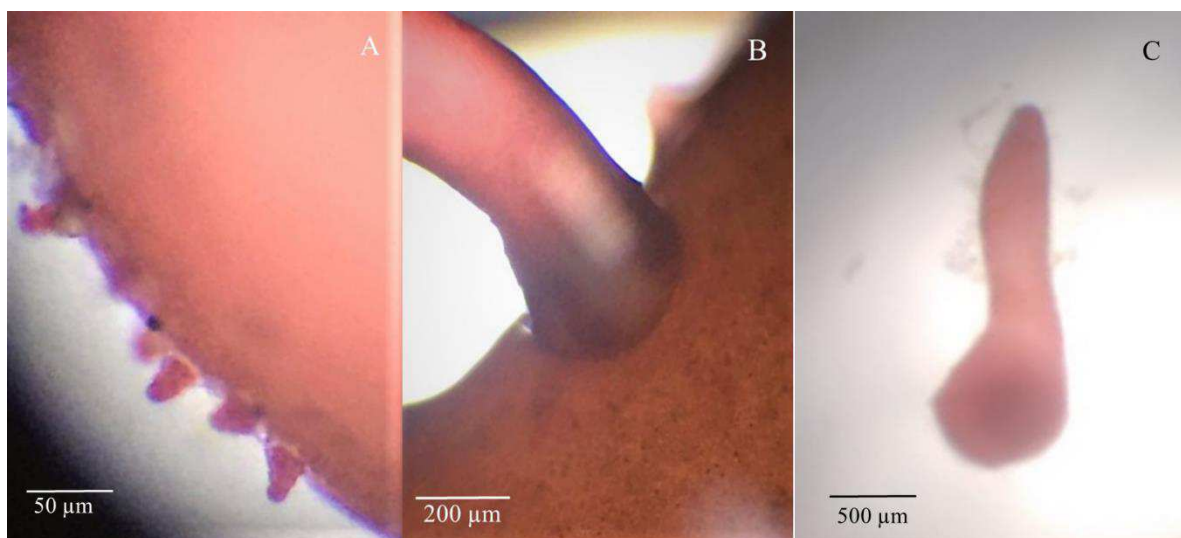
4.2.2 Cultivo de talos gametófitos

Após observação detalhada dos talos tetrasporófitos mantidos sob cultivo em condições de laboratório, foi observada a formação de disco basal aderido ao talo-mãe, caracterizando a germinação de tetrásporos *in situ* (Figura 10A e 10B). Desta forma, em uma única muda foi possível observar talos tetrasporófito e gametófito. Tal observação foi relatada por Miranda, Yokoya e Fujii (2012) quando avaliaram o desenvolvimento dos carpósporos da alga vermelha *Hidropuntia caudata*. Durante o cultivo de tetrasporófitos mais velhos da alga *Gracilaria dura* (cerca de 13-14 meses de idade), foram formados em todo o talo-mãe, proliferações finas decorrentes de uma base comum. Estas estruturas mostraram capacidade de produzir um talo maduro completo, no entanto tal constatação foi relatada apenas para cultivos em laboratório (MANTRI; REDDY; JHA, 2010).

Ainda fixados no talo-mãe e cultivados em meio líquido por 15, 45 e 60 dias, os talos gametófitos mostraram um crescimento apical e apresentaram valores médios de comprimento de 121,8 μ m , 567,6 μ m e 806,2 μ m respectivamente. Vale ressaltar, que mesmo talos gametófitos desprendidos do talo-mãe cresceram no meio e atingiram 0,2 cm de comprimento em 37 dias de cultivo (Figura 10C). Esse resultado está de acordo com os obtidos por Lima-Holanda (2016). Quando comparado a formação dos plântulas tetrasporófitos de *G. birdiae* o período de tempo foi menor do que o observado para as algas *G. gracilis* (MICHETTI;

MARTÍN; LEONARDI, 2013) e *G. dura* (MANTRI *et al.*, 2009) que exibiram formação dos plântulas somente após 60 dias de cultivo.

Figura 10: Germinação *in situ* de tetrásporos de *G. birdiae* cultivada sob condições de laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A: Plântulas gametófitos originados da germinação *in situ* de tetrásporos; B: Disco basal fixado ao talo-mãe; C: Talo gametófito desprendido do talo-mãe, medindo aproximadamente 0,2 cm após 37 dias de cultivo.

