

FERNANDA RAMLOV

**Variação sazonal dos carotenóides e compostos
fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes
estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*
(Kütz.) Sonder *ex* Dickie (Gracilariales,
Rhodophyta)**

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

SÃO PAULO

2010

FERNANDA RAMLOV

Variação sazonal dos carotenóides e compostos fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta)

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

ORIENTADORA: Dra. NAIR SUMIE YOKOYA
CO-ORIENTADOR: Dr. PAULO ANTUNES HORTA JÚNIOR

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Ramlov, Fernanda

R173v Variação sazonal dos carotenóides e compostos fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (Kuttz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) / Fernanda Ramlov -- São Paulo, 2010.
150 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010
Bibliografia.

1. Algas. 2. Rhodophyta. 3. Carotenóides. I. Título

CDU: 582.26

Dedico esse trabalho aos grandes amores da minha vida:

*Deus,
meus pais, Mara e Walmor,
meu esposo Anderson
e meu filho Lucas.*

*“...Uma nova história Deus tem pra mim,
Um novo tempo Deus tem pra mim,
Tudo aquilo que perdido foi
Ouvirei de sua boca: Te abençoarei...”
(Fernandinho – Uma nova história)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permitiu a conclusão de mais um sonho. A ti Senhor, que cuida do meu deitar e do meu levantar, eu declaro toda glória e todo louvor, pois sem a Tua presença em minha vida, eu nada seria. “Em tudo daí graças; por que esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para conosco” (Tessalonicenses 5:18).

À minha orientadora Dra. Nair Sumie Yokoya, por acreditar e confiar em mim. Obrigada pelo carinho, amizade, conselhos e discussões que ajudaram à concretização de mais uma etapa em minha vida. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Paulo Horta, querido Paulinho, por ter aceitado esta co-orientação e ter passado comigo tantas frustrações. Obrigada pela amizade, paciência e orientação segura durante esses três anos.

Ao Prof. Marcelo Maraschin (Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina), meu orientador do coração, por ter aceitado o desafio de colaborar com este trabalho. Obrigada pela amizade, carinho e pela enorme paciência em tentar esclarecer todas as minhas dúvidas. Sua participação e dedicação foram importantíssimas para que este trabalho fosse concluído.

Ao Prof. Pio Colepicolo (Instituto de Química – Universidade de São Paulo) pela oportunidade de participar do projeto intitulado “Algas Marinhas da Costa Brasileira: Isolamento e Caracterização de Micosporinas e de Substâncias com Atividade Antiinflamatória, Antioxidante e Antibacteriana”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo auxílio financeiro sob forma de concessão de bolsa de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI) através do projeto “Algas Marinhas da Costa Brasileira: Isolamento e Caracterização de Micosporinas e de Substâncias com Atividade Antiinflamatória, Antioxidante e Antibacteriana” e de Doutorado através do programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela infra-estrutura oferecida e, em especial, ao Núcleo de Pesquisa em Ficologia pela disponibilização dos laboratórios, equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial, ao Laboratório de Ficologia (LAFIC) e ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) pela infra-estrutura e suporte oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Alessandra Fonseca, da Universidade Federal de Santa Catarina, e em especial, a Beatriz Gomes pela análise dos nutrientes dissolvidos na água do mar.

À Prof. Edna R. Amante, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilidade do espectrofotômetro para inúmeras análises realizadas neste trabalho.

Ao CIRAM (Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia) pelo fornecimento dos dados climáticos do município de Florianópolis.

Aos funcionários da pós-graduação do Instituto de Botânica, especialmente a Márcia Regina Ângelo (Marcinha) pelo carinho e bom atendimento.

Aos funcionários e amigos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica pelo carinho com que me acolheram, pela agradável convivência, pelo apoio e pela amizade cultivada: Dra. Andréa Tucci, Dra. Célia Leite Sant'Anna, Dra. Diclá Pupo Santos, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães, Dra. Sílvia Susanne Melcher, Dra. Mutue Toyota Fujii, Dra. Luciana Retz de Carvalho, Neide Pozo Rios de Souza, Neuzete Martins Oliveira, Elizete Mítico Mitsugui, José Domingos e Manuel Gomes da Silva.

