

ANA LÍVIA NEGRÃO LEITE RIBEIRO

**Respostas fisiológicas e bioquímicas de espécies
de *Hypnea* J. V. Lamour. (Rhodophyta) frente
às variações de nitrogênio e fósforo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Avasculares e Fungos em Análises
Ambientais.

SÃO PAULO

2012

ANA LÍVIA NEGRÃO LEITE RIBEIRO

**Respostas fisiológicas e bioquímicas de espécies
de *Hypnea* J. V. Lamour. (Rhodophyta) frente
às variações de nitrogênio e fósforo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E
MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Avasculares e Fungos em Análises
Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. NAIR SUMIE YOKOYA

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Ribeiro, Ana Livia Negrão Leite

R484r Respostas fisiológicas e bioquímicas de espécies de Hypnea J.V. Lamour.
(Rhodophyta), frente às variações de nitrogênio e fósforo”. / Ana Livia Negrão Leite
Ribeiro -- São Paulo, 2012.
119 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2012
Bibliografia.

1. Algas. 2. Metabolismo. 3. Nutrientes. I. Título

CDU: 582.26

*Aos meus pais, meus grandes amores e
aos meus irmãos, sempre queridos!*

*...Viu uma lua no céu,
Viu outra lua no mar.
No sonho em que se perdeu,
Banhou-se toda em luar...
Queria subir ao céu,
Queria descer ao mar...
E, no desvario seu,
Na torre pôs-se a cantar...
Estava perto do céu,
Estava longe do mar...
E como um anjo pendeu
As asas para voar...
Queria a lua do céu,
queria a lua do mar...
As asas que Deus lhe deu
Ruflaram de par em par...
Sua alma subiu ao céu,
Seu corpo desceu ao mar...*

Alfonsus de Guimarães

*Já que não durmo, viaje comigo por
este universo e abra suas asas, pois
precisarei delas para o segunda ato
desta cena!*

Celso M. L. Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, pois foi nele em quem me apoiei em todos os momentos e que sempre me abençoou.

À Capes pela bolsa concedida durante todo o período do mestrado.

À Dr.^a Nair Sumie Yokoya, querida orientadora que me ajudou em todo período de mestrado, me ensinando muito, pelo seu carinho e ajuda em todos os momentos.

À Dr.^a Elisabete de Santis Braga da Graça Saraiva do laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar do Instituto Oceanográfico IO-USP, pela ajuda na análise das amostras de água, dicas valiosas sobre o trabalho, com uma visão que jamais teria e pelos sorrisos acolhedores.

Ao aluno Vitor Chiozzinni do laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar do Instituto Oceanográfico IO-USP pela ajuda nas análises da água.

À Dr.^a. Estela Maria Plastino pela avaliação do trabalho e conselhos enriquecedores.

Ao meu irmão André Luís que compartilhou parte do período de mestrado e que sempre estava disposto a me ajudar, cuidando de mim da forma mais carinhosa e que por muitas vezes me tirou do sério, mas na maioria, me colocava pra dormir.

À minha irmã Ana Carolina que mesmo distante sempre deu força e se mostrou uma pessoa fantástica nesse período. Sem você talvez não tivesse concluído o mestrado.

À amiga Talita Silveira Amador por sua amizade e apoio, por me escutar em todos os momentos, sendo na maioria das vezes minha terapeuta e por sempre me fazer dar risadas.

Às amigas que acompanharam mesmo que parte desta fase de mestrado e que sempre me apoiaram: Ingrid Balesteros, Fernanda Tresmondi, Nídia Mara Marchiori, Érica Mayumi, Gisele Marquardt e Simone Wengrat. Vocês são fantásticas!

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia pela companhia e boas risadas: Watson Arantes Gama Jr., Camila Malone, Guilherme Scotta, Kléber Renan, Fernanda Rios, Patrícia Guimarães, André Faria, Levi Machado, Renato Rocha, Jonatas Martinez e Kenner Tesima.

Ao aluno Kenner Tesima pela ajuda na manutenção das algas em laboratório e conversas sobre o trabalho.

Ao aluno Jonatas Martinez Canuto de Souza pela ajuda nas análises de pigmentos e proteínas e muitas outras incontáveis.

A todos os pesquisadores e técnicos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia pelo convívio e apoio.

Aos amigos do alojamento por participarem desse período e por bons momentos: Pryscilla Denise, Simone Silva, Thiara Siqueira, Luanda Soares, Julyana Farias, Daiane Teixeira, Majoi Nascimento, Jadson Oliveira, Michel Colmanetti, Pedro Bond. Os finais de semana com vocês foram os mais divertidos!

Aos meus pais Cleunice Maria Negrão e Celso Michailowsky Leite Ribeiro, por me ensinarem o certo e o errado. Mesmo pelos erros, acertando. Mesmo pela distância, juntos. Obrigada por tudo!

MUITO OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O gênero <i>Hypnea</i> J.V. Lamouroux.....	1
1.2 Metabolismo do Nitrogênio e Fósforo nas macroalgas marinhas	3
1.3 Efeitos do nitrogênio e do fósforo nas algas marinhas bentônicas	7
1.4 Utilização de algas como biofiltros	10
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Espécies estudadas.....	17
3.1.1 <i>Hypnea</i> sp. e <i>Hypnea cervicornis</i> J. Agardh.....	17
3.1.2 <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen in Jacq.) J.V. Lamour.....	18
3.2 Aspectos gerais das áreas de coleta	19
3.2.1 São Sebastião	19
3.2.2 Ubatuba.....	21
3.3 Culturas unialgáceas em laboratório.....	22
3.3.1 Esterilização da água do mar	22
3.3.2 Meio de Cultura	23

3.3.3 Isolamento e propagação de culturas unialgáceas.....	23
3.4 Metodologia experimental.....	24
3.4.1 Análise de nutrientes da água do mar utilizada nos experimentos	24
3.4.2 Experimentos com nitrogênio e fósforo	26
3.4.3 Condições laboratoriais	27
3.5 Variáveis analisadas.....	28
3.5.1 Taxa de crescimento.....	28
3.5.2 Extração e análise de pigmentos	28
3.5.3 Extração e análise de proteínas solúveis totais	29
3.5.4 Análise morfométrica	30
3.6 Análise dos dados	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em <i>Hypnea</i> sp.....	31
4.2 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em <i>Hypnea</i> sp.	41
4.3 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em <i>Hypnea cervicornis</i>	52
4.4 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em <i>Hypnea cervicornis</i>	62
4.5 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em <i>Hypnea musciformis</i>	73
4.6 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em <i>Hypnea musciformis</i>	83

4.7 Efeitos do amônio:fosfato e nitrato:fosfato nas espécies de <i>Hypnea</i>	93
5. DISCUSSÃO.....	96
5.1 Efeitos do amônio e fosfato nas espécies de <i>Hypnea</i>	96
5.2 Efeitos do nitrato e fosfato nas espécies de <i>Hypnea</i>	98
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
RESUMO.....	118
ABSTRACT	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema do metabolismo do nitrogênio em macroalgas marinhas bentônicas segundo DeBoer (1981), com modificações. NR= nitrato redutase, NiR= nitrito redutase, FDX=ferredoxina, GS= glutamina sintetase, GOGAT= Glutamato sintetase, NAD= nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH= nicotinamida adenina dinucleótido reduzido NADP= nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NADPH= nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido, TrA=Transaminase, PII= fotossistema II, ATP= adenosina trifosfato, ADP= adenosina difosfato.4
- Figura 2:** Esquema do metabolismo do fósforo em macroalgas marinhas bentônicas, modificada segundo Lobban & Harrison (1997) Pi= fosfato inorgânico, DOP= fosfato orgânico dissolvido, Poly-P= polifosfato.6
- Figura 3 :** Aspecto geral de *Hypnea* sp. e *H. cervicornis* cultivadas em laboratório com água do mar esterilizada e adição de solução de Von Stosch 25 %, temperatura média de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala = 1 cm.18
- Figura 4:** Aspecto geral de *H. musciformis* cultivada em laboratório com água do mar esterilizada e adição de solução de Von Stosch 25 %, temperatura média de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala = 1 cm.19
- Figura 5:** Mapa com a localização da Praia das Cigarras e seu aspecto geral, no município de São Sebastião (SP).20
- Figura 6:** Localização e aspecto geral da Praia da Fortaleza e Ilha das Couves no município de Ubatuba (SP).22
- Figura 7:** Curva de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em água do mar e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).32
- Figura 8:** Variação da taxa de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6 $\pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).33

Figura 9: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de <i>Hypnea</i> sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....	33
Figura 10: Conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina de <i>Hypnea</i> sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....	34
Figura 11: Conteúdo de clorofila <i>a</i> em <i>Hypnea</i> sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).....	35
Figura 12: Efeitos de diferentes concentrações de amônio:fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de <i>Hypnea</i> sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).	36
Figura 13: Aspecto geral de <i>Hypnea</i> sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e em diferentes concentrações de amônio:fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . Escala: 1cm. As fotos para os tratamentos água do mar, controle, 10:1 e 20:2 são apresentadas em forma de negativo.	37
Figura 14: Aspecto geral de <i>Hypnea</i> sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H ₂ O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo	

fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos para todos os tratamentos s\u00e3o apresentadas em forma de negativo.....38

Figura 15: Curva de crescimento de *Hypnea* sp cultivada por 28 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato: fosfato nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fot\u00f4nico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia ($n=6$).42

Figura 16: Varia\u00e7\u00e3o da taxa de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato: fosfato nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fot\u00f4nico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia ($n=6 \pm$ desvio padr\u00e3o). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....43

Figura 17: Varia\u00e7\u00e3o do conte\u00fado de prote\u00ednas sol\u00faveis totais de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato: fosfato nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fot\u00f4nico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia ($n=3 \pm$ desvio padr\u00e3o). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....43

Figura 18: Conte\u00fado de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato: fosfato nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fot\u00f4nico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia ($n=3 \pm$ desvio padr\u00e3o). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....44

Figura 19: Conte\u00fado de clorofila *a* de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e em diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato: fosfato nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm 3^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fot\u00f4nico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia ($n=3 \pm$ desvio padr\u00e3o). Tratamentos com letras distintas s\u00e3o significativamente diferentes entre si segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....45

Figura 20: Efeitos de diferentes concentra\u00e7\u00f5es de nitrato:fosfato no comprimento do eixo principal, na forma\u00e7\u00e3o de ramos prim\u00e1rios e ramos secund\u00e1rios de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em \u00e1gua do mar (H_2O) e nas raz\u00f5es de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura

de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).46

Figura 21: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.47

Figura 22: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.48

Figura 23: Curva de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6$).53

Figura 24: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).54

Figura 25: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).54

Figura 26: Variação do conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C,

fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).55

Figura 27: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).56

Figura 28: Efeitos de diferentes concentrações de amônio: fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).57

Figura 29: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos de todos os tratamentos são apresentadas na forma de negativo.58

Figura 30: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos de todos os tratamentos são apresentadas na forma de negativo.59

Figura 31: Curva de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6$).63

Figura 32: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 28 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH

8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$)......64

Figura 33: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$)......64

Figura 34: Conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina em *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$)......66

Figura 35: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$)......67

Figura 36: Efeitos da adição de nitrato:fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$)......68

Figura 37: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de $23\pm3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo

fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos talos cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.....69

Figura 38: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos talos cultivados com água do mar e do controle são apresentadas na forma de negativo.70

Figura 39: Curva de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).74

Figura 40: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6 $\pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....75

Figura 41: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=3 $\pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....75

Figura 42: Conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=3 $\pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....76

Figura 43: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em

meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....77

Figura 44: Variação no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....78

Figura 45: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados nos tratamentos água do mar, controle, 10:1, 20:2, 30:3 e 40:4 são apresentadas na forma de negativo.....79

Figura 46: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos das algas cultivadas em todos os tratamentos são apresentadas na forma de negativo.80

Figura 47: Curva de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6$).84

Figura 48: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....85

Figura 49: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato:

fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....85

Figura 50: Conteúdo de aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....86

Figura 51: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....87

Figura 52: Variação no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e de ramos secundários de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).....88

Figura 53: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos tratamentos água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.89

Figura 54: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos tratamentos água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados no Brasil nos últimos anos sobre os efeitos de diferentes concentrações de N: P na fisiologia e bioquímica de algas marinhas bentônicas. VSES= Von Stosch, PES= Provasoli, TC= Taxa de crescimento, NR= nitrato redutase, PT= proteínas solúveis totais.	11
Tabela 2: Remoção máxima de nutrientes por algas marinhas atuando como biofiltradoras em experimentos de laboratório ou em cultivos integrados com animais marinhos.	15
Tabela 3: Espécies estudadas com os locais e dados de coleta, o tipo de ambiente, as datas de coleta e o número de depósito no Herbário.	17
Tabela 4: Composição química da solução Von Stosch preparada segundo Edwards (1970) e modificado segundo Yokoya (1996).	24
Tabela 5: Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos com <i>Hypnea</i> sp. e <i>Hypnea cervicornis</i> . Os valores correspondem à média (n=3) ± desvio padrão.	26
Tabela 6: Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos com <i>Hypnea musciformis</i> . Os valores correspondem à média (n=3) ± desvio padrão.	26
Tabela 7: Equações utilizadas para quantificar as concentrações de ficobiliproteínas e clorofila <i>a</i> (em µg/mL) segundo Kursar <i>et al</i> (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975), respectivamente.	29
Tabela 8: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com <i>Hypnea</i> sp. cultivadas em água do mar ou em meio VSES 25% com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.	39
Tabela 9: Comparações entre as médias ± desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com <i>Hypnea</i> sp. cultivada em água do mar ou com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol fótons m ⁻² s ⁻¹ . As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).	40
Tabela 10: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com <i>Hypnea</i> sp. cultivadas em água do mar e em meio VSES 25% com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela	

correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.50

Tabela 11: Comparação entre média $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea* sp. cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).51

Tabela 12: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea cervicornis* cultivadas em água do mar e em meio VSES 25% com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.60

Tabela 13: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea cervicornis* cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).61

Tabela 14: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea cervicornis* cultivadas em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.71

Tabela 15: Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea cervicornis* cultivada dias em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).72

Tabela 16: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas em *Hypnea musciformis* cultivadas em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a

relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.81

Tabela 17: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea musciformis* cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).82

Tabela 18: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea musciformis* cultivadas em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.91

Tabela 19: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea musciformis* cultivada por em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em vermelho representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA de medidas repetidas e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).92

Tabela 20: Valores máximos, mínimos e concentrações ótimas das variáveis analisadas em concentrações de amônio e fosfato (μM) para as espécies de *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis*.94

Tabela 21: Valores máximos, mínimos e concentrações ótimas das variáveis analisadas em concentrações de nitrato e fosfato (μM) para as espécies de *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis*.95

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Hypnea* J.V. Lamouroux

O gênero *Hypnea* J.V. Lamour. faz parte da divisão Rhodophyta, ordem Gigartinales e família Cystocloniaceae (Wynne 2011). Tal gênero, assim como todas as algas vermelhas, é caracterizado pela presença de clorofila *a* como principal pigmento fotossintetizante e as ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) e carotenóides como pigmentos acessórios. As ficobiliproteínas estão arrançadas em estruturas conhecidas como ficobilissomos, localizados na membrana do tilacóide (Lee 2008). Além disso, as rodofíceas possuem características peculiares, tendo como produto de reserva o amido das florídeas e não possuem células flageladas no seu ciclo de vida (Raven 2007).

Estão descritas até o momento 67 espécies de *Hypnea* que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Geraldino *et al.* 2010). No Brasil, as espécies de *Hypnea* podem ser encontradas em todo o litoral durante todo o ano, com distribuição desde o mesolitoral até o infralitoral, sobre rochas ou como epífitas de outras algas, principalmente sobre espécies de *Sargassum* C. Agardh (Schenkman 1989, Wallner *et al.* 1992, Reis *et al.* 2003). Para o Brasil, foram citadas seis espécies, sendo elas: *Hypnea cenomyce* J. Agardh; *Hypnea cornuta* (Kütz.) J. Agardh; *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacq.) J.V. Lamour.; *Hypnea nigrescens* Grev. ex J. Agardh; *Hypnea spinella* (C.Agardh) Kütz. e *Hypnea valentiae* (Turner) Mont. (Schenkman 1986, Nunes 2005, Wynne 2011). Recentemente, o trabalho realizado por Guimarães (2011) no estado de São Paulo, descreveu seis espécies: *Hypnea cervicornis* J. Agardh, *Hypnea cornuta*, *Hypnea musciformis*, *Hypnea spinella*; *Hypnea flexicaulis* Y. Yamagishi & M. Masuda, *Hypnea* sp. 1 e *Hypnea* sp. 2.

O gênero *Hypnea* é de grande importância econômica, principalmente a espécie *H. musciformis*, que é uma importante fonte de κ -carragenana e ι -carragenana, que são galactanas (polissacarídeos) sulfatadas presentes na matriz extracelular (Schenkman 1986,

Knutsen *et al.* 1995). A carragenana é utilizada na indústria alimentícia como agente espessante, estabilizante e gelificante, e também na indústria farmacêutica como agente espessante e estabilizante (Oliveira 1998, Rodrigues *et al.* 2011). Alguns estudos também mostraram que a carragenana apresenta atividades antivirais que inibem os vírus da herpes simples (HSV) e da AIDS (HIV) (Neushul 1990). Além da presença de carragenana, *H. musciformis* e *H. cervicornis* também produzem lectinas, que são importantes glicoproteínas utilizadas como agentes pró e anti-inflamatórios, que são empregadas no diagnóstico e terapia do câncer, e como agentes antibióticos e antifúngicos (Nagano *et al.* 2005, Cordeiro *et al.* 2006, Nascimento *et al.* 2006).

Devido a grande importância econômica do gênero, diversos estudos de cultivo foram realizados em laboratório e em campo, de forma a estabelecer as melhores condições físicas e químicas para o cultivo dessas algas. Schenkman (1980) estudou o crescimento de *H. musciformis* cultivadas em laboratório e no mar. A autora verificou a influência das concentrações de nitrogênio e fósforo no meio, a influência da profundidade e da sazonalidade no crescimento e no conteúdo de carragenana presente nos espécimes.

Berchez & Oliveira (1989) relacionaram o crescimento de *H. musciformis* com os efeitos do nitrato, da sazonalidade e as oscilações de temperatura e salinidade da água verificando melhores condições para a maricultura da espécie. Reis *et al.* (2003) observaram os efeitos da profundidade, herbivoria e epifitismo em *Sargassum cymosum* var. *nanum* E. de Paula & E.C. Oliveira de maneira que a utilização de *H. musciformis* com finalidade comercial seja feita de forma manejada para não causar danos à comunidade marinha bentônica.

Estudos recentes com *Hypnea musciformis* tem mostrado que, além do seu grande potencial comercial, a espécie pode ser utilizada na biorremediação de locais eutrofizados atuando como um biofiltro. Martins & Yokoya (2010) no estudo com linhagens verde clara e

marrom de *H. musciformis*, observaram um bom desenvolvimento da espécie em concentrações de 10 e 20 μM de nitrato e para a adição de uréia, essas concentrações variaram de 5 a 15 μM . Já com a adição de amônio, foi visto que concentrações acima de 15 μM foram letais para as duas variantes pigmentares. Pelo fato de *H. musciformis* tolerar altas concentrações de nitrato, estudos mostraram a sua utilização como biofiltro. Martins (2007) estudou a remoção de nitrogênio e fósforo na água do mar, no qual *H. musciformis* removeu esses nutrientes do meio em concentrações de até 60 μM de nitrato e em concentrações maiores que 60 μM , grande parte do nitrato assimilado foi devolvido ao meio como nitrogênio orgânico dissolvido (NOD).

1.2 Metabolismo do Nitrogênio e Fósforo nas macroalgas marinhas

O nitrogênio é o principal elemento que limita o crescimento das algas marinhas bentônicas e controla a produtividade primária dos oceanos, sendo o nitrato e o amônio importantes íons que influenciam o crescimento desses organismos (DeBoer 1981, Lobban & Harrison 1997). No ambiente marinho, o nitrogênio está disponível na forma de nitrato (NO_3^- , nas concentrações de 0 a 40 $\mu\text{mol N l}^{-1}$), nitrito (NO_2^- , de 0 a 1 $\mu\text{mol N l}^{-1}$), amônio (NH_4^+ , entre 0 a 1 $\mu\text{mol N l}^{-1}$) e nitrogênio orgânico dissolvido (Tyrrel 1999).

A utilização das diferentes fontes de nitrogênio varia entre as espécies de macroalgas marinhas bentônicas. Isso ocorre devido ao metabolismo do nitrogênio, uma vez que, para a captação de nitrato ocorre um maior gasto de energia do que para a captação de amônio. O metabolismo do nitrogênio engloba quatro etapas: a captação do nitrogênio do meio, sua assimilação, seu armazenamento e seu “turnover” (figura 1).

O nitrogênio captado e armazenado pelas algas tem como função a formação de aminoácidos, purinas, pirimidinas, porfirinas, aminas, açúcares amino, entre outros, sendo um

nutriente com grande importância metabólica para esses organismos (Lobban & Harrison 1997).

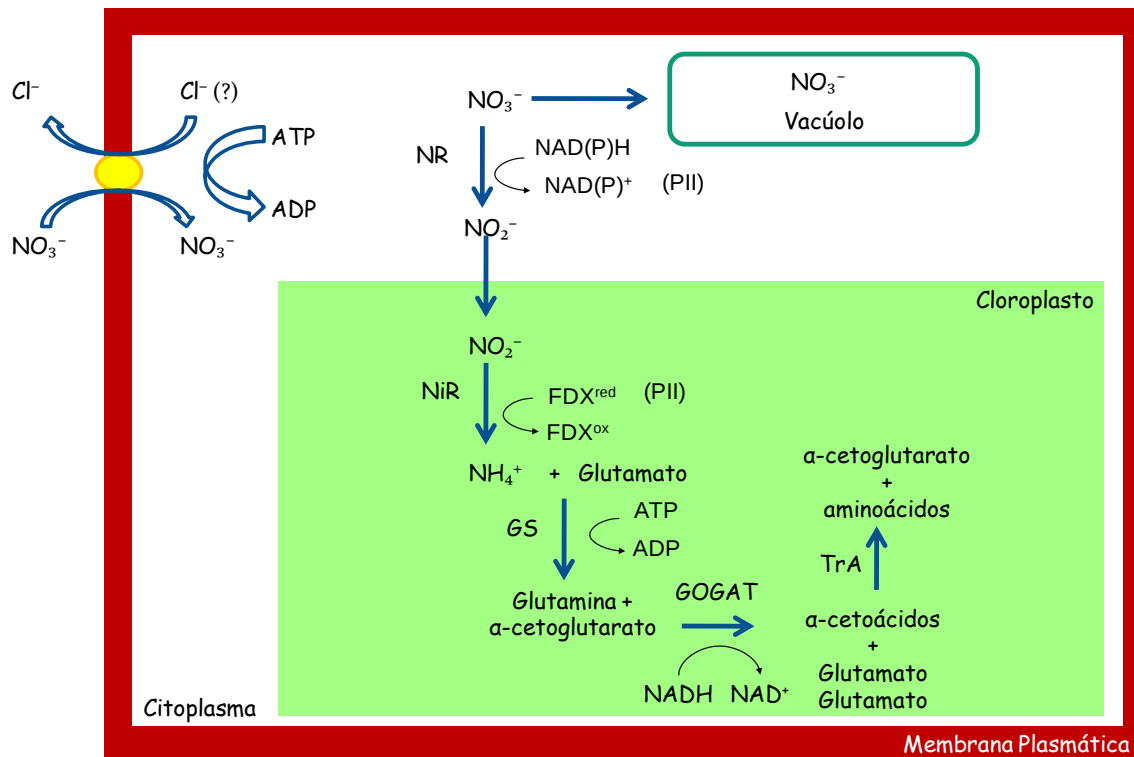


Figura 1: Esquema do metabolismo do nitrogênio em macroalgas marinhas bentônicas segundo DeBoer (1981), com modificações. NR= nitrato redutase, NiR= nitrito redutase, FDX=ferredoxina, GS= glutamina sintetase, GOGAT= Glutamato sintetase, NAD= nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH= nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido NADP= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, TrA=Transaminase, PII= fotossistema II, ATP= adenosina trifosfato, ADP= adenosina difosfato.

A absorção do nitrogênio pode se dar na forma de nitrato, nitrito, amônio e uréia. A absorção do nitrato ocorre pela membrana plasmática por transporte ativo, tendo gasto de energia na forma de ATP. O nitrato presente no citoplasma pode ser armazenado no vacúolo para posterior utilização ou é reduzido a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase, utilizando a NADPH como fonte de elétrons. O nitrito, resultante da redução do nitrato ou captado diretamente do meio marinho, é reduzido no cloroplasto a amônio pela ação da enzima nitrito redutase que utiliza como fonte de elétrons a ferredoxina reduzida, passando a ferredoxina oxidada (figura 1).

O amônio obtido pela redução do nitrito ou pela captação direta do meio marinho, se incorpora ao glutamato, em uma reação com gasto de energia e catalisada pela enzima glutamina sintetase. A glutamina transfere o grupo amino a um alfacetoglutarato que forma duas moléculas de glutamato pela ação enzimática da glutamato sintetase que utiliza o NADH como fonte de elétrons. Os grupos aminos das moléculas de glutamato serão transferidos a alfacetoácidos pela ação da transaminase, formando aminoácidos e alfacetoglutarato. O alfacetoglutarato será utilizado em processos metabólicos, como o Ciclo de Krebs, e os aminoácidos serão incorporados na forma de proteínas e pigmentos (ficobiliproteínas) (figura 1).

Considera-se que as ficobiliproteínas, principalmente a ficoeritrina seja a principal reserva de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras moléculas a se degradar quando a alga se encontra em meio com limitação de nitrogênio (Lobban & Harrison 1997). Da mesma forma, as proteínas solúveis são formas de reserva desse elemento, que podem ser consumidas pelas algas em condições de limitação de nitrogênio. A diminuição das concentrações dos compostos nitrogenados, pode causar uma redução dos processos fotossintetizantes e por fim, uma queda das taxas de crescimento (Lobban & Harrison 1997, Martins 2007).

Assim como o nitrogênio, o fósforo é um nutriente limitante no desenvolvimento das algas marinhas e está disponível principalmente na forma de ortofosfato (HPO_4^{2-}), que corresponde a 97% do fosfato inorgânico presente na água do mar (DeBoer 1981, Lüning *et al.* 1990, Lobban & Harrison 1997, Tyrrel 1999). O fósforo também está disponível no mar na forma de outros íons fosfato, como 1% de íon fosfato (PO_4^{3-}) e 2% como fosfato dihidrogênio (H_2PO_4^-) (Lobban & Harrison 1997). O fósforo tem como função nas algas marinhas, a formação da sua estrutura e a transferência de energia através da formação de ATP, GTP, ácidos nucleicos, fosfolipídios, coenzimas e fosfoenolpiruvato (Lobban & Harrison 1997).

O diagrama ilustra o fluxo de energia e matéria no citoplasma, limitado pela membrana plasmática (vermelha). No topo, uma seta azul indica a entrada de DOP (Dióxido de Oxigênio Plasmático) no citoplasma. À esquerda, um retângulo azul representa o **Vacúolo**, com uma seta azul apontando para cima (entrada de DOP) e outra apontando para baixo (saída de DOP). No centro, há duas organelas ovais: a **Mitocôndria** (marrom) e o **Cloroplasto** (verde). Ambas contêm o ciclo $ADP + Pi \leftrightarrow ATP$. À direita, um retângulo azul claro representa a **Reserva interna de Pi**. Abaixo dela, há um ciclo de $ATP \leftrightarrow ADP + Pi$. No canto inferior direito, um círculo amarelo representa a **Membrana Plasmática**, com uma seta azul apontando para a reserva de Pi (entrada de Pi) e outra apontando para fora (saída de ATP). O fluxo de energia é mostrado por setas azuis: ATP produzido na mitocôndria e no cloroplasto flui para a reserva de Pi. A reserva de Pi fornece ATP para a síntese de RNA e DNA, e para a produção de Fosfolipídios. A reserva de Pi também fornece Pi para a síntese de Polímeros (Poly-P (A), Poly-P (B), Poly-P (C), Poly-P (D)) e para a síntese de Fosfolipídios. A síntese de RNA e DNA é catalisada por Polifosfatase. A síntese de Fosfolipídios é catalisada por Polifosfatase. A síntese de Polímeros (Poly-P (A), Poly-P (B), Poly-P (C), Poly-P (D)) é catalisada por Polifosfatase. A síntese de Fosfolipídios é catalisada por Polifosfatase.

O fósforo é captado do meio marinho na forma de fosfato inorgânico, tendo gasto de energia na forma de ATP (figura 2). Esse fosfato inorgânico pode ser armazenado no citoplasma em quatro formas de polifosfatos (representados por Poly-P A, B, C e D na figura 2) que poderão formar moléculas de DNA e RNA. O fosfato inorgânico armazenado no citoplasma, também pode ser utilizado para a formação de fosfolipídios e para fornecer energia na forma de ATP nos processos de respiração e fotossíntese, que ocorrem na mitocôndria e no cloroplasto, respectivamente. Além disso, o fosfato inorgânico pode

ser armazenado no vacúolo, onde poderá retornar ao meio marinho na forma de fosfato orgânico dissolvido (figura 2).

1.3 Efeitos do nitrogênio e do fósforo nas algas marinhas bentônicas

Alguns autores observaram mudanças na fisiologia das macroalgas relacionadas à ausência e presença de nitrogênio e fósforo no meio. Para Chlorophyta, muitos estudos foram realizados, principalmente com espécies do gênero *Enteromorpha* Link in Nees e *Ulva* L.. *Ulva fenestrata* Postels & Ruprecht apresentou maior conteúdo de proteínas, aminoácidos e nitrogênio total presente no talo em meios enriquecidos com amônio do que com nitrato (Naldi & Wheeler 1999). Espécimes de *Enteromorpha intestinalis* (L.) Nees coletados em locais com diferentes concentrações de nutrientes, captaram e assimilaram maiores concentrações de amônio do que de nitrato e nessas condições, tiveram maiores valores de clorofila *a* e *b* e glutamina (Barr & Rees 2003). *Ulva* spp. e *Ulvaria* Ruprecht apresentaram uma taxa de crescimento e conteúdo de carbono semelhantes tanto com a alta disponibilidade quanto com a limitação de nitrogênio no meio. Os maiores valores de N no talo, de proteínas e clorofila *a* e *b* foram maiores em *Ulvaria* spp e em maiores concentrações de nitrogênio (Nelson *et al.* 2008). *Ulva rigida* C. Agardh mostrou um grande crescimento em altas concentrações de amônio e um baixo conteúdo de N no talo (Mata *et al.* 2010). A espécie também teve uma maior atividade da nitrato redutase e concentração de compostos fenólicos em maiores concentrações de nitrato (Cabello-Pasini *et al.* 2010). *Ulva lactuca* L. apresentou grande afinidade ao amônio, apresentando um maior crescimento e maior remoção deste nutriente do meio (Ale *et al.* 2010).

Para Ochrophyta, *Lobophora variegata* (J.V. Lamour.) Womersley ex E.C. Oliveira apresentou altas concentração de compostos fenólicos, maior relação C:N e formação de pelos hialinos em meio com limitação de nitrato (Arnold *et al.* 1995). Para *Fucus vesiculosus* L.,

ocorreu uma queda de 50% na germinação dos esporos em altas concentrações de nitrato e fosfato (Bergström *et al.* 2003). *Sargassum enerve* C. Agardh apresentou um maior crescimento em altas concentrações de amônio do que de nitrato (Dogyan *et al.* 2004). As frondes de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringarm apresentaram um maior crescimento em altas concentrações de nitrato e o crescimento do estipe diminuiu em baixas concentrações de nitrato e amônio. Além disso, em altas concentrações de nitrogênio observaram-se as maiores porcentagens de C e N, e menores conteúdos de clorofila *a*, *c* e fucoxantina nas frondes (Dean & Hurd 2007).

Algumas espécies de Phaeophyceae (*Alaria esculenta* (L.) Grev., *Chorda tomentosa* Lyngb., *Chordaria flagelliformis* (O.F. Müll.) C. Agardh, *Desmarestia aculeata* (L.) J.V. Lamour., *Laminaria saccharina* (L.) J.V. Lamour., *Laminaria solidungula* J. Agardh e *Sphacelaria plumosa* Lyngb.) apresentaram uma queda da atividade da anidrase carbônica externa e de carboidratos em ambientes com enriquecimento de nitrogênio e fósforo, e paralelamente, ocorreu um aumento da atividade da nitrato redutase, da relação de C:N interno e de pigmentos acessórios e clorofila *a* (Gordillo *et al.* 2006).

Diversos estudos foram realizados com espécies pertencente a divisão Rhodophyta. *Gracilaria tikvahiae* McLachlan teve uma queda no crescimento com limitação de nutrientes no meio (Hwang *et al.* 1987). *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. Xia teve uma maior afinidade ao amônio, apresentando um maior crescimento em altas concentrações desse nutriente e em menores concentrações de fosfato (Haglund & Pedersén 1993). *Gracilaria* sp. apresentou um melhor crescimento com maiores concentrações de N e P no meio, e o conteúdo de ágar foi maior com a diminuição das concentrações de fósforo (Lewis & Hanisak 1996). *Bostrychia moritziana* (Sond. ex Kütz.) J. Agardh e *Caloglossa leprieurii* (Mont.) G. Martens apresentaram um crescimento dependente das concentrações de nitrato no meio, sendo que apenas *C. leprieurii* foi altamente dependente de fosfato (Ryder *et al.* 1999).

Porphyra umbilicalis Kütz. e *Porphyra yezoensis* Ueda apresentaram maiores concentrações de P e N no talo em altas concentrações de nitrogênio e fósforo, e *P. yezoensis* apresentou maiores conteúdos de ficoeritrina e ficocianina do que *P. umbilicalis* (Chopin *et al.* 1999). Estudos com *Chondrus crispus* Stack. mostraram uma maior porcentagem de P no talo em maiores concentrações de fosfato e a síntese de carragenana foi estimulada por concentrações médias à altas de nitrogênio e fósforo (Chopin & Wagey 1999). *Gracilaria* sp. apresentou um maior crescimento em menores concentrações de N no meio juntamente com altas concentrações de carbono inorgânico dissolvido. A espécie teve maiores concentrações de N no talo, de proteínas solúveis totais, clorofila *a*, ficocianina e ficoeritrina em maiores concentrações de N no meio (Andria *et al.* 1999). *Gracilaria cornea* J. Agardh apresentou maior taxa de crescimento em experimentos com N:P nas razões de 10:1 e 10:5, e menor crescimento na razão de 10:0 e 10:10 (Navarro-Angulo & Robledo 1999).

Gracilaria tenuistipitata C.F. Chang & B.M. Xia teve uma queda no crescimento, no teor de proteínas e na atividade enzimática, indicando uma diminuição no metabolismo celular geral quando ocorre limitação de nutrientes (Cólleen *et al.* 2004). *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. apresentou maior crescimento, maior taxa fotossintetizante, conteúdo de clorofila *a* e de proteínas solúveis totais com uma adição maior de amônio e menor de fosfato (Gal-Or & Israel 2004). *Porphyra dioica* J. Brodie & L.M. Irvine teve a taxa de crescimento, o conteúdo de N, de ficobiliproteínas e clorofila *a* influenciada pelas maiores concentrações de nitrato e amônio no meio (Pereira *et al.* 2008). A espécie *Asparagopsis armata* Harv. cresceu bem em ambientes com saturação de nitrato e teve menor conteúdo de N no talo (Mata *et al.* 2010). O crescimento de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenf. foi inibido pelas altas concentrações de amônio, nitrato, nitrito e fosfato, mostrando que a espécie é sensível a altas concentrações de nutrientes (Huo *et al.* 2011).

Alguns estudos referentes aos efeitos do nitrogênio e do fósforo na fisiologia e bioquímica das algas marinhas foram realizados nos últimos anos no Brasil e estão sumarizados na tabela 1.

Os estudos sobre a disponibilidade do nitrogênio e fósforo no meio marinho e seus efeitos na fisiologia e bioquímica das algas marinhas bentônicas é de grande importância, uma vez que, esses elementos são essenciais para o metabolismo desses organismos e são nutrientes responsáveis por impactos ambientais de origem antrópica, como a eutrofização marinha.