4.3 Fixação dos carpósporos de *G. birdiae* em diferentes materiais de suporte

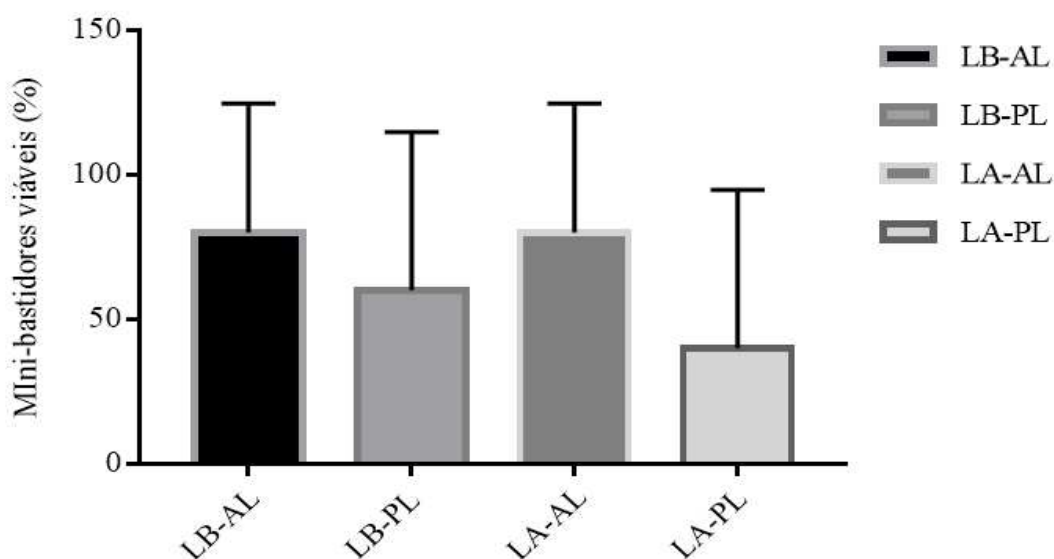
4.3.1 Cordas de algodão e polietileno

Após 7 dias de cultivo, foi observada a fixação de carpósporos nos mini-bastidores confeccionados com cordas de algodão e polipropileno mantidos sob luz branca e luz azul como mostra o Gráfico 2. Apesar da elevada variação na viabilidade dos mini-bastidores, os carpósporos colonizaram cerca de 85% dos bastidores com corda de algodão sem efeito evidente do comprimento de onda da luz. Enquanto apenas 60% dos mini-bastidores com corda de polietileno foram colonizados por carpósporos, quando submetidos a incubação sob luz branca. Sob luz azul a viabilidade dos mini-bastidores foi ainda menor, com apenas 45% das estruturas colonizadas.

Além da maior viabilidade dos mini-bastidores de corda de algodão, foi observado

um maior número de carpósporos aderidos a essas estruturas, quando comparadas as estruturas de cordas de polietileno (Gráfico 3), em ambos os tratamentos com luz azul e branca. Uma grande variação nesses dados também foi observada. Após 15 dias de cultivo, os carpósporos fixados nos mini-bastidores de corda de polietileno permaneceram visíveis apenas sob microscopia, enquanto nas cordas de algodão aglomerações já foram observadas a olho nu indicando a germinação dos carpósporos e a formação de plântulas nessas estruturas. Após 30 dias de cultivo foi observada morte celular nas cordas de polietileno, enquanto as de algodão se encontravam em pleno desenvolvimento. Os resultados sugerem que carpósporos liberados envoltos em uma massa mucilagínosa favoreceu a fixação dos carpósporos às cordas de algodão em virtude da sua porosidade e rugosidade. Já na corda de polietileno, a qual é encerada para umentar a sua vida útil (já que esta é comumente utilizada na indústria naval), não houve adesão mediada pela mucilagem que envolvia os carpósporos. Por outro lado, vale ressaltar que após 45 dias de experimentos as cordas de algodão se tornaram quebradiças, o que não ocorreu com a corda de polietileno, que continuaram intactas até o fim do experimento.