Aos amigos queridos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia por todo apoio durante esses anos: Daniella, Rodrigo (*in memoriam*), Kleber Renan, Marisa, Camila Malone, Edna, Camilinha, Fernando Pipole, Fernanda Rios, Sandra, Andressa, Cesar, Raquel, Renato, Ingrid e Ana Livia.

Aos amigos do Laboratório de Cultura, Jonatas, André e Kenner pelo cuidado e dedicação que tiveram em manter minhas culturas. Obrigada pelo auxílio na extração de pigmentos e proteínas.

Aos preciosos amigos do LMBV que me receberam tão bem e que contribuíram para que o ambiente de trabalho se tornasse tão agradável e acolhedor: Prof. Paulo F. Dias, Maria Beatriz (Bia), Diego, Ana Cláudia, Luana, Ana Zeni, Virgílio, Simone, Bianca, Priscilla, Aline, Fernanda Savicki, Fernanda de Andrade, Fernanda Borba, Ana, Aureanna, Ricardo, Maíra, Vanessa e Volmir. Em especial a Loísiane (Nani), pelo carinho e por tudo que me ensinou quando cheguei ao LMBV.

Aos amigos do LAFIC por todo carinho: Profa. Roselane, Dávia, Bianca, Julyana, Débora, Fernando, Alejandro, Cíntia Lhullier e Cíntia Martins.

À Leila Hayashi pela amizade e apoio.

Ao Éder C. Schmidt, meu companheiro desde a graduação. Obrigada por todo carinho, pelas discussões, pela leitura criteriosa desta tese e pelo help no abstract. Sua amizade é muito valiosa.

À Aline Paternostro Martins pelo companheirismo, carinho e por sempre me receber tão bem em São Paulo.

Aos amigos que fiz em São Paulo e que, durante esses três anos me receberam com tanto carinho em suas casas, fazendo com que a distância de casa parecesse tão pequena: Priscilla, Juçara, Regina, Adriano, Luciana, Berta e Patrícia. A amizade de vocês vale ouro!

Às minhas queridas amigas que estarão sempre em meu coração, não importa a distância: Kátia, Samantha e Giseli. Obrigada pela torcida.

E finalmente, porém não menos importante, agradeço muito a minha família. Ao meu maior tesouro, meus pais, Mara e Walmor e, meus queridos irmãos, Viviane, Walmorzinho e Renata pelo apoio e amor incondicional. Ao meu amor Anderson, por estar sempre ao meu lado e entender minhas ausências, pelo carinho e compreensão incondicionais, mesmo nos momentos mais críticos. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa. Ao meu filho Lucas, meu bem maior, simplesmente por ser meu!! Amo muito todos vocês.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 - O gênero <i>Gracilaria</i> Grev. – ênfase em <i>Gracilaria domingensis</i> (Kütz.) Sonder ex Dickie.....	1
1.2 - Compostos antioxidantes: carotenóides e compostos fenólicos	5
1.2.1 - Carotenóides	5
1.2.2 - Compostos fenólicos.....	10
1.3 - Estudos ecofisiológicos em espécies de <i>Gracilaria</i>	13
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 - Área de estudo.....	20
3.2 - Estudo fenológico e avaliação dos parâmetros ambientais.....	21
3.3 – Material biológico	24
3.4 – Preparo das amostras e relação massa fresca/massa seca	24
3.5 - Extração e quantificação de carotenóides	25
3.5.1 - Saponificação	25
3.5.2 - Detecção de carotenóides por CLAE.....	26
3.6 - Extração e quantificação de compostos fenólicos	26
3.6.1 - Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	26
3.6.2 - Detecção de compostos fenólicos por CLAE	27
3.7 - Determinação do conteúdo de flavonóides totais	28
3.8 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.....	28
3.8.1 - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	28
3.8.2 - Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	29
3.9 - Metodologia geral de cultivo em laboratório.....	30
3.9.1 - Coleta e esterilização da água do mar.....	30
3.9.2 - Meio de Cultura	31
3.9.3 - Coleta das algas, isolamento de esporos e manutenção das culturas unialgáceas	31
3.10 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas e tetrasporófitos adultos	32
3.11 - Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos adultos cultivados em laboratório	33
3.12 - Extração e dosagem de clorofila a e pigmentos fotossintetizantes.....	34
3.13 - Extração e dosagem de proteínas solúveis totais	34