1.4 Utilização de algas como biofiltros

Os impactos ambientais causados pela descarga de efluentes nas águas costeiras vêm aumentando nas últimas décadas, o que tem promovido uma procura por métodos que possam melhorar a qualidade da água antes da sua liberação nos corpos d'água (Cloern 2001, Andersen *et al.* 2006). A utilização de métodos de tratamento de efluentes domésticos e industriais não é adequada para água do mar e as alternativas disponíveis para a remoção de nutrientes nesse tipo de água são escassas. A utilização de macroalgas marinhas para a remoção de nutrientes tem sido um mecanismo de combate a eutrofização (Carneiro 2007, Huo *et al.* 2010).

As macroalgas são eficientes na remoção de nutrientes em excesso na água, atuando como biofiltradoras, ou seja, removendo do ambiente aquático íons como o nitrato e amônio, que serão incorporados (bioacumulados) na forma de compostos nitrogenados orgânicos, como pigmentos ou aminoácidos. (Lobban & Harrison 1997, Nunes 2006, Carneiro 2007). Diversos estudos demonstraram a capacidade das macroalgas marinhas bentônicas de absorver/remover nitrogênio e fósforo conforme dados descritos na tabela 2.

Tabela 1: Estudos realizados no Brasil nos últimos anos sobre os efeitos de diferentes concentrações de N: P na fisiologia e bioquímica de algas marinhas bentônicas. VSES= Von Stosch, PES= Provasoli, TC= Taxa de crescimento, NR= nitrato redutase, PT= proteínas solúveis totais.

Espécies	Linhagens	Concentrações testadas	Resultados	Referências
<i>Gracilaria birdiae</i>	Linhagens verde clara e vermelhas masculinas e femininas	VSES - 250 µM de nitrato PES - 330 µM de nitrato	Maior TC de tetrasporófitos e gametófitos masculinos em PES, sendo maior Vm.	Ursi & Plastino (2001)
<i>Gracilaria chilensis</i> C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira		VSES - 500 µM de nitrato, 5 de amônio e 15 µM de uréia	A atividade da NR foi maior com adição de nitrato e níveis basais foram encontrados para amônio e uréia.	Ho (2002)
<i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & E.C. Oliveira		VSES - 125 e 250 µM de nitrato ASP 12-NTA – 1170 µM de nitrato MCM – 1000 µM de nitrato	Menores TC em ASP 12-NTA e MCM.	
	Linhagens vermelha do Ceará e Espírito Santo	VSES - 62,5; 125, 250, 375 e 500 µM de nitrato + concentrações de 125 e 500 µM de nitrato	Maior TC da linhagem do ES em VSES 62,5 à 250 µM. Maior TC em VSES 62,5 µM + 125µM para a linhagem do CE e em VSES 125µM + 250 µM para a linhagem do ES	Costa (2005)
	Linhagens vermelha, marrom-esverdeada, verde e verde clara do ES e CE.	VSES 12,5% + adição de nitrato de 0, 62,5; 125, 250 e 500 µM	Menor TC e maior conteúdo de N para verde clara do ES e conteúdo de C em vermelha do CE em limitação de N. Maior conteúdo de FE para vermelha do CE, com adição de 500 µM de nitrato	
<i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh	Linhagem verde e vermelha	VSES - 62,5 e 125 µM de nitrato, PES - 165, 330 e 660 µM de nitrato	Não houve diferenças na TC das duas linhagens.	Ferreira <i>et al.</i> (2006)
<i>Gracilaria domingensis</i> (Kütz.) Sond.ex Dickie	Linhagens vermelha, marrom e verde	VSES 25% + 0, 62,5; 125, 250 e 500 µM de nitrato.	Maior sobrevivência de: - carpósporos de marrom. - tetrásporos TC maior em tetrasporófitos do que em gametófitos. Maior concentração de PT de gametófitos verde e menor em tetrasporófitos de marrom em 62,5 µM. Atividade da NR maior em gametófitos vermelhos do que nos verdes em 62,5 e 125 µM.	Ferreira (2008)

Continuação Tabela 1.

Espécies	Linhagens	Concentrações testadas	Resultados	Referências
<i>Gracilaria chilensis</i> C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira		VSES + 100 a 4000 µM de nitrato, 0 a 90 µM de amônio, 0 a 45 µM uréia.	Maior atividade da NR em altas concentrações de nitrato Concentrações acima de 5 µM de amônio inibiram a atividade da NR Uréia aumentou a atividade enzimática até 45 µM	Chow & Oliveira (2008)
<i>Hypnea musciformis</i>	Linhagem verde clara	Cinetina (0 à 50µM) + 10µM de nitrato Cinetina (0 à 50µM) + 100µM de nitrato	Maior ramificação, FC e AFC em 10µM de nitrato Mais FE em 100µM	Martins <i>et al.</i> (2008)
<i>Hypnea musciformis</i>	Linhagens marrom e verde clara	VSES 50% + 5, 25, 45, 65, 85 e 105µM de nitrato VSES 50% + adições de nitrato + fosfato na razão de 4:1 de N:P	Aumento da atividade da NR na linhagem verde clara em meio com adição de fosfato	Matins <i>et al.</i> 2009
<i>Gracilariopsis tenuifrons</i> (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fred. & Hommers.		VSES 50 % + 0, 50, 150, 250, 500 e 750 µM de nitrato	Alta concentração de N tecidual e PT em 500 µM, e menores concentrações de C e H, atividade da NR Maior TC, ficobiliproteína, Cl <i>a</i> e menor massa seca em 250 µM.	Wanderley (2009)
<i>Hypnea musciformis</i>	Linhagens marrom 1 e marrom 2, verde clara e verde escura	VSES e ASP12 Nitrato, amônio e uréia 5, 10, 15, 20 e 25µM Razão de 4:1 de N:P	A partir de 15µM o amônio foi tóxico para as linhagens verde clara e marrom 2 Maior crescimento das linhagens marrom 1 e verde escura em 5 e 10µM de uréia	Martins & Yokoya (2010)

Continuação Tabela 1.

Espécies	Linhagens	Concentrações testadas	Resultados	Referências
<i>Gracilaria domingensis</i> (Kütz.) Sond.ex Dickie		VSES 125 e 250 µM de nitrato em irradiâncias de 50 e 100 µmol de fótons m ⁻² s ⁻¹	As concentrações de N não influenciaram a TC e o conteúdo de pigmentos. Maior conteúdo de zeaxantina em limitação de N e em 50 µmol.fóton. m ⁻² .s ⁻¹ e de β-criptoxantina em maiores concentrações de N.	Ramlov <i>et al.</i> (2011)
<i>Gracilaria tenuistipitata</i> C.F. Chang & B.M. Xia		VSES + 0, 30, 70, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µM de nitrato e radiação PAR+UVA+UVB PAR= radiação fotossinteticamente ativa UVA= radiação ultravioleta 200 à 300 nm UVB= radiação ultravioleta 280 à 320 nm VSES + 0, 100 e 500 µM de nitrato e radiação UV VSES + 0, 100 e 500 µM de nitrato e radiação UVB	Menor conteúdo de Cl a em 0 e 100 µM e saturação a partir de 250 µM Saturação de todos os carotenóides a partir de 200 µM. Maior eficiência da fotossíntese em 500 µM e de aminoácidos tipo microsporina (MAAs) em 750 µM. Maior conteúdo de FE em radiação PAR e 500 µM Menor conteúdo de FC, Cl a e PT em radiação PAB e 100 µM Maior atividade da anidrase carbônica em radiação PAB e 100 µM e melhor rendimento quântico ótimo em todas concentrações de N na radiação PAR. Maior conteúdo de MAAs e rendimento quântico efetivo em PAB e 500 µM TC maior em PAR e 500 µM Maior conteúdo de FE, rendimento quântico ótimo e de fotossíntese em PA e 500 µM Maior conteúdo de carotenóides em radiação PAB em limitação de N, de MAAs, rendimento quântico efetivo e DNA em 500 µM	Barufi (2010)

Para o Brasil, alguns estudos descreveram a utilização das algas marinhas, como forma de minimizar os impactos causados pela liberação de nutrientes na água do mar. Costa (2006) verificou um maior crescimento da Chlorophyta *Ulva lactuca* em viveiros de camarão com alta disponibilidade de nutrientes. Carneiro (2007) avaliou o crescimento de *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh em um viveiro de camarão e observou que a espécie tem boa capacidade de absorção de nitrato e fosfato, utilizando esses nutrientes para o seu crescimento. Hayashi (2007) relatou que a espécie *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva, quando cultivada com efluentes dos cultivos de peixes, apresentou um potencial como biofiltro, removendo os nutrientes e utilizando-os para o seu crescimento.

Nunes (2006) observou um menor crescimento de *Gracilaria birdiae* quando exposta a altas concentrações de fosfato e nitrato. Rocha (2009) observou que em cultivos integrados, os menores valores de amônio e nitrito na água ocorreram em presença dessa espécie que em condições hipereutróficas, armazenou um maior conteúdo de proteínas. Entretanto, a espécie não removeu o fosfato do meio, e no final dos experimentos verificou uma mortalidade das espécies, caracterizando um efeito negativo das altas concentrações desse nutriente para esse organismo.

Estudos com *Hypnea musciformis* tem evidenciado que essa espécie apresenta potencial como biofiltro em ambientes com níveis elevados de nitrogênio e fósforo, tendo uma rápida absorção desses nutrientes e estocando-os na forma de pigmentos e proteínas (Haines & Wheeler 1978, Martins 2004, Martins 2007).

Assim, partindo-se do pressuposto de que algumas espécies de algas apresentam mecanismos para se aclimatar a limitação de nitrogênio e fósforo, armazenando-os durante períodos de alta disponibilidade de nutrientes (como num ambiente eutrófico), o presente estudo contribuirá para o conhecimento dos efeitos da disponibilidade de nitrogênio e fósforo sobre o crescimento e conteúdo de pigmentos e proteínas em três espécies de *Hypnea*.

Tabela 2: Remoção máxima de nutrientes por algas marinhas atuando como biofiltradoras em experimentos de laboratório ou em cultivos integrados com animais marinhos.

Espécie	Tipo de cultivo	% de remoção de nutrientes	Autores
<i>Laminaria saccharina</i> (L.) J.V. Lamour.	Cultivo de salmão	40 % de DIN (nitrato + amônio)	Subandar <i>et. al</i> (1993)
<i>Ulva rotundata</i> Bliding		96,2% de fosfato	
<i>Enteromorpha intestinalis</i> L.Nees	Cultivo de peixe	99,2% de fosfato	Martínez-Aragón <i>et. al</i> (2002)
<i>Gracilaria gracilis</i> (Stack.) M. Steentoft. L.M.Irv. & W.F. Farnham		98% de fosfato	
<i>Hypnea musciformis</i> Linhagem marrom		99,98% de nitrato 94,89 % de nitrito 44,16% de amônio 98,33 % de fosfato	
Linhagem verde clara	Laboratório	99,98% de nitrato 93,92 % de nitrito 38,88% de amônio 99,31 % de fosfato	Martins (2007)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Cultivo de peixe (<i>Trachinotus carolinus</i> L.)	18,20% de nitrato 50,84% de nitrito 70,54% de amônio 26,76% de fosfato	Hayashi (2007)
<i>Ulva lactuca</i>	Cultivo de abalone (gastrópode <i>Haliotis midae</i> L.)	80% de amônio 77% de nitrato 75% de nitrito	Robertson-Anderson <i>et. al</i> (2008)
<i>Porphyra dioica</i>	Laboratório	98% de nitrato 88% de fosfato	Pereira <i>et. al</i> (2008)
<i>Gracilaria lemaneiformis</i> (Bory de Saint-Vicent) Grev.	Cultivo de vieira (molusco <i>Chlamys farreri</i> Jones et Preston)	80 % amônio 70,4 % de fosfato	Mao <i>et. al</i> (2009)
<i>Ulva chladrata</i> (Roth) C. Agardh	Cultivo de camarão (<i>Litopenaeus vannamei</i> Boonei)	85 % de DIN em 10 dias 44% de fosfato em 10 dias	Copertino <i>et. al</i> (2009)
<i>Ulva lactuca</i>	Laboratório	80% de fosfato	Tsagkamilis <i>et. al</i> (2010)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento das respostas fisiológicas e bioquímicas de espécies de *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *Hypnea musciformis* expostas a diferentes níveis de nitrogênio e de fósforo.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio e de fósforo no crescimento, na morfologia e no conteúdo de pigmentos e de proteínas em *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis*;
2. Avaliar as diferenças interespecíficas nos requisitos nutricionais das espécies de *Hypnea* e o seu potencial na biorremediação de ambientes eutrofizados.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies estudadas

O estudo foi realizado com tetrasporófitos de três espécies do gênero *Hypnea* J.V. Lamour. cujos dados de coleta estão descritos na tabela 3. As espécies foram cultivadas no laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. Os espécimes foram depositados no Herbário Científico do Estado “Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo”.

Tabela 3: Espécies estudadas com os locais e dados de coleta, o tipo de ambiente, as datas de coleta e o número de depósito no Herbário.

ESPÉCIE	DATA DA COLETA	LOCAL	TIPO DE AMBIENTE	Nº SP
<i>Hypnea</i> sp.	27/05/2002	Praia das Cigarras, São Sebastião (SP)	Eutrófico	SP 390903
<i>Hypnea cervicornis</i> J. Agardh	29/05/2002	Praia da Fortaleza, Ubatuba (SP)	Oligo- Mesotrófico	SP 390904
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen in Jacq.) J. V. Lamour.	07/05/2009	Ilha das Couves, Ubatuba (SP) – mesolitoral	Oligo- Mesotrófico	SP 400933

3.1.1 *Hypnea* sp. e *Hypnea cervicornis* J. Agardh

Primeiramente, a espécie *Hypnea* sp. foi identificada como *Hypnea cervicornis* (figura 3) e a espécie *H. cervicornis* foi identificada como *H. spinella* (figura 3). O estudo molecular realizado por Guimarães (2011) concluiu que as sequências de *H. cervicornis* foram diferentes das demais espécies estudadas e não tiveram afinidade com as sequências disponíveis no banco de dados (GenBank), podendo ser uma espécie nova e foi denominada de *Hypnea* sp. No caso da espécie identificada preliminarmente como *H. spinella*, a sequência molecular foi

diferente das encontradas para *H. spinella* do GenBank e os estudos morfológicos mostraram semelhanças com as descrições de *H. cervicornis*.



Figura 3 : Aspecto geral de *Hypnea* sp. e *H. cervicornis* cultivadas em laboratório com água do mar esterilizada e adição de solução de Von Stosch 25 %, temperatura média de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala = 1 cm.

3.1.2 *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacq.) J.V. Lamour.

Hypnea musciformis é encontrada em toda a costa brasileira, desde o Maranhão, até o Rio Grande do Sul. Essa espécie apresenta uma grande importância econômica, já que é fonte de ι e κ - carragenana, polissacarídeos presentes na sua parede celular, que são utilizados em indústria farmacêutica e alimentícia (Reis & Yoneshigue-Valentin 2000).

A espécie também apresenta uma grande plasticidade fenotípica, devido a um polimorfismo do gênero. Essa plasticidade pode ser verificada na sua morfologia, podendo ser causada por variações físicas e químicas dos ambientes (Berchez & Oliveira 1989, Guimarães 2011). A espécie *H. musciformis* utilizada no presente estudo é mostrada na figura 4

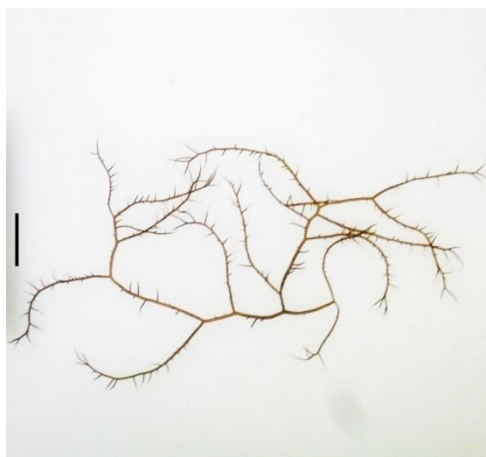


Figura 4: Aspecto geral de *H. musciformis* cultivada em laboratório com água do mar esterilizada e adição de solução de Von Stosch 25 %, temperatura média de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala = 1 cm.

3.2 Aspectos gerais das áreas de coleta

3.2.1 São Sebastião

O município de São Sebastião localiza-se ao norte do litoral paulista e caracteriza-se pela presença da Ilha de São Sebastião (Ilhabela) e do Canal de São Sebastião (figura 5), que atribuem ao local uma grande relação entre linha de costa e volume de água, apresentando um relevo íngreme, com cobertura vegetal constituída predominantemente por Mata Atlântica e rios de pequeno e médio porte (como o rio Caraguatatuba), que contribuem com um grande aporte de nutrientes e matéria orgânica para o mar (Gianesella & Saldanha-Corrêa 2003). O local também sofre com a grande expansão urbana que gera impactos ao meio ambiente, uma vez que as águas são utilizadas para recreação, despejos de emissários submarinos (emissário do Araçá e o das Cigarras) e aquicultura. Na região também se localiza o Tebar (Terminal Marítimo Almirante Barroso), que contribui para esses impactos, devido aos riscos de derramamentos de óleo e despejo de efluentes de esgoto de embarcações (CETESB 2004, De Laquila 2006).



Figura 5: Mapa com a localização da Praia das Cigarras e seu aspecto geral, no município de São Sebastião (SP).

Na região de São Sebastião, a distribuição de nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre total podem ser relacionados com os padrões de circulação da área, com os aportes de matéria orgânica e com a ação das ACAS (Água Central do Atlântico Sul) que contribuem para o aumento dos nutrientes na água durante a primavera e verão, uma vez que trata-se de uma corrente de massa de água fria, sub-superficial e rica em nutrientes. A região também sofre a ação da lixiviação devido a grandes índices pluviométricos, contribuindo para o escoamento de nutrientes presentes no solo e atmosfera (Venturini 2007). Assim, o litoral de São Sebastião pode ser considerado como um ambiente oligotrófico, podendo se tornar mesotrófico uma vez que ocorrem variações sazonais das concentrações de nutrientes na água do mar (Gianesella & Saldanha-Corrêa 2003).

Um estudo realizado na praia das Cigarras (figura 5) situada ao norte do município de São Sebastião e ao Canal de São Sebastião mostrou uma variação nas concentrações de nitrogênio inorgânico total de 0,13% na primavera de 2006 para 0,56% em 2007. Essa área sofre impactos causados por esgotos domésticos devido à presença do emissário submarino e

à presença de córregos que transportam água contaminada (Zardini 1996, Giancesella & Saldanha-Corrêa 2003).

3.2.2 Ubatuba

A região de Ubatuba está localizada ao norte do litoral paulista e faz divisa com o litoral sul do Estado do Rio de Janeiro. No geral, o litoral de Ubatuba é conhecido como um ambiente oligo-mesotrófico, uma vez que a produtividade primária é limitada por falta de compostos inorgânicos, como o nitrogênio e o fósforo (Teixeira & Tundisi 1981).

No verão, ocorrem os maiores índices pluviométricos que juntamente com a atuação dos ventos ocasionam um aumento das concentrações de nutrientes e matéria orgânica na água do mar. Isso ocorre devido ao escoamento desses compostos presentes no solo e na atmosfera, além da influência das correntes marítimas, como as ACAS. Durante o inverno, as ACAS recuam e as Águas Tropicais (AT) e Águas Costeiras (AC) passam a ser predominantes. A AT e AC juntamente com os ventos fortes causam ressurgimento das águas, sendo a principal fonte de nutrientes para a produtividade primária (Braga 1999, Moraes 2007). Estudos realizados na região têm mostrado que as concentrações de nitrato (NO_3^-) e fosfato (PO_4^{2-}) são maiores no inverno e baixas no verão ($0,71$ e $0,16 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ l}^{-1}$, respectivamente, e $0,36$ e $0,17 \mu\text{mol PO}_4^{2-} \text{ l}^{-1}$, respectivamente), ocasionado por essas variações sazonais (Braga 1999).

A praia da Fortaleza (figura 6), localizada na enseada da Fortaleza, sofre grande influência de ondas, devido à localização da sua desembocadura. Um dos principais aportes de matéria orgânica e nutrientes é proveniente do Rio Escuro, do despejo de esgoto pela comunidade e das atividades turísticas, mesmo que em menor escala do que as demais regiões de Ubatuba (Moraes 2007).

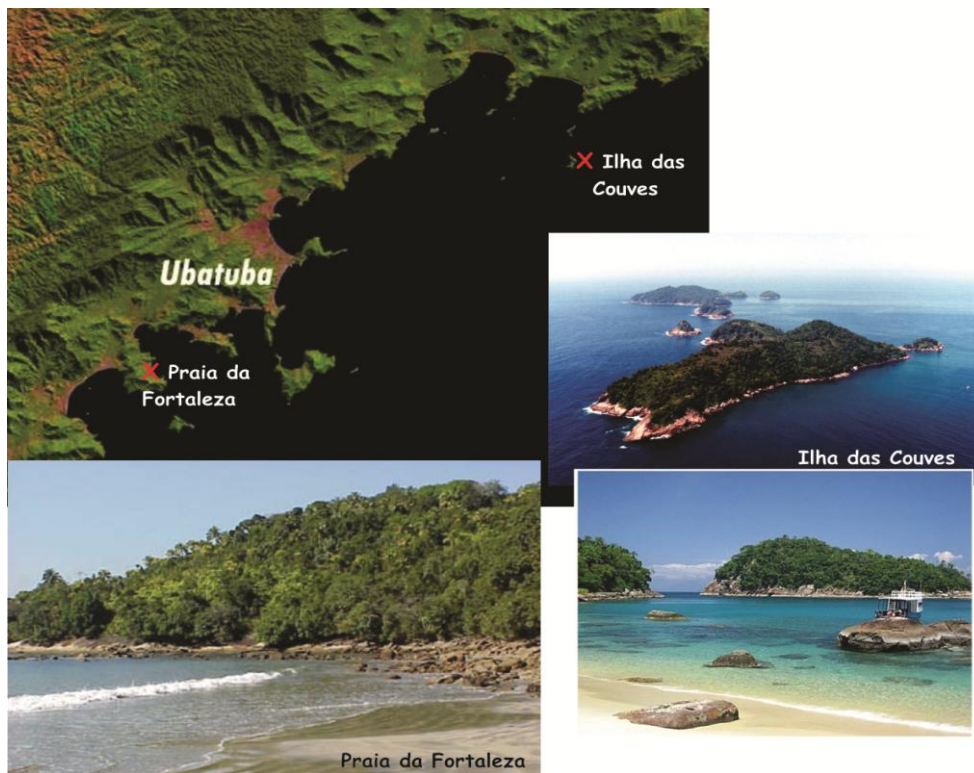


Figura 6: Localização e aspecto geral da Praia da Fortaleza e Ilha das Couves no município de Ubatuba (SP).

A Ilha das Couves (figura 6) faz parte do tombamento da Vila de Picinguaba e encontra-se a 2,53 km da costa. Esta Ilha faz parte do arquipélago das Couves, localizado ao norte do município de Ubatuba e é considerado uma Área de Proteção Ambiental (APA) Marinha do Litoral Norte. As ilhas do Litoral Norte, como em todo o litoral paulista, são bem frequentadas por turistas e pescadores, sendo locais visitados por passeios de escuna, prática de mergulho autônomo e pesca subaquática, o que pode impactar esses locais.

3.3 Culturas unialgáceas em laboratório

3.3.1 Esterilização da água do mar

Os meios de cultura foram preparados com água do mar coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, Ubatuba (SP).

Um mesmo lote de água do mar coletado no outono (24/04/2010) foi utilizado nos experimentos com *Hypnea* sp. e *Hypnea cervicornis* para padronização da composição química. Para os experimentos com *Hypnea musciformis*, utilizou-se o lote coletado no inverno (02/06/2011). A água do mar utilizada nos experimentos foi esterilizada por filtração em pré filtro de membrana (Millipore) AP 20 e aquecida duas vezes em banho-maria durante 1 hora, contado a partir do início da fervura.

3.3.2 Meio de Cultura

As algas foram mantidas em meio de cultura preparado com água do mar esterilizada e enriquecida com solução de Von Stosch segundo Edwards (1970) e modificado por Yokoya (1996) (tabela 4). Para a manutenção das algas e experimentos, adicionou-se a concentração de 2 ml de solução de Von Stosch por litro de água do mar esterilizada (VSES 25%). Nos experimentos para avaliar os efeitos da variação de nitrogênio e fósforo, foi preparada uma solução de Von Stosch sem nitrato e fosfato, e esses íons foram adicionados posteriormente conforme o tratamento a ser testado.

3.3.3 Isolamento e propagação de culturas unialgáceas

O isolamento e propagação das culturas das espécies estudadas foram realizados a partir de segmentos apicais de indivíduos tetrasporofíticos. Para o isolamento de *Hypnea musciformis*, os indivíduos foram cultivados em meio de cultura VSES 25% com adição de dióxido de germânio (GeO_2) e a troca do meio foi realizada semanalmente. Já para a propagação de todas as espécies, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando apenas o meio de cultura VSES 25% (sem adição de GeO_2).

Tabela 4: Composição química da solução Von Stosch preparada segundo Edwards (1970) e modificado segundo Yokoya (1996).

Componentes	Concentrações para um litro de meio
NaNO ₃	0,50 mM
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	30 µM
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 µM
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,1 µM
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	10 µM
Tiamina.HCl	0,59 µM*
Biotina	4,10 µM*
Cianocobalamina	1,0 nM*

*concentração equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970).

Para o isolamento, utilizou-se frascos de vidro de 120 ml contendo 70 ml de meio de cultura com adição de GeO₂ e para a propagação foram utilizados frascos de vidro de 230 ml, contendo 130 ml de meio de cultura. A vidraria foi autoclavada a 121°C durante meia hora e os instrumentos utilizados no manuseio das algas foram esterilizados em etanol 70% e flambados.

3.4 Metodologia experimental

3.4.1 Análise de nutrientes da água do mar utilizada nos experimentos

Amostras da água do mar (n=3) foram filtradas em membrana com poro de 0,45 µm de diâmetro (marca Millipore) por duas vezes, sendo utilizadas para a análise de nutrientes no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar do Instituto Oceanográfico da

Universidade de São Paulo (IO-USP). As análises de nitrato (A), nitrito (A) e fosfato (B) e nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) (C) foram realizadas segundo os métodos descritos por Strickland & Parsons (1972) e Grasshoff *et al.* (1983) em colaboração com a professora Dr^a Elisabete de Santis Braga, conforme os seguintes métodos:

A. A quantificação de nitrato e nitrito dissolvido foi realizada utilizando o Technicon Auto Analyzer II (Technicon ®), seguindo a metodologia descrita por Grasshoff *et al.* (1983), que consiste na redução do nitrato à nitrito através da passagem das amostras por uma coluna de cádmio. A concentração final de nitrito foi determinada por espectrofotometria a 543 nm, após a adição de sulfanilamida e n-(1-naftil) etilenodiamina diidrocloreto (NED).

B. A obtenção dos valores de fosfato dissolvido foi feita pela reação do íon com um reagente contendo molibdato, que produz o complexo fosfomolibdato em meio ácido. Essa reação é catalisada pelo antimônio e forma um complexo amarelado que é reduzido a um composto azul, por ação do ácido ascórbico. Por fim, é feita a leitura por espectrofotometria a 880 nm (Grasshoff *et al.* 1983, Strickland & Parsons 1968).

C. O nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) foi quantificado a partir da foto-oxidação das amostras de água do mar. Essas amostras foram transferidas para tubos de ensaio de quartzo com adição de peróxido de hidrogênio e incubadas por 10 horas em câmara com lâmpada de radiação ultravioleta, causando a quebra das moléculas orgânicas. Adicionou-se peróxido de hidrogênio para que todo o nitrogênio formado fosse oxidado, formando nitrato e nitrito, que foram analisados como descrito nos itens A e B. Por fim, obtêm-se o conteúdo de nitrogênio total dissolvido (NTD). Para o cálculo do valor de NOD, subtraiu-se o valor de NTD pelos valores de nitrato, nitrito e amônio das análises anteriores. Essa análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Armstrong *et al.* (1966) e adaptada pela Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga.

As concentrações de nutrientes iniciais (nitrato, nitrito, fosfato e nitrogênio orgânico dissolvido - NOD) disponíveis na água do mar utilizada nos experimentos com *H. sp.* e *H. cervicornis* estão apresentados na tabela 5 e as concentrações dos nutrientes da água utilizada para os experimentos com *H. musciformis* são apresentadas na tabela 6.

Tabela 5: Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos com *Hypnea sp.* e *Hypnea cervicornis*. Os valores correspondem à média (n=3) $\pm$ desvio padrão.

	Nitrato	Nitrito	Fosfato	NOD
Concentração (μM)	2,01 $\pm$	0,42 $\pm$	0,37 $\pm$	4,54 $\pm$
	0,35	0,04	0,04	0,62

Tabela 6: Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos com *Hypnea musciformis*. Os valores correspondem à média (n=3) $\pm$ desvio padrão.

	Nitrato	Nitrito	Fosfato	NOD
Concentração (μM)	5,60 $\pm$	0,41 $\pm$	0,76 $\pm$	5,33 $\pm$
	0,02	0,00	0,00	0,29

3.4.2 Experimentos com nitrogênio e fósforo

As concentrações de nitrogênio e fósforo descritas a seguir foram testadas na razão de 10:1, simulando um meio eutrófico e 100:1, simulando um meio oligotrófico. O tratamento controle é representado pela adição de 0 μM de nitrogênio na forma de nitrato ou amônio e de fosfato.

1. Experimentos com adição de nitrato e fosfato: para esse experimento, utilizou-se água do mar esterilizada com adição de VSES 25% (descrito no item 3.3.2) sem adição de NaNO_3 e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Nesse meio de cultura adicionou-se nitrato de sódio (NaNO_3) como fonte de nitrogênio nas concentrações de zero, 100, 200, 300, 400 e 500 μM

de nitrato e fosfato dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) mantendo as relações de 10:1 e 100:1 de N:P

2. Experimentos com adição de amônio e fosfato: o amônio utilizado para os experimentos foi proveniente do cloreto de amônio (NH_4Cl) que assim como o nitrato, foi adicionado com $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultura. Foram testadas as concentrações de zero, 10, 20, 30, 40 e 50 μM de amônio.

3.4.3 Condições laboratoriais

Foram preparadas soluções estoque para cada fonte de nitrogênio e fosfato, que foram filtradas em membrana com poro de 0,45 μm de diâmetro (marca Millipore) e adicionadas ao meio VSES 25% como descrito no item 3.4.2. Para cada tratamento foram feitas seis repetições, cada uma com cinco segmentos apicais de 1 cm de comprimento, provenientes das culturas unialgáceas. Os experimentos tiveram uma duração de 32 dias e foram realizados utilizando-se frascos de vidro de 150 ml contendo aproximadamente 80 ml de meio de cultura e a sua troca foi feita semanalmente. Foram feitos rodízios dos frascos diariamente para que todos recebam a mesma irradiância.

As espécies foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” no Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, sob as seguintes condições: temperatura média de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade 30, pH 8,0, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W do tipo “luz do dia” dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Ao final dos experimentos de taxa de crescimento (28 dias) foi trocado o meio de cultura dos tratamentos e após quatro dias (32º dia), as algas foram congeladas em nitrogênio

líquido e mantidas em freezer a -80°C para extrações de pigmentos e proteínas posteriormente.

3.5 Variáveis analisadas

3.5.1 Taxa de crescimento

A massa da matéria fresca dos espécimes (provenientes de cinco segmentos apicais) cultivados nos diferentes tratamentos foi determinada semanalmente, durante quatro semanas, utilizando uma balança analítica. Antes da pesagem, o excesso de água foi retirado utilizando papel absorvente. As taxas de crescimento (TC) foram calculadas utilizando-se a fórmula:

$$TC = (I_n \text{ Massa final} - I_n \text{ Massa inicial}) / (\text{Tempo final} - \text{Tempo inicial}).$$

3.5.2 Extração e análise de pigmentos

A extração de pigmentos foi realizada triturando 80mg de massa fresca em nitrogênio líquido. Para as repetições que não tiveram uma biomassa de 80 mg, utilizou-se a maior biomassa obtida e para o cálculo foi feito uma regra de três como por exemplo, $x = 80y/z$, onde z é a biomassa utilizada, y é o valor obtido por espectrofotometria em cada absorbância, nessa biomassa e x é o valor de pigmentos caso a biomassa utilizada fosse 80 mg.

O material triturado foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 14000 g a 4°C. O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi mantido no escuro em eppendorfs, para posterior leitura em espectrofotômetro. O sedimento foi ressuspenso em acetona 90% para obter um homogeneizado e foi centrifugado a 12000 g a 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante (contendo a clorofila *a*) foi transferido para eppendorfs e mantido no escuro até

a leitura em espectrofotômetro. As concentrações dos pigmentos foram determinadas pelas equações de Kursar *et al* (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975) e estão representadas na tabela 7 a seguir:

Tabela 7: Equações utilizadas para quantificar as concentrações de ficobiliproteínas e clorofila *a* (em µg/mL) segundo Kursar *et al* (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975), respectivamente.

Pigmento	Equação
Aloficocianina – AFC	$AFC = 181,3 \cdot A_{651} - 22,3 \cdot A_{614}$
Ficocianina – FC	$FC = 151,1 \cdot A_{614} - 99,1 \cdot A_{651}$
Ficoeritrina – FE	$FE = 155,8 \cdot A_{498,5} - 40,0 \cdot A_{614} - 10,5 \cdot A_{651}$
Clorofila <i>a</i> - Cl <i>a</i>	$Cl\ a = 11,85 \cdot A_{664} - 1,54 \cdot A_{647} - 0,08 \cdot A_{630}$

$A_{498,5}$ = Valor da absorbância no comprimento de onda de 498,5 nm; A_{614} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 614 nm; A_{630} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 630; A_{647} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 647 nm; A_{651} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 651nm.

As análises de pigmentos foram realizadas a partir de três das seis repetições realizadas para cada tratamento nas duas relações de nitrogênio e fósforo cultivadas por 32 dias.

3.5.3 Extração e análise de proteínas solúveis totais

A extração de proteínas foi realizada através da trituração de 80 mg de biomassa fresca em nitrogênio líquido. Para as repetições que não tiveram uma biomassa de 80 mg, utilizou-se a maior biomassa obtida e modificou-se as concentrações de tampão utilizadas. Por fim, as concentrações para a leitura foram padronizadas. O material triturado foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8, 5 mM EDTA; 1 mM DTT) na proporção de

1g de biomassa fresca por 10 ml de tampão. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 12000 *g* e 4 °C. O conteúdo de proteína solúvel total foi determinado por espectrofotômetro a 595 nm após a adição da solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo o método de Bradford (1976). A curva padrão utilizada para a realização dos cálculos foi feita utilizando-se BSA (albumina sérica bovina). As análises de proteínas foram realizadas a partir de três das seis repetições realizadas para cada tratamento nas duas relações de nitrogênio e fósforo cultivadas por 32 dias.

3.5.4 Análise morfométrica

A análise morfométrica foi avaliada com base nas medidas do comprimento do eixo principal e do número total de ramos primários e secundários dos espécimes estudados. Os valores de cada variável analisada correspondem à seis repetições, e foram analisados um espécime de cada repetição e para cada tratamento realizado. A análise morfométrica foi realizada no 32º dia de experimento, anteriormente ao congelamento das amostras. As medidas foram feitas no programa AxionVision 4.6.3.

3.6 Análise dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) One-Way e fatorial, e testes “*a posteriori*” de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls para distinguir os tratamentos significativamente diferentes. Também foi feita a análise de correlação de Pearson, para verificar as correlações significativas entre as variáveis analisadas (TC, PT, pigmentos e morfometria) e as relações de N:P testadas. As análises foram feitas com o programa STATISTICA (versão 10).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em *Hypnea* sp.

É possível observar um maior crescimento no tratamento com N:P de 50:0,5 μ M, apresentando uma biomassa de 39,93 mg (figura 7). As menores curvas de crescimento foram obtidas em água do mar e controle. As maiores taxas de crescimento (TC) de *Hypnea* sp. foram observadas nas concentrações de 30 a 50 μ M, e as diferenças entre as relações N:P de 10:1 e 100:1 não foram significativas (figuras 8). As taxas de crescimento de espécimes cultivados nos tratamentos com 20 μ M nas razões de N:P de 10:1 foram semelhantes entre si, e as menores TC foram observadas nos demais tratamentos (H₂O do mar e controle) (figura 8).

As maiores concentrações de proteínas solúveis totais (PT) foram observadas em espécimes cultivados com adições de 40 e 50 μ M de amônio em 100:1 de N:P e em 10:1 de N:P na adição de 50 μ M (figura 9). As menores concentrações foram observadas nos tratamentos com limitação de nutrientes, como a água do mar esterilizada e o controle (figura 9).