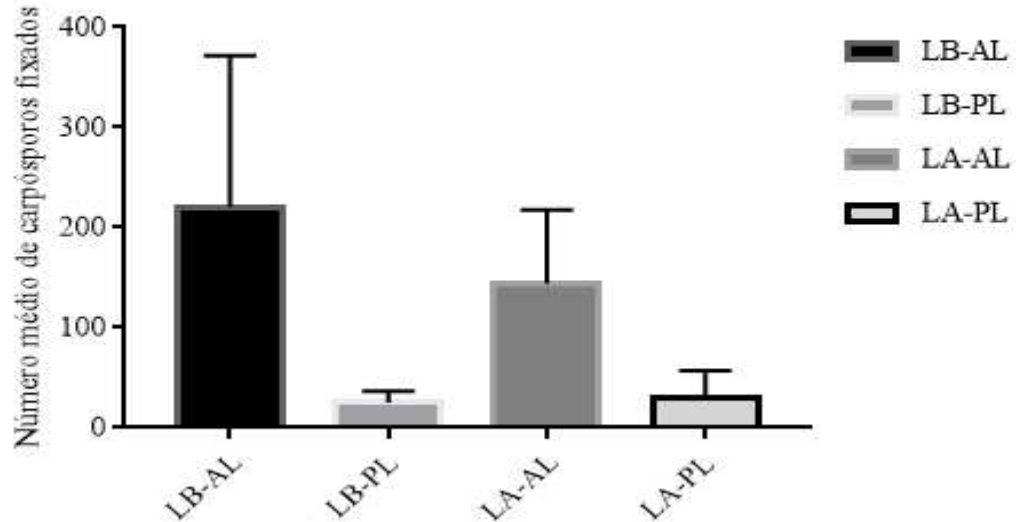
Gráfico 2: Viabilidade de mini-bastidores de cordas de algodão e polietileno colonizados por meio da fixação de carpósporos de *G. birdiae* incubados sob luz branca e luz azul em condições controladas de laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: (LB-LA): luz branca-corda de algodão, (LB-PL): luz branca-corda de polietileno, (LA-AL): luz azul-corda de algodão e (LA-PL): luz azul-corda de polietileno. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo de Turkey ($p < 0,05$), onde, em todas as condições indicam inexistência de diferença significativa.

Gráfico 3: Número médio de carpósporos de *G. birdiae* fixados em mini-bastidores de cordas de algodão e polietileno incubados sob luz branca e luz azul em condições controladas de laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

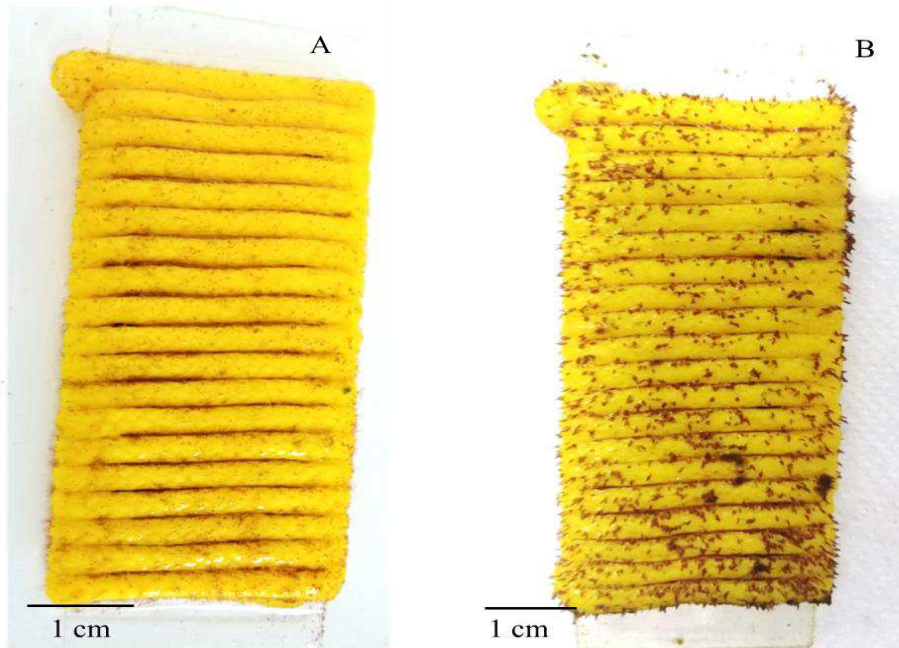
Legenda: (LB-LA): luz branca-corda de algodão, (LB-PL): luz branca-corda de polietileno, (LA-AL): luz azul-corda de algodão e (LA-PL): luz azul-corda de polietileno. Os resultados foram analisados por *two-way* ANOVA, seguido pelo de Turkey ($p < 0,05$), onde, em todas as condições indicam inexistência de diferença significativa.