3.14 - Análise estatística dos resultados.....	35
IV. RESULTADOS.....	36
4.1 - Avaliação dos parâmetros ambientais.....	36
4.2 - Variação fenológica da população.....	39
4.3 - Variação sazonal do perfil carotenóidico e fenólico.....	41
4.3.1 – Carotenóides.....	41
4.3.2 - Compostos fenólicos.....	48
4.3.3 - Análise de correlações.....	57
4.3.4 - Análise de Componentes Principais (PCA).....	60
4.4 - Atividade antioxidante dos extratos.....	62
4.4.1 - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	63
4.4.2 - Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	64
4.5 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas tetrasporofíticas e gametofíticas.....	65
4.5.1 - Plântulas derivadas da germinação de carpósporos.....	67
4.5.2 - Plântulas derivadas da germinação de tetrásporos.....	73
4.6 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes em tetrasporófitos adultos..	79
4.7 - Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos adultos cultivados em laboratório.....	83
V. DISCUSSÃO.....	90
5.1 - Estudo fenológico da população.....	90
5.2 - Variação sazonal do perfil carotenóidico e fenólico.....	92
5.2.1 - Carotenóides.....	92
5.2.2 - Compostos fenólicos.....	95
5.2.3 – Análise de Componentes Principais (PCA).....	97
5.3 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.....	98
5.4 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas.....	101
5.5 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes em tetrasporófitos adultos	104
5.6 – Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos adultos cultivados em laboratório.....	106
VI. CONCLUSÕES.....	110
VII. RESUMO.....	114
VIII. ABSTRACT.....	116
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Aspecto geral do talo de *Gracilaria domingensis* (tetrasporófitos). Escala: 1 cm. 2
- Figura 2: Histórico de vida de *Gracilaria domingensis* (adaptado de Oliveira & Plastino 1994)..... 4
- Figura 3: Ciclização do licopeno à α e β - caroteno e formação das xantofilas a partir do α e β - caroteno (adaptado de Römer *et al.* 2002). 6
- Figura 4: Via de biossíntese de compostos fenólicos (adaptado de Vermerris & Nicholson 2008 – Enzimas: PAL= fenilalanina amônia liase; C4H= cinamato 4-hidroxilase; 4CL= 4-cumaroil-Coa ligase)..... 11
- Figura 5: Exemplos de estruturas químicas representativas das classes de compostos fenólicos (adaptado de Shahidi & Naczki 2006). 12
- Figura 6: Mapa do município de Florianópolis com a localização da Praia da Lagoinha (em vermelho no mapa) (Horn-Filho 2002). 21
- Figura 7: Área de coleta na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC (A e B), com esquema ilustrativo da unidade amostral (A) e aspecto geral da população de *Gracilaria domingensis* no local de coletas (C e D) (Fotos: F. Ramlov)..... 22
- Figura 8: Variação mensal dos valores de precipitação pluviométrica total mensal (mm) e do número total de dias de chuva (NDC) no município de Florianópolis, Santa Catarina. ... 36
- Figura 9: Variação mensal das médias de temperatura (máxima e mínima) do ar no município de Florianópolis, Santa Catarina. 37
- Figura 10: Variação mensal dos valores de insolação total (horas de brilho solar) no município de São José e médias da velocidade dos ventos (ms) no município de Florianópolis, Santa Catarina. 38
- Figura 11: Proporção dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada coluna representa a porcentagem total referente a n=20 indivíduos. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil. 39
- Figura 12: Variação do comprimento (cm) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey para n desigual. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil. 40
- Figura 13: Variação da massa fresca (g) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil..... 41