As maiores concentrações de ficobiliproteínas (AFC, FC e FE) foram observadas nos tratamentos com adição de 40 e 30 μ M de amônio na razão de N:P de 100:1 e 10:1, respectivamente (figura 10). As menores concentrações de AFC, FC e FE ocorreram nos tratamentos com menores concentrações de nutrientes (água do mar esterilizada e controle) (figura 10). O conteúdo de Cl *a* apresentou níveis basais, sendo menor que 0,01 mg de pigmento/ g de massa fresca em todos os tratamentos, e as maiores concentrações foram observadas em tratamentos com adição de 40 e 50 μ M de amônio nas razões 10:1 de N:P, (figura 11).

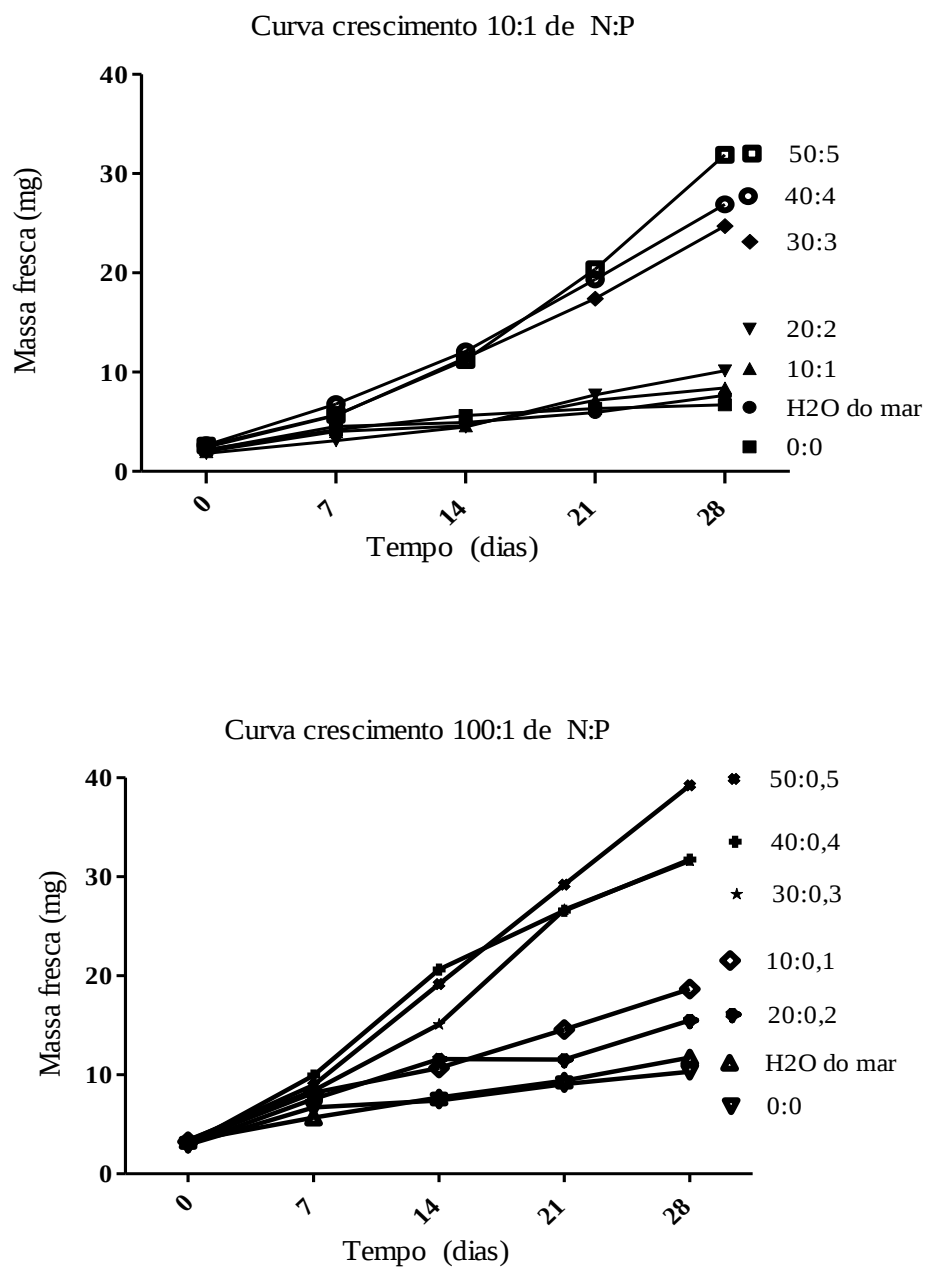


Figura 7: Curva de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em água do mar e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=6$).

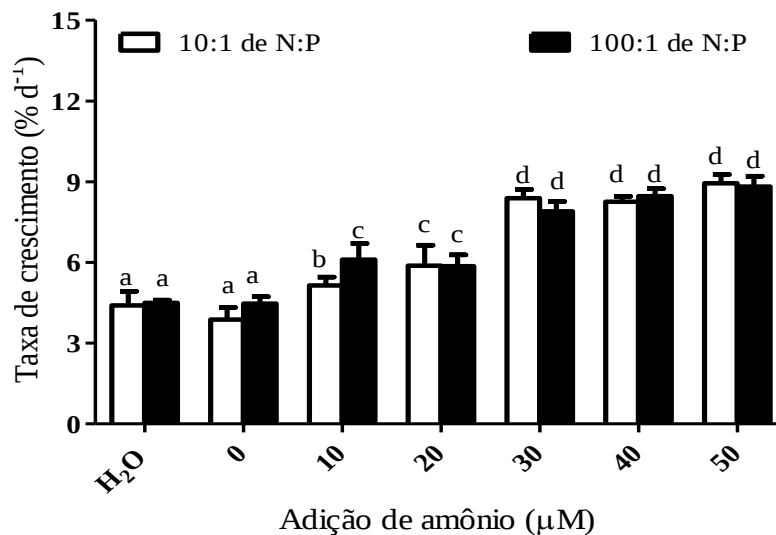


Figura 8: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

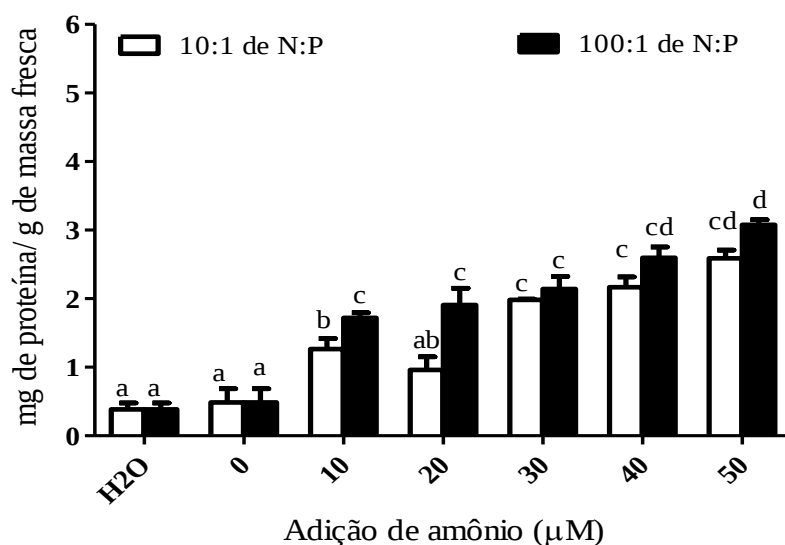


Figura 9: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

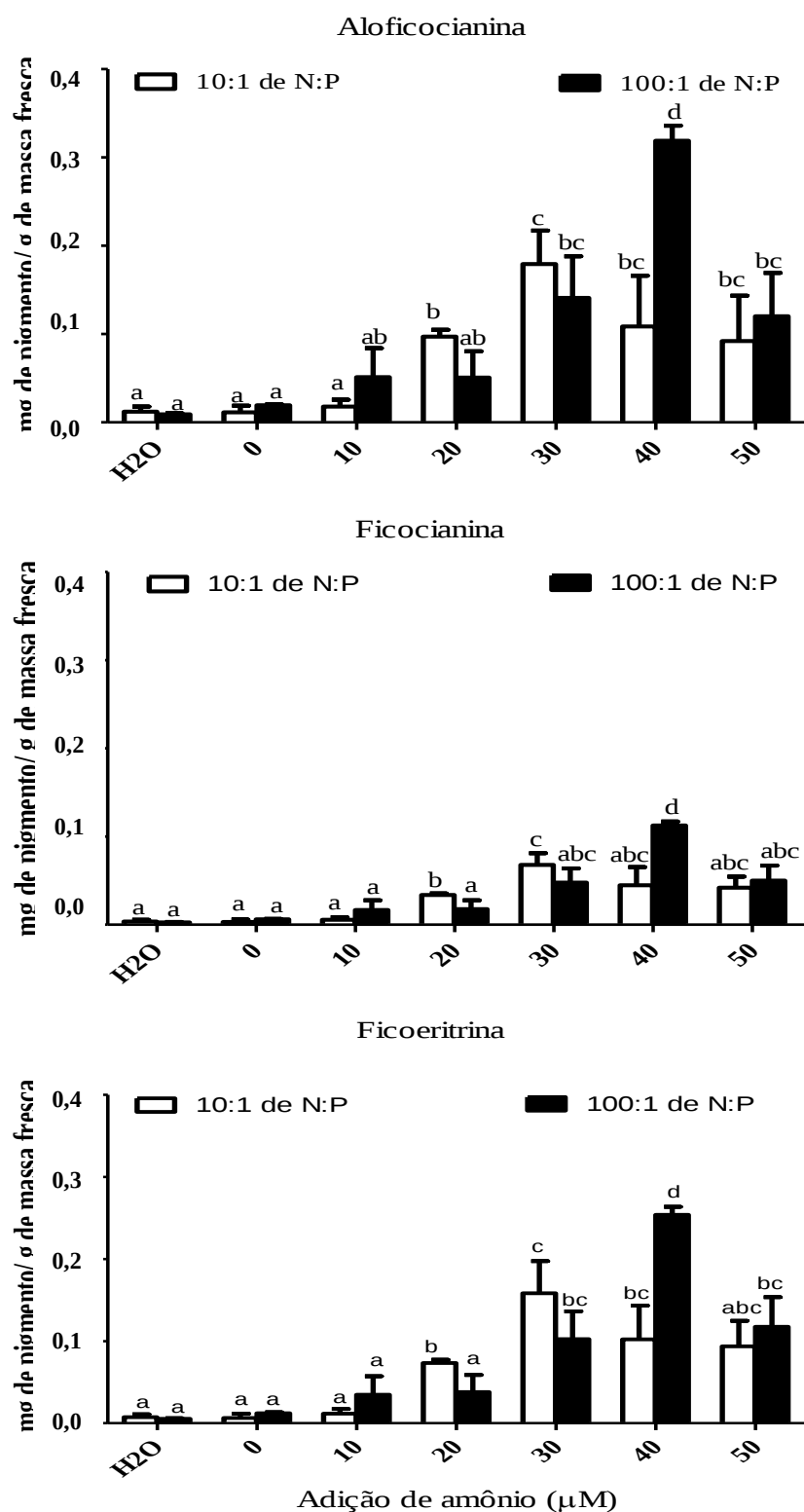


Figura 10: Conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

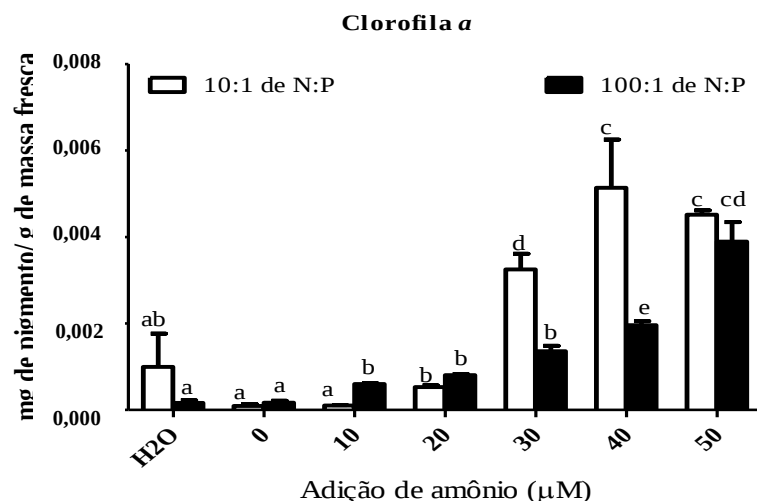


Figura 11: Conteúdo de clorofila *a* em *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

O comprimento do eixo principal (CEP) do talo de *Hypnea* sp. e a disponibilidade de amônio no meio apresentaram uma relação proporcional, atingindo os maiores valores nos tratamentos com adição de 50μM de amônio em 100:1 de N:P e os menores nos tratamentos água do mar e controle (figura 12). O número de ramificações primárias não variou significativamente entre os tratamentos e entre as razões de N:P testadas. Entretanto, o número de ramificações secundárias (RS) foi maior no tratamento com adição de 20 μM de amônio em 100:1 de N:P e os tratamentos com adição de amônio na razão 10:1 de N:P apresentaram menor número de RS (figura 12).

A figura 13 mostra o aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada nos diferentes tratamentos com adição de amônio e fosfato na razão 10:1 de N:P. Os espécimes cultivados nos tratamentos com água do mar, controle, 10:1 e 20:2 μM de amônio e fosfato foram apresentados na forma de negativo devido a despigmentação do talo, observando-se um menor comprimento do eixo principal e do número de ramos secundários nesses tratamentos. Os espécimes cultivados com amônio em concentrações iguais e superiores a 30:3 μM,

apresentaram o eixo principal com coloração amarelada e as partes apicais com coloração marrom (figura 13).

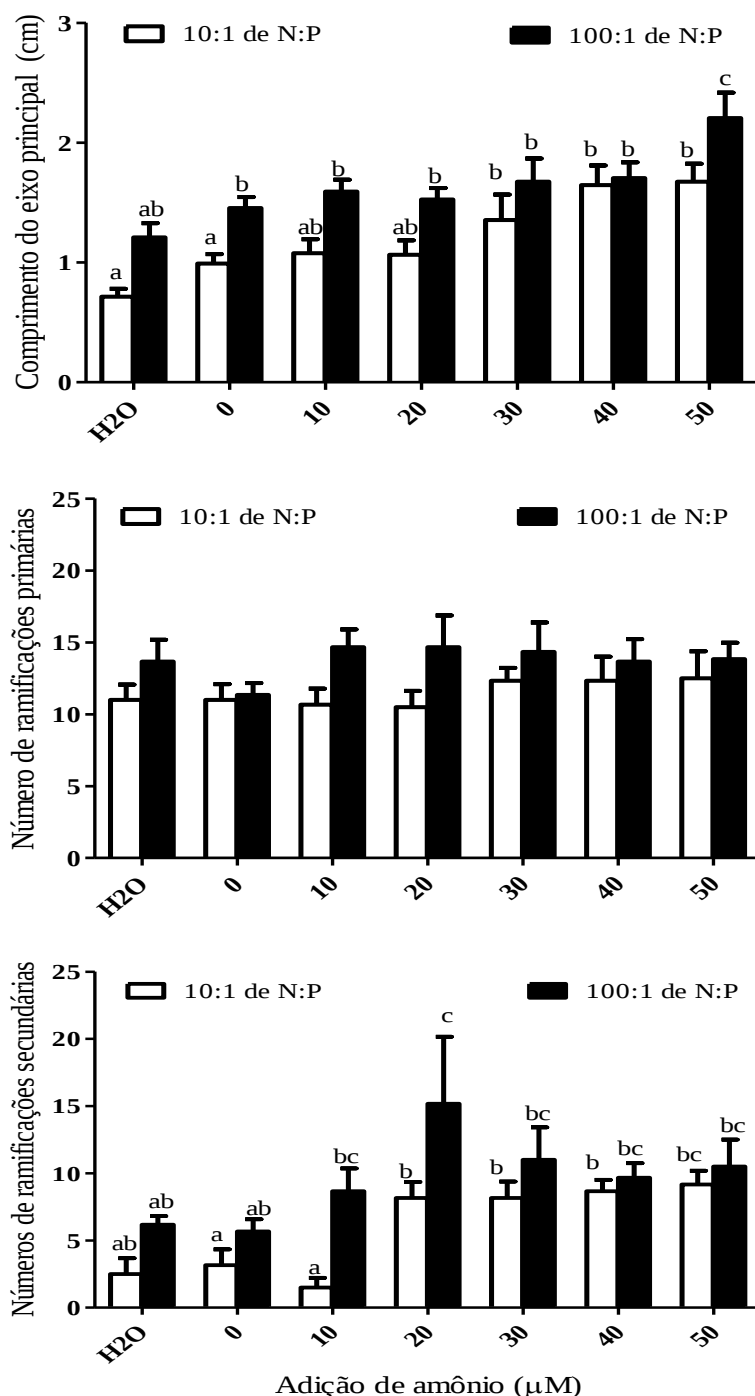


Figura 12: Efeitos de diferentes concentrações de amônio:fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

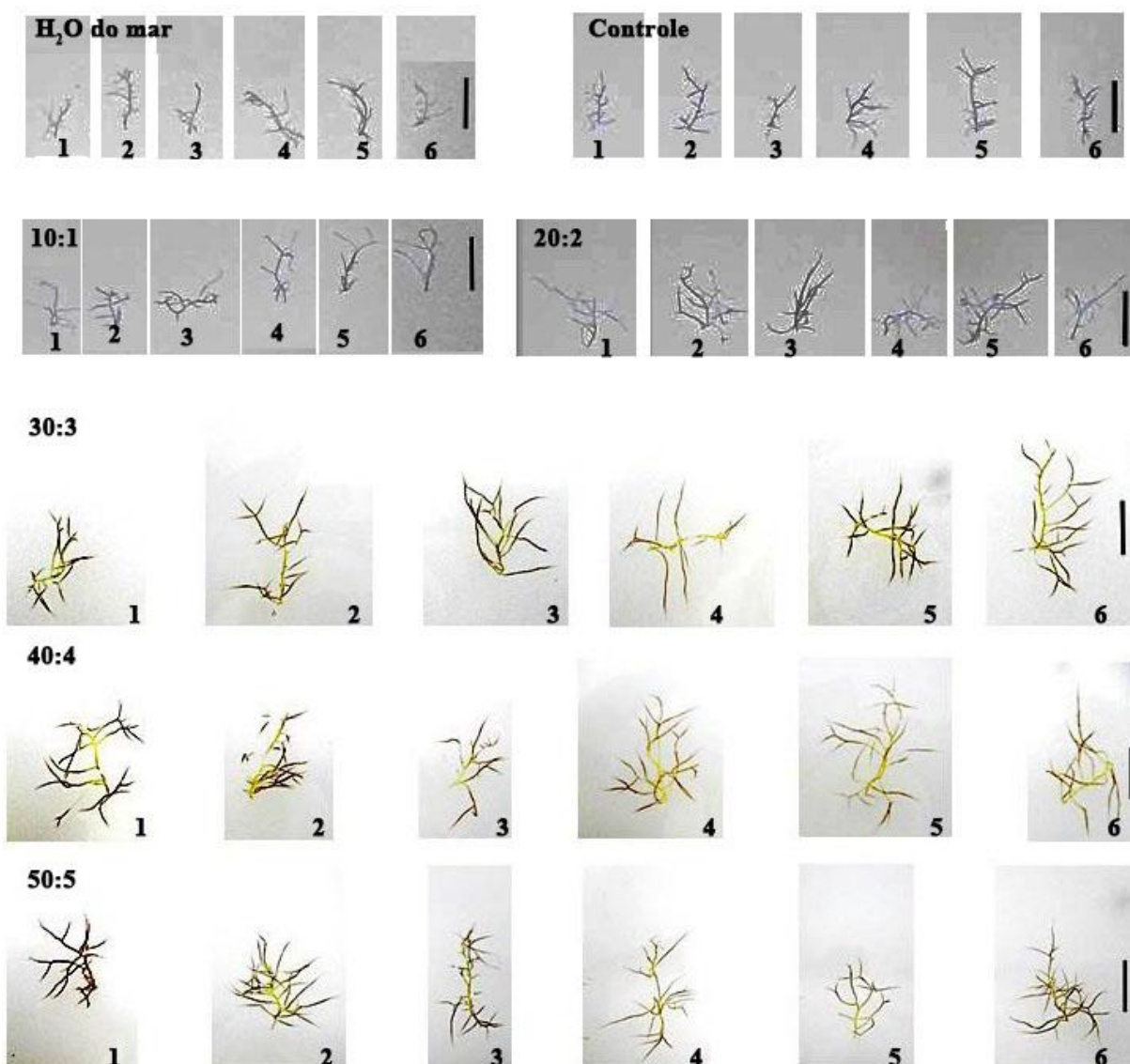


Figura 13: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio:fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos para os tratamentos água do mar, controle, 10:1 e 20:2 são apresentadas em forma de negativo.

Na figura 14 é possível observar a morfologia dos espécimes cultivados nos tratamentos com amônio:fosfato na relação de 100:1. Os espécimes cultivados em todos os tratamentos foram apresentados na forma de negativo, já que ocorreu uma despigmentação do talo das algas e podem ser observadas diferenças quanto ao CEP e ao número de RS.

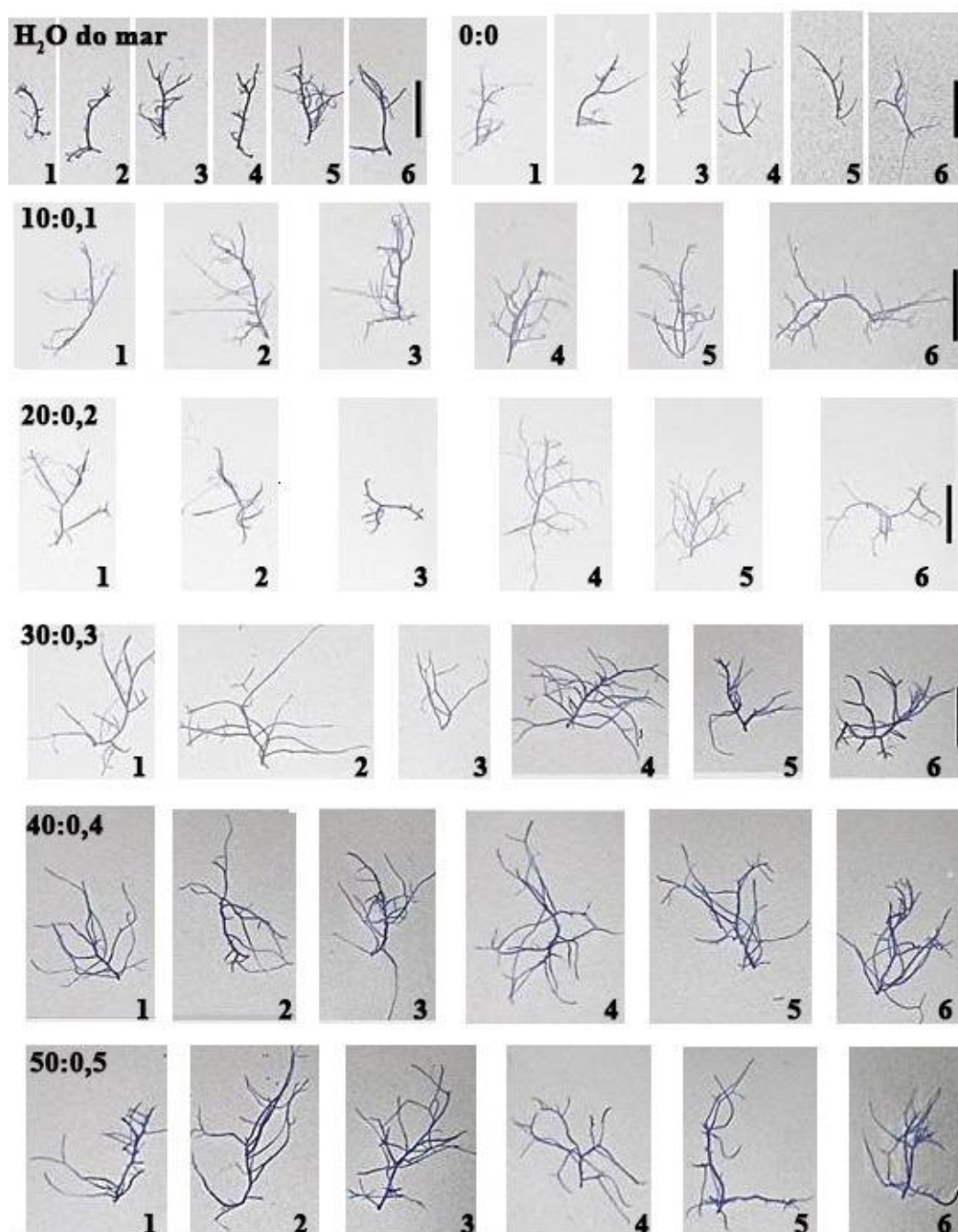


Figura 14: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos para todos os tratamentos s\~ao apresentadas em forma de negativo.

De acordo com a correla\~ao de Pearson (tabela 8), houve uma correla\~ao negativa significativa entre as concentra\~oes de am\~onio:fosfato em 10:1 com as ficobiliprote\~inas (AFC, FC e FE), PT e CEP. Na raz\~ao de 100:1 de N:P, observou uma correla\~ao negativa

significativa entre todos os pigmentos, PT e CEP e as concentrações de amônio:fosfato. As demais variáveis (TC, RP e RS) não tiveram correlação significativa com as adições de amônio e fosfato nas razões de N:P testadas.

Tabela 8: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea* sp. cultivadas em água do mar ou em meio VSES 25% com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,309	-0,651	-0,486	-0,520	-0,510	-0,347	-0,508	0,028	-0,083
p	0,894	0,001	0,025	0,016	0,018	0,123	0,019	0,904	0,718

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,274	-0,491	-0,453	-0,458	-0,456	-0,442	-0,486	0,144	-0,123
p	0,228	0,024	0,039	0,037	0,038	0,045	0,025	0,533	0,595

A tabela 9 mostra as médias e desvios padrão das variáveis analisadas em relação aos tratamentos com adição de amônio:fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P. Diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos de 20µM para o conteúdo de PT. O conteúdo de Cl *a* foi diferente na adição de 30 e 40µM. Nos tratamentos com adição de 50µM, houve diferença significativa para o CEP e PT dos talos de *Hypnea* sp. Os maiores valores de PT e CEP foram observados nos tratamentos com a razão de 100:1 de N:P. A única exceção foram as concentrações de Cl *a* que foram maiores na razão de 10:1 de N:P.

Tabela 9: Comparações entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea* sp. cultivada em água do mar ou com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de amônio e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		10:1	10:0,1	20:2	20:0,2	30:3	30:0,3	40:4	40:0,4	50:5	50:0,5
TC (% d ⁻¹)	4,40 $\pm$ 1,27	4,49 $\pm$ 0,24	3,88 $\pm$ 1,09	4,47 $\pm$ 0,63	5,14 $\pm$ 0,75	6,09 $\pm$ 1,48	5,87 $\pm$ 1,87	5,86 $\pm$ 1,04	8,38 $\pm$ 0,79	7,89 $\pm$ 0,90	8,25 $\pm$ 0,49	8,46 $\pm$ 0,70	8,94 $\pm$ 0,80	8,81 $\pm$ 0,95
PT (mg PT/g MF)	0,35 $\pm$ 0,22	1,41 $\pm$ 0,27	0,48 $\pm$ 0,34	1,54 $\pm$ 0,22	1,26 $\pm$ 0,26	1,71 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,33	1,90 $\pm$ 0,42	1,98 $\pm$ 0,01	2,14 $\pm$ 0,32	2,16 $\pm$ 0,26	2,59 $\pm$ 0,27	2,47 $\pm$ 0,08	3,09 $\pm$ 0,18
AFC (mg pig/g MF)	0,01 $\pm$ 0,00	0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,08	0,10 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,08
FC (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02
FE (mg pig/g MF)	0,01 $\pm$ 0,01	0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,06
Cl α (mg pig/g MF)	0,001 $\pm$ 0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003 $\pm$ 0,000	0,001 $\pm$ 0,000	0,005 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,000	0,005 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
CEP (cm)	0,71 $\pm$ 0,16	1,21 $\pm$ 0,29	0,99 $\pm$ 0,19	1,45 $\pm$ 0,22	1,07 $\pm$ 0,29	1,59 $\pm$ 0,24	1,06 $\pm$ 0,29	1,52 $\pm$ 0,23	1,35 $\pm$ 0,51	1,67 $\pm$ 0,47	1,64 $\pm$ 0,40	1,70 $\pm$ 0,31	1,67 $\pm$ 0,36	2,5 $\pm$ 0,52
RP	11,00 $\pm$ 2,60	13,66 $\pm$ 3,72	11,00 $\pm$ 2,68	11,33 $\pm$ 2,06	10,66 $\pm$ 2,73	14,66 $\pm$ 3,01	10,50 $\pm$ 2,73	14,66 $\pm$ 5,39	12,33 $\pm$ 2,16	14,33 $\pm$ 5,04	12,33 $\pm$ 4,08	13,66 $\pm$ 3,82	12,5 $\pm$ 4,59	13,83 $\pm$ 2,78
RS	2,5 $\pm$ 2,88	6,16 $\pm$ 1,60	3,16 $\pm$ 2,85	5,66 $\pm$ 2,25	1,5 $\pm$ 1,76	8,66 $\pm$ 4,13	8,16 $\pm$ 2,92	15,16 $\pm$ 12,22	8,16 $\pm$ 2,99	11,00 $\pm$ 5,93	8,66 $\pm$ 2,06	9,66 $\pm$ 2,65	9,16 $\pm$ 2,48	10,5 $\pm$ 4,92

4.2 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em *Hypnea* sp.

Os espécimes de *Hypnea* sp. cultivados em água do mar e controle (sem adição de N:P) apresentaram as menores TC (figuras 15 e 16). O crescimento de *Hypnea* sp. em biomassa foi maior nos tratamentos de 100 a 500 μ M de nitrato:fosfato na razão de 10:1 N:P quando comparado com os mesmos tratamentos na razão de 100:1 (figura 15). Nas relações de 10:1 e de 100:1 de N:P, a variação das TC nos diferentes tratamentos apresentou uma cinética de saturação, atingindo as maiores taxas nas adições de 100 a 300 μ M de nitrato (figura 16).

O conteúdo de PT em *Hypnea* sp. foi maior nos tratamentos com 300 μ M de nitrato em N:P de 10:1 e em 300 e 400 μ M em 100:1, entretanto a concentração na razão de 10:1 de N:P foi maior quando comparada a razão de 100:1 de N:P (figura 17). As menores concentrações de PT foram observadas nos tratamentos controle e água do mar esterilizada (figura 17).

As concentrações de AFC, FC, FE e Cl *a* foram maiores nos tratamentos com adição de nitrato e menores no tratamento controle e com água do mar, tanto em N:P de 10:1 quanto de 100:1 (figura 18). Os maiores valores foram observados no conteúdo de AFC e FE (figura 18). O conteúdo de AFC foi semelhante em todos os tratamentos com adição de nitrato e fosfato e nas duas razões testadas. Os conteúdos de FC, FE e Cl *a* apresentaram o mesmo padrão que o conteúdo de AFC, sendo maiores e semelhantes nos tratamentos com adição de 100 a 500 μ M de nitrato (figuras 18 e 19).

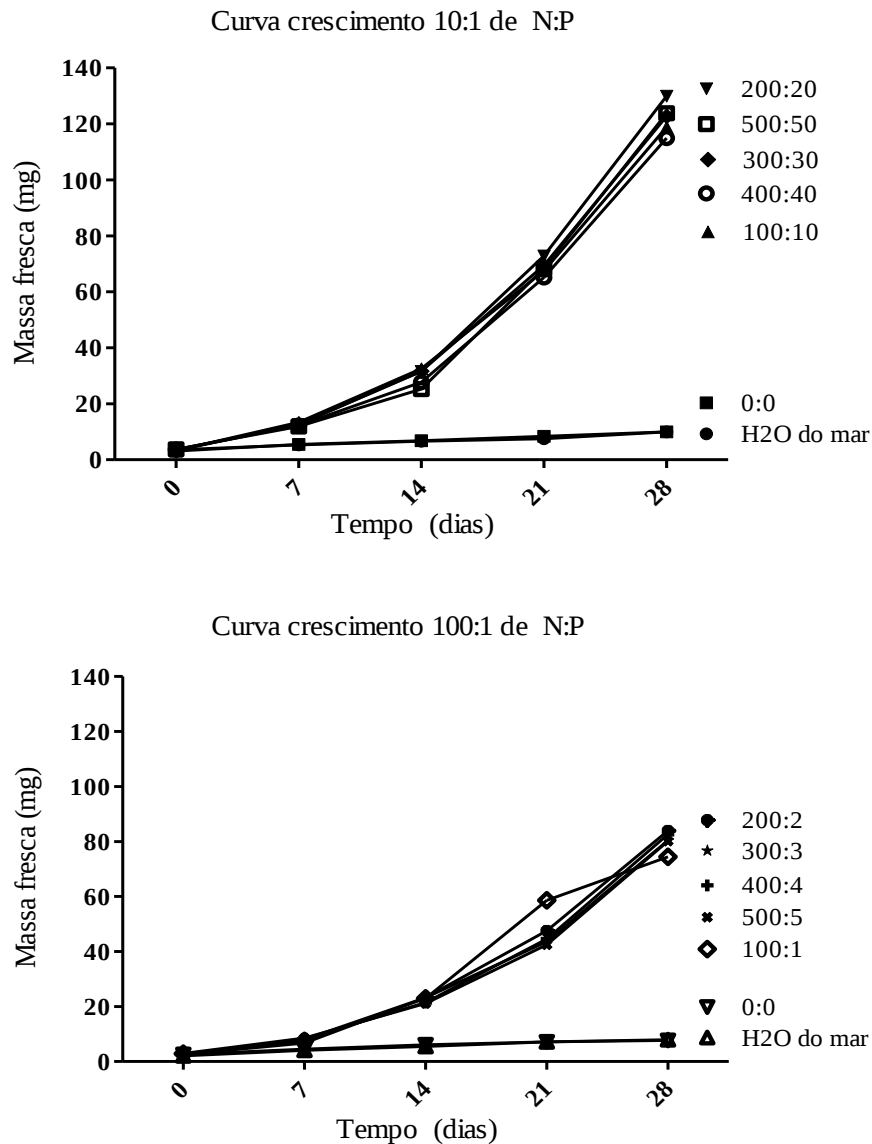


Figura 15: Curva de crescimento de *Hypnea* sp cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).