4.3.2 Cordas de polipropileno

A Figura 11 mostra o aspecto visual dos mini-bastidores de corda de polipropileno incubados sob luz branca em condições controladas de laboratório para fixação de carpósporos de *G. birdiae*. Após 15 dias foi observada uma leve camada de pigmentação avermelhada sobre os mini-bastidores (Figura 11A) e decorridos 35 dias de incubação, uma camada mais espessa foi observada a olho nu (Figura 11B), decorrente da formação de plântulas. Essa camada mais espessa foi formada por plântulas de aproximadamente 100 μ m (Figura 12A-B) e 240 μ m (Figura 12C) após 28 e 35 dias respectivamente. Zhou e colaboradores (2016) testaram a fixação de carpósporos da alga *Gracilariopsis lemaneiformis* em estruturas formadas por cordas de algodão com epóxi e observaram carpósporos germinados no estágio multicelular em um período de 5 semanas, tempo esse bem superior ao observado nesse experimento, pois com 28 dias já foram visualizados plântulas aparentes em toda estrutura. Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho foram considerados promissores para o desenvolvimento de uma inovadora tecnologia de cultivo de macroalgas vermelhas, mais

adaptada às condições ambientais do litoral brasileiro que apresenta águas mais profundas e movimentadas, uma vez que previne a perda de biomassa algácea.

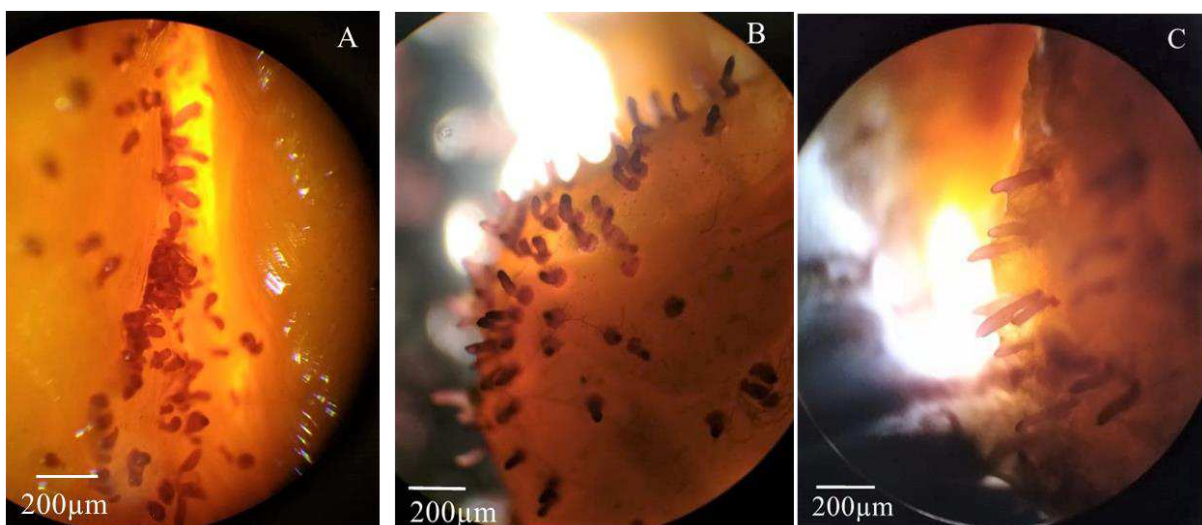
Figura 11: Aspecto visual de mini-bastidores de corda de polipropileno contendo carpósporos da *G. birdiae* fixados e germinados.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: (A): Camada fina de coloração avermelhada sobre a corda após 15 dias de incubação;
(B) Plântulas visíveis a olho nu fixados na corda de polipropileno após 35 dias de incubação.

Figura 12: Germinação de carpósporos e formação de plântulas de *G. Birdiae* sobre mini-bastidores de corda de polipropileno incubados sobre condições controladas de laboratório.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: (A) e (B): plântulas fixadas medindo 100 μm após 28 dias de cultivo; (C): plântulas fixados medindo 240 μm após 35 dias de cultivo.

5. Conclusão

A macroalga *G. birdiae* apresentou fácil aclimação às condições controladas e estabelecidas em laboratório, bem como mostrou um evidente sistema biológico de adaptação para sobrevivência sob luz branca e azul, o qual é induzido a biossintetizar macromoléculas de elevado valor agregado de forma dependente da condição de cultivo estabelecida. Além disso, foi possível a obtenção de mudas e de uma estrutura de cultivo colonizada com carpósporos da macroalga vermelha *G. birdiae* sob condições controladas de laboratório.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY M.C. 2004. Desenvolvimento da Maricultura artesanal de macroalgas no baixo-sul baiano. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo. 164pp.
- ACCIOLY, M.C. Esforços para estabelecer cultivos artesanais de macroalgas marinhas na Bahia. In: **Anais da X Reunião Brasileira de Ficologia**. Salvador. Rio de Janeiro, Museu Nacional, p.107-114, 2005
- AHMED, A. B. A.; TAHA, R. M. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through plant tissue culture in seaweeds. **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology**, p. 431–438, 2012.
- ALMEIDA, C. L. F. *et al.* Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4550–4573, 2011.
- ALVES, A.W. S. **Técnicas de maricultura da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* em Flecheiras, Trairi-Ceará: Rendimentos de biomassa e extração de ágar**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ARMISÉN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 231-243, 1995.
- ASK, E.I. & AZANZA, R. V., 2002. Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: A review with suggestions for future research. **Aquaculture**, 206(3-4), p.257–277.
- AVANZINI, A. La ultra estructura de las esporas de Rhodophyta. **Insula**, v. 19, p. 7–10, 1989.
- BARUFI, José Bonomi; FIGUEROA, Félix L.; PLASTINO, Estela M. Effects of light quality on reproduction, growth and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta: Gracilariales). **Scientia Marina**, v. 79, n. 1, p. 15-24, 2015.
- BEZERRA, A. F. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras**, 2008.
- BEZERRA, A. F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1813–1817, 2010
- BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal**