- Figura 14: Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* coletados no outono/2008 (Picos: 1 – luteína; 2 – zeaxantina livre; 3 – zeaxantina esterificada; 4 – β -criptoxantina; 5 – α -caroteno; 6 – *trans*- β -caroteno; 7 – *cis*- β -caroteno). 42
- Figura 15: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão. Os dados referentes à zeaxantina representam a somatória das médias de zeaxantina livre e esterificada; os dados referentes ao β -caroteno representam a somatória das médias das formas isoméricas *cis* e *trans*. CarT: carotenóides totais. 47
- Figura 16: Perfis de absorvância UV-vis dos extratos aquoso, MeOH 80% e MeOH 80% HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* coletados no verão/2009, na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, para a janela espectral de 290 a 750 nm. 49
- Figura 17: Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (CLAE, 280 nm) do extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* coletados no inverno/2008 (Picos: 1 – epicatequina; 2 – composto X; 3 – galocatequina). 51
- Figura 18: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH 80% – HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 μL) \pm desvio padrão. FenóisT: compostos fenólicos totais. 56
- Figura 19: Distribuição fatorial do componente principal 1 (PC1) e do componente principal 2 (PC2) para os dados de conteúdo médio de carotenóides e compostos fenólicos determinado por CLAE encontrados nos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* durante o primeiro ano de coletas (outono, inverno e primavera/2008 e verão/2009) na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC. 61
- Figura 20: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de carotenóides e compostos fenólicos determinado por CLAE encontrados nos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* durante o segundo ano de coletas (outono e inverno/2009 e verão/2010) na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC. 62
- Figura 21: Aspecto geral de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em VSES 25%, (A e B) 35 ups, (C e D) 40 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, irradiância de $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Escala: A-B: 25 μm ; C-D: 100 μm 66
- Figura 22: Aspecto geral de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos (A-D) de *Gracilaria domingensis* após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em VSES 25%, (A e B) 20°C , (C e D) 25°C , 34 ups, fotoperíodo de 14 h, irradiância de $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Escala: A-B: 25 μm ; C-D: 100 μm 67

- Figura 23: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 68
- Figura 24: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 69
- Figura 25: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 70
- Figura 26: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 71
- Figura 27: Efeito da irradiância (50, 100 e 150 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹) e nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES) na taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal e eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 4). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES). 72
- Figura 28: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=2). 74
- Figura 29: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=2). 75

- Figura 30: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão de 20 plântulas de uma repetição (n=1)..... 76
- Figura 31: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão de 20 plântulas de uma repetição (n=1). 77
- Figura 32: Efeito da irradiância (50, 100 e 150 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹) e nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES) na taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal e eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 2). 78
- Figura 33: Efeito da temperatura na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetrásporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 79
- Figura 34: Aspecto geral de segmentos apicais de tetrásporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Escala: 5 mm. 80
- Figura 35: Efeito da salinidade (ups) na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetrásporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em meio VSES 25%. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 81
- Figura 36: Efeito da irradiância (50 e 100 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹) e nutrientes (25% e 50% de VSES) na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetrásporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES). 82

Figura 37: Efeitos da irradiância (50 e $100 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) no conteúdo de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) e clorofila *a* de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis*, após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repetição. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n= 3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES)..... 84

Figura 38: Efeitos da irradiância (50 e $100 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) no conteúdo de proteínas solúveis totais de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repetição. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n= 3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES)..... 85

Figura 39: Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em meio VSES 25% sob a irradiância de $100 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. (Picos: 1 – luteína; 2 – zeaxantina livre; 3 – zeaxantina esterificada; 4 – β -criptoxantina; 5 – *trans*- β -caroteno)..... 86