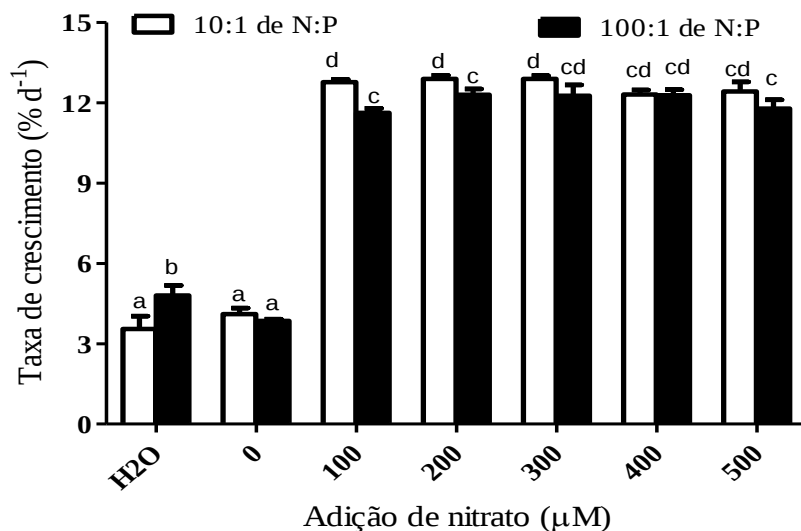


Figura 16: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea* sp. cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

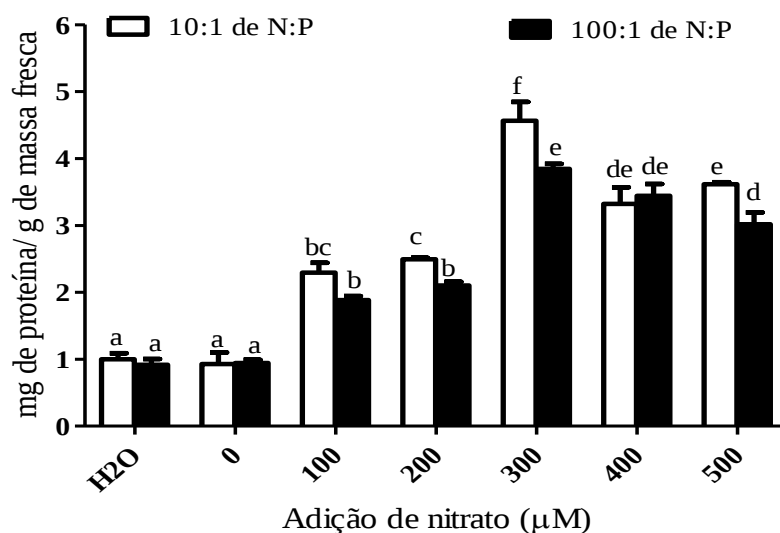


Figura 17: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

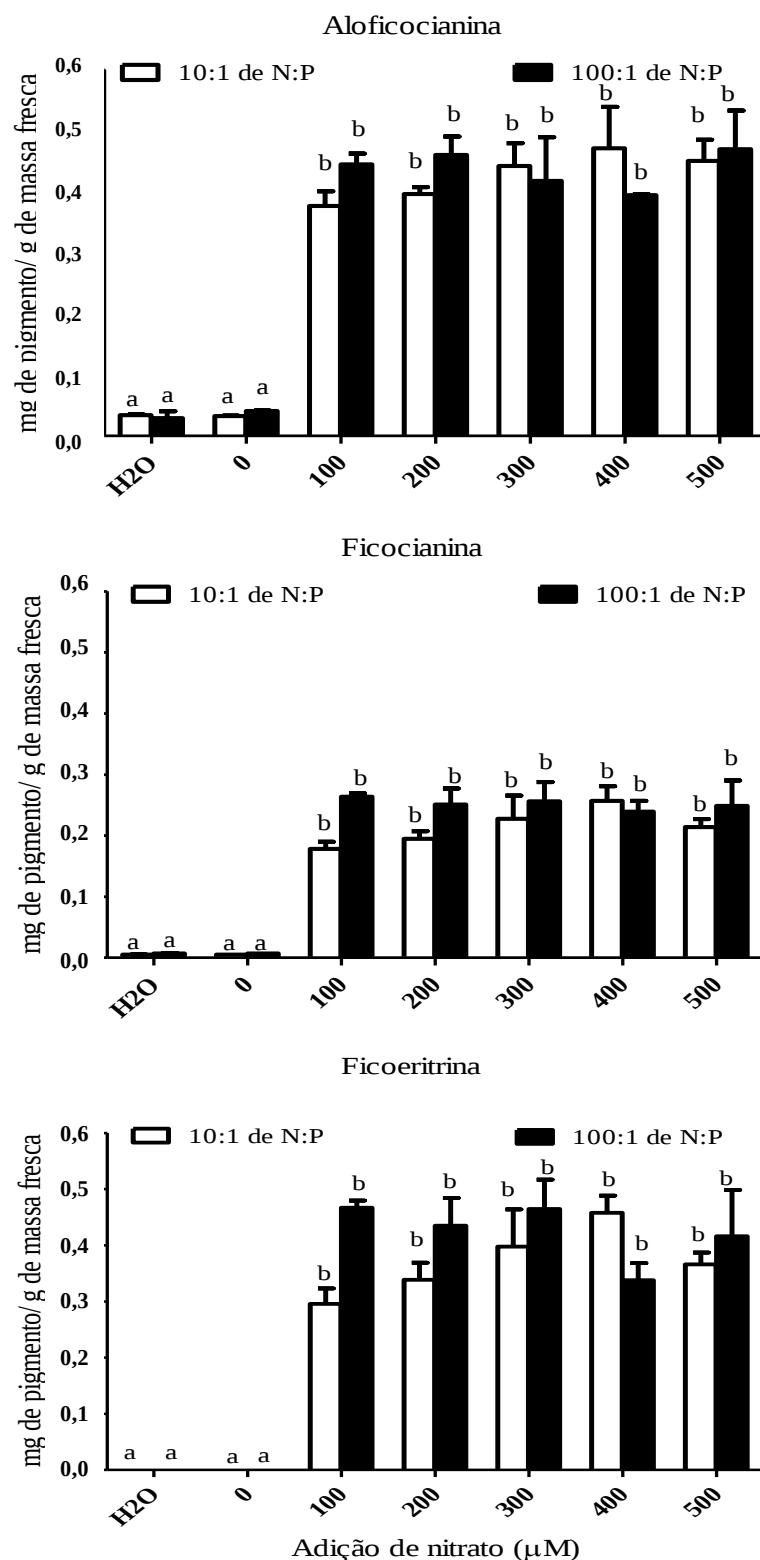


Figura 18: Conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p<0,05$).

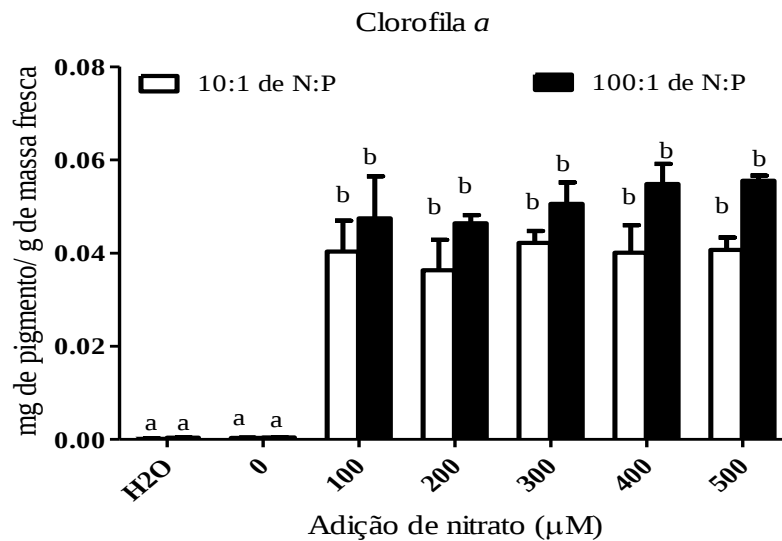


Figura 19: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

O maior CEP de talos de *Hypnea* sp. foi observado no tratamento com adição de 200 µM de nitrato na razão de 10:1 de N:P e os tratamentos com água do mar esterilizada e controle inibiram o crescimento do eixo principal (figura 20). O menor número de RP foi observado nos tratamentos controle e com água do mar esterilizada e os demais tratamentos não foram significativamente diferentes. A limitação de nitrogênio e fósforo inibiu a formação de RS (água do mar esterilizada e controle), e o maior número de RS foi observado em espécimes cultivados com adição de 200 µM em 100:1 de N:P (figura 20).

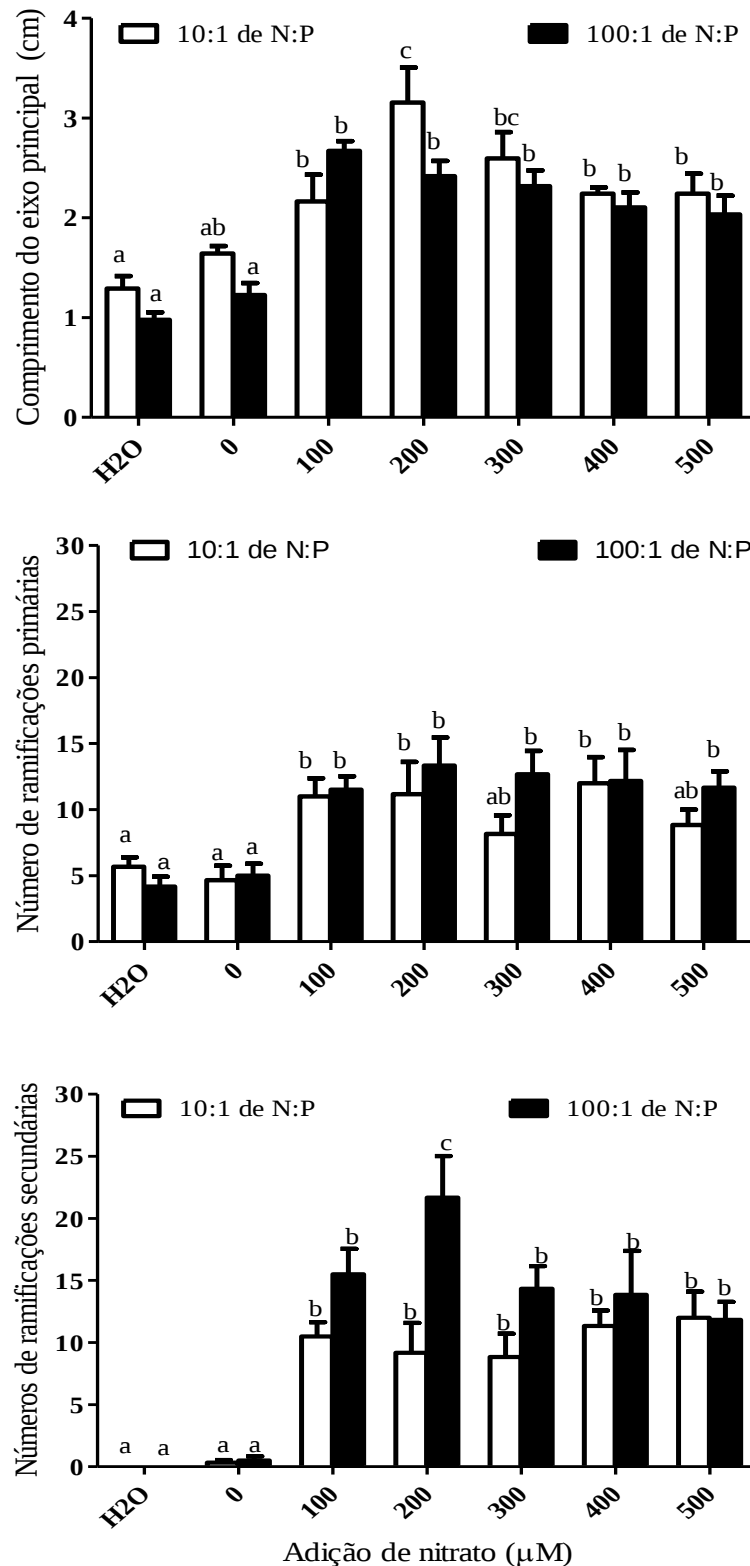


Figura 20: Efeitos de diferentes concentrações de nitrato:fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea* sp. cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

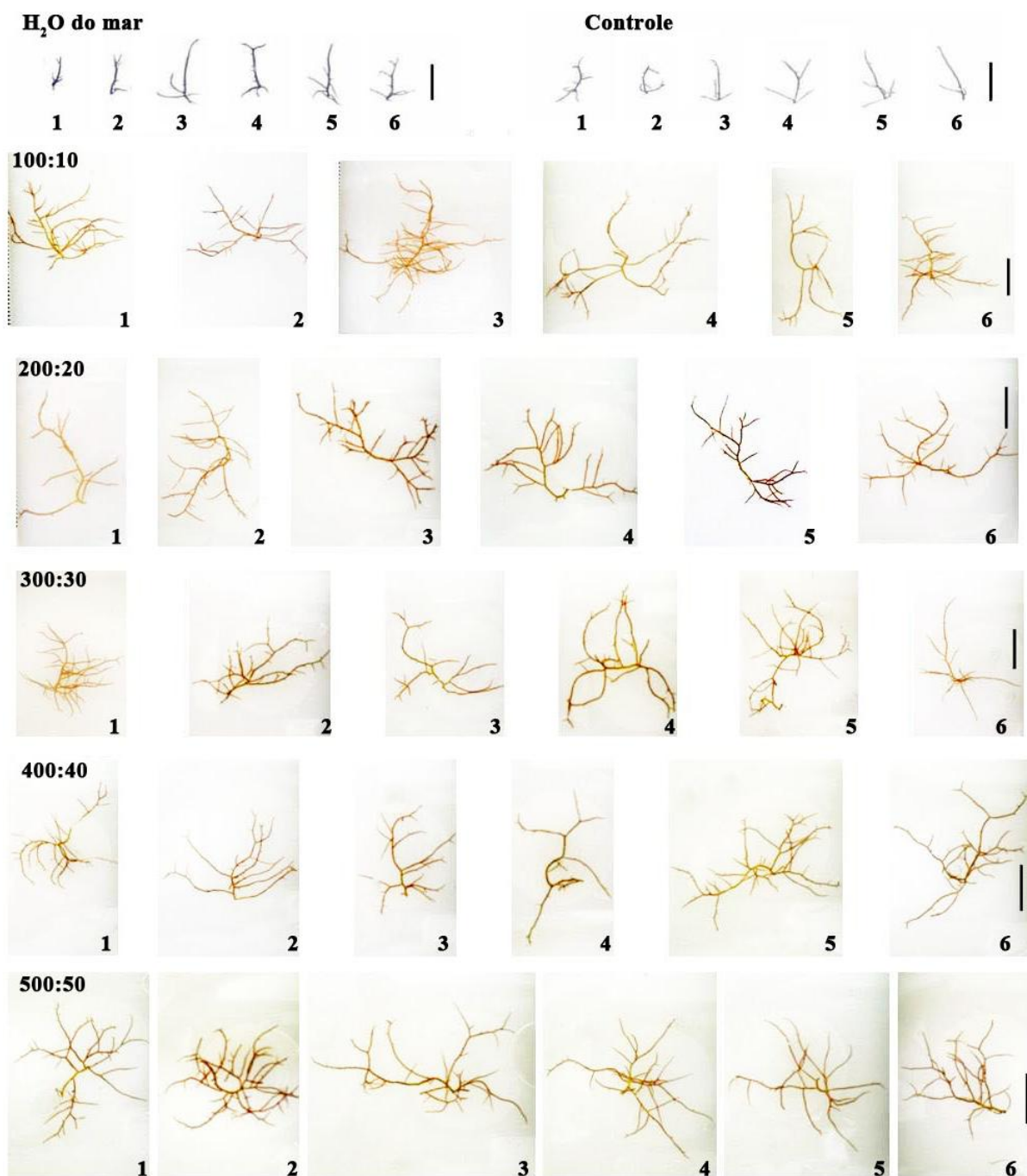


Figura 21: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.

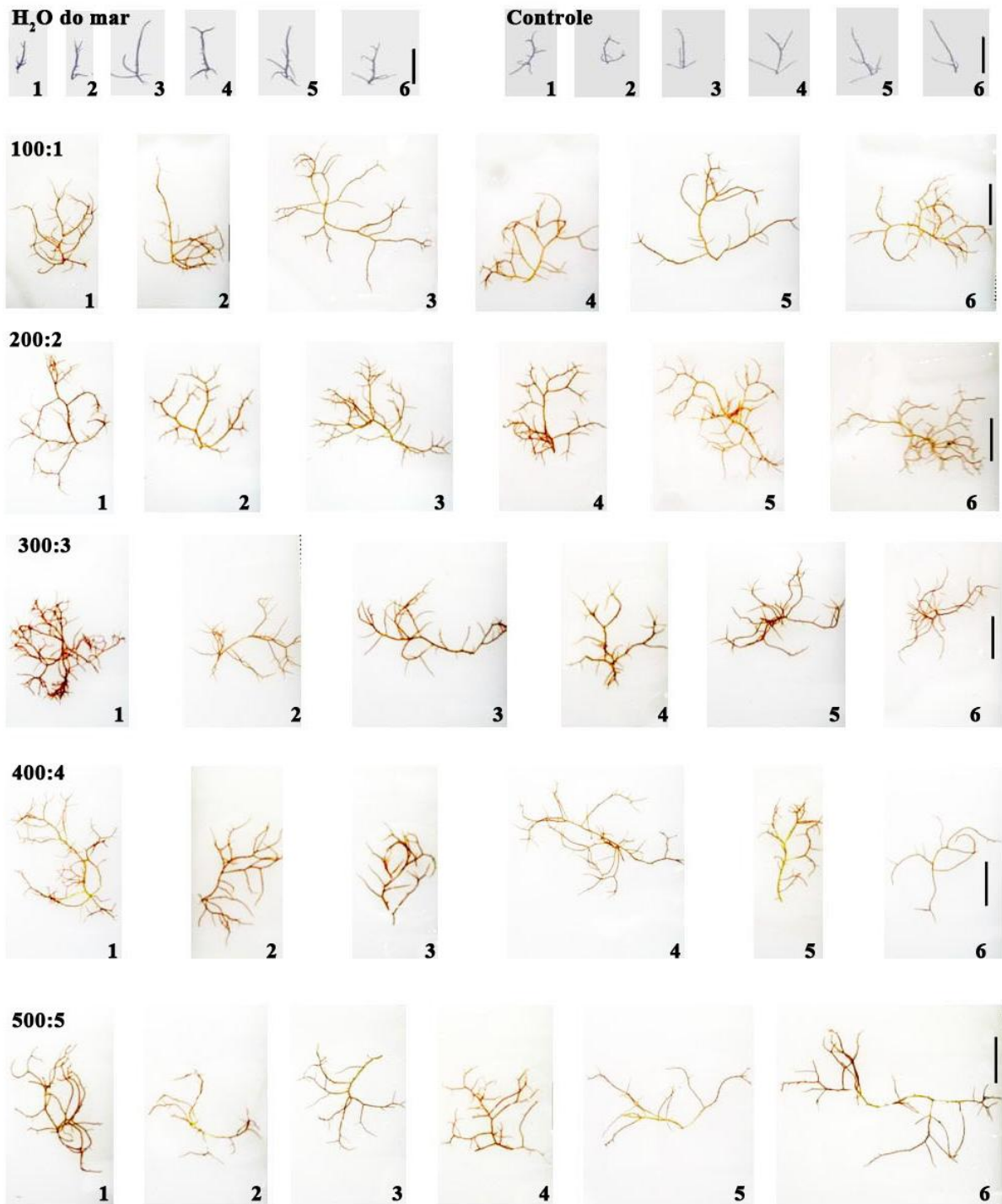


Figura 22: Aspecto geral de *Hypnea* sp. cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.

Na figura 21, é possível observar a diferença do crescimento vegetativo de *Hypnea* sp. avaliado pelo CEP, RP e RS nos tratamentos com água do mar e com meio VSES 25% com adição de nitrato e fosfato na razão de 10:1 de N:P. Os tratamentos com limitação de nitrogênio e fósforo (água do mar e controle) são apresentados na forma de negativo devido a despigmentação do talo, além de ser possível observar um menor número de RP e principalmente RS. Para os tratamentos com adição de nitrato e fosfato, os espécimes apresentaram uma coloração marrom avermelhada, maior CEP e maior formação de RP e RS.

Na figura 22, observa-se que nos tratamentos com limitação de nitrogênio e fósforo (apresentados na forma de negativo) ocorreu despigmentação do talo, menor CEP, número de RP e principalmente RS. Além disso, observa-se uma maior ramificação das algas cultivadas com adição de 100 a 300 μ M de nitrato na relação de 100:1 de N:P. As algas cultivadas com adição de 100 a 500 μ M de nitrato apresentaram uma coloração marrom avermelhada.

Foi observada uma correlação positiva significativa entre as concentrações de nitrato e fosfato e a TC, os pigmentos, o CEP, o número de RS e PT na razão de N:P 10:1 (tabela 10). Para a razão de N:P 100:1, todas as variáveis apresentaram uma correlação positiva significativa com as concentrações de nitrato e fosfato testadas (tabela 10).

Tabela 10: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea* sp. cultivadas em água do mar e em meio VSES 25% com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl a	CEP	RP	RS
Coeficiente	0,635	0,789	0,747	0,747	0,753	0,655	0,309	0,297	0,605
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,046	0,055	0,000

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl a	CEP	RP	RS
Coeficiente	0,682	0,822	0,636	0,616	0,550	0,736	0,336	0,451	0,373
p	0,000	0,000	0,002	0,003	0,010	0,000	0,030	0,003	0,015

A tabela 11 apresenta as médias e desvios padrão das variáveis analisadas de *Hypnea* sp. com adição de nitrato e fosfato na razão de N:P 10:1 e 100:1. É possível observar uma diferença significativa nas TC entre os dois tratamentos com água do mar esterilizada. O conteúdo de PT foi significativamente diferente entre 100, 300 e 500 μM , com maiores valores na razão de 10:1. As concentrações de AFC e FE foram diferentes na adição de 200 μM . A FE também apresentou diferenças significativas na adição 100 μM , assim como a FC. O CEP e RS diferiram significativamente entre os tratamentos de 200 μM , sendo que o maior CEP foi observado na razão de N:P 10:1 e o de RS em N:P 100:1. O CEP também foi significativamente diferente em água do mar esterilizada.

Tabela 11: Comparação entre média $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea* sp. cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de nitrato e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		100:10	100:1	200:20	200:2	300:30	300:3	400:40	400:4	500:50	500:5
TC (% d ⁻¹)	3,55 $\pm$ 1,19	4,80 $\pm$ 0,91	4,10 $\pm$ 0,54	3,85 $\pm$ 0,16	12,77 $\pm$ 0,25	12,62 $\pm$ 0,43	12,89 $\pm$ 0,31	12,30 $\pm$ 0,52	12,90 $\pm$ 0,28	12,26 $\pm$ 0,99	12,31 $\pm$ 0,42	12,28 $\pm$ 0,51	12,42 $\pm$ 0,87	11,78 $\pm$ 0,80
PT (mg PT/g MF)	1,04 $\pm$ 0,19	0,93 $\pm$ 0,20	0,92 $\pm$ 0,29	0,94 $\pm$ 0,08	2,29 $\pm$ 0,25	1,88 $\pm$ 0,10	2,49 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,09	4,56 $\pm$ 0,49	3,84 $\pm$ 0,13	3,32 $\pm$ 0,42	3,44 $\pm$ 0,30	3,64 $\pm$ 0,02	2,92 $\pm$ 0,36
AFC (mg pig/g MF)	0,38 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,00	0,48 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,11
FC (mg pig/g MF)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,07
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,12	0,49 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,15
Cl <i>a</i> (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
CEP (cm)	1,29 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,18	1,64 $\pm$ 0,18	1,22 $\pm$ 0,29	2,16 $\pm$ 0,65	2,67 $\pm$ 0,23	3,15 $\pm$ 0,86	2,41 $\pm$ 0,37	2,59 $\pm$ 0,64	2,31 $\pm$ 0,38	2,24 $\pm$ 0,15	2,10 $\pm$ 0,37	2,24 $\pm$ 0,49	2,03 $\pm$ 0,46
RP	5,66 $\pm$ 1,75	4,16 $\pm$ 1,83	4,66 $\pm$ 2,65	5,00 $\pm$ 2,19	11,00 $\pm$ 3,34	11,50 $\pm$ 2,50	11,16 $\pm$ 6,01	13,33 $\pm$ 5,20	8,16 $\pm$ 3,43	12,66 $\pm$ 4,36	12,00 $\pm$ 4,81	12,16 $\pm$ 5,74	8,83 $\pm$ 2,85	11,66 $\pm$ 3,01
RS	0,00	0,00	0,33 $\pm$ 0,51	0,50 $\pm$ 0,83	10,50 $\pm$ 2,81	15,50 $\pm$ 5,00	9,16 $\pm$ 5,91	21,66 $\pm$ 8,23	8,83 $\pm$ 4,62	14,33 $\pm$ 4,45	11,33 $\pm$ 3,07	13,83 $\pm$ 8,70	12,00 $\pm$ 5,17	11,83 $\pm$ 3,54

4.3 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em *Hypnea cervicornis*

H. cervicornis apresentou curvas de crescimento semelhantes em resposta aos tratamentos com água do mar e com meio VSES 25% com diferentes concentrações de amônio nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P (figura 23). A variação nas TC não apresentou uma cinética de saturação e pode ser observada uma relação proporcional entre a TC e as concentrações de amônio testadas (de água do mar à 50µM de amônio), principalmente na razão de N:P de 100:1 (figura 24). Portanto, a TC de *H. cervicornis* com adição de amônio foi maior com a adição de 50 µM de amônio na razão de 100:1 e as menores TC foram observadas nos tratamentos com água do mar esterilizada (Figura 24).

O conteúdo de PT em *Hypnea cervicornis* foi menor em água do mar esterilizada, no controle e com a adição de 10 µM de amônio em 10:1 de N:P (figura 25). O maior conteúdo de PT ocorreu na razão de 10:1 de N:P com adição de 50 µM de amônio. Na razão 100:1 de N:P, não se observou uma saturação nas concentrações de PT, sendo maior na adição de 50µM de amônio nas duas razões de N:P testadas (figura 25).

As maiores concentrações de ficobiliproteínas em *Hypnea cervicornis* foram nas formas de AFC e FE (figura 26). As maiores concentrações de AFC, FC e FE foram observadas nos tratamentos com a adição de 30µM de amônio nas duas razões de N:P testadas. As menores concentrações foram observadas nos tratamentos com água do mar, controle e adição de 10 µM, principalmente na razão de N:P de 10:1 (figura 26).

As menores concentrações de Cl *a* em *Hypnea cervicornis* foram observadas nos tratamentos com água do mar esterilizada, controle e nas adições de 10 e 20 µM de amônio nas razões de N:P de 10:1 e 100:1 (figura 27). Os maiores valores ocorreram nos tratamentos com adição de 30 a 50 µM de amônio na relação de 10:1 de N:P. Com a adição de 30µM de amônio, observou-se o maior conteúdo de clorofila *a* na razão de 100:1 de N:P (figura 27).

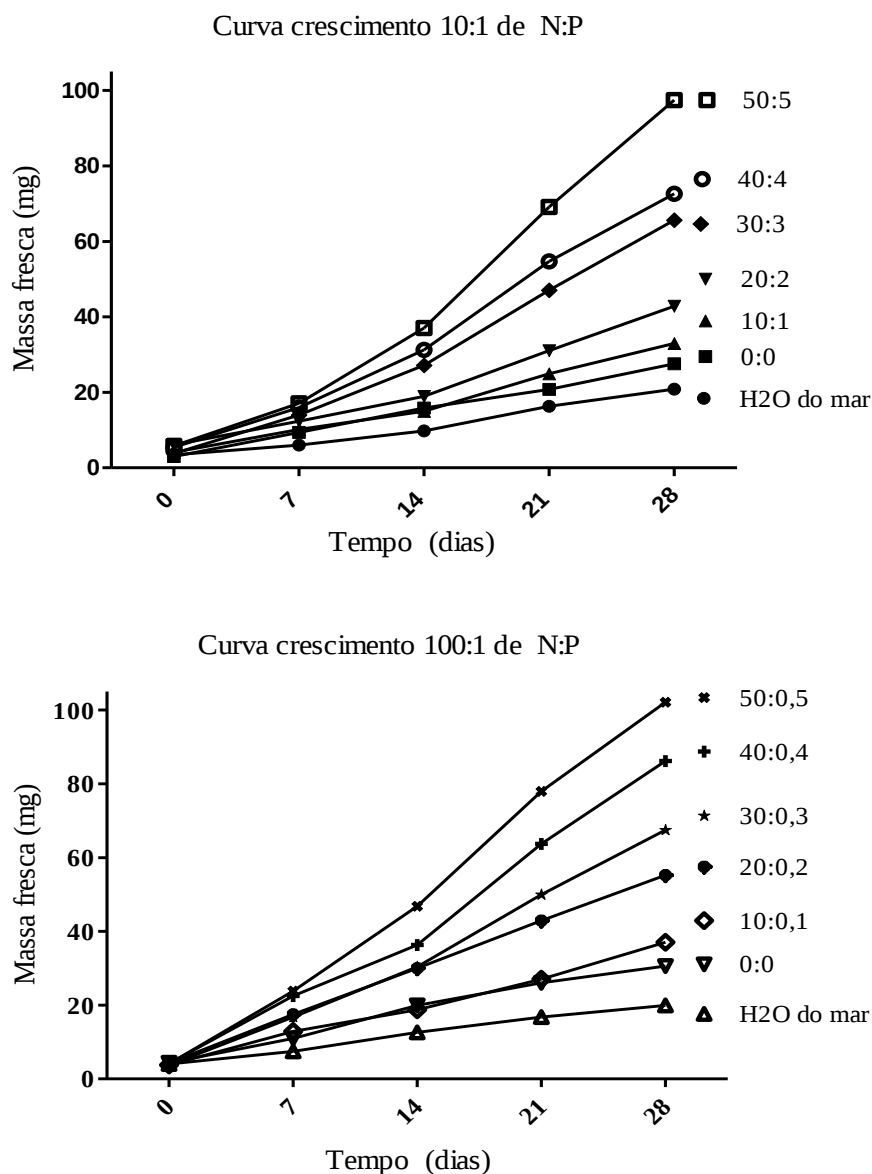


Figura 23: Curva de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).

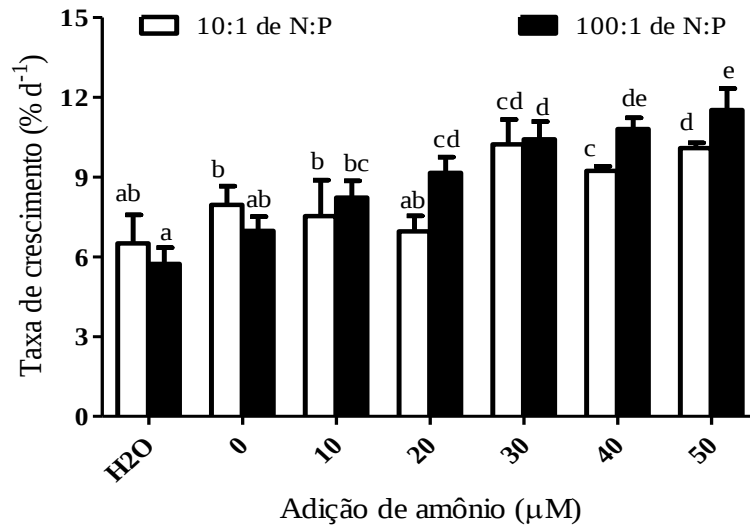


Figura 24: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

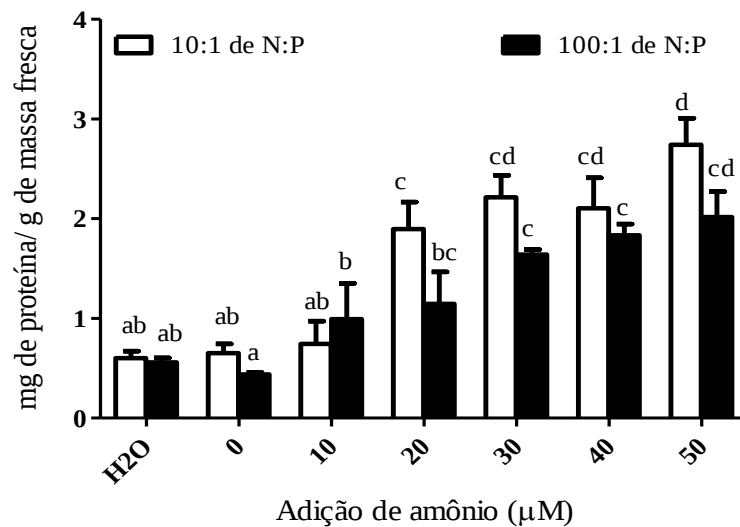


Figura 25: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

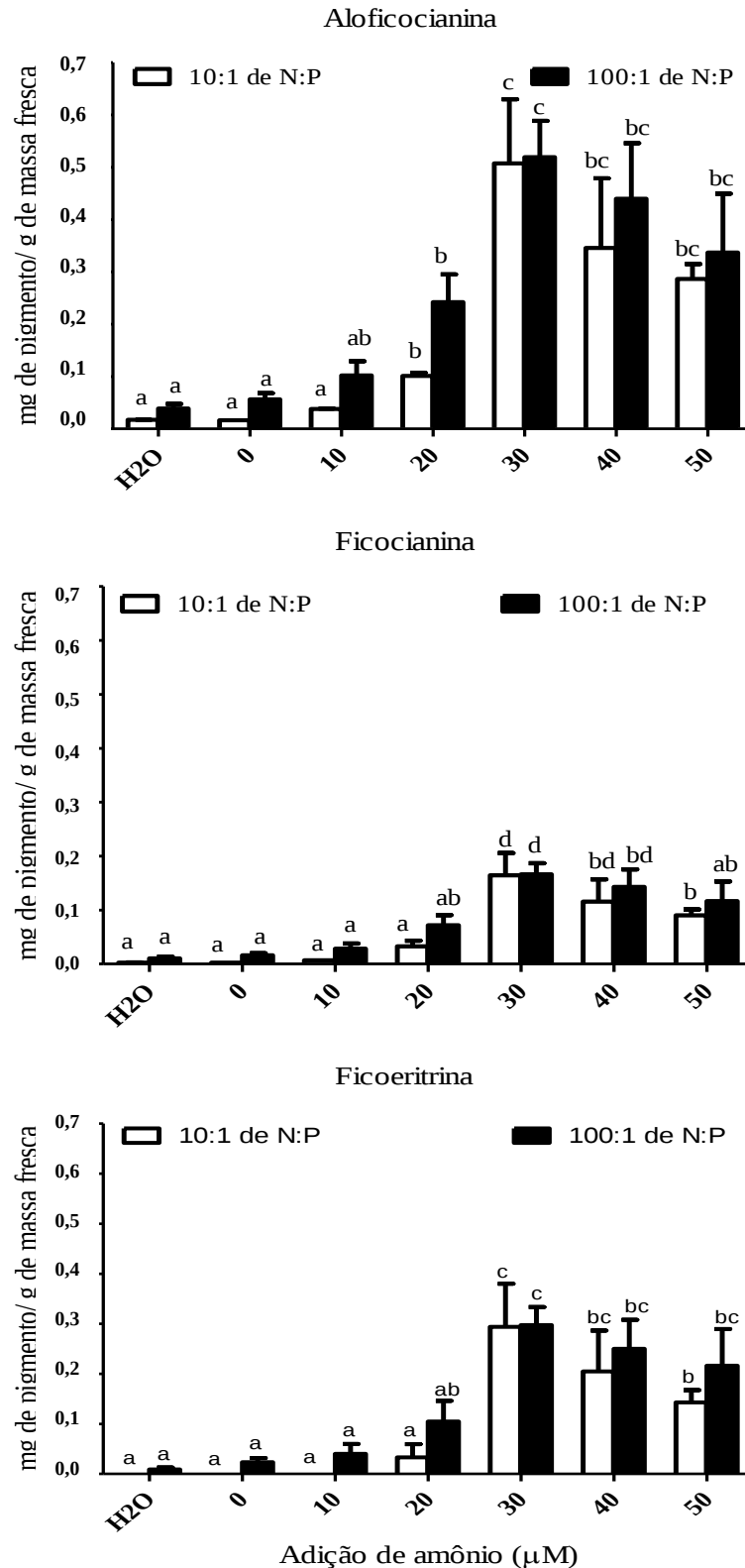


Figura 26: Variação do conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

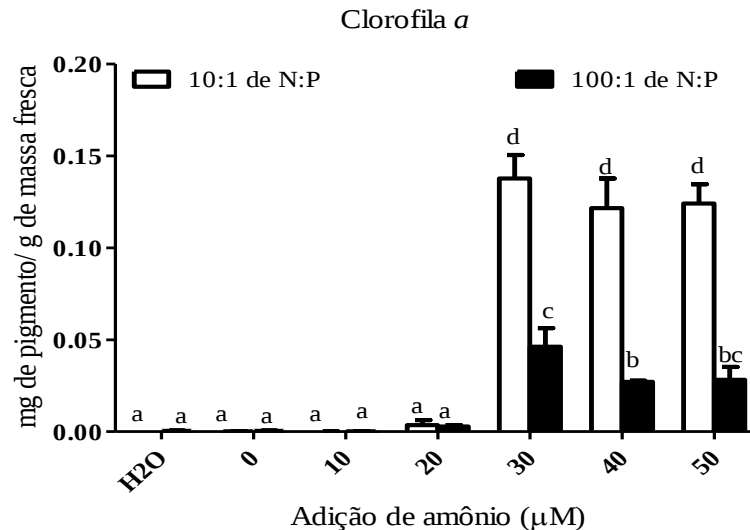


Figura 27: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

O maior CEP ocorreu com adição de 30, 40 e 50 μM de amônio em 100:1 de N:P (figura 28). Os menores valores de CEP foram observados em tratamentos com N:P de 10:1. O maior número de RP ocorreu apenas com adição de 20 μM de amônio na razão de 10:1 de N:P, e o menor valor foi observado na mesma concentração na razão N:P de 100:1 (figura 28). O número de RS foi menor no tratamento com água do mar esterilizada, e o maior valor ocorreu na razão N:P de 10:1 com adição de 20 μM de amônio (figura 28).