of **Applied Phycology**, v. 23, p. 321–335, 2011.

BODIAN, M. Y. *et al.* Evaluation of the in vitro methods for micropropagation of *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq (Gigartinales, Rhodophyta): tissue culture and production of protoplasts. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 1835–1845, 2013

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the Algae**, p. 21, 23 39, 1985

BOUZON, Z. L.; MINGUENS, F.; OLIVEIRA, E. C. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). **Cryptogamic Algology**, v. 21, p. 33–47, 2000.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; OLIVEIRA, E. C. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 287–294, 2006

BRITO, Á. A. M. **Otimização da extração de R-ficoeritrina da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson e sua aplicação como corante natural em alimentos**. 2017. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2017.

BUGS, Leila Cristina *et al.* USO DA BIOMASSA DE ALGAS COMO BIODISSORVENTE PARA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS: UMA REVISÃO. **Revista CIATEC–UPF**, v. 10, n. 1, p. 53–67, 2018.

BULBOA, C. *et al.*, 2013. A new method for cultivation of the carragenophyte and edible red seaweed *Chondracanthus chamissoi* based on secondary attachment disc: Development in outdoor tanks. **Aquaculture**, 410–411, p.86–94.

BYRNE, K. *et al.* *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov.: morphology, molecular relationships and agar content. **Phycological Research**, v. 50, p. 295–312, 2002.

CAMACHO, O. & MONTAÑA, F.J., 2012. Cultivo experimental en el mar del alga roja *Hypnea Musciformis* en el área de Santa Marta. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR**, 41(1), p.29–46.

CARNEIRO, M. A. A. **Fenologia, aspectos ecofisiológicos e seleção de linhagens em cultivos no mar de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales) no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil**. 2011.

CASCAREJO, Margarida Marinheira Dias Fontes *et al.* **Uso de Algas em Dermocosmética**. 2018. Dissertação de Mestrado.

CHAMBERLAIN, A. H. L.; EVANS, L. V. Aspects of spore production in the red alga *Ceramnium*. **Protoplasma**, v. 76, p. 138–159, 1973.

CHENG, Wen Po; CHEN, Wei Yi; YU, Ruey Fang. PACl coagulation for the solid-liquid separation of highly concentrated algae suspensions. **Desalination and Water Treatment**, v. 16, n. 1-3, p. 290-297, 2010.

CHOPIN, T., & SAWHNEY, M. Seaweeds and their mariculture. In: Steele JH, Thorpe SA, Turekian KK (Eds.) *The Encyclopedia of Ocean Sciences*. Elsevier, Oxford: p.4477 – 4487, 2009.

CLAYTON, M. N. Propagules of marine macroalgae: structure and development. **British Phycological Journal**, v. 27, p. 219–232, 1992.

COURA, C. O. *et al.* Mechanisms involved the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. **Plos One**, v. 10, p. 1-18, 2015.

CRITCHLEY A.T. 1997. Introduction – seaweed resources. In: Ohno M. & Critchley A.T. (eds). **Seaweed Cultivation and Marine Ranching**. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan. pp 1-6.

DANTAS, A. C. M. **Gracilaria birdiae** como biomassa para a produção de pigmento e ágar sob o conceito de biorrefinaria e sua importância no mercado brasileiro. 2018. Universidade Federal do Ceará, 2018.

DAWES, C. J.; ORDUÑA-ROJAS, J.; ROBLEDO, D. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 419 – 425, 1999.

DE CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, p. 757–764, 2000.

DE MIRANDA, George Emmanuel Cavalcanti. **Avaliação do impacto da exploração (simulada) da alga agarófito Gracilaria caudata J. Agardh (Rhodophyta) no litoral do Estado da Paraíba**. 2000. Tese de Doutorado.