Figura 40: Efeitos da irradiância (50 e $100 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) na concentração de carotenóides determinada por CLAE (luteína, zeaxantina livre, zeaxantina esterificada, β -criptoxantina e β -caroteno) de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repetição. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n= 3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES)..... 88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Resultados referentes à ocorrência do ciclo violaxantina em espécies do gênero *Gracilaria*..... 10
- Tabela 2: Valores ótimos de temperatura e salinidade para o desenvolvimento de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de espécies do gênero *Gracilaria*..... 17
- Tabela 3: Valores ótimos de temperatura e salinidade para o desenvolvimento de plantas adultas de espécies do gênero *Gracilaria*. 18
- Tabela 4: Relação das estações do ano e datas de coletas de *Gracilaria domingensis* na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC e os números de acesso dos exemplares depositados no Herbário SP, Instituto de Botânica, SP. 23
- Tabela 5: Relação massa fresca/massa seca (MF/MS) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (n=3). 25
- Tabela 6: Composição química da solução de nutrientes de von Stosch (VSES) preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996)..... 31
- Tabela 7: Valores médios \pm desvio padrão (n=3) da temperatura, O₂ dissolvido, pH, salinidade da água do mar e maré baixa (n^o dias/mês; maré \leq 0,2) obtidos durante o período de coleta de *Gracilaria domingensis* na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010..... 38
- Tabela 8: Concentração dos nutrientes dissolvidos na água do mar obtidos durante o período de coleta de *Gracilaria domingensis* na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores correspondem a média \pm desvio padrão (n=3). 38
- Tabela 9: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 43
- Tabela 10: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 45
- Tabela 11: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de gametófitos masculinos de *Gracilaria*

domingensis. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 µL) ± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 46

Tabela 12: Concentração dos carotenóides (µg/g - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de indivíduos não-férteis de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 µL) ± desvio padrão. 48

Tabela 13: Concentração de compostos fenólicos totais (µg/g – massa seca) determinada por espectrofotometria de UV-vis dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (triplicata). 50

Tabela 14: Concentração de flavonóides totais (µg/g – massa seca) determinada por espectrofotometria de UV-vis dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (triplicata). 50

Tabela 15: Concentração dos compostos fenólicos (µg/g - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 µL) ± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 53

Tabela 16: Concentração dos compostos fenólicos (µg/g - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 µL) ± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 55

Tabela 17: Concentração dos compostos fenólicos (µg/g - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 µL) ± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. 55

Tabela 18: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros ambientais e os compostos carotenóides e fenólicos, referentes ao primeiro ano de coletas dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em negrito, correlação significativa. 58

Tabela 19: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros ambientais e os compostos carotenóidicos e fenólicos referentes ao segundo ano de coletas dos estádios reprodutivos de <i>Gracilaria domingensis</i> . Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em negrito, correlação significativa.....	59
Tabela 20: Inibição do radical DPPH para o extrato MeOH 80% dos estádios reprodutivos de <i>Gracilaria domingensis</i> . As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC) no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata). As letras (mesma coluna) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.	63
Tabela 21: Coeficientes de correlação de Pearson entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração de compostos fenólicos totais dos estádios reprodutivos de <i>Gracilaria domingensis</i> . Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em negrito, correlação significativa.....	64
Tabela 22: Inibição da oxidação lipídica para o extrato hexano:acetona (1:1, v/v) dos estádios reprodutivos de <i>Gracilaria domingensis</i> . As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC) no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata). As letras (mesma coluna) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.	64
Tabela 23: Coeficientes de correlação de Pearson entre a % de inibição da oxidação lipídica e a concentração de carotenóides totais dos estádios reprodutivos de <i>Gracilaria domingensis</i> . Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em negrito, correlação significativa.....	65
Tabela 24: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento do disco basal e do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de <i>Gracilaria domingensis</i> após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50, 100 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES). Em negrito, efeito significativo.	73
Tabela 25: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos <i>Gracilaria domingensis</i> após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em negrito, efeito significativo.	83
Tabela 26: Análise de variância bifatorial do conteúdo de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) e clorofila <i>a</i> de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos <i>Gracilaria domingensis</i> após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em negrito, efeito significativo.	85
Tabela 27: Análise de variância bifatorial do conteúdo de proteínas solúveis totais de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos <i>Gracilaria domingensis</i> após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em negrito, efeito significativo.	86