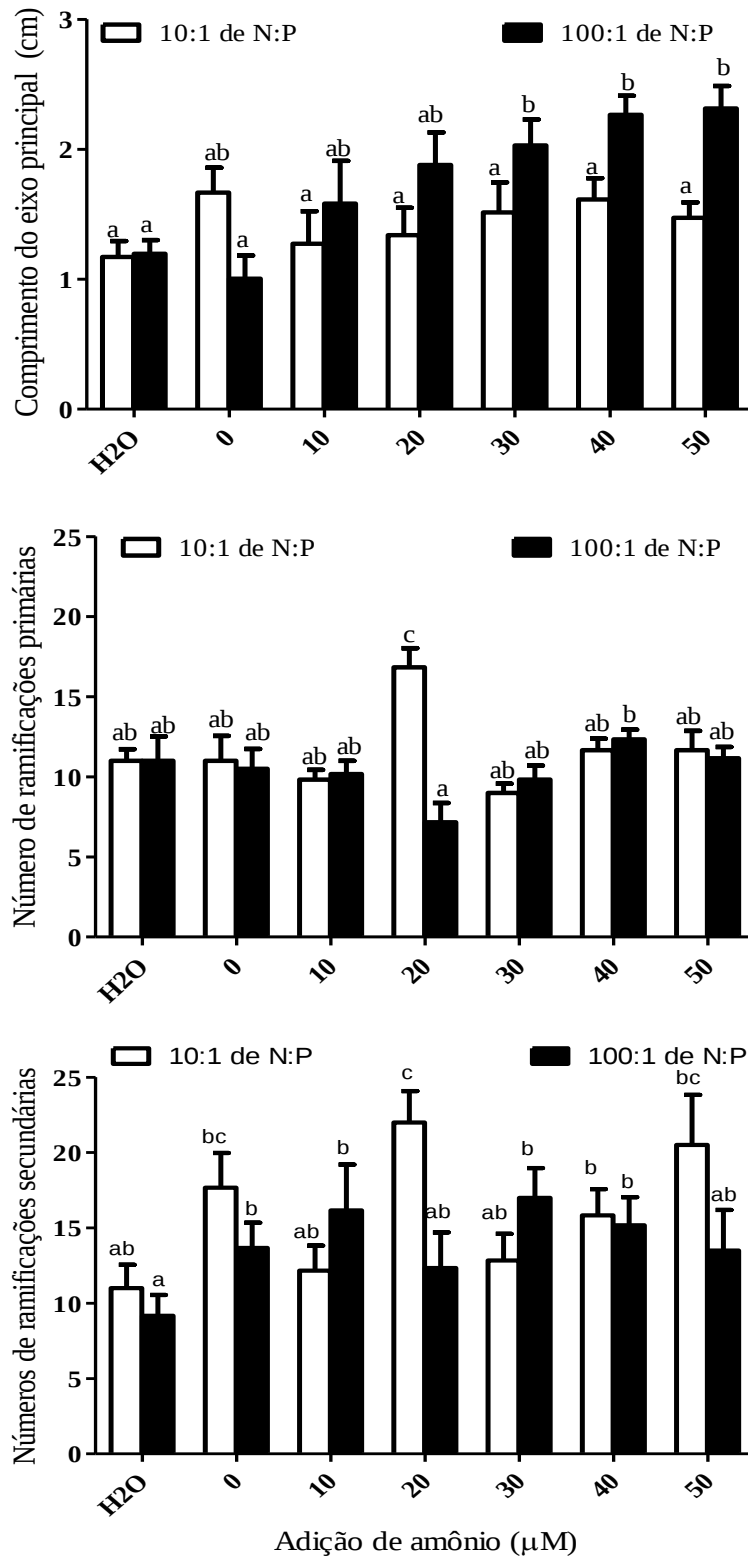


Figura 28: Efeitos de diferentes concentrações de amônio: fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

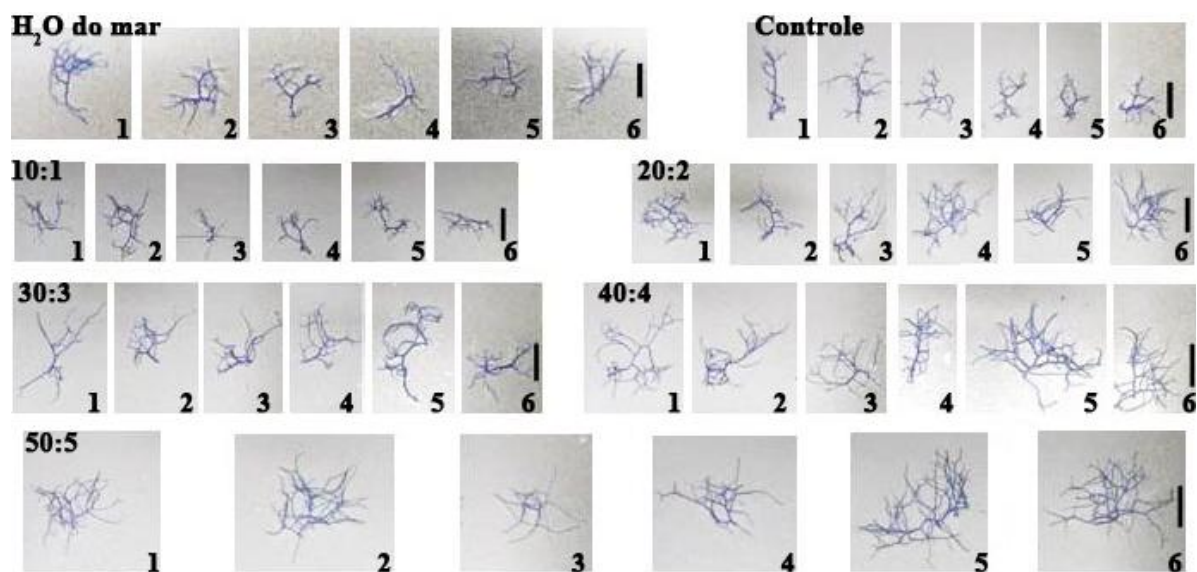


Figura 29: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos de todos os tratamentos são apresentadas na forma de negativo.

Nas figuras 29 e 30, é possível observar que em todos os tratamentos ocorreu uma despigmentação do talo de *H. cervicornis*. Ocorreu um maior comprimento do eixo principal e ramificação secundária na adição de 50:5 de amônio e fosfato (figura 29). Nos tratamentos com adição de amônio e fosfato na razão de 100:1, observa-se principalmente a diferença do comprimento do eixo principal (figura 30).

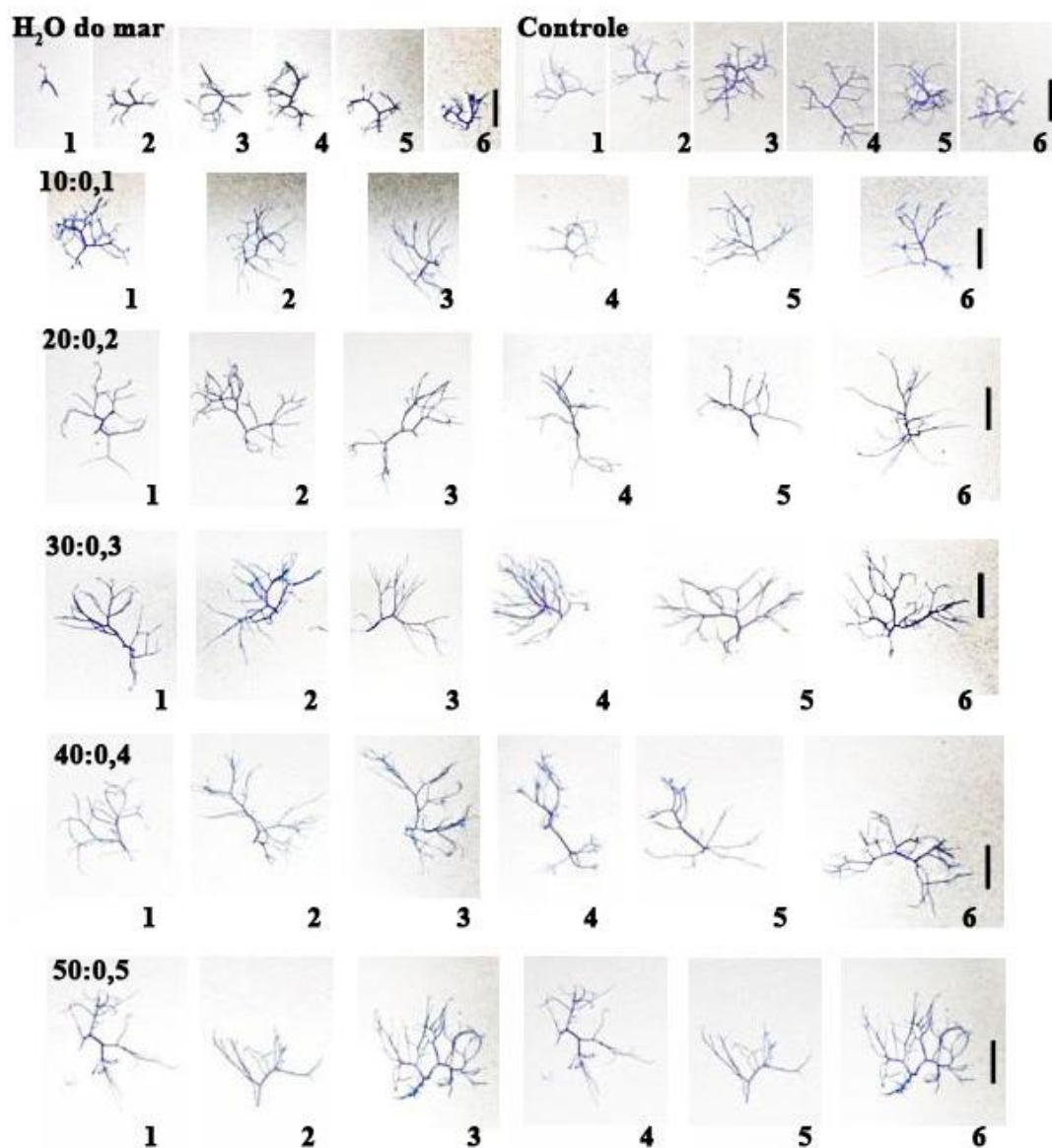


Figura 30: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos de todos os tratamentos s\~ao apresentadas na forma de negativo.

Foram observadas correlações positivas entre as adições de amônio e fosfato e PT, AFC, FC, FE e Cl *a* para os tratamentos com as razões N:P de 10:1 e 100:1 (Tabela 12). As demais variáveis não foram correlacionadas significativamente com as concentrações de amônio e fosfato.

Tabela 12: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea cervicornis* cultivadas em água do mar e em meio VSES 25% com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,131	0,882	0,676	0,680	0,635	0,837	-0,191	-0,054	-0,223
p	0,405	0,000	0,001	0,001	0,002	0,000	0,224	0,730	0,155

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,197	0,864	0,735	0,763	0,762	0,705	0,103	0,192	-0,295
p	0,209	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,949	0,223	0,058

A tabela 13 apresenta as médias e os desvios padrão das variáveis analisadas em *H. cervicornis* em tratamentos com adições de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P. Ocorreu uma diferença entre as TC e o RP com adição de 20µM, sendo a TC maior em 100:1 e RP maior em 10:1 de N:P. A TC também teve diferenças significativas nas adições de 40 e 50µM e também foi maior em 100:1 de N:P. O conteúdo de Cl *a* foi significativamente diferente nos tratamentos com 30 a 50µM e os valores foram maiores em 10:1 de N:P.

Tabela 13: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea cervicornis* cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de nitrogênio:fósforo em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de amônio e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		10:1	10:0,1	20:2	20:0,2	30:3	30:0,3	40:4	40:0,4	50:5	50:0,5
TC (% d ⁻¹)	6,51 $\pm$ 1,07	5,73 $\pm$ 0,61	7,95 $\pm$ 0,71	6,97 $\pm$ 0,54	7,53 $\pm$ 1,35	8,22 $\pm$ 0,63	6,95 $\pm$ 0,58	9,15 $\pm$ 0,59	10,23 $\pm$ 0,92	10,41 $\pm$ 0,66	9,23 $\pm$ 0,17	10,80 $\pm$ 0,42	10,09 $\pm$ 0,20	11,52 $\pm$ 0,80
PT (mg PT/g MF)	0,55 $\pm$ 0,13	0,55 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,16	0,43 $\pm$ 0,34	0,74 $\pm$ 0,39	0,99 $\pm$ 0,62	1,89 $\pm$ 0,46	1,14 $\pm$ 0,55	2,21 $\pm$ 0,38	1,63 $\pm$ 0,08	2,10 $\pm$ 0,53	1,83 $\pm$ 0,19	1,52 $\pm$ 0,38	1,76 $\pm$ 0,01
AFC (mg pig/g MF)	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,21	0,51 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,23	0,43 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,19
FC (mg pig/g MF)	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,06
FE (mg pig/g MF)	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,14	0,29 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,14	0,24 $\pm$ 0,10	0,14 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,12
Cl <i>a</i> (mg pig/g MF)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
CEP (cm)	1,17 $\pm$ 0,29	1,19 $\pm$ 0,25	1,66 $\pm$ 0,47	1,00 $\pm$ 0,43	1,27 $\pm$ 0,61	1,58 $\pm$ 0,80	1,34 $\pm$ 0,51	1,88 $\pm$ 0,61	1,51 $\pm$ 0,56	2,03 $\pm$ 0,48	1,61 $\pm$ 0,40	2,26 $\pm$ 0,36	1,47 $\pm$ 0,28	2,31 $\pm$ 0,42
RP	11,00 $\pm$ 1,78	11,00 $\pm$ 3,74	11,00 $\pm$ 3,79	10,50 $\pm$ 3,01	9,83 $\pm$ 1,47	10,16 $\pm$ 2,04	16,83 $\pm$ 2,92	7,16 $\pm$ 2,92	9,00 $\pm$ 1,41	9,83 $\pm$ 2,13	11,66 $\pm$ 1,75	12,33 $\pm$ 1,50	11,66 $\pm$ 2,94	11,16 $\pm$ 1,72
RS	11,00 $\pm$ 3,79	9,16 $\pm$ 3,37	17,66 $\pm$ 5,64	13,66 $\pm$ 4,13	12,16 $\pm$ 4,07	16,16 $\pm$ 7,44	22,00 $\pm$ 5,09	12,33 $\pm$ 5,81	12,83 $\pm$ 4,35	17,00 $\pm$ 4,81	15,83 $\pm$ 4,26	15,16 $\pm$ 4,57	20,50 $\pm$ 8,16	13,5 $\pm$ 6,59

4.4 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em *Hypnea cervicornis*

As curvas de crescimento e as TC de *H. cervicornis* foram maiores nos tratamentos com adição de nitrato e fosfato nas concentrações de 100 a 500 μM e menores nos tratamentos com limitação de nutrientes, como em água do mar e controle (figuras 31-32). Nos tratamentos com a razão N:P de 100:1, observou-se um menor crescimento no tratamento com 100:1 μM e, em geral, as TC foram menores quando comparadas aos tratamentos com N:P de 10:1 (figura 32).,

As menores concentrações de PT foram observadas em espécimes de *H. cervicornis* cultivadas nos tratamentos com limitação de nutrientes (água do mar esterilizada e controle) e maiores nos tratamentos com adição de nitrato:fosfato (figura 33). O conteúdo de PT atingiu a saturação com 100 μM de nitrato na razão N:P de 100:1, e 200 μM de nitrato para a razão N:P de 10:1 (figura 33).

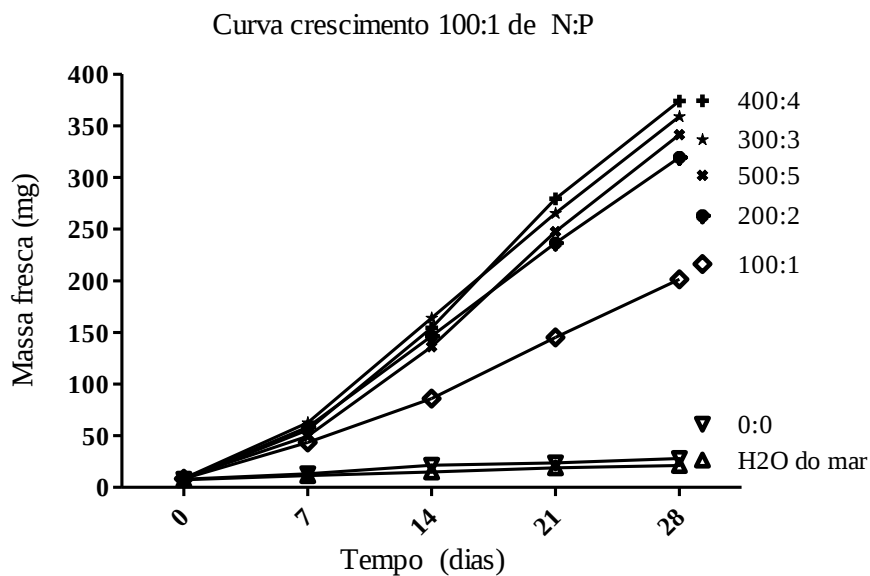
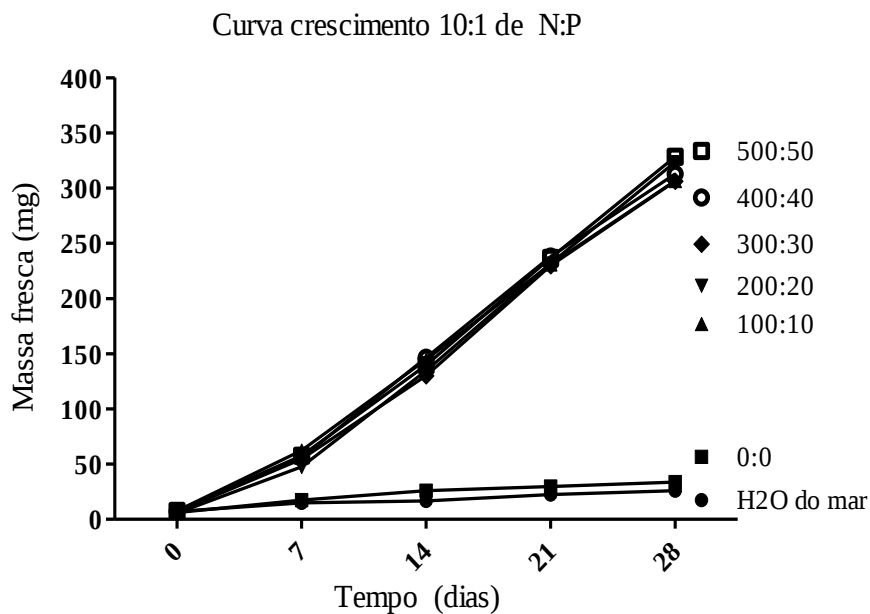


Figura 31: Curva de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivada por 28 dias em água do mar e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).

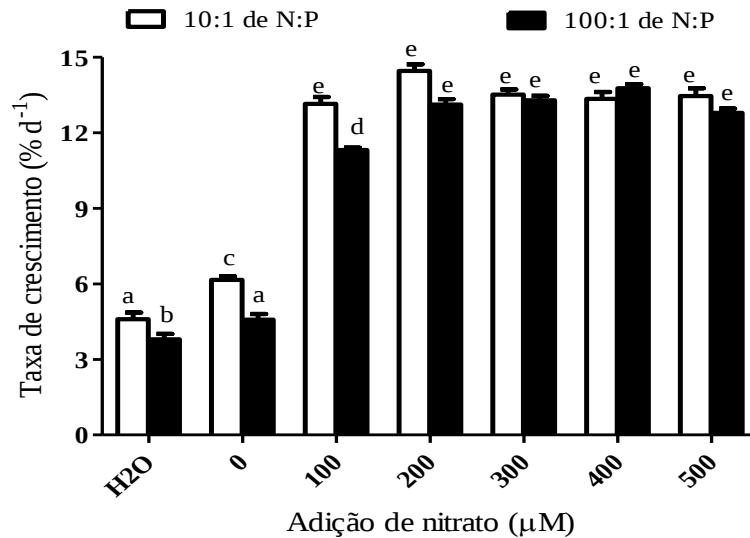


Figura 32: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 28 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

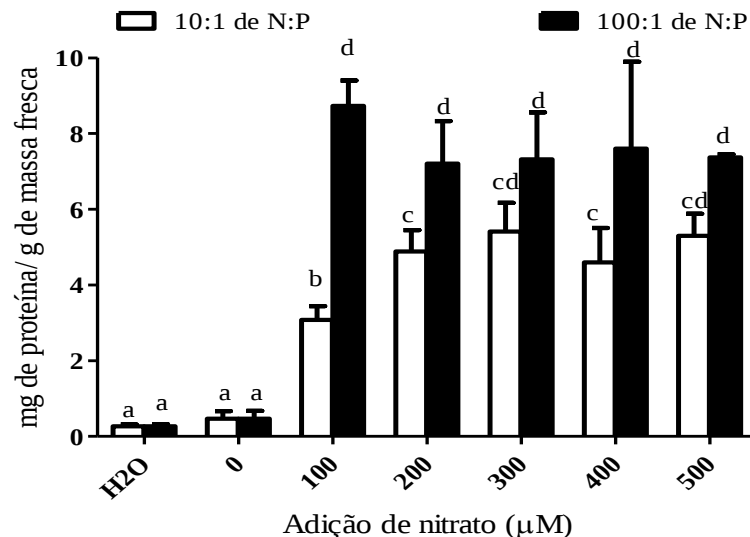


Figura 33: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

O maior conteúdo de pigmentos em *Hypnea cervicornis* ocorreu principalmente na forma de FE, quando comparada com os demais pigmentos, e a Cl *a* apresentou a menor concentração (figuras 34 e 35). As menores concentrações de AFC, FC e FE foram observadas nos tratamentos com limitação de nitrato:fosfato e as maiores concentrações foram observadas nos tratamentos com adição de nitrato:fosfato (figura 34). Entretanto, as concentrações ótimas de nitrato variaram conforme o tipo de pigmento e a razão N:P. As maiores concentrações de AFC e de FC foram observadas nos tratamentos com 400 µM de nitrato nas razões N:P de 10:1. Os espécimes de *H. cervicornis* cultivados nos tratamentos com água do mar e controle apresentaram conteúdo de FE abaixo do limite de detecção do método (figura 34). O conteúdo de FE atingiu a saturação com a adição de 100 µM de nitrato na razão de 100:1 de N:P. Já na razão de 10:1, o conteúdo de FE apresentou o maior valor com a adição de 400 e 500 µM de nitrato (figura 34).

Os maiores valores de Cl *a* foram observados em espécimes de *H. cervicornis* cultivados com adição de N:P na razão de 10:1 do que aqueles cultivados com adição de nitrato:fosfato de 100:1 (figura 35).

Em relação a morfometria, *Hypnea cervicornis* apresentou maiores valores de CEP no tratamento com adição de 200 µM de nitrato na razão N:P de 100:1 e os menores valores foram observados em espécimes cultivados nos tratamentos com limitação de nitrato e fosfato (figura 36). O maior número de RP foi observado em espécimes cultivados em água do mar esterilizada e nas adições de 500 µM de nitrato na razão de 10:1 de N:P. Para o número de RS, os menores e maiores valores foram observados, respectivamente, em espécimes cultivados no tratamento controle e com adição de 500 µM de nitrato na razão de 10:1 (figura 36).

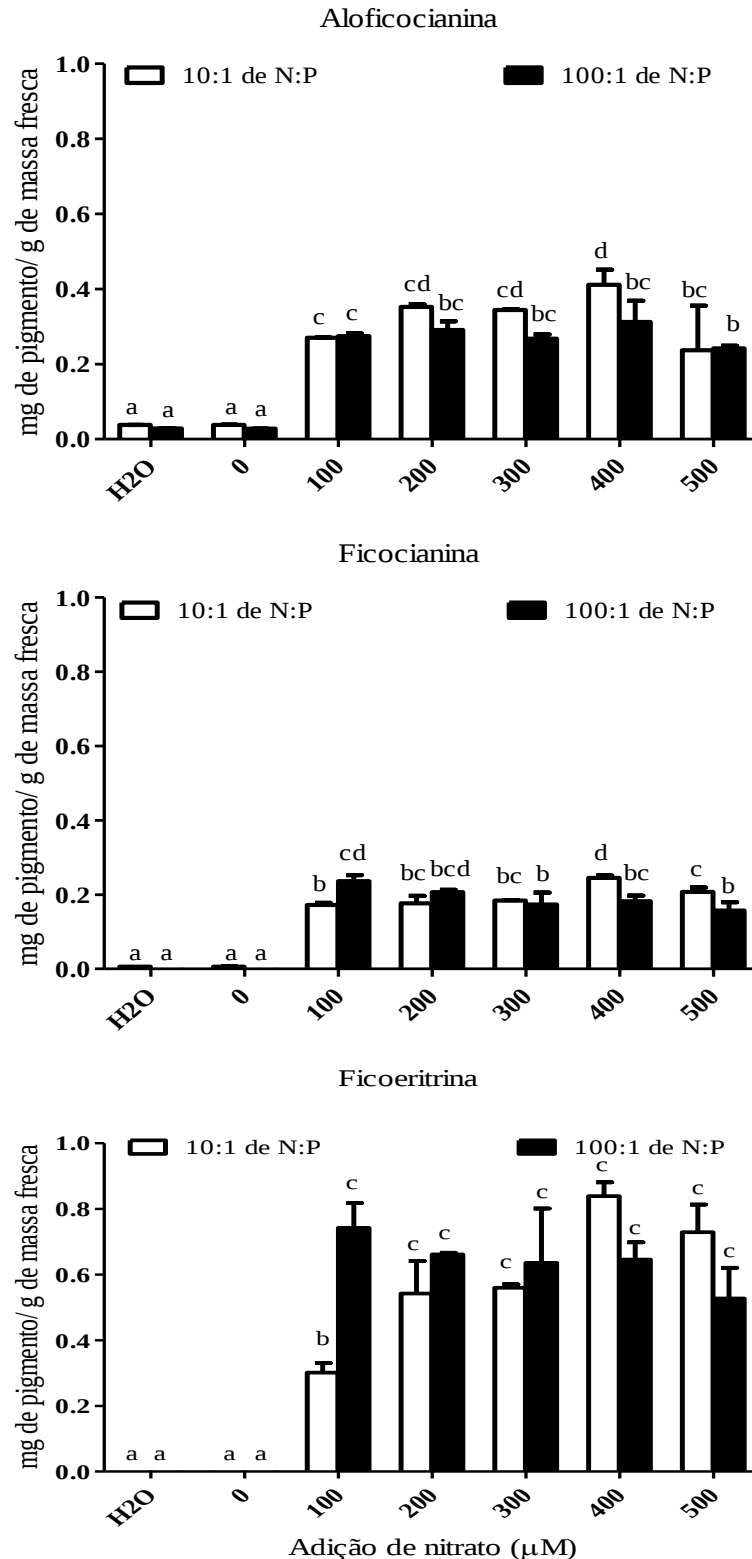


Figura 34: Conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina em *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H2O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média ($n=3 \pm$ desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

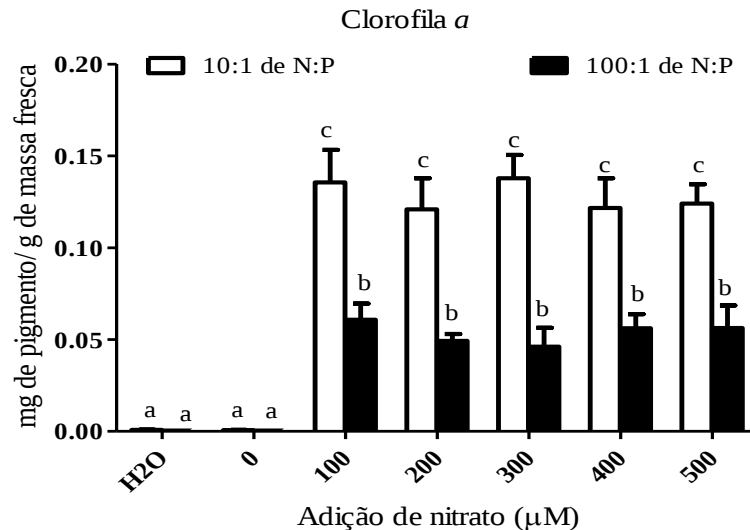


Figura 35: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

As figuras 37 e 38 apresentam as variações do CEP, RP, RS e da coloração do talo de *H. cervicornis* expostas a diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões N:P de 10:1 e 100:1. Observou-se uma despigmentação dos talos de *H. cervicornis* nos tratamentos com limitação de nitrato e fosfato (figura 37). No tratamento com adição de 100:10 μM, os talos apresentaram uma coloração amarelada. Com o aumento das concentrações de N:P, o talo apresentou um aspecto mais saudável e com coloração marrom avermelhada nos tratamentos com adição de nitrato:fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 (figuras 37-38).

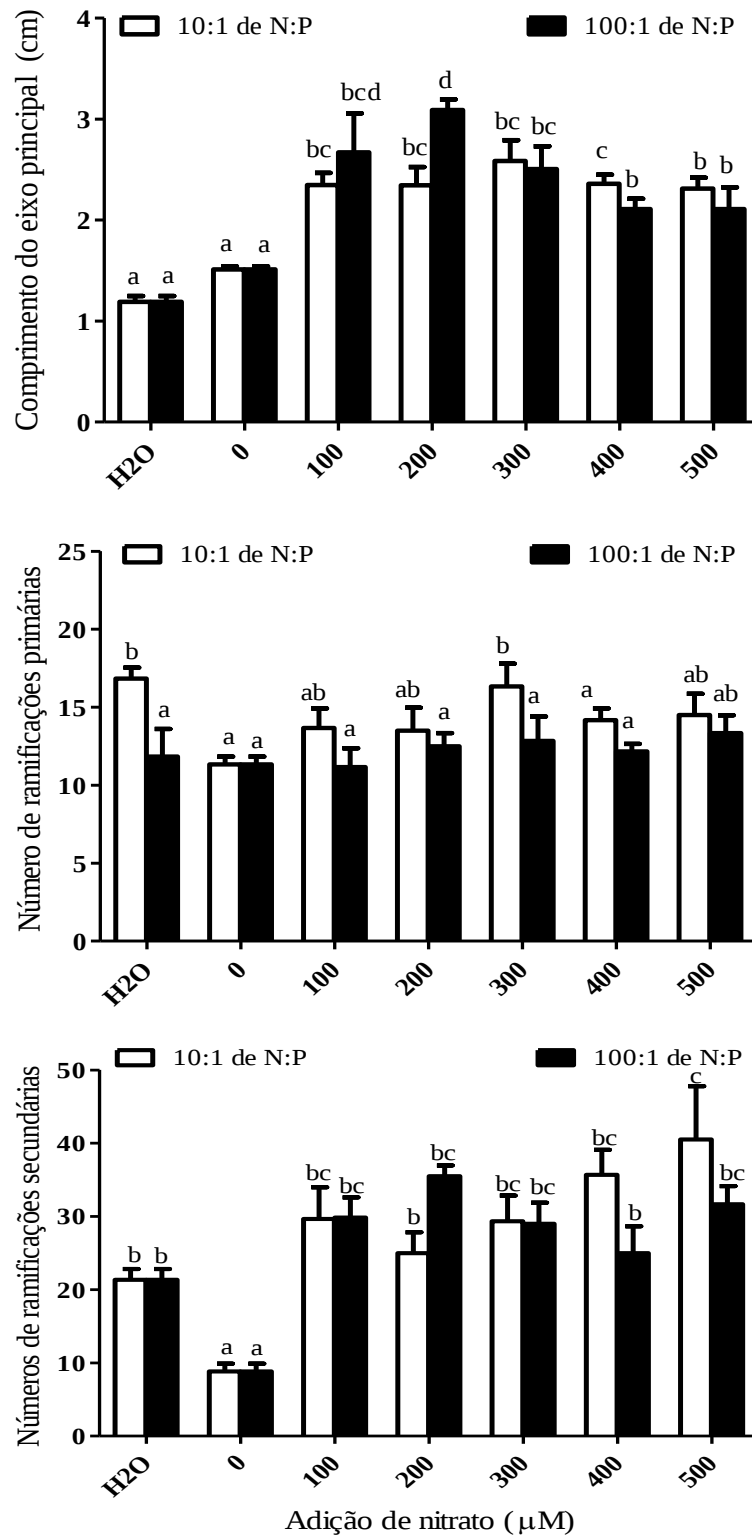


Figura 36: Efeitos da adição de nitrato:fosfato no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea cervicornis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻²s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

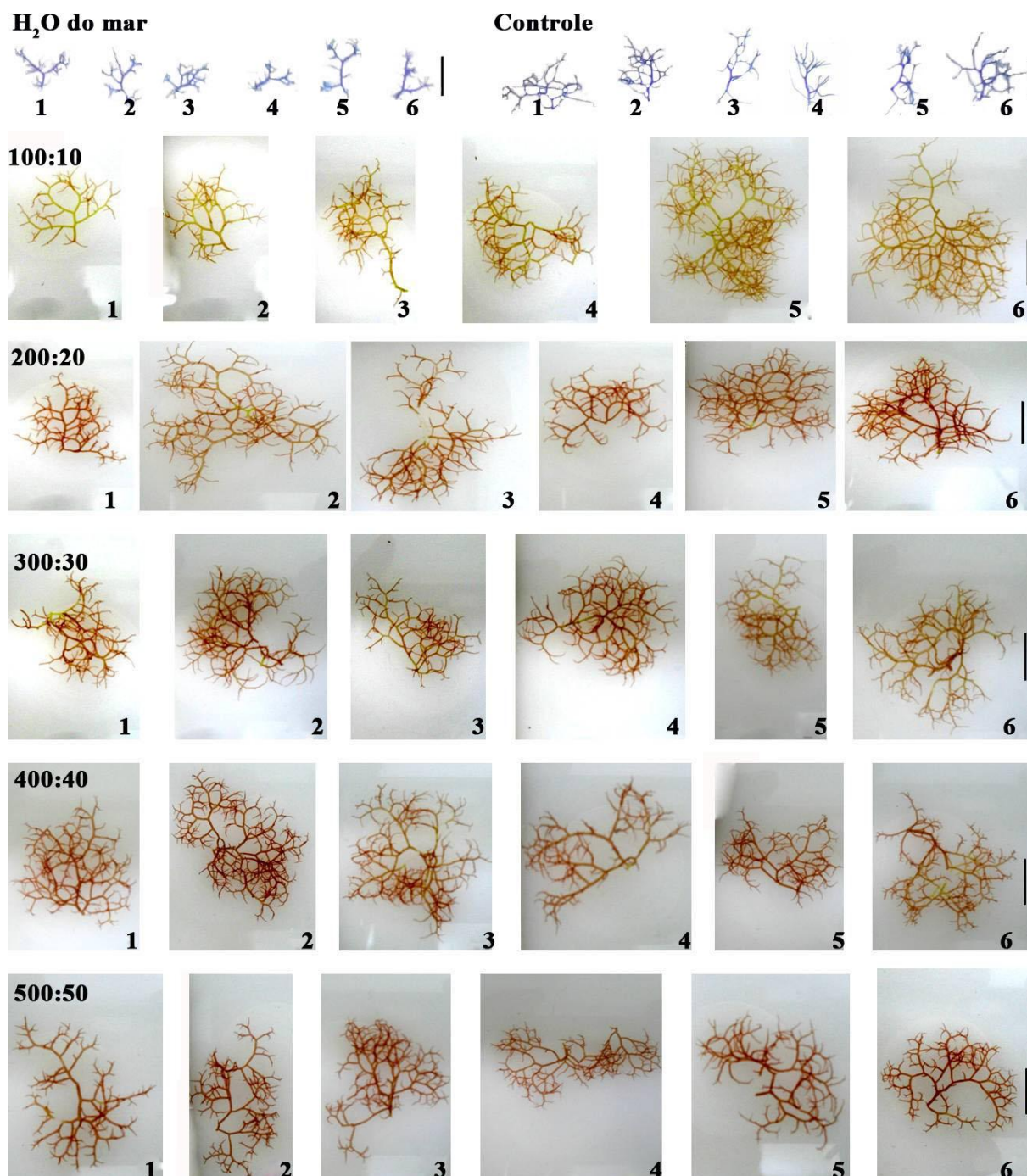


Figura 37: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos talos cultivados com água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.