DELIVOPOULOS, S. G.; TSEKOS, I. Ultrastructure of carposporogenesis in the red alga *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Gracilariaceae). **Botanica Marina**, v. 29, p. 27–35, 1986.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Farm. J.**, v. 18, p. 1–25, 2010.

ELLER, Gundula; TÖBE, Kerstin; MEDLIN, Linda K. Hierarchical probes at various taxonomic levels in the Haptophyta and a new division level probe for the Heterokonta. **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 7, p. 629-640, 2007.

ENGEL, C. R.; DESTOMBE, C. Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, *Gracilaria gracilis*: influence of high and low tides on fertilization success. **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 82, p. 189–192, 2002.

ESTEVAM, A.C.T, **AVALIAÇÃO DE ESTRATOS DE ALGAS DO FILO RHODOPHYTA NO DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS**. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

FAO 2010. State of world aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**. Rome. 134pp.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. **FAO statistical yearbook**, 2014.

FAO, Food. Agriculture Organization of the United Nations. 2016. **FAO statistical yearbook**, 2016.

FOSCARINI, Roberto et al. **Handbook on Eucheuma seaweed cultivation in Fiji**. Ministry of Primary Industries, Fisheries Division and South Pacific Aquaculture Development Project, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1990.

GAYLORD, B. et al. A physically based model of macroalgal spore dispersal in the wave and current-dominated nearshore. **Ecology**, v. 83, p. 1239–1251, 2002.

GOMES, D. S.; ESMERALDO, G. G. S. L. Sustentabilidade e territorialidade: Fios que tecem a luta e a resistência das mulheres camponesas. **Sustentabilidade em Debate**, Brasília, p. 18–35, 2014.

GUALTIERI, Paolo; BARSANTI, Laura. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. 2006.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal Phycology**, v. 48, p. 1057–1063, 2012.

GUSEV, M. V. et al. Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. **Marine Biology**, v. 95, p. 593–597, 1987.

HAFTING, J.T. et al., 2012. On-land cultivation of functional seaweed products for human

usage. **Journal of Applied Phycology**, 24(3), p.385–392

HAMED, I. *et al.* Marine bioactive compounds and their health benefits: A review. **Food Science and Food Safety**, v. 14, 2015.

HANNIGAN, J. **Environmental Sociology: a social constructionist perspective**. [s.l.] New York: Routledge 2º ed., 2006.

HARPER, J. L. Modules, branches and the capture of resources. **Population Biology and Evolution of Clonal Organisms**, p. 1–33, 1985.

HAYASHI, L. **Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

HAYASHI, L. *et al.* Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 719–727, 2014.

HENRY-SILVA, Gustavo Gonzaga; CAMARGO, Antonio Fernando Monteiro. Impacto das atividades de aquíicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas–relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 1, p. 163-173, 2018.

INFANTE, R.; CANDIA, A. Cultivo de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss e *Iridaea ciliata* Kutzing (Rhodophyta, Gigartinales) en laboratorio: esporulacion inducida y colonizacion de carposporas en diferentes sustratos. **Gayana Bot.**, v. 45, p. 297–304, 1988

JOSEPH, M. M.; KRISHNAMURTHY, V. Studies on shedding of carpospores in *Gracilaria corticata*. **J. Ag. Seaweed Res. Util.**, v. 2, p. 1–8, 1977.

KACZYNA, F.; MEGNET, R. The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). **Hydrobiologia**, v. 268, p. 57–64, 1993.

KAIN, J. M.; DESTOMBE, C. A review of the life history , reproduction and phenology of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 269–281, 1995.

LIMA, Renata Nayhara de. **UTILIZAÇÃO DA MACROALGA GRACILARIA BIRDIAE NA ALIMENTAÇÃO DE CABRAS EM LACTAÇÃO EM REGIÃO SEMIÁRIDA**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2017.

LIMA-HOLANDA, T.B. **OBTENÇÃO DE BIOMASSA DA MACROALGA AGARÓFITA *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) ATRAVÉS DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

LIN, H.; QIN, S. Tipping points in seaweed genetic engineering: scaling up opportunities in the next decade. **Marine Drugs**, v. 12, p. 3025–3045, 2014

LOPES, P. H. M. **Estudos de cultura de tecidos, in vitro, de macroalgas marinhas da espécie *Gracilaria birdie***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca)- Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LOUREIRO, R.; GACHON, C. M. M.; REBOURS, C. Seaweed cultivation: potential and challenges of crop domestication at an unprecedented pace. **New Phytologist**, v. 206, p. 489–492, 2015.

MACCHIAVELLO, Juan et al. A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown in vitro. In: **Sixteenth International Seaweed Symposium**. Springer, Dordrecht, 1999. p. 397-400.