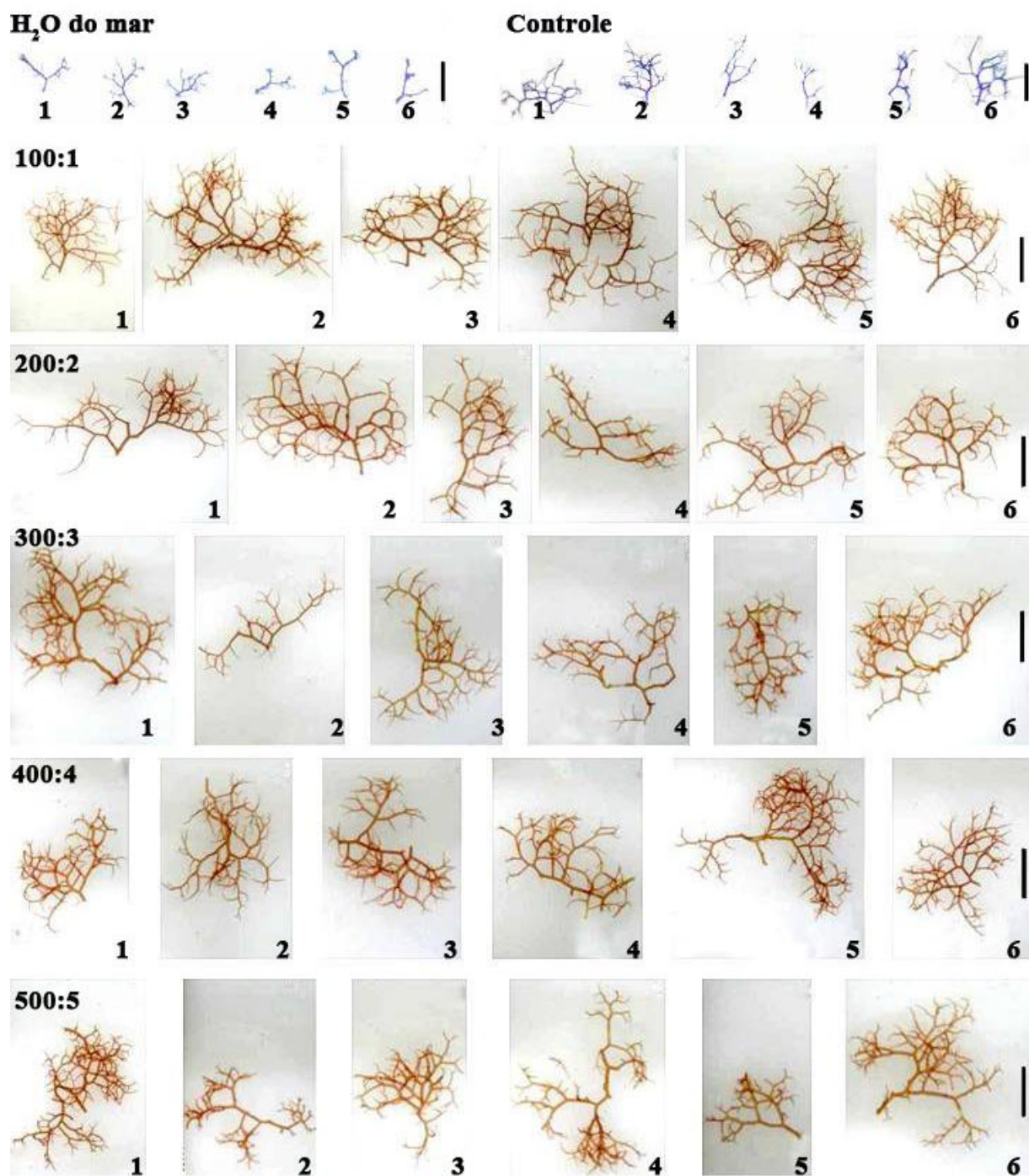


Figura 38: Aspecto geral de *Hypnea cervicornis* cultivada por 32 dias em diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a $90 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos talos cultivados com \u00e1gua do mar e do controle s\u00e3o apresentadas na forma de negativo.

A tabela 14 apresenta as correlações de Pearson para os tratamentos com adição de nitrato: fosfato em 10:1 e 100:1. Houve uma correlação significativa positiva entre as concentrações de nitrato e fosfato em 10:1 e 100:1 de N:P e a TC, PT, pigmentos, CEP e RS.

Tabela 14: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea cervicornis* cultivadas em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl a	CEP	RP	RS
Coeficiente	0,933	0,867	0,865	0,866	0,924	0,724	0,802	0,044	0,634
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,780	0,000

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl a	CEP	RP	RS
Coeficiente	0,981	0,874	0,877	0,824	0,815	0,710	0,858	-0,252	0,654
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,000

A tabela 15 apresenta uma comparação entre as médias obtidas para as variáveis de *Hypnea cervicornis* cultivada com adição de nitrato:fosfato nas razões 10:1 e 100:1. As concentrações de PT e de Cl a foram significativamente maiores nos tratamentos com adição de 100 a 500 μM na razão de 100:1 de N:P quando comparada a razão N:P de 10:1. O conteúdo de AFC e FC foi maior nos tratamentos com 400 e 500 μM em 100:1 de N:P. O conteúdo de FE foi maior na concentração de nitrato de 100 μM de nitrato também na razão de 100:1, e o CEP dos talos de *H. cervicornis* foi maior com adição de 200 μM (tabela 15).

Tabela 15: Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea cervicornis* cultivada dias em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de nitrato e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		100:10	100:1	200:20	200:2	300:30	300:3	400:40	400:4	500:50	500:5
TC (% d ⁻¹)	4,60 $\pm$ 0,64	3,80 $\pm$ 0,51	6,15 $\pm$ 0,34	4,58 $\pm$ 0,55	13,15 $\pm$ 0,66	11,31 $\pm$ 0,22	14,45 $\pm$ 0,66	13,12 $\pm$ 0,53	13,51 $\pm$ 0,49	13,28 $\pm$ 0,45	13,34 $\pm$ 0,66	13,77 $\pm$ 0,40	13,46 $\pm$ 0,77	12,79 $\pm$ 0,42
PT (mg PT/g MF)	0,26 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,20	0,46 $\pm$ 0,20	3,07 $\pm$ 0,36	8,73 $\pm$ 0,67	4,88 $\pm$ 0,56	7,20 $\pm$ 1,11	5,41 $\pm$ 0,75	7,32 $\pm$ 1,24	4,59 $\pm$ 0,90	7,60 $\pm$ 2,29	4,99 $\pm$ 0,37	7,35 $\pm$ 0,12
AFC (mg pig/g MF)	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,27 $\pm$ 0,00	0,27 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,09	0,35 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,01
FC (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,03
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,13	0,54 $\pm$ 0,23	0,66 $\pm$ 0,00	0,55 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,28	0,83 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,09	0,72 $\pm$ 0,14	0,52 $\pm$ 0,16
Cl <i>a</i> (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02
CEP (cm)	1,19 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,13	1,51 $\pm$ 0,07	1,51 $\pm$ 0,07	2,34 $\pm$ 0,29	2,67 $\pm$ 0,94	2,34 $\pm$ 0,44	3,09 $\pm$ 0,25	2,58 $\pm$ 0,50	2,50 $\pm$ 0,55	2,36 $\pm$ 0,22	2,10 $\pm$ 0,25	2,31 $\pm$ 0,25	2,10 $\pm$ 0,53
RP	11,33 $\pm$ 1,21	16,83 $\pm$ 1,72	13,66 $\pm$ 3,07	11,33 $\pm$ 1,21	13,50 $\pm$ 3,61	11,16 $\pm$ 2,92	16,33 $\pm$ 3,55	12,5 $\pm$ 2,07	16,33 $\pm$ 3,55	12,83 $\pm$ 3,86	14,16 $\pm$ 1,83	12,16 $\pm$ 1,16	14,50 $\pm$ 3,33	13,33 $\pm$ 2,80
RS	21,33 $\pm$ 3,61	21,33 $\pm$ 3,61	8,83 $\pm$ 2,63	8,83 $\pm$ 2,63	29,66 $\pm$ 10,6	29,83 $\pm$ 6,76	25,00 $\pm$ 6,95	35,5 $\pm$ 3,61	29,33 $\pm$ 8,64	25,00 $\pm$ 7,09	35,66 $\pm$ 8,43	31,66 $\pm$ 8,94	40,50 $\pm$ 17,86	31,66 $\pm$ 6,08

4.5 Efeitos da disponibilidade de amônio e fosfato em *Hypnea musciformis*

Hypnea musciformis apresentou um crescimento maior quando cultivada com altas concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 e um menor crescimento nos tratamentos com limitação de nutrientes (figura 39). Foi observado uma aumento nas TC com o aumento das concentrações de amônio, nas duas razões de N:P (figura 40).

O conteúdo de PT foi significativamente maior em espécimes de *H. musciformis* cultivados com adição de 50:5 μM de amônio: fosfato, e os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas (figura 41).

As maiores concentrações de AFC, FC, FE e Cl *a* foram observadas nos tratamentos com adição de amônio:fosfato nas razões 10:1 e 100:1 e as menores concentrações foram observadas nos tratamentos com limitação de nutrientes (figuras 42-43). Entre as ficobliproteínas, o maior conteúdo foi de FE, entretanto os tratamentos com adição de amônio (de 10 à 50 μM) nas duas razões de N:P testadas não apresentaram diferenças significativas (figura 42). As maiores concentrações de AFC e foram observadas nos tratamentos com adição de 10 e 50 μM de amônio na razão N:P de 100:1 e em 40 μM de amônio na razão N:P de 10:1 (figura 42). A concentração de Cl *a* aumentou com o aumento das concentrações de amônio:fosfato, sendo maiores com a maior disponibilidade de fosfato, isto é, na razão N:P de 10:1 (figura 43).

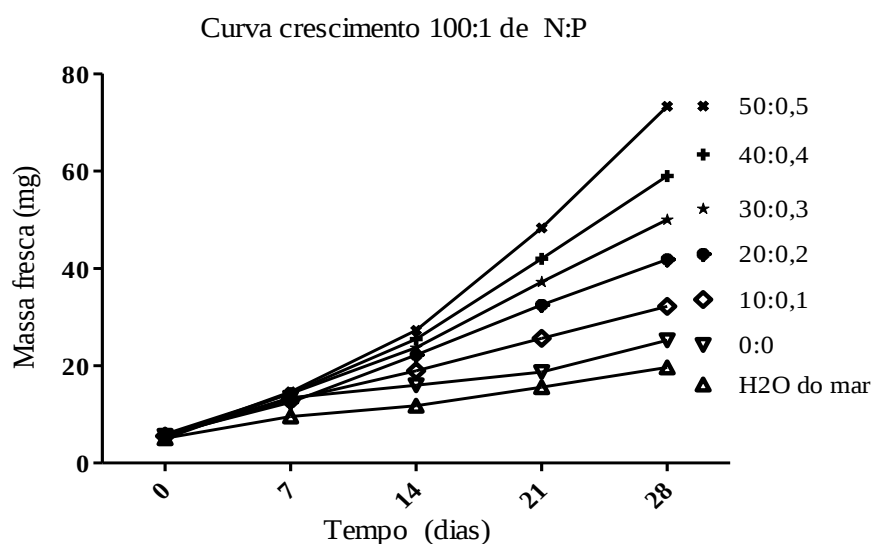
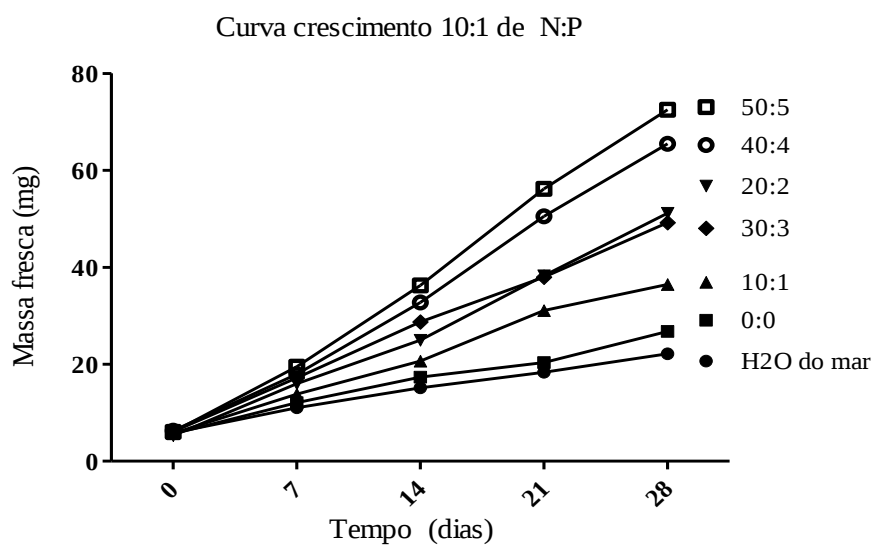


Figura 39: Curva de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).

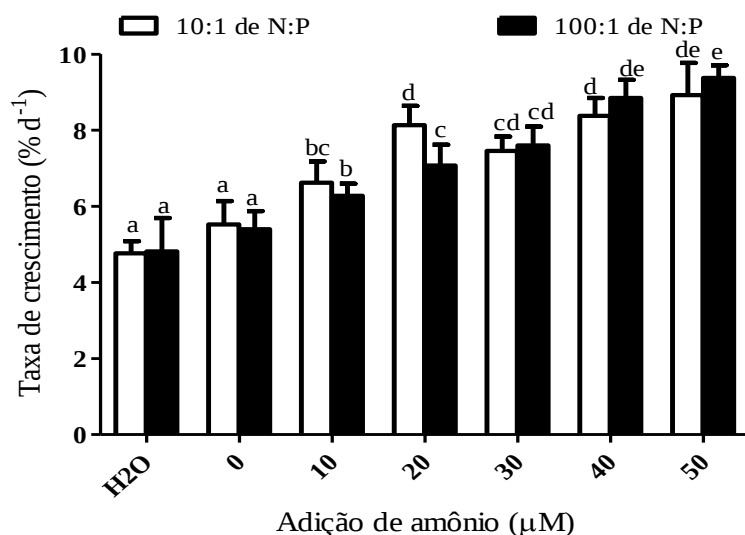


Figura 40: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

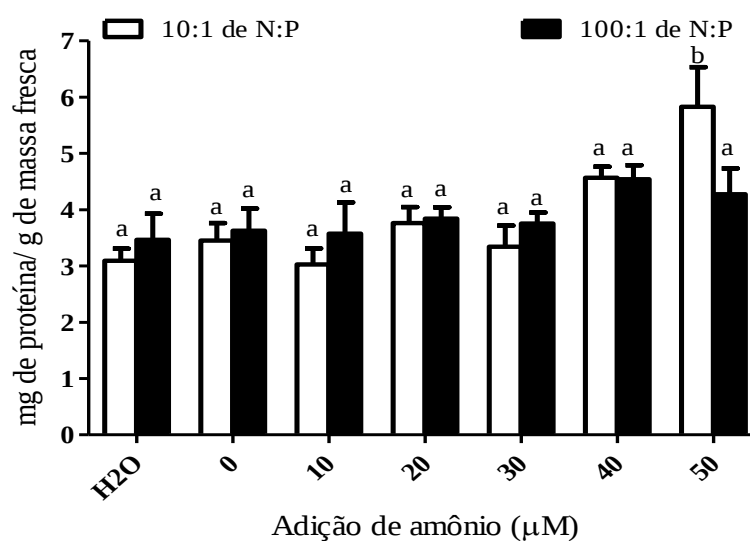


Figura 41: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

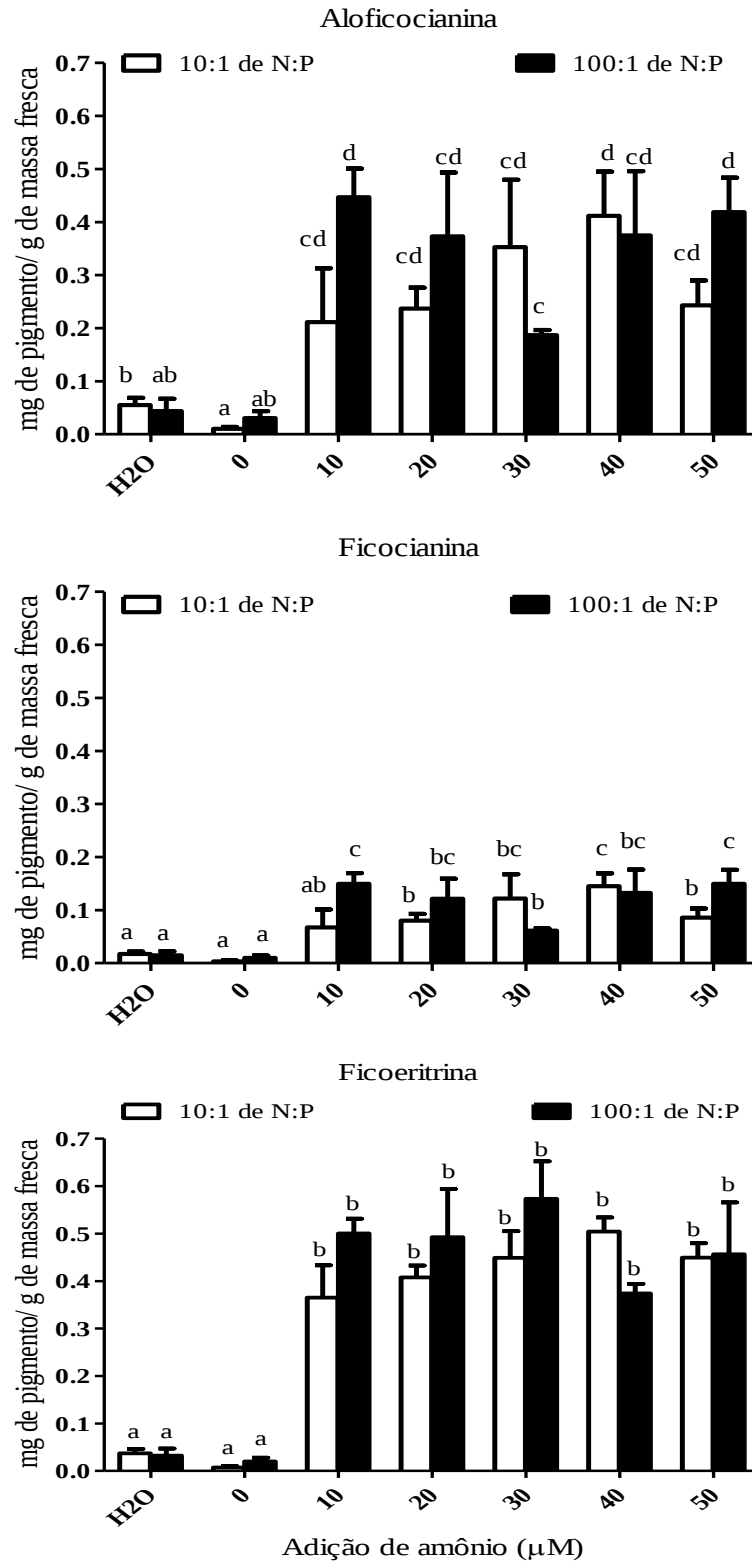


Figura 42: Conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻²s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

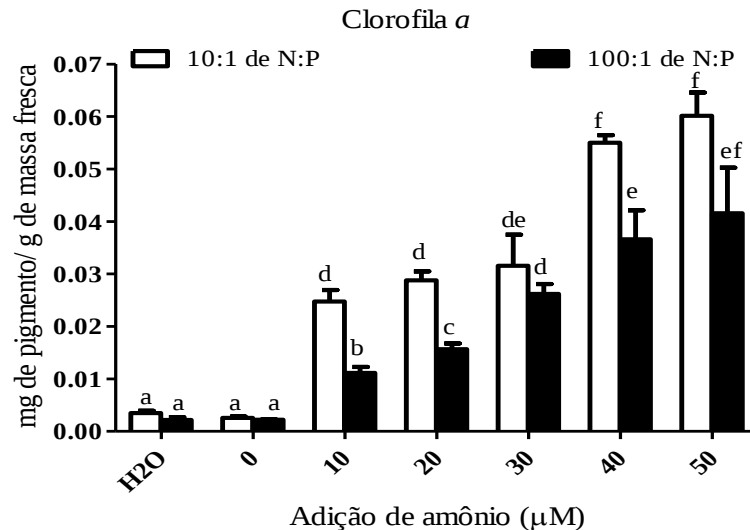


Figura 43: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

O CEP e o número de RS dos talos de *Hypnea musciformis* foram maiores com adição de 50 μM de amônio na razão de 10:1 de N:P (figura 44), e o número de RP foi maior na mesma concentração, mas na razão de 100:1. O menor CEP foi observado em talos cultivados com água do mar esterilizada e em 40μM de nitrato na razão N:P de 100:1. O menor número de RP e de RS foram observados em talos cultivados com água do mar esterilizada e no tratamento controle, respectivamente (figura 44).

A figura 45 apresenta o aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada com adição de amônio e fosfato na relação de 10:1 de N:P e são apresentadas na forma de negativo (com exceção do tratamento de 50:5 μM). Todas as algas apresentaram um talo despigmentado, com exceção do espécime 6 no tratamento com 50:5 μM, cujo talo apresentou uma coloração marrom-avermelhada. No geral, observou-se um aumento do CEP, número de RP e de RS com o aumento da disponibilidade de amônio e fosfato.

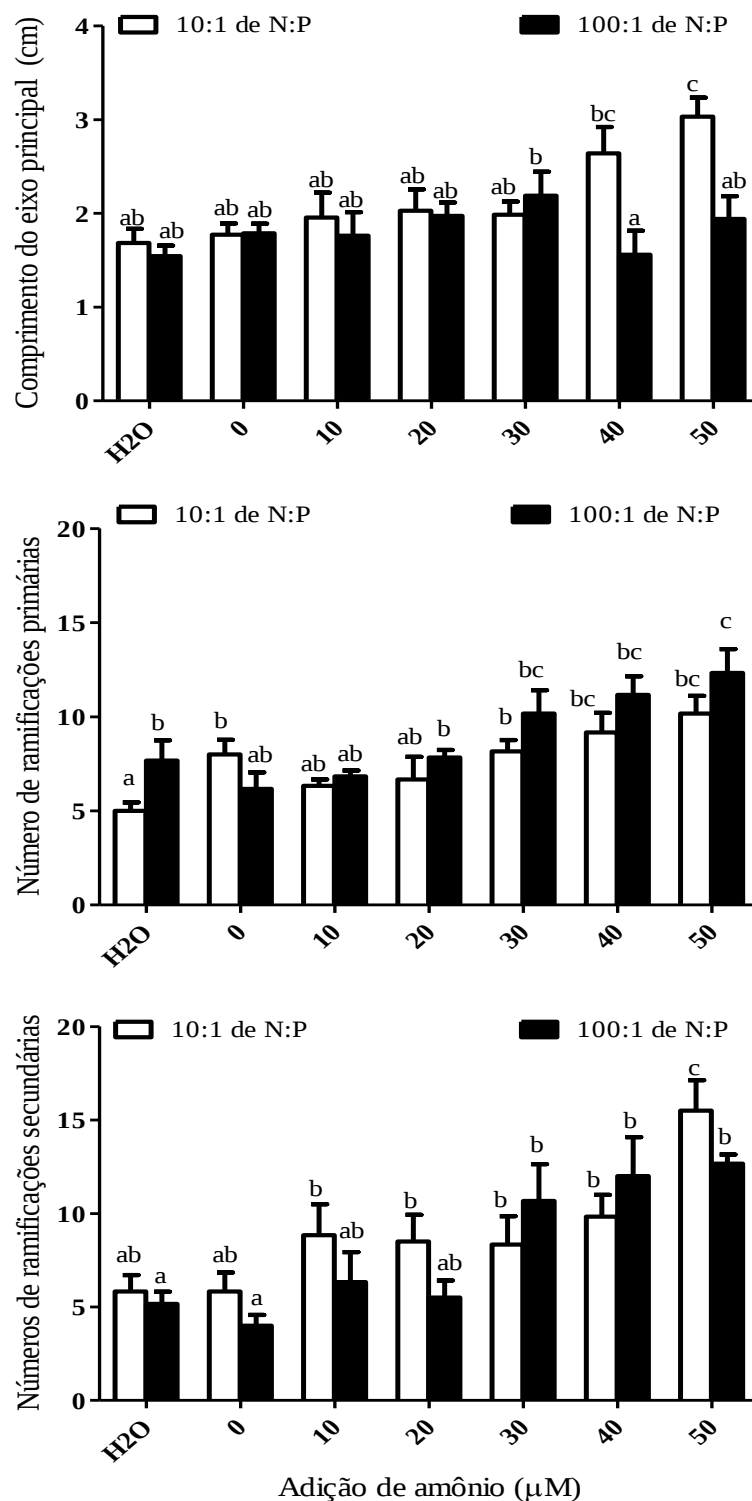


Figura 44: Variação no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e ramos secundários de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de amônio: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

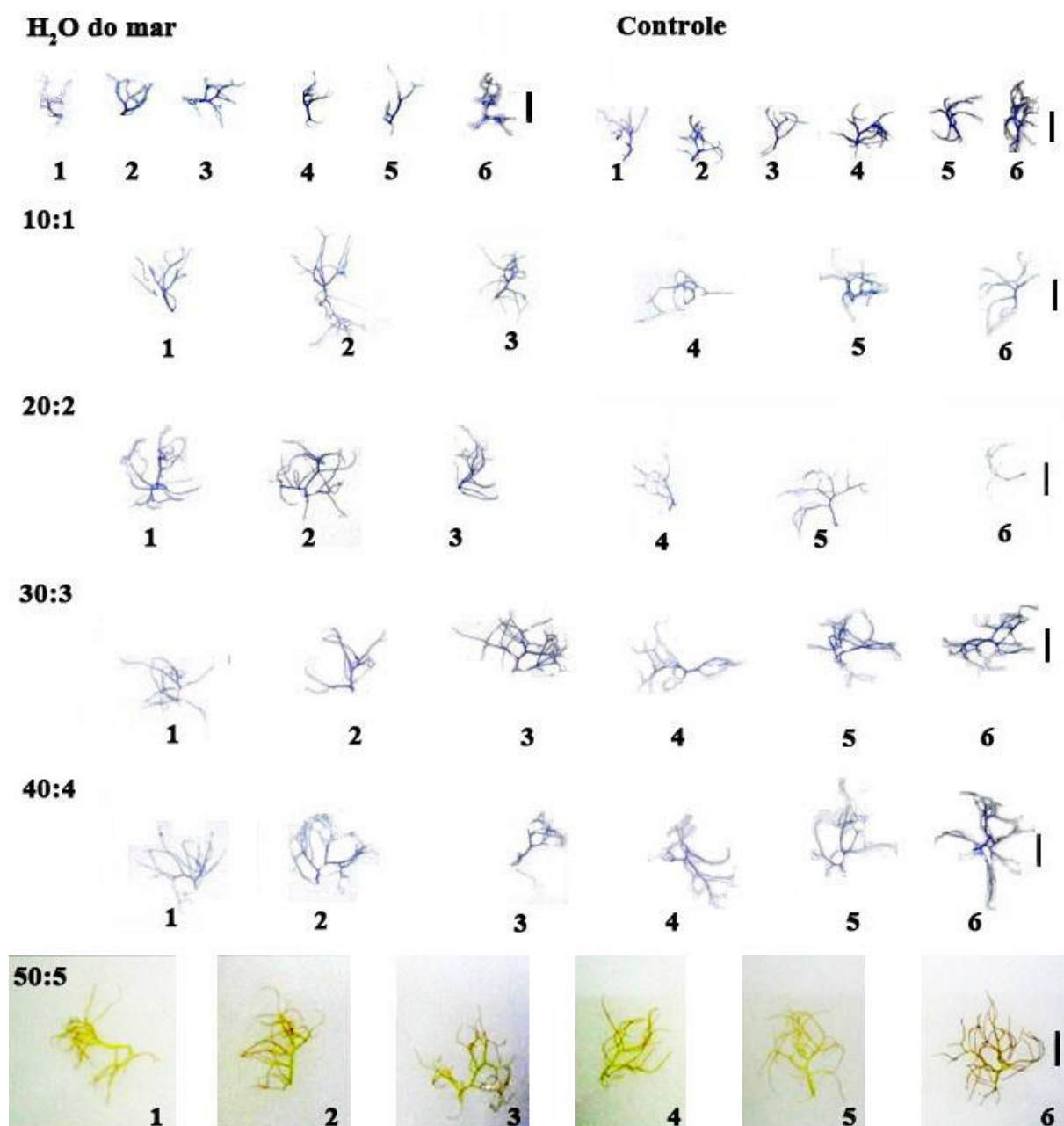


Figura 45: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos espécimes cultivados nos tratamentos água do mar, controle, 10:1, 20:2, 30:3 e 40:4 são apresentadas na forma de negativo.

A figura 46 mostra o aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada com diferentes concentrações de amônio e fosfato na razão de 100:1 de N:P e também é apresentada na forma de negativo por causa da despigmentação do talo. Observou-se um aumento no CEP, no número de RP e de RS com o aumento das concentrações de amônio e fosfato no meio.

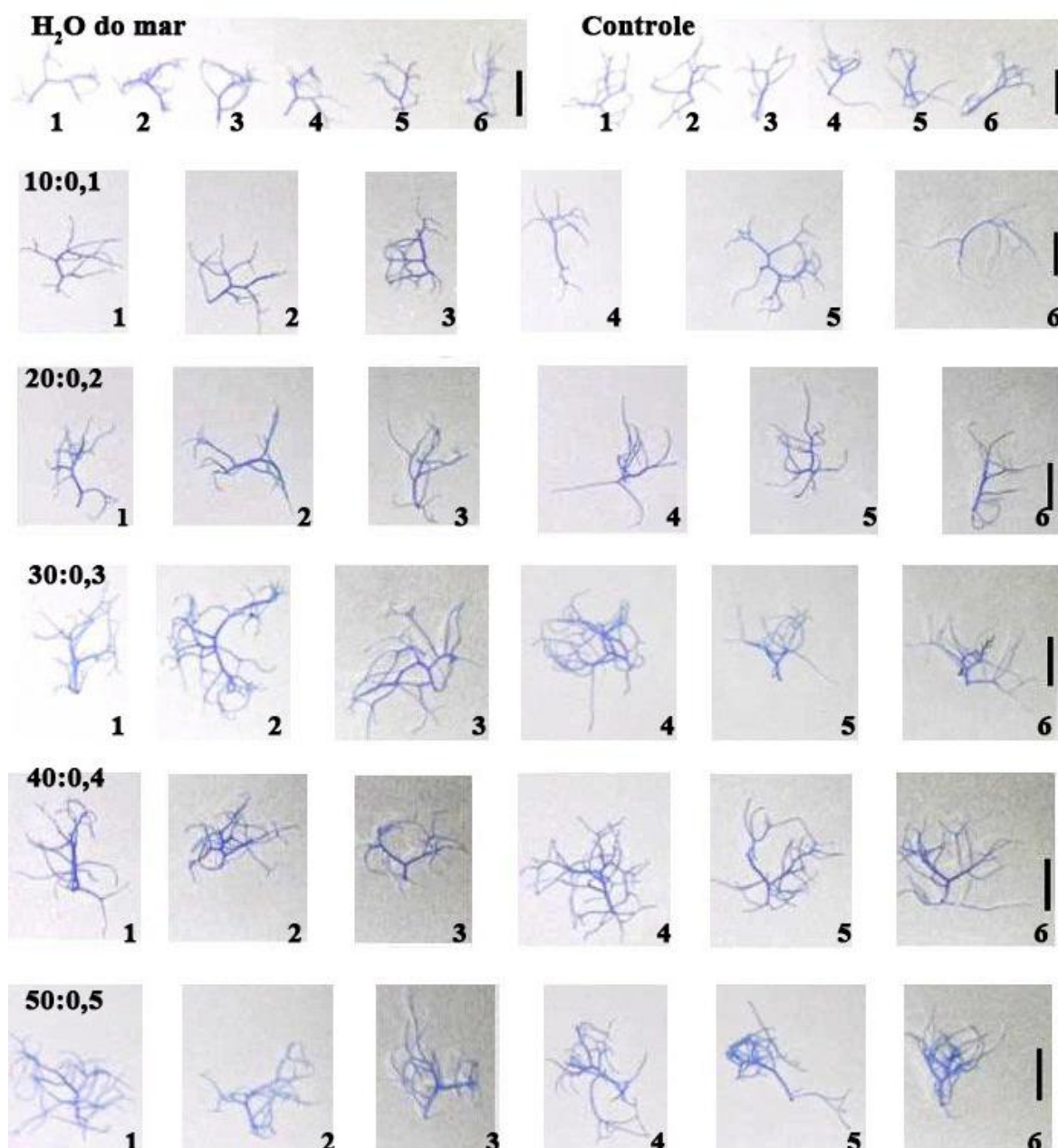


Figura 46: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar e com diferentes concentrações de amônio: fosfato na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos das algas cultivadas em todos os tratamentos s\u00e3o apresentadas na forma de negativo.

A tabela 16 apresenta os coeficientes da correla\u00e7\u00e3o de Pearson para as vari\u00e1veis analisadas em *Hypnea musciformis* cultivada com \u00e1gua do mar e com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de am\u00f4nio e fosfato na raz\u00e3o de 10:1 e 100:1. Para a raz\u00e3o de 10:1 de N:P, as adi\u00e7\u00f5es de am\u00f4nio e fosfato apresentaram uma correla\u00e7\u00e3o negativa com a TC, AFC, FC, FE,

Cl *a* e RP . Para a razão de 100:1 de N:P, observou-se uma correlação negativa significativa entre as adições de amônio e fosfato e a TC, AFC, FC, FE e Cl *a*.

Tabela 16: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas em *Hypnea musciformis* cultivadas em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,514	-0,248	-0,665	-0,657	-0,911	-0,706	-0,190	-0,564	-0,214
p	0,017	0,277	0,001	0,001	0,000	0,000	0,407	0,008	0,349

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
Coeficiente	-0,491	-0,264	-0,749	-0,730	-0,883	-0,596	-0,300	0,255	0,022
p	0,024	0,246	0,000	0,000	0,000	0,004	0,185	0,264	0,925

A tabela 17 apresenta uma comparação entre as médias das variáveis analisadas em *Hypnea musciformis* cultivada nas diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de N:P de 10:1 e 100:1. A TC foi significativamente maior no tratamento com N:P de 10:1 na adição de 20µM de amônio. As concentrações de Cl *a* foram maiores nos tratamentos com 10, 40 e 50 µM na razão de 10:1, o que também foi observado para o CEP dos talos de *H. musciformis*, que foram maiores nos tratamentos com 40 e 50 µM (tabela 17).

Tabela 17: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea musciformis* cultivada em água do mar e com diferentes concentrações de amônio e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA fatorial e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de amônio e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		10:1	10:0,1	20:2	20:0,2	30:3	30:0,3	40:4	40:0,4	50:5	50:0,5
TC (% d ⁻¹)	4,76 $\pm$ 0,32	4,81 $\pm$ 0,88	5,52 $\pm$ 0,61	5,40 $\pm$ 0,47	6,62 $\pm$ 0,56	6,27 $\pm$ 0,32	8,13 $\pm$ 0,50	7,07 $\pm$ 0,54	7,45 $\pm$ 0,37	7,59 $\pm$ 0,49	8,37 $\pm$ 0,47	8,85 $\pm$ 0,47	8,92 $\pm$ 0,84	9,37 $\pm$ 0,33
PT (mg PT/g MF)	2,87 $\pm$ 0,05	3,46 $\pm$ 1,13	3,45 $\pm$ 0,54	3,62 $\pm$ 0,68	3,02 $\pm$ 0,49	3,57 $\pm$ 0,95	3,76 $\pm$ 0,49	3,84 $\pm$ 0,35	3,34 $\pm$ 0,65	3,75 $\pm$ 0,34	4,56 $\pm$ 0,34	4,53 $\pm$ 0,43	6,06 $\pm$ 1,62	4,14 $\pm$ 1,08
AFC (mg pig/g MF)	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,17	0,44 $\pm$ 0,09	0,23 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,20	0,35 $\pm$ 0,21	0,18 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,20	0,24 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,11
FC (mg pig/g MF)	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,07	0,06 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04
FE (mg pig/g MF)	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,11	0,50 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,19	0,44 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,18
Cl a (mg pig/g MF)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01
CEP (cm)	1,68 $\pm$ 0,36	1,54 $\pm$ 0,28	1,77 $\pm$ 0,29	1,78 $\pm$ 0,25	1,95 $\pm$ 0,65	1,76 $\pm$ 0,61	2,03 $\pm$ 0,55	1,97 $\pm$ 0,34	1,95 $\pm$ 0,34	2,18 $\pm$ 0,62	2,64 $\pm$ 0,68	1,56 $\pm$ 0,62	3,03 $\pm$ 0,49	1,94 $\pm$ 0,59
RP	5,00 $\pm$ 1,09	7,66 $\pm$ 2,65	8,00 $\pm$ 1,89	6,16 $\pm$ 2,13	6,33 $\pm$ 0,81	6,83 $\pm$ 0,75	6,66 $\pm$ 2,94	7,83 $\pm$ 0,98	8,16 $\pm$ 1,47	10,16 $\pm$ 3,06	9,16 $\pm$ 2,56	11,16 $\pm$ 2,40	10,16 $\pm$ 2,31	12,33 $\pm$ 3,07
RS	5,83 $\pm$ 2,13	5,16 $\pm$ 1,60	5,83 $\pm$ 2,48	4,00 $\pm$ 1,41	8,83 $\pm$ 4,07	6,33 $\pm$ 3,93	8,50 $\pm$ 3,50	5,50 $\pm$ 2,25	8,33 $\pm$ 3,72	10,66 $\pm$ 4,84	9,83 $\pm$ 2,85	12,00 $\pm$ 5,09	15,50 $\pm$ 3,98	12,66 $\pm$ 1,21

4.6 Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em *Hypnea musciformis*

As curvas de crescimento e as TC de *H. musciformis* foram maiores nos tratamentos com adição de nitrato e fosfato nas concentrações de 100 a 400 μM e menores nos tratamentos com limitação de nutrientes, como em água do mar e controle (figuras 47-48). Além disso, os dados das curvas de crescimento e das TC mostram um crescimento maior na razão de 10:1 de N:P quando comparado a razão 100:1 (figuras 47-48).