MAIA, R. A. **Estabelecimento de condições de cultivo in vitro e análise histológica da macroalga vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh**. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016

MAKKAR, R. H. P. S. et al. **Seaweeds for livestock diets: A review**. 2015.

MAL, T. K.; SUBBARAMAIAH, K. Diurnal periodicity of carpospores shedding in the red alga *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva (Rhodophyta). **Indian J. Mar. Sci.**, v. 19, p. 63–65, 1990.

MANTRI, V. A. *et al.* The carpospore culture of industrially important red alga *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Aquaculture**, v. 297, n. 1–4, p. 85–90, 2009.

MANTRI, V.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Reproductive processes in red algal genus *Gracilaria* and impact of climate change. **Bhavnagar**, India, 2010.

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

MARINHO-SORIANO, E. et al. Nutrients removal from aquaculture wastewater using the

macroalgae *Gracilaria birdiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 2, p. 327–331, 2009.

MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W. S. C.; CARNEIRO, M. A. A. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. **Aquac. Int.**, v. 14, p. 327–336, 2006.

MAZARRASA, Inés et al. Global unbalance in seaweed production, research effort and biotechnology markets. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 5, p. 1028-1036, 2014.

MCBRIDE, D. L.; COLE, K. Electron microscopic observations on the differentiations and release of monospores in the marine red alga *Smithora naiadum*. **Phycologia**, v. 10, p. 49–61, 1971.

MCHUGH, D. J. **A guide to the seaweed industry**. Austrália, 2003.

MEDINA, Francisco J. et al. Coalescence increases abiotic stress tolerance in sporelings of *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 4, p. 1593-1598, 2015.

MICHETTI, K. M.; MARTÍN, L. A.; LEONARDI, P. I. Carpospore release and sporeling development in *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from the southwestern Atlantic coast (Chubut, Argentina). **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1917–1924, 2013.

MIRANDA, G. E. C. DE; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T. Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hidropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 818–824, 2012.

NAYLOR, J. Production, trade and utilization of seaweeds and seaweed products. **Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization.**, 1976.

NETO, C. Câmara. Seaweed culture in Rio Grande do Norte, Brazil. In: **Twelfth International Seaweed Symposium**. Springer, Dordrecht, 1987. p. 363-367.

O’KELLY, C.; BACA, B. J. The time course of carpogonial branch and carposporophyte development in *Callithamnion cordatum* (Rhodophyta, Ceramiales). **Phycologia**, v. 23, p. 407–417, 1984.

OLIVEIRA E.C. 1997. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **Panorama da Aquicultura** maio/junho: 24-26

OLIVEIRA E.C. 2000. **Aquaculture in Brazil: prospects and constraints**. Co-operative

Aquaculture Research in Developing Countries. AQUA-2000. pp 277-288

OLIVEIRA, E. C. **Macroalgas Marinhas da Costa Brasileira: estado do conhecimento, uso e conservação biológica.** Universidade de Recife, 2002.

OLIVEIRA, E. C.; PLASTINO, E. M. The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brazil. **Journal of Phycology**, v. 32, p. 203–208, 1984.

ORDUÑA-ROJAS, J.; ROBLEDO, D. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J . Agardh (Gracilariales , Rhodophyta). **Botanica Marina**, v. 42, p. 315–319, 1999

OZA, R. M. Studies on Indian *Gracilaria* I. Carpospore and tetraspore germination and early stages of development in *Gracilaria corticata*. **J Ag Bot Mar**, v. 18, p. 199–201, 1975.

OZA, R. M.; KRISHNAMURTHY, V. Studies on carposporic rithm of *Gracilaria verrucosa* (Huds). **Botanica Marina**, v. 11, p. 118–121, 1967.

PACHECO-RUIZ, I.; GARCÍA-ESQUIVEL, Z.; ANGUILAR-ROSAS, L. E. Spore discharge in the carragenophyte *Gigartina canaliculata* Harvey (Rhodophyta, Gigartinales). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 126, p. 293–299, 1989.

PAULA E.J. & Pereira R.T.L. 1998. Da "marinomia" maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura** 8: 10-15.

PAULA E.J., Erbert C. & Pereira R.T.L. 2001. Growth rate of the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. **Phycological Research**. 49: 155-16.

PELLIZZARI, F. & REIS, R.P., 2011. Seaweed cultivation on the southern and Southeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(2), p.305– 312.

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

POLIFRONE, M.; DE MASI, F.; GARGIULO, G. M. Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). **Aquaculture**, v. 261, n. 3, p. 1003–1013, 2006.