A variação no conteúdo de PT em *H. musciformis* apresentou uma cinética de saturação nos tratamentos com adição de nitrato na razão de 10:1 de N:P, atingindo o maior valor na concentração de 200 e 300 μM de nitrato (figura 49). Na razão de 100:1 de N:P, a maior concentração de PT foi observada no tratamento com 500 μM de nitrato. Os menores conteúdos de PT foram observados nos tratamentos controle e água do mar esterilizada (figura 49).

Em relação a variação de pigmentos em *H. musciformis*, as concentrações de AFC e FE foram maiores do que as concentrações de FC (figura 50). As maiores concentrações de AFC e FC foram observadas nos tratamentos com adição de nitrato:fosfato nas razões 10:1 e o oposto foi observado para as concentrações de FE (figura 50). A maior concentração de AFC ocorreu na adição de 500 μM de nitrato e para FC ocorreu nas adições de 200 e 300 μM . O conteúdo de FE foi maior na adição de 300 μM de nitrato. As concentrações de ficobiliproteínas foram maiores do que as de clorofila *a*, que foi menor que 0,1 mg de pigmento/ g de massa fresca (figura 51). O conteúdo de Cl *a* foi maior nos tratamentos com adição de nitrato na razão N:P de 10:1 do que em 100:1, aumentando com o incremento de nutrientes no meio (figura 51).

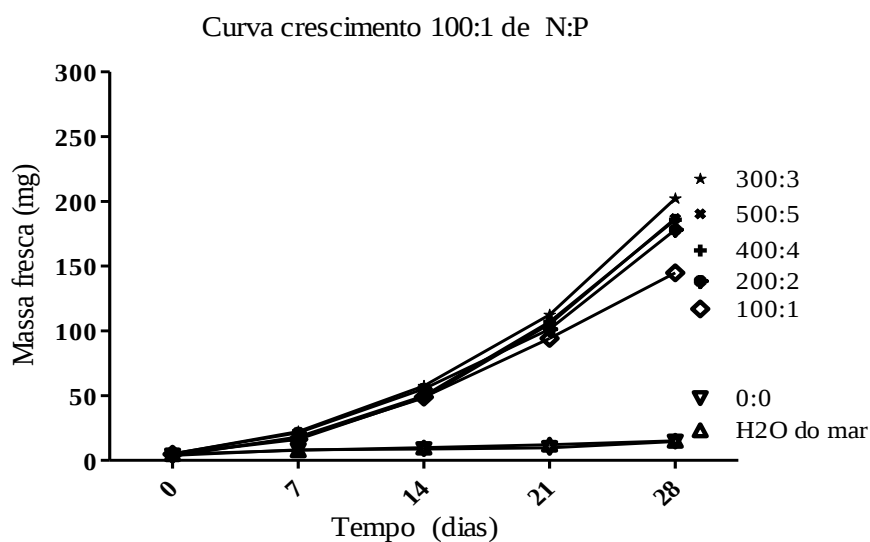
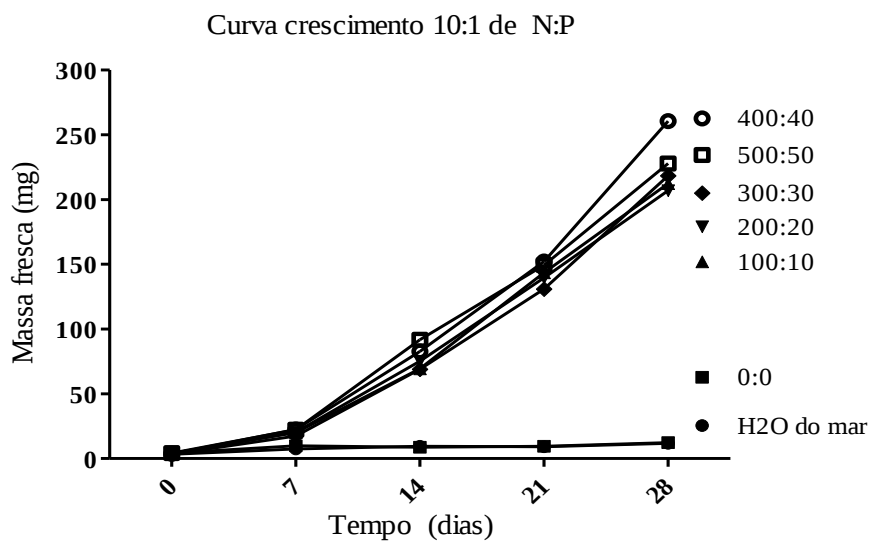


Figura 47: Curva de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores correspondem à média (n=6).

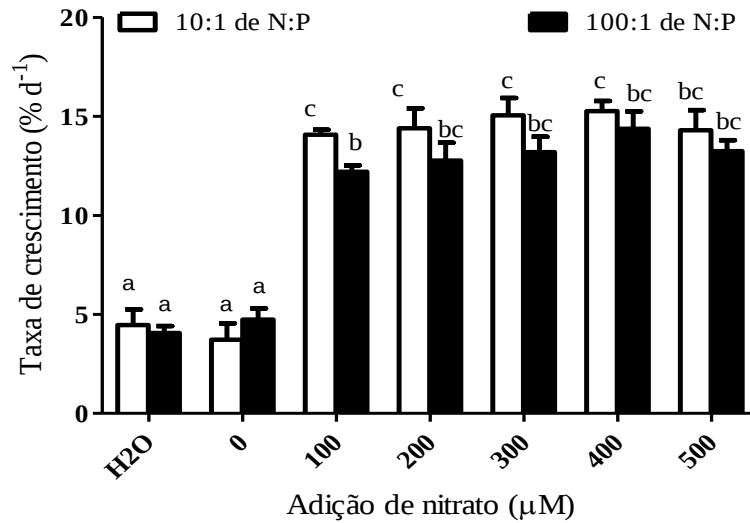


Figura 48: Variação da taxa de crescimento de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

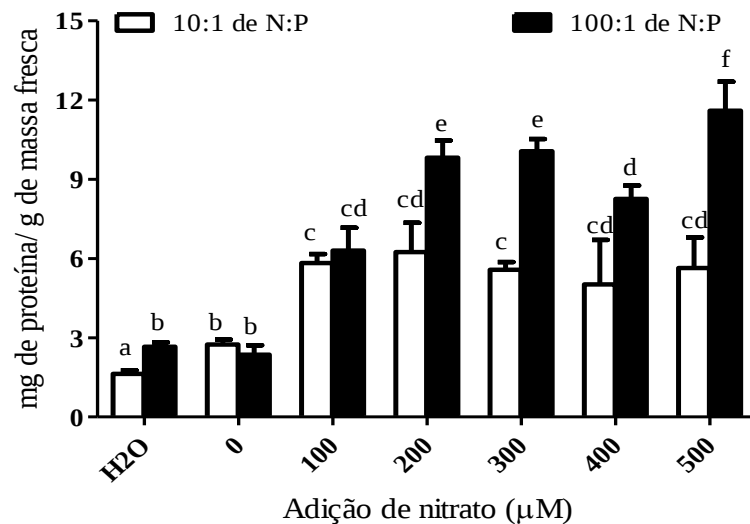


Figura 49: Variação do conteúdo de proteínas solúveis totais de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

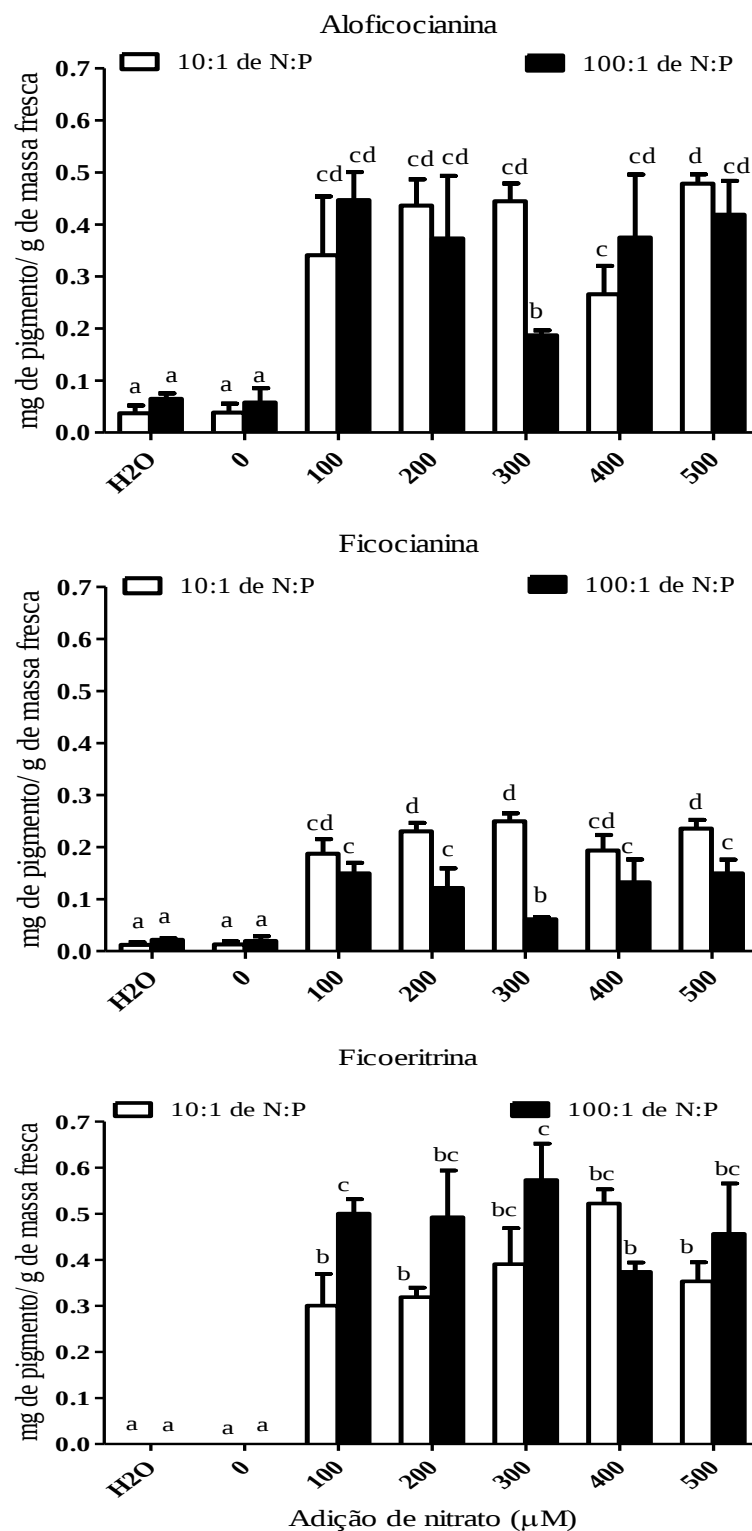


Figura 50: Conteúdo de alococianina, ficocianina e ficoeritrina de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

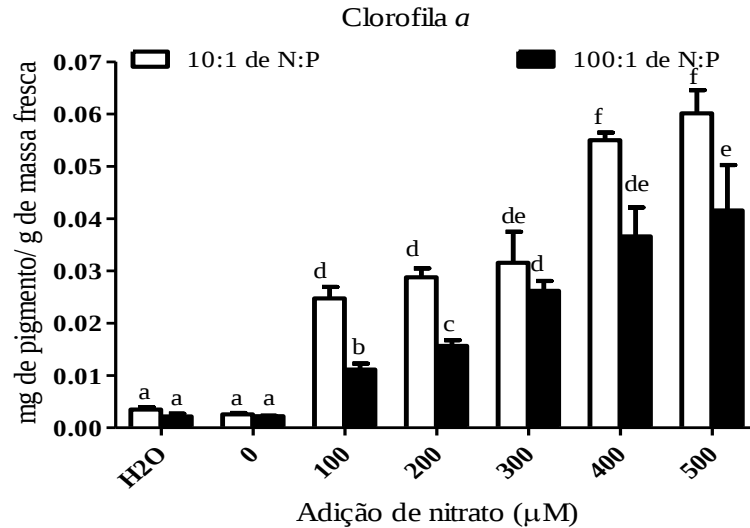


Figura 51: Conteúdo de clorofila *a* de *Hypnea musciformis* cultivadas por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=3 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

Os maiores valores de CEP e do número de RP e RS foram observados em talos de *Hypnea musciformis* cultivada com adição de nitrato enquanto que os menores valores foram observados em espécimes cultivados em água do mar e no controle (figura 52). A figura 53 mostra o aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada em diferentes concentrações de nitrato e fosfato na razão de 10:1 de N:P. Nos tratamentos com limitação desses nutrientes (apresentados na forma de negativo) é possível observar uma despigmentação do talo e menor CEP e número de RP e de RS. Com o aumento da disponibilidade de nitrato e fosfato, essas algas apresentaram uma coloração marrom avermelhada e uma alta ramificação do talo. A mesma resposta foi observada nos tratamentos realizados na razão de 100:1 (figura 54).

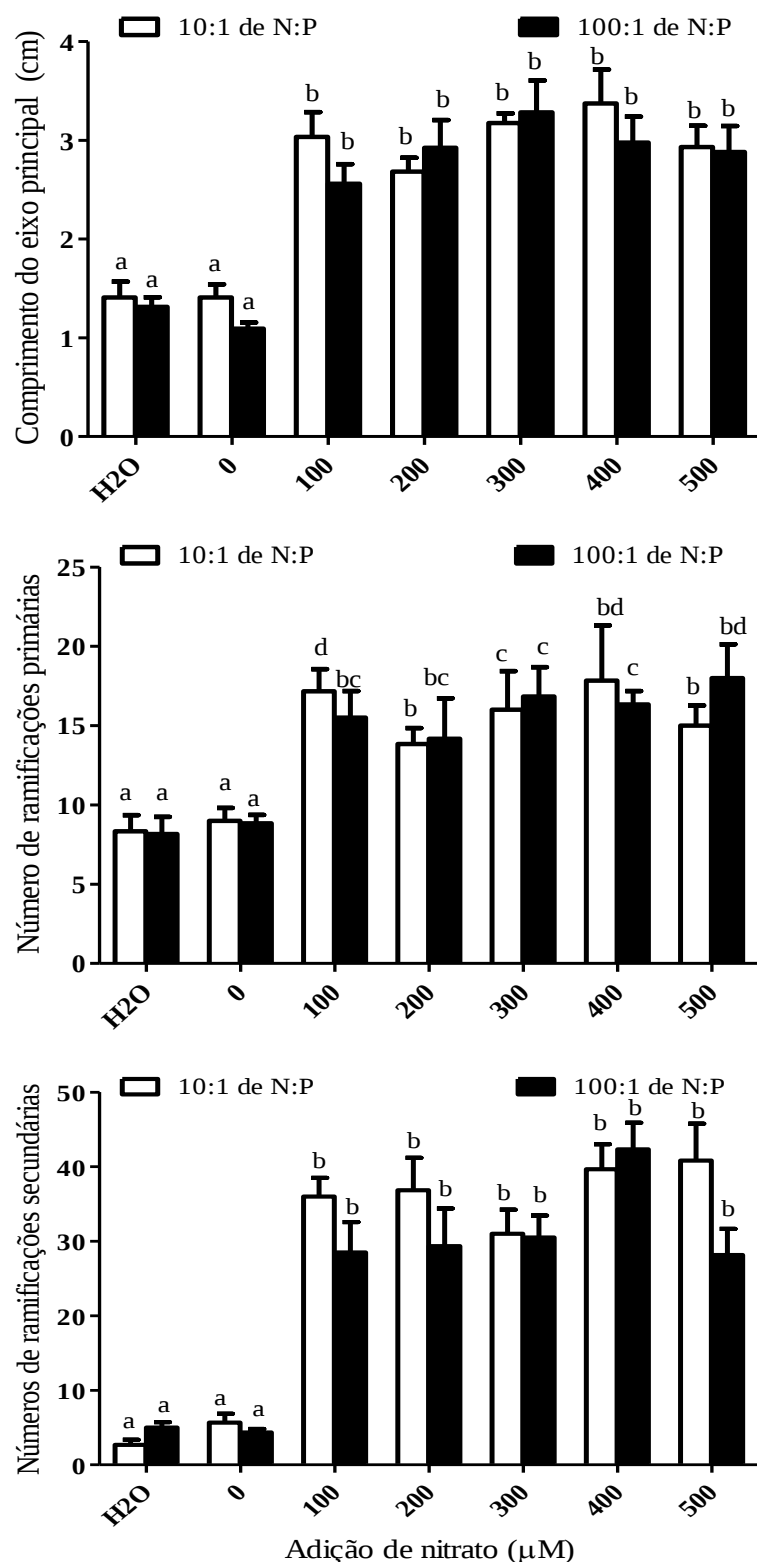


Figura 52: Variação no comprimento do eixo principal, na formação de ramos primários e de ramos secundários de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H₂O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 em meio VSES 25%, temperatura de 23±3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os valores correspondem à média (n=6 ± desvio padrão). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (p<0,05).

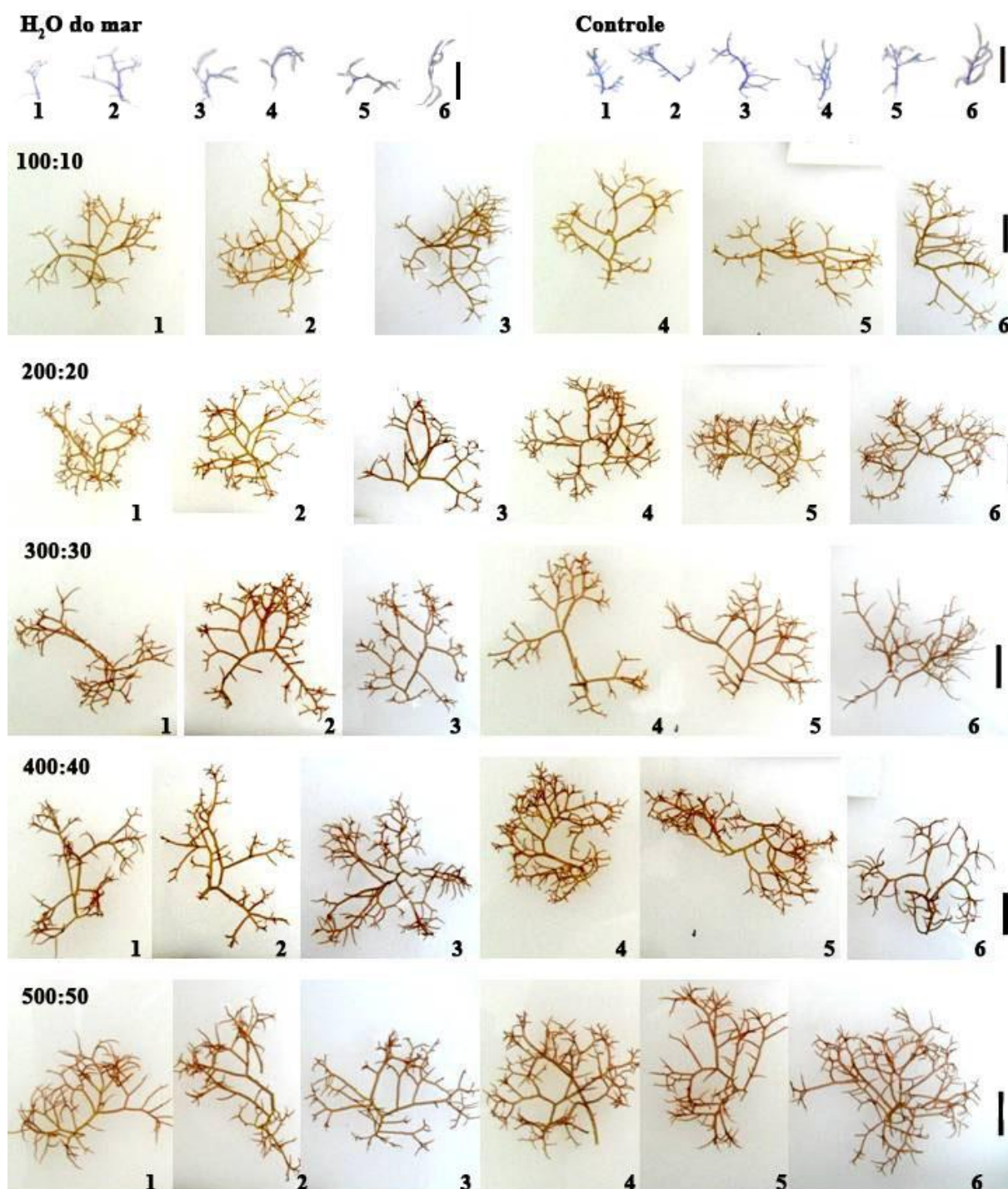


Figura 53: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fosfato na razão de 10:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos tratamentos água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.

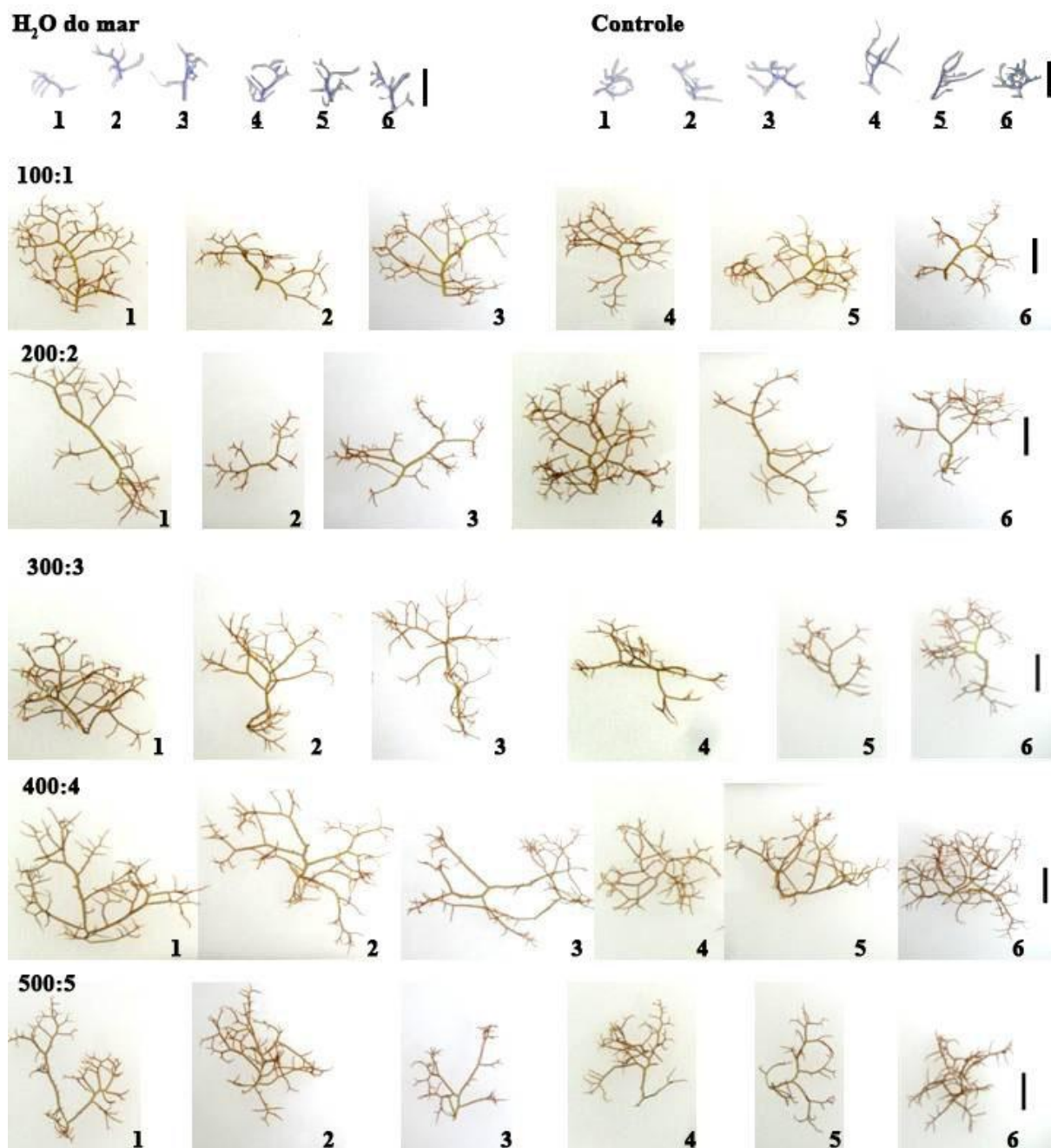


Figura 54: Aspecto geral de *Hypnea musciformis* cultivada por 32 dias em água do mar (H_2O) e com diferentes concentrações de nitrato: fósforo na razão de 100:1, em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Escala: 1cm. As fotos dos tratamentos água do mar e controle são apresentadas na forma de negativo.

A tabela 18 apresenta os valores das correlações entre as concentrações de nitrato: fósforo e as variáveis analisadas para *Hypnea musciformis*. Segundo a análise de correlação de Pearson, é possível verificar uma correlação positiva entre as concentrações de nitrato:fósforo

na razão de 10:1 e a TC, CEP e RS. Para a razão N:P de 100:1, foi observada correlação positiva entre os tratamentos com TC, RS, CEP e conteúdo de Cl *a*. (tabela 18).

Tabela 18: Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com *Hypnea musciformis* cultivadas em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 10:1 e 100:1. Os valores da primeira linha da tabela correspondem ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de p (sendo $p < 0,05$). Em negrito estão representadas as correlações significativas.

10:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
	0,669	0,195	-0,014	-0,056	-0,007	0,374	0,520	0,384	0,596
	0,001	0,395	0,951	0,809	0,976	0,094	0,016	0,086	0,004

100:1 de N:P

Variáveis	TC	PT	AFC	FC	FE	Cl <i>a</i>	CEP	RP	RS
	0,610	0,169	-0,156	-0,100	-0,185	0,479	0,628	0,188	0,578
	0,003	0,462	0,499	0,665	0,422	0,028	0,002	0,414	0,006

Comparando-se os tratamentos realizados nas razões de N:P de 10:1 e 100:1, as TC e as concentrações de FC em *Hypnea musciformis* foram maiores nos tratamentos com adição de nitrato na razão de 10:1, enquanto que o conteúdo de PT foi maior com adição de nitrato na razão de 100:1 (tabela 19). A concentração de AFC foi maior no tratamento com 300 μM de nitrato na razão de 10:1 de N:P e o conteúdo de Cl *a* foi maior nos tratamentos com 100, 400 e 500 μM na mesma razão de N:P (tabela 19).

Tabela 19: Comparação entre as médias $\pm$ desvios padrão das variáveis analisadas nos experimentos com *Hypnea musciformis* cultivada por em água do mar e com diferentes concentrações de nitrato e fosfato nas razões de 10:1 e 100:1 de N:P em meio VSES 25%, temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14h, salinidade de 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As células com números em vermelho representam as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados segundo ANOVA de medidas repetidas e teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Variáveis	Tratamentos com adição de nitrato e fosfato 10:1 e 100:1													
	H ₂ O do mar		0:0		100:10	100:1	200:20	200:2	300:30	300:3	400:40	400:4	500:50	500:5
TC (% d ⁻¹)	4,46 $\pm$ 0,78	4,06 $\pm$ 0,34	3,71 $\pm$ 0,83	4,73 $\pm$ 0,56	14,07 $\pm$ 0,24	12,20 $\pm$ 0,32	14,40 $\pm$ 0,99	12,76 $\pm$ 0,90	15,04 $\pm$ 0,87	13,19 $\pm$ 0,78	15,26 $\pm$ 0,50	14,37 $\pm$ 0,87	14,29 $\pm$ 1,01	13,24 $\pm$ 0,55
PT (mg PT/g MF)	1,64 $\pm$ 0,32	2,82 $\pm$ 0,01	2,73 $\pm$ 0,32	2,35 $\pm$ 0,63	5,83 $\pm$ 0,57	6,29 $\pm$ 1,50	6,24 $\pm$ 1,92	9,82 $\pm$ 1,12	5,57 $\pm$ 0,49	10,06 $\pm$ 0,79	5,01 $\pm$ 2,92	8,25 $\pm$ 0,87	6,65 $\pm$ 1,36	12,67 $\pm$ 0,51
AFC (mg pig/g MF)	0,03 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,19	0,44 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,20	0,44 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,11
FC (mg pig/g MF)	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30 $\pm$ 0,11	0,50 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,19	0,39 $\pm$ 0,13	0,57 $\pm$ 0,13	0,52 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,18
Cl a (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01
CEP (cm)	1,41 $\pm$ 0,39	1,31 $\pm$ 0,23	1,40 $\pm$ 0,32	1,09 $\pm$ 0,15	3,03 $\pm$ 0,61	2,56 $\pm$ 0,48	2,68 $\pm$ 0,34	2,92 $\pm$ 0,68	3,17 $\pm$ 0,23	3,28 $\pm$ 0,79	3,37 $\pm$ 0,84	2,97 $\pm$ 0,64	2,93 $\pm$ 0,52	2,88 $\pm$ 0,64
RP	8,33 $\pm$ 2,50	8,16 $\pm$ 2,63	9,00 $\pm$ 2,00	8,83 $\pm$ 1,32	17,16 $\pm$ 3,43	15,50 $\pm$ 4,13	13,83 $\pm$ 2,48	14,16 $\pm$ 6,27	16,00 $\pm$ 5,96	16,83 $\pm$ 4,53	17,83 $\pm$ 8,54	16,33 $\pm$ 2,06	15,00 $\pm$ 3,09	18,00 $\pm$ 5,21
RS	2,66 $\pm$ 1,75	5,00 $\pm$ 1,78	5,66 $\pm$ 2,94	4,33 $\pm$ 1,21	36,00 $\pm$ 6,13	28,50 $\pm$ 10,01	36,83 $\pm$ 10,68	29,33 $\pm$ 12,38	31,00 $\pm$ 7,92	30,50 $\pm$ 7,25	39,66 $\pm$ 8,23	42,33 $\pm$ 8,75	40,83 $\pm$ 12,08	28,16 $\pm$ 8,58

4.7 Efeitos do amônio:fosfato e nitrato:fosfato nas espécies de *Hypnea*

Foi feita uma comparação entre as espécies de *Hypnea* cultivadas nas diferentes concentrações de amônio e fosfato. A tabela 20 mostra as diferenças entre as espécies em relação às variáveis analisadas e os valores mínimos, máximos e concentrações ótimas para as adições de amônio e fosfato. Observa-se que *Hypnea* sp. apresentou o menor valor para TC, conteúdo de AFC, CEP e RS, e maiores valores, apenas para FC quando comparada com as demais espécies. A TC de *H. cervicornis* apresentou valor máximo na concentração de 50µM de amônio e foi maior em comparação com *Hypnea* sp. e *H. musciformis*. A espécie também apresentou os maiores valores para o CEP e formação de RS e os menores valores foram observados para o conteúdo de PT e formação de RP. *H. musciformis* apresentou os maiores valores máximos, em relação as outras espécies, para o conteúdo de PT, e todos os pigmentos (ficobiliproteínas e clorofila *a*).

A tabela 21 mostra as diferenças entre as espécies em relação às variáveis analisadas e os valores mínimos, máximos e concentrações ótimas na adição de nitrato e fosfato ao meio. *Hypnea* sp. teve o valor mínimo para TC, o conteúdo de AFC, CEP e formação de RP e RS em relação as demais espécies. O maior valor ocorreu apenas para FC e foi maior em relação as outras duas espécies de *Hypnea*. Os conteúdos de AFC, FC e FE não foram estimuladas pelas concentrações de nitrato e fosfato testadas. A espécie *H. cervicornis* teve o valor mínimo para PT em relação as outras espécies. O valor máximo apresentado para o conteúdo de AFC foi menor para esta espécie, assim como o CEP. O valor máximo obtido para o conteúdo de FC foi menor e igual ao apresentado por *H. musciformis*, e esta espécie apresentou valores máximos para TC, PT, CEP, RP e RS em comparação à *H. cerviconis* e *Hypnea* sp.

Tabela 20: Valores máximos, mínimos e concentrações ótimas das variáveis analisadas em concentrações de amônio e fosfato (μM) para as espécies de *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis*.

Variáveis	<i>Hypnea</i> sp.			<i>H. cervicornis</i>			<i>H. musciformis</i>		
	Mín.	Máx.	Conc. ótima	Mín.	Máx.	Conc. ótima	Mín.	Máx.	Conc. ótima
TC (% d ⁻¹)	3,88	8,94	30, 40 e 50 em 10:1 e 100:1	5,73	11,52	50 em 100:1	4,76	9,37	50 em 100:1
PT (mg PT/g MF)	0,48	3,09	30, 40 e 50 em 10:1 e 100:1	0,43	2,52	50 em 10:1	2,87	6,06	50 em 10:1
AFC (mg pig/g MF)	0,00	0,35	40 em 100:1	0,01	0,10	30 em 10:1 e 100:1	0,01	0,44	10 e 50 em 100:1
FC (mg pig/g MF)	0,00	0,12	40 em 100:1	0,00	0,02	30 em 10:1 e 100:1	0,00	0,14	10 e 50 em 100:1
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,26	40 em 100:1	0,00	0,40	30 em 10:1 e 100:1	0,00	0,57	*
Cl <i>a</i> (mg pig/g MF)	0,000	0,006	40 em 10:1	0,000	0,000	30 em 10:1 e 100:1	0,002	0,060	40 e 50 em 10:1
CEP (cm)	0,71	2,20	40 e 50 em 10:1 e 100:1	1,00	2,31	40 e 50 em 100:1	1,54	3,03	50 em 10:1
RP	10,5	14,66	*	7,16	16,83	20 em 10:1	5,00	12,33	50 em 100:1
RS	1,5	15,16	20 em 100:1	9,16	22,00	20 em 10:1	4,00	15,50	50 em 10:1

* não ocorreu diferenças significativas entre as concentrações testadas.

Tabela 21: Valores máximos, mínimos e concentrações ótimas das variáveis analisadas em concentrações de nitrato e fosfato (μM) para as espécies de *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis*.

Variáveis	<i>Hypnea</i> sp.			<i>H. cervicornis</i>			<i>H. musciformis</i>		
	Mín.	Máx.	Conc. ótima	Mín.	Máx.	Conc. ótima	Mín.	Máx.	Conc. ótima
TC (% d ⁻¹)	3,55	12,90	200 e 300 em 10:1	3,80	14,45	*	3,71	15,26	300 e 400 em 10:1
PT (mg PT/g MF)	0,92	4,56	300 em 10:1	0,02	8,73	100 em 100:1	1,64	12,67	500 em 100:1
AFC (mg pig/g MF)	0,00	0,47	*	0,02	0,41	400 em 10:1	0,03	0,47	*
FC (mg pig/g MF)	0,00	0,26	*	0,00	0,24	400 em 10:1	0,01	0,24	300 em 10:1
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,46	*	0,00	0,83	*	0,00	0,57	300 em 100:1
Cl a (mg pig/g MF)	0,00	0,05	*	0,00	0,13	Em 10:1	0,02	0,06	400 e 500 em 10:1
CEP (cm)	0,97	3,15	200 em 10:1	1,19	3,09	200 em 100:1	1,09	3,37	*
RP	4,16	13,33	200 em 100:1	11,33	16,83	H ₂ O	8,16	18,00	100 e 400 em 10:1 e 500 em 100:1
RS	0,00	21,66	200 em 100:1	8,83	40,5	500 em 10:1	2,66	40,83	*

* mostram que nas variáveis não ocorreu diferenças significativas entre as concentrações testadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do amônio e fosfato nas espécies de *Hypnea*

As taxas de crescimento de *H. cervicornis* e de *H. musciformis* apresentaram um incremento linear com o aumento da disponibilidade de amônio. Este resultado podem indicar que essas espécies apresentam alta preferência ao amônio, sendo que as concentrações utilizadas não foram limitantes para o seu crescimento. Por outro lado, as altas concentrações de amônio inibiram apenas a TC de *Hypnea* sp. e a espécie continuou assimilando maiores concentrações de amônio na forma de proteínas e pigmentos. Esses dados corroboram com aqueles apresentados por Haines & Wheeler (1978) para *Hypnea musciformis*, que captou altas concentrações de amônio no meio (60µM de amônio). O crescimento de *Neogardhiella baileyi* (Kützinger) M.J. Wynne & W.R. Taylor e *Gracilaria foliifera* (Forskåll) Børgesen apresentaram uma cinética de saturação, atingindo o valor máximo com adição de 20µM amônio (DeBoer *et al.* 1978). Este resultado é similar ao observado no presente trabalho para *Hypnea* sp. Em contrapartida, concentrações a partir de 15µM de amônio inibiram o crescimento das linhagens verde clara e marrom de *H. musciformis* (Martins & Yokoya 2010), sendo que a toxicidade pode ser uma consequência da falta de esqueleto de carbono necessário para a assimilação do amônio, que se acumula no citoplasma gerando prótons H^+ , diminuindo o pH celular.

Alguns estudos evidenciaram que a principal forma de incorporação de amônio ocorreu na forma de proteínas solúveis totais. Além disso, a presença do fosfato pode aumentar a capacidade de incorporação de nitrogênio na forma de proteínas, como foi observado em *Gelidium crinale* (Turner) Gaillochon cultivada na concentração de 50µM de amônio e 10µM fosfato (razão de 5:1 de N:P) (Perfeto *et al.* 2004). *Gracilaria pacifica* I.A. Abbott e *Gracilaria tikvahiae* McLachlan apresentou alto conteúdo de proteínas quando

cultivadas em concentrações de 1 mM de amônio. *Gracilaria chilensis* C.J. Bird, Mclachlan & E.C. Oliveira também apresentou alto conteúdo de proteínas quando cultivada em baixas concentrações de amônio e fosfato (0,02 e 0,51 μ M, respectivamente) provenientes de efluentes de cultivo de salmão (Bird *et al.* 1982, Naldi & Wheeler 1999, Buschmann *et al.* 2008).

As espécies de *Hypnea* estudadas no presente trabalho também incorporaram o amônio na forma de ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina), sendo a ficoeritrina a segunda principal forma de incorporação de nitrogênio em *Hypnea musciformis* quando cultivada com altas concentrações de amônio e fosfato. *Hypnea* sp. acumulou menos ficoeritrina do que as demais espécies, incorporando nitrogênio como aloficocianina. Em limitação de nitrogênio e fósforo, as concentrações de FE foram basais para todas as espécies estudadas, uma vez que esse pigmento é o primeiro a ser utilizado como fonte de nitrogênio para a alga. Em meio com baixa disponibilidade de amônio e fosfato, houve uma maior incorporação de ficobiliproteínas em *Hypnea* sp. e *H. cervicornis*, enquanto que *H. musciformis* armazenou esses pigmentos principalmente em meio com alta disponibilidade de amônio e fosfato. O acúmulo de clorofila *a* foi baixa e sua incorporação foi estimulada pela presença de fósforo no meio. Resultados similares foram observados para *Gracilaria tikvahiae* que assimilou nitrogênio na forma de ficoeritrina e a síntese de clorofila *a* foi baixa em concentrações de 1mM de amônio (Bird *et al.* 1982). A incorporação de nitrogênio como ficoeritrina em *Porphyra linearis* Greville, *P. umbilicalis* Kützinger, *P. leucosticta* Thuret e *P. amplissima* (Kjellman) Setchell & Huss também foi estimulada em concentrações de amônio de 250 μ M e na razão de 10:1 de N:P (Kim *et al.* 2007).

As espécies de *Hypnea* estudadas no presente trabalho, apresentaram um crescimento do eixo principal e a formação de ramos primários e secundários estimulados pela maior disponibilidade de amônio e fosfato no meio. Em limitação de nutrientes, *Hypnea*

musciformis apresentou menor formação de ramos secundários e *H. cervicornis* apresentou uma maior formação de ramificações. Além disso, os talos das espécies estudadas apresentaram uma despigmentação, o que indica uma deficiência no conteúdo de pigmentos, principalmente de ficobliproteínas.

Desta forma, as espécies estudadas podem ser consideradas boas indicadoras do desbalanceamento e/ou limitação de fósforo e principalmente de nitrogênio no meio. Estudos relatam a despigmentação e ramificação em *Bostrichia moritziana* Mont. e *Caloglossa lepriurii* (Mont.) G. Martens em meio com limitação de nitrogênio e fósforo (Ryder *et al.* 1999). Alguns estudos mostram o aparecimento de pelos hialinos em *Hypnea musciformis*, *Gracilaria* sp., *Ceramium rubrum* C. agardh e *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J. Wynne cultivadas em meio com déficit de nitrogênio, aumentando a superfície de contato e a capacidade de absorção de nutrientes (Deboer 1981).

5.2 Efeitos do nitrato e fosfato nas espécies de *Hypnea*

As taxas de crescimento das espécies estudadas de *Hypnea* em diferentes concentrações de nitrato e fosfato apresentaram uma cinética de saturação, atingindo o valor máximo logo nas primeiras adições de nitrato ao meio (em 100 e 200 μM). A disponibilidade de fósforo estimulou uma maior taxa de crescimento nas espécies estudadas e, na sua presença, a saturação da taxa de crescimento ocorreu mais rapidamente. Resultados similares foram observados nas linhagens de cor de *H. musciformis* que não apresentaram diferenças no crescimento com adições de 125 a 500 μM de nitrato (Martins & Yokoya 2010). *Porphyra torta* V. Krishnamurthy apresentou maiores taxas de crescimento com adição de 88 μM de nitrato e *Gracilaria pacifica* I.A. Abbott teve uma taxa de crescimento elevada com a adição de 1 mM (Conitz *et al.* 2001, Naldi & Wheeler 1999). *Gracilaria* sp. apresentou uma baixa

taxa de crescimento com a adição de 490µM de nitrato e sem adição de fosfato (Lewis & Hanisak 1996).

A principal forma de armazenamento de nitrogênio com a maior disponibilidade de nitrato nas espécies estudadas de *Hypnea* ocorreu na forma de proteínas solúveis totais, e a maior disponibilidade de fosfato no meio não alterou essa resposta em *H. cervicornis* e *H. musciformis*. Resultados similares foram observados por Martins *et al.* (2009) para *H. musciformis* que apresentou maior conteúdo de proteínas solúveis totais em alta disponibilidade de nitrato, entretanto este não foi estimulado pela presença de fosfato no meio. *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq. & Hommers. também apresentou altas concentrações de proteínas com a disponibilidade de nitrato de 750µM (Wanderley 2009). Tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sond. Ex Dickie apresentaram uma tendência a acumular menos proteínas solúveis totais quando cultivadas em meio com limitação de nitrato (Ferreira 2008). Esses dados corroboram com os apresentados no presente estudo. Além disso, as espécies de *Hypnea* apresentaram baixas concentrações de proteínas em meios com limitação de nitrato e fosfato.

As espécies estudadas de *Hypnea* apresentaram conteúdo de ficobiliproteínas semelhantes, sendo maior em *H. cervicornis*. As espécies armazenaram nitrato principalmente na forma de ficoeritrina e a concentração desse pigmento foi maior nos tratamentos com adição de concentrações intermediárias de nitrato (300µM) em *H. musciformis* e não apresentou diferenças entre as concentrações de nitrato para *Hypnea* sp. e *H. cervicornis*. Em estudo com variantes pigmentares de *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira, observou-se um aumento no conteúdo de ficoeritrina em meios com adição de 500µM de nitrato (Costa 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a α é pouco alterada em relação às concentrações de nitrato testadas e o conteúdo de clorofila a das espécies estudadas se apresentou em níveis basais. O conteúdo de ficobiliproteínas e clorofila a de *Porphyra dioica* J. Brodie & L.M. Irvine aumentaram com a adição de 500 μ M de nitrato (Pereira *et al.* 2008). Para esta espécie, o armazenamento de nitrato ocorreu principalmente na forma de ficocianina, sendo que para as espécies de *Hypnea* do presente estudo, a ficocianina apresentou as menores concentrações quando comparada a outras formas de ficobiliproteínas.

As espécies de *Hypnea* cultivadas em meio com limitação de nutrientes apresentaram baixas concentrações de pigmentos, o que também foi observado pelos talos despigmentados. Resultados similares foram observados em *Gracilaria* sp. cultivada em meio com limitação de nitrato e fosfato, que também apresentou despigmentação do talo, indicando uma deficiência no conteúdo de ficobiliproteínas (Lewis & Hanisak 1996). O conteúdo de ficoeritrina das espécies de *Hypnea* apresentou valores abaixo do limite detectado pelo método utilizado no presente estudo para as espécies cultivadas em limitação de nutrientes. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que em meios com limitação de nitrogênio e fósforo, as algas utilizaram a ficoeritrina como reserva de nitrogênio, incorporando este elemento em outros compostos necessários para o seu crescimento. A utilização de ficoeritrina como principal fonte de nitrogênio quando este se encontra limitante no meio também foi verificado para *Gracilaria* sp. (Andria *et al.* 1999).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies de *Hypnea* estudadas no presente trabalho apresentaram algumas diferenças nos mecanismos fisiológicos de captação e armazenamento de nitrogênio e fósforo. *Hypnea* sp. foi proveniente da praia das Cigarras, em São Sebastião, uma região considerada

eutrofizada devido a constante descarga de esgoto no mar (Gianesella & Saldanha-Corrêa 2003). Considera-se que em áreas com descarga de esgoto, ocorre uma maior concentração de amônio (Lobban & Harrison 1997).

Apesar das diferentes concentrações testadas para amônio e nitrato, pode-se considerar que *Hypnea* sp. apresentou uma maior preferência ao nitrato, uma vez que as taxas de crescimento foram maiores com a disponibilidade de nitrato do que de amônio. Além disso, a espécie apresentou maiores taxas de crescimento em meio considerado eutrofizado, tanto com a maior disponibilidade de amônio quanto de nitrato. Em contrapartida, o acúmulo de pigmentos como reserva de nitrogênio foi maior em meio oligotrófico, podendo considerar que com a menor disponibilidade de fósforo, ocorreu um aumento na incorporação de nitrogênio. *Hypnea* sp. também apresentou diferenças fisiológicas em relação ao armazenamento de amônio e nitrato na forma de proteínas solúveis totais. Com a adição de amônio e menor disponibilidade de fosfato, estimulou-se a síntese de proteínas solúveis totais, e para o nitrato, este estímulo ocorreu em altas concentrações de fosfato no meio.

Mesmo com o acúmulo de nitrogênio na forma de proteínas e pigmentos nas adições de amônio, *Hypnea* sp. foi mais sensível a esta forma de nitrogênio do que as demais espécies estudadas no presente trabalho. *Hypnea* sp. é cultivada em laboratório desde 2002 e mostrou uma aclimação a ambientes oligotróficos. Por se tratar de uma espécie nova e ainda não estudada em relação a sua fisiologia, estudos posteriores se fazem necessários.

Hypnea cervicornis apresentou uma maior preferência ao amônio do que as demais espécies estudadas no presente trabalho, e apresentou um maior crescimento em meio com menor disponibilidade de fósforo. *H. cervicornis* foi proveniente da praia da Fortaleza, em Ubatuba, um ambiente caracterizado como oligo-mesotrófico e limitado por compostos inorgânicos, tendo uma relação de N:P dissolvidos de 15:1 (próxima à relação de Redfield de

16:1) (Teixeira & Tundisi 1981, Braga 1999). A espécie teve o maior acúmulo de nitrogênio na forma de proteínas e pigmentos, sugerindo que as concentrações de amônio não foram limitantes. Além disso, estudos com maiores concentrações de amônio no meio são necessários, a fim de verificar os limites de tolerância da espécie. Na presença de nitrato, *H. cervicornis* apresentou um crescimento maior em meio eutrofizado, além de acumular maiores concentrações pigmentos. A espécie apresentou um comportamento característico de espécies de ambientes oligotróficos, onde, quando ocorre maior disponibilidade de nutrientes, armazenam maiores concentrações de nitrogênio para suprir suas necessidades nutricionais quando esses se tornam limitantes no meio.

Hypnea musciformis foi coletada na Ilha das Couves, uma região considerada oligotrófica. A espécie apresentou características típicas de uma espécie de regiões com baixa disponibilidade de nutrientes, já que em alta disponibilidade, captou e acumulou maiores conteúdos de pigmentos e proteínas solúveis totais. A espécie também apresentou diferentes respostas para as diferentes fontes de nitrogênio, sendo que com adição de amônio, *H. musciformis* cresceu quando a disponibilidade de fosfato foi maior, ao contrário do que ocorreu na presença de nitrato.

O conhecimento dos efeitos da disponibilidade de fósforo e principalmente do nitrogênio sobre as algas é de extrema importância para o sucesso do seu cultivo, seja em campo ou em laboratório (Lobban & Harrison 1997). Entretanto, deve-se ter cuidado ao extrapolar os resultados obtidos em experimentos de laboratório para o campo, uma vez que as condições são distintas.

No presente estudo, as espécies de *Hypnea* apresentaram diferenças no metabolismo do nitrogênio e fósforo. Todas as espécies cresceram com as adições de amônio e nitrato e as concentrações testadas nas razões de N:P de 10:1 e 100:1 não foram inibitórias. Lewis &

Hanisak (1996) observaram uma razão N:P de 30:1 para *Gracilaria* sp., indicando uma limitação por fósforo e Redfield (1958) mostra uma relação de 16:1 de N:P para o fitoplâncton. No presente estudo, podemos observar que a maioria dos parâmetros testados (taxa de crescimento, conteúdo de proteínas solúveis totais e pigmentos), apresentaram melhores respostas em concentrações (30, 40 e 50 μ M de amônio e 100, 200 e 300 μ M de nitrato) que nos remetem a uma razão semelhante a observada pelos autores. Todas as espécies apresentaram uma preferência ao nitrato, em altas concentrações de fósforo ao meio (10:1 de N:P). *H. cervicornis* mostrou uma preferência maior ao amônio como fonte de nitrogênio, do que as demais espécies e *Hypnea* sp. foi mais sensível. Apesar dessas diferenças, *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis* acumularam nitrogênio principalmente na forma de proteínas e ficobiliproteínas em altas concentrações de nutrientes no meio, o que lhes conferem características de espécies biofiltradoras, podendo ser utilizadas na biorremediação de ambientes eutrofizados. Para que isso seja confirmado, estudos subsequentes sobre remoção de nutrientes da água do mar, além de uma ampliação na investigação sobre os efeitos de nitrogênio e fósforo sobre espécies de *Hypnea*, se fazem necessários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. & Meyer, A.S.** 2010. Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *Journal of Applied Phycology*. 23(3): 345-351.
- Andersen, J.H., Schlüter, L. & Ærtebjerg, G.** 2006. Coastal eutrophication: recent developments in definitions and implications for monitoring strategies. *Journal of Plankton Research* 28(7): 621-628.
- Andria, J.R., Vergara, J.J. & Perez-Llorens, J.L.** 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *European Journal of Phycology* 34: 497-504.
- Armstrong, F.A., Williams, P.M. & Strickland, J.D.H.** 1966. Photooxidation of organic matter in sea water by ultraviolet radiation, analytical and other applications. *Nature* 211: 463-481.
- Arnold, T.M., Tanner, C.E & Hatch, W.I.** 1995. Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Marine Ecology Progress Series*. 123: 177-183.
- Barr, N.G. & Rees, T. A.V.** 2003. Nitrogen status and metabolism in the green seaweed *Enteromorpha intestinalis*: an examination of three natural population. *Marine Ecology Progress Series*. 249: 133-144.
- Barufi, J.B.** 2010. Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 325 p.

- Berchez, F.A.S. & Oliveira, E.C.** 1989. Maricultural essays with the carrageenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brazil. In: E.C. Oliveira & N. Kautsky (eds.). Cultivation of Seaweeds in Latin America. Universidade de São Paulo, São Paulo, pp.89-94.
- Bergström, L., Berger, R. & Kautsky, L.** 2003. Negative direct effects of nutrient enrichment on the establishment of *Fucus vesiculosus* in the Baltic Sea. European Journal of Phycology 38: 41-46.
- Bird, K.T., Habig, C. & DeBusk, T.** 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). Journal of Phycology. 18: 344-348.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Braga, E.S.** 1999. Seasonal variation of atmospheric and terrestrial nutrients and their influence on primary production in an oligotrophic coastal system-southeastern Brazil. Revista Brasileira de Oceanografia 47(1): 47-57.
- Buschmann, A.H., Varela, D.A., Hernández-González, M.C. & Huovinen, P.** 2008. Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of *Macrocystis* and *Gracilaria* as biofilters. Journal of Applied Phycology. 20:571-577.
- Cabello-Pasini, A. Macías-Carranza, V., Abdala, R., Korb, N. & Figueroa, F.L.** 2010. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology. 23(3): 362-369.

- Carneiro, M.A.A.** 2007. Estudo do crescimento, eficiência de biofiltração e cinética de absorção de nutrientes (N-NH, N-NO e P-PO₄³⁻) da macroalga *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 75 p.
- CETESB.** 2004. Relatório de qualidade das águas litorâneas no Estado de São Paulo. Balneabilidade das Praias. São Paulo: CETESB, 38p.
- Chopin, T., Gallant, T. & Davison, I.** 1995. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production and photosynthetic pigments. *Journal of Phycology* 31: 283-293.
- Chopin, T. & Wagey, B.T.** 1999. Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. *Botanica Marina* 42: 23-31.
- Chopin, T., Yarish, C., Wilkes, R., Belyea, E., Lu, S. & Mathieson, A.** 1999. Developing *Porphyra*/salmon integrated aquaculture for bioremediation and diversification of the aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*. 11: 463-472.
- Chow, F.** 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 136 p.
- Chow, F. & Oliveira, M. C.** 2008. Rapid and slow modulation of nitrate reductase activity in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta): influence of different nitrogen sources. *Journal of Applied Phycology*. 20: 775-782.
- Cloern, J.E.** 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210: 223–253.

- Cóllen, P.N., Camitz, A., Hancock, R.D., Viola, R. & Pedersén, M.** 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 40: 305-314.
- Conitz, J.M., Fagen, R., Lindstrom, S.C., Plumley, F.G. & Stekoll, M.S.** 2001. Growth and pigmentation of juvenile *Porphyra torta* (Rhodophyta) gametophytes in response to nitrate, salinity and inorganic carbon. *Journal of Applied Phycology*. 13: 423-431.
- Copertino, M.C., Tormena, T. & Seeliger, U.** 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *Journal of Applied Phycology*. 21:31-45.
- Cordeiro, R.A., Gomes, V.M. Carvalho, A.F.U. & Melo, V.M.M.** 2006. Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. *Brazilian archives of Biology and Technology*. 49 (6): 915-921.
- Costa, V.L.** 2005. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): Efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 100 p.
- Costa, V.M.F. da.** 2006. Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{2-}) provenientes da carcinicultura. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 62 p.
- Dean, P.R. & Hurd, C.L.** 2007. Seasonal growth erosion rates and nitrogen and photosynthetic ecophysiology of *Undaria pinnatifida* (Heterokontophyta) in southern New Zealand. *Journal of Phycology*. 45: 1138-1148.

- DeBoer, J.A., Guigli, H.J., Israel, T.L. & D'Elia, C.F.** 1978. Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. *Journal of Phycology*. 14: 261-266.
- DeBoer, J.A.** 1981. Nutrients. *In*: C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). *The Biology of Seaweeds*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 91-356.
- De Laquila, V.** 2006. Estrutura de comunidades de algas marinhas bentônicas no Canal de São Sebastião, SP e presença de hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica de São Paulo, SMA, São Paulo. 156 p.
- Dogyan, L., Pickering, A. & Jun. S.** 2004. Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen source and its availability. *Journal of Ocean University of China*. 3 (1): 75-79.
- Edwards, P.** 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions to Marine Science, University of Texas, Austin* 15: 1-228.
- Ferreira, L.B., Barufi, J.B. & Plastino, E.M.** 2006. Growth of red and Green strains of the tropical agarophytes *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica*. 29(1): 187-192.
- Ferreira, L.B.** 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 200 p.
- Gal-Or, S. & Israel, A.** 2004. Growth responses of *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta) in laboratory and outdoor cultivation. *Journal of Applied Phycology*. 16: 195-202.

- Geraldino, P.J.L., Riosmena-Rodriguez, R. Liao, L.M. & Boo, S.M.** 2010. Phylogenetic relationships within the genus *Hypnea* (Gigartina, Rhodophyta), with a description of *H. caespitosa* sp. nov. *Journal of Applied Phycology*. 46: 336-345.
- Gianesella, S.M.F. & Saldanha-Corrêa, F.M.P.** 2003. Nutrientes, séston e biomassa fitoplanctônica na plataforma interna de São Sebastião- verão de 1994 e primavera de 1997. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* 29(2): 161-172.
- Gordillo, F.J.L., Aguilera, J. & Jiménez, C.** 2006. The response of nutrient assimilation and biochemical composition of Arctic seaweeds to a nutrient input in summer. *Journal of Experimental Botany*. 57(11): 2661-2671.
- Grasshoff, K., Enhardt, M. & Kremling, K.** 1983. *Methods of Sea Water Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 419 p.
- Guimarães, N.R.** 2011. Diversidade do gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) do Estado de São Paulo baseada em marcadores moleculares e morfologia. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo. 94 p.
- Haglund, K. & Pedersén, M.** 1993. Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control. *Journal of Applied Phycology*. 5: 271-284.
- Haines, K.C. & Wheeler, P.A.** 1978. Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 14: 319-324.

- Hayashi, L.** 2007. Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 92 p.
- Huo, Y.Z., Xu, S.N., Wang, Y.Y., Zhang, J.H., Zhang, Y.J., Wu, W.N., Chen, Y.Q. & He, P.M.** 2011. Bioremediation efficiencies of *Gracilaria verrucosa* cultivated in an enclosed sea area of Hangzhou Bay, China. *Journal of Applied Phycology*. 23(2): 173-182.
- Hwang, S.-P.L., Williams, S.L. & Brinkhuis, B.H.** 1987. Changes in internal dissolved nitrogen pools as related to nitrate uptake and assimilation in *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta). *Botanica Marina* 30: 11-19.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F.** 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)*. 167: 191-194.
- Kim, J. K., Kraemer, G.P., Neefus, C.D., Chung, I.K. & Yarish, C.** 2007. Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. *Journal of Applied Phycology*. 19:431-440.
- Knutsen, S. H., E.Murano, M. D'Amato, R. Toffanin, R. Rizzo & S. Paoletti,** 1995. Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*. 7: 565–576.
- Kursar, T.A., Van Der Meer, J. & Alberte, R.S.** 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.

- Lapointe, B.E.** 1986. Phosphorus and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: an experimental field study. *Marine Biology*. 33: 391-399.
- Lee, R.E.** 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 4 ed. 561 p.
- Lewis, R.J. & Hanisak, D.** 1996. Effects of phosphate and nitrate supply on productivity, agar content and physical properties of agar of *Gracilaria* strain G-16S. *Journal of Applied Phycology*. 8: 41-49.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J.** 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, New York, 366 p.
- Lüning K.** 1990. *Seaweeds*. Their environment, biogeography and ecophysiology. New York: Wiley-Interscience. 527p.
- Mao, Y., Yang, H., Zhou, Y., Ye, N. & Fang, J.** 2009. Potencial of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* for integrated multi-trophic aquaculture with scallop *Chlamys farreri* in North China. *Journal of Applied Phycology*. 21: 649-656.
- Martinez-Aragón, J.F., Hernández, I., Pérez-Lloréns, J.L., Vásquez, R. & Vergara, J.J.** 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 1. Phosphate. *Journal of Applied Phycology* 14: 365-374.
- Martins, A.P.** 2004. Efeitos de diferentes fontes e concentrações de nitrogênio no crescimento de variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). Monografia, Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo. 42p.
- Martins, A.P.** 2007. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V.Lamour.

- (Gigartinales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 131 p.
- Martins , A.P., Yokoya, N.S., Carvalho, M.A.M. & Plastino, E.M.** 2008. Effects of kinetin and nitrogen on growth rates, pigment and protein contents in wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 20: 767-773.
- Martins, A.P., Chow, F. & Yokoya, N.S.** 2009. Ensaio *in vitro* da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 32(4): 635-645.
- Martins, A.P. & Yokoya, N.S.** 2010. Intraespecific variations in colour morphs of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. *Hoehnea*. 37 (3): 599-613.
- Mata, L., Schuenhoff, A. & Santos, R.** 2010. A direct comparison of the performance of the seaweeds biofilters, *Asparagopsis armata* and *Ulva rigida*. *Journal of Applied Phycology*. 22: 639-644.
- Moraes, P. C.** 2007. Dinâmica bacteriana em sedimentos costeiros de Ubatuba, São Paulo. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 87p.
- Nagano, C.S., Debray, H., Nascimento, K.S., Pinto, V.P.T., Cavada, B.S., Saker-Sampaio, S., Farias, W.R.L., Sampaio, A.H. & Calvete, J.J.** 2005. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. *Protein Science*. 14: 2167-2176.

- Naldi, M. & Wheeler, P.A.** 1999. Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *Journal of Phycology*; 35: 70-77.
- Naldi, M. & Wheeler, P.A.** 2002. N-15 measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and N-15 accumulation in algal tissue. *Journal of Phycology* 38: 135-144.
- Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Nunes, E.V., Rodrigues, R.F., Goersch, G.V., Cavada, B.S., Calvete, J.J., Saker-Sampaio, S., Farias, W.R.L. & Sampaio, A.H.** 2006. Isolation and characterization of a new agglutinin from the marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. *Biochemical Cell Biology*. 84: 49-54.
- Navarro-Ângulo, L. & Robledo, D.** 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia* 398/399: 315–320.
- Nelson, T.A., Haberlin, K., Nelson, A.V., Ribarich, H., Hotchkiss, R., Van Alstyne, K.L., Buckingham, L., Simunds, D.J. & Fredrickson, K.** 2008. Ecological and physiological controls of species composition in Green macroalgal blooms. *Ecology*. 89 (5): 1287-1298.
- Neushul, M.** 1990. Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hidrobiologia* 204/205: 99-104.
- Nunes, J.M.C.** 2005. Rodófitas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p.

- Nunes, S.O.** 2006. Efeito dos nutrientes (nitrogênio e fósforo) sobre o desenvolvimento da *Gracilaria birdiae*: crescimento e possível uso como biofiltro. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 131p.
- Oliveira, E.C.** 1998. The seaweed resources of Brazil. In: A.T. Crithcley & M. Ohno (eds.). Seaweeds Resources of the World. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp. 366-371.
- Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I.** 2008. Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dióica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. European Journal of Phycology. 43(1): 107-118.
- Perfeto, P.N.M., Dillenburg, L.R., Almeida, T.L. & Schwarzbald, A.** 2004. Efeitos da temperature, intensidade luminosa e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux (Rhodophyta, Gelidiaceae). Bociências. 12(1): 3-10.
- Ramlov, F., Souza, J.M.C., Faria, A.V.F., Maraschin, M., Horta, P.A. & Yokoya, N.S.** 2011. Growth and accumulation of cartotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sond. Ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. Revista Brasileira de Farmacognosia. 21(2): 255-261.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2007. Biologia Vegetal. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 7^a. ed. 856 p.
- Redfield, A.C.** 1958. The biological control chemical factors in the environment. American Scientist 46: 1-221.

- Reis, R.P. & Yoneshigue-Valentin, Y.** 2000. Phenology of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) in three populations from Rio de Janeiro state, Brazil. *Botanica Marina*. 43: 299-304.
- Reis, R.P., Leal, M.C.R., Yoneshigue -Valentin, Y. & Belluco, R.** 2003. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). *Acta Botanica Brasilica* 17: 279-286.
- Robertson-Anderson, D.V., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J.J., Troell, M., Anderson, R.J., Halling, C. & Probyn, T.** 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology*. 20: 579-595.
- Rocha, N.M.** 2009. Tempo de residência da água em um sistema experimental de aquicultura integrada com camarões, ostras e macroalgas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 116 p.
- Rodrigues, J.A.G., Araújo, I.W.F., Paula, G.A. de, Vanderlei, E.S.O., Queiroz, I.N.L., Quinderé, A.L.G., Coura, C.O., Bessa, E.F., Lima, T.B. & Benevides, N.M.B.** 2011. Isolamento, fracionamento e avaliação toxicológica *in vivo* de polissacarídeos sulfatados de *Hypnea musciformis*. *Ciência Rural*. 1-7.
- Ryder, K., West, J. & Nicholis, D.** 1999. Effects of initial enrichment of nitrogen and phosphorus on *Bostrychia* and *Caloglossa* (Ceramiales, Rhodophyta) growth using digital imaging. *Phycological Research*. 47: 39-51.
- Schenkman, R.P.F.** 1980. Biomassa, crescimento, reprodução e ficocolóide de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 73 p.

- Schenkman, R.P.F.** 1986. Cultura de *Hypnea* (Rhodophyta) *in vitro* como subsídio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 81p.
- Schenkman, R.P.F.** 1989. *Hypnea musciformis* (Rhodophyta): ecological influence on growth. Journal of Phycology 25: 192-196.
- Strickland J.D.H & Parsons, T.R.** 1972. A practical handbook of seawater. Fisheries Research Board, Canada, Bulletin n° 167, 311 p.
- Subandar, A., Petrell, R.J. & Harrison, P.J.** 1993. *Laminaria* culture for reduction of dissolved inorganic nitrogen in salmon farm effluent. Journal of Applied Phycology. 5: 455-463.
- Teixeira, C. & Tundisi, J.G.** 1981. The effects of nitrogen and phosphorus enrichments on phytoplankton in the region of Ubatuba (Lat. 23°30'S – Long 45°06'W) Brasil. Boletim do Instituto Oceanográfico, São Paulo, 30(1): 77-86.
- Tsagkamilis, P., Danielidis, D., Dring, M. & Katsaros, C.** 2010. Removal of phosphate by the green seaweed *Ulva lactuca* in a small-scale sewage treatment plant (Ios Island, Aegean Sea, Greece). Journal of Applied Phycology. 22: 331-339.
- Tyrrell, T.** 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400: 525-531.
- Ursi, S. & Plastino, E.M.** 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de dois estádios reprodutivos. Revista Brasileira de Botânica. 24: 587-594.
- Venturini, N.** 2007. Influência da quantidade e qualidade da matéria orgânica sedimentar na estrutura e distribuição vertical e horizontal das comunidades bentônicas na plataforma

- de São Sebastião, São Paulo, Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo. 230 p.
- Wallner, M., Lobo, S., Boccanera, N & Silva, E.M.**1992. Biomass, carrageenan yield and reproductive state of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta: Gigartinales) under natural and experimental cultivated condition. *Aquaculture and Fisheries Mangement* 23: 443-451.
- Wanderley, A.** 2009. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e caotação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 140 p.
- Wynne, M.J.** 2011. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: third revision. *Nova Hedwigia*. J. Cramer. 140: 166 p.
- Yokoya, N.S.** 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.
- Zardini, E.** 1996. Hidrocarbonetos no Canal de São Sebastião e Plataforma Interna Adjacente – Influência do derrame de maio de 1994. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 112 p.

RESUMO

O nitrogênio e o fósforo são os principais elementos que limitam o crescimento das algas marinhas bentônicas e controlam a produtividade primária dos oceanos, e o nitrato e o amônio são íons importantes que influenciam o crescimento desses organismos. Os estudos sobre a disponibilidade do nitrogênio e fósforo no meio marinho e seus efeitos na fisiologia e bioquímica das algas marinhas bentônicas são de grande relevância, uma vez que esses elementos são essenciais para o metabolismo desses organismos e são nutrientes responsáveis por impactos ambientais de origem antrópica. Assim, o presente estudo tem como principal objetivo contribuir para o conhecimento dos efeitos da disponibilidade de nitrogênio e fósforo sobre o crescimento e conteúdo de pigmentos e proteínas em *Hypnea cervicornis* J.Agardh, *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacquin) J.V. Lamour. e *Hypnea* sp. (Rhodophyta, Gigartinales). Os tratamentos testados foram preparados com água do mar esterilizada enriquecida com a solução de Von Stosch 25% sem nitrogênio e fósforo, e com adição de nitrato (NaNO_3) ou de amônio (NH_4Cl) e de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), mantendo uma razão de N:P de 100:1 e 10:1. As concentrações testadas de NO_3^- foram de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 μM e de NH_4^+ foram de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μM . Cada tratamento foi testado com 6 repetições e foram determinadas a taxa de crescimento, morfometria, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas solúveis totais. Os experimentos foram mantidos em temperatura de 23 ± 3 °C, fotoperíodo de 14 h, salinidade 30, pH 8,0 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 $\mu\text{mol de fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Nos tratamentos com limitação de nutrientes, as espécies apresentaram os menores valores na maioria das variáveis analisadas. Todas as espécies estudadas apresentaram uma afinidade ao nitrato em alta disponibilidade de fósforo no meio. As espécies estudadas também apresentaram afinidade ao amônio, entretanto *H. cervicornis* mostrou uma afinidade maior a esta fonte de nitrogênio e *Hypnea* sp. foi mais sensível. As espécies apresentaram um crescimento linear nas adições de amônio, enquanto que em adição de nitrato, as TC apresentaram uma cinética de saturação. As espécies estudadas acumularam o nitrogênio (tanto nitrato quanto amônio) na forma de proteínas solúveis totais e ficobiliproteínas, sendo a ficoeritrina a principal forma de armazenamento. *Hypnea* sp., *H. cervicornis* e *H. musciformis* bioacumularam nitrogênio quando submetidas a altas concentrações de nutrientes no meio, o que lhes conferem características de espécies biofiltradoras, podendo ser utilizadas na biorremediação de ambientes eutrofizados.

Palavras-chave: *Hypnea*, amônio, nitrato, fosfato.

ABSTRACT

The nitrogen and the phosphorus are the main elements that limit the growth of seaweeds, and control the primary productivity of the oceans. The nitrate and the ammonium are important ions that influence the growth of these organisms. Studies on the availability of nitrogen and phosphorus in the marine environment, and their effects on the physiology and biochemistry of seaweeds are of great importance, since such elements are essential for their metabolism, and they are responsible for the anthropic impacts in the environment. The present study contributes to the knowledge of the effects of nitrogen and phosphorus availabilities on the growth, and in the content of pigments and proteins in *Hypnea cervicornis* J. Agardh, *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacquin) J.V. Lamour. and *Hypnea* sp. (Rhodophyta, Gigartinales). Treatments were composed by sterilized seawater enriched with 25% Von Stosch's solution without nitrogen and phosphorus, with addition of nitrate (NaNO_3) or ammonium (NH_4Cl) and phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) in order to obtain N:P ratios of 100:1 e 10:1. Nitrate concentrations varied from 0, 100, 200, 300, 400 to 500 μM and ammonium concentrations varied from 0, 10, 20, 30, 40 to 50 μM . Each treatment was tested with six replicates, and growth rates, morphology, photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin) and total soluble proteins were analysed. The species were cultured at $23 \pm 3^\circ\text{C}$, photoperiod of 14 h, salinity 30, pH 8.0, photon flux densities of 60 to 90 $\text{mol of photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. In treatments with nutrient limitation, the species had the lowest values in all variables. All species showed affinity for nitrate at high concentrations of phosphorus in the medium, and had also affinity to ammonium availability in the medium. *Hypnea cervicornis* showed higher affinity to this nitrogen source, and *Hypnea* sp. was more sensitive to ammonium. The studied species showed a linear increase in the additions of ammonium. In nitrate addition, the growth showed saturation kinetics. All studied species accumulated nitrogen (nitrate or ammonium) as total soluble protein, and the phycoerythrin was the main nitrogen storage in the form of phycobiliproteins. *Hypnea* sp., *H. cervicornis* and *H. musciformis* bio-accumulate high concentrations of nitrogen when submitted to high nutrient availabilities in the medium, which gives them the characteristic of bio-filters, and thus they could be used in bio-remediation in eutrophic environments.

Key words: *Hypnea*, ammonium, nitrate, phosphate.