PUESCHEL, C. M. Ultrastructural observation of tetrasporangia end conceptacles in *Hildenbrandia* (Rhodophyta, Hildenbrandiales). **British Phycological Journal**, v. 17, p. 333–

341, 1982.

PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 15, p. 409–424, 1979.

QIN, S.; LIN, H.; JIANG, P. Advances in genetic engineering of marine algae. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1602–1613, 2012.

RADULOVICH, R. et al. Tropical seaweeds for human food, their cultivation and its effect on biodiversity enrichment. **Aquaculture**, v. 436, p. 40–46, 2015.

RAMA RAO, K.; THOMAS, P. C. Shedding of carpospores in *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva. **Phykos**, v. 13, p. 54–59, 1974.

RAMLOV, F. **Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese de morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente)- Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAMLOV, F.; PLASTINO, E. M.; YOKOYA, N. S. Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p. 607–615, 2009.

REBOURS, Céline et al. Algas marinhas: uma oportunidade de riqueza e sustento sustentável para as comunidades costeiras. **Journal of phycology aplicado**, v. 26, n. 5, p. 1939-1951, 2014.

REDDY, C. R. K. et al. Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 609–617, 2008.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RODRIGUEZ, PAOLA ALEJANDRA TENORIO. Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas: actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana. **Centro**, 2018.

RORRER, G. L.; CHENEY, D. P. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. **Aquacultural Engineering**, v. 32, n. 1, p. 11–41, 2004

SALLES, J. P. **Potencial de cultivo de *Gracilaria cornea* (Rhodophyta) em módulos submersos afastados da costa**. 2006. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Centro de

Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. J. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae – A review. **Food Res. Int.**, v. 48, p. 948–960, 2012.

SANTELICES, B.; CORREA, J. A.; ISABEL, M. Sporeling coalescence and intraclonal variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 32, p. 313–322, 1996.

SOUZA, R. B. et al. Analysis of two precipitation methods on the yield, structural features and activity of sulfated polysaccharides from *Gracilaria cornea* (Rhodophyta). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** (Impresso), v. 37, p. 31-39, 2015.

TEIXEIRA, D. I. A. et al. Cultivo de alga marinha *Gracilaria* sp. nas praias de Flecheiras e Guagiru–Ceará–Brasil. **IX Reunião Brasileira de Ficologia, Santa Cruz, Espírito Santo**. p. v. 95, 2002.

TITLYANOV, E. A. & TITLYANOVA, T. V., 2010. Seaweed cultivation: Methods and problems. **Russian Journal of Marine Biology**, 36(4), p.227–242.

UMAMAHESWARA RAO, M. Spore liberation in *Gracilaria corticata* J. Agardh growing at Mandapam. **J. exp. mar. Biol. Ecol.**, v. 21, p. 91–98, 1976.

UTHIRAPANDI, Veeranan et al. Bio-fertilizer potential of seaweed liquid extracts of marine macro algae on growth and biochemical parameters of *Ocimum sanctum*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 3528-3532, 2018.

VALENTI W.C. 2000. Introdução. In: Valenti W.C., Poli C.R., Pereira J. A. & Borghetti J. R. (eds) **Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável**. Ministério da Ciência eTecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília. pp 25-32.

VANDERLEI, E. S. O. **Atividades antiviral e antiinflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira)**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

WAALAND, J. R.; STILLER, J. W.; CHENEY, D. P. Macroalgal candidates for genomics. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 26–33, 2004.

YANG, Y. et al. Cultivation of seaweed *Gracilaria* in Chinese coastal waters and its contribution to environmental improvements. **Algal Research**, v. 9, p. 236–244, 2015.

YEONG, H.-Y. et al. Production of clonal planting materials from *Gracilaria changii* and *Kappaphycus alvarezii* through tissue culture and culture of *G. changii* explants in airlift photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 729–746, 2014

YEONG, HUI-YIN; KHALID, N.; PHANG, S.-M. Protoplast isolation and regeneration from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 641–651, 2008.

YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Effects of temperature on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 41, p. 283–293, 1993.

YOKOYA, N. S.; WEST, J. A.; LUCHI, A. E. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 52, p. 244–254, 2004.

YOKOYA, N. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Micropropagation as a tool for sustainable utilization and conservation of populations of Rhodophyta. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 334–339, 2011.

ZHAO, F. et al. Carpospore early development and callus-like tissue induction of *Chrysiomenia wrightii* (Rhodymeniaceae, Rhodophyta) under laboratory conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 2, p. 195–202, 2010.

ZHOU, Wei et al. Cultivo em massa da alga vermelha economicamente importante *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) de tetrásporos e carposporos. **Aquicultura**, v. 460, p. 25 a 31 de 2016.