Tabela 28: Análise de variância bifatorial do conteúdo de carotenóides (luteína, zeaxantina livre, zeaxantina esterificada, β -criptoxantina e *trans*- β -caroteno) de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em negrito, efeito significativo. 89

I. INTRODUÇÃO

1.1 - O gênero *Gracilaria* Grev. – ênfase em *Gracilaria domingensis* (Kütz.) *Sonder ex Dickie*

Atualmente, as espécies do gênero *Gracilaria* são responsáveis por cerca de 50% da produção mundial de ágar (McHugh 2003). Isto se deve principalmente às altas taxas de crescimento e fácil propagação vegetativa das espécies deste gênero, que favorecem o seu cultivo (Kain & Destombe 1995). Além disso, a descoberta de tratamentos alcalinos que possibilitam o melhoramento da qualidade de seu gel também torna atrativa a sua utilização (Critchley 1993, Murano 1995). Algumas espécies do gênero são utilizadas como biofiltros em cultivos integrados (McHugh 2003, Soriano 2007) e como fonte de alimento, principalmente em países asiáticos (De Casabianca *et al.* 1997). Adicionalmente, são utilizadas como matéria-prima na produção de metabólitos secundários para produção de medicamentos e cosméticos (Zemke-White & Ohno 1999, Smit 2004, Souza *et al.* 2007).

O gênero *Gracilaria* apresenta ampla distribuição geográfica, compreendendo mais de 110 espécies (Gurgel & Fredericq 2004). Dentre elas, *Gracilaria domingensis* (figura 1) é amplamente distribuída no litoral brasileiro, sendo uma das poucas espécies do gênero que ocorre na região sul do país (Oliveira 1977). Esta espécie é produtora de ágar, mas sua importância comercial deve-se a sua utilização na dieta humana (alimento *in natura*), sendo coletada esporadicamente e exportada para o mercado alimentício japonês (Guimarães *et al.* 1999, Plastino *et al.* 1999). A atividade antitumoral de polissacarídeos “tipo-ágar” foi relatada para esta espécie (Fernández *et al.* 1989) bem como a sua utilização em cosméticos com formulações direcionadas à fotoproteção (Cardozo 2007).

No litoral brasileiro, *Gracilaria domingensis* é caracterizada por apresentar morfos de cor vermelho (selvagem), verde e marrom. Plastino *et al.* (1999) verificaram que as colorações vermelha, verde e marrom de *G. domingensis* são determinadas por um par de alelos com herança mendeliana de origem nuclear codominante, sendo o alelo que confere a cor verde codominante ao que confere a cor vermelha. Quando em heterozigose, eles expressam a cor marrom, observada apenas na fase tetrasporofítica. Com relação à frequência nas populações naturais, as variantes pigmentares de *G. domingensis* podem ser denominadas morfos, já que os mesmos ocorrem em frequência igual ou superior a 1% (Guimarães *et al.* 2003).



Figura 1: Aspecto geral do talo de *Gracilaria domingensis* (tetrasporófitos). Escala: 1 cm.

Estudos relacionados à fisiologia de *Gracilaria domingensis* revelaram que morfos verde e vermelho apresentaram taxas de crescimento semelhantes e crescentes quando submetidos à irradiância de 20 a 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que em 220 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ o morfo verde apresentou taxa de crescimento maior do que o morfo vermelho (Guimarães 2000). Investigações sobre o conteúdo pigmentar dos morfos de cor de *G. domingensis* demonstraram que o morfo verde apresentou menores quantidades de ficoeritrina. Além disso, experimentos realizados em laboratório demonstraram que as taxas de fotossíntese, irradiância de compensação e saturação luminosa de morfos verdes foram maiores do que as observadas para os morfos vermelhos (Guimarães 2000).

A análise da ultra-estrutura de células vegetativas dos morfos de cor de *Gracilaria domingensis*, considerando a organização, morfologia, localização, número e disposição dos cloroplastos e tilacóides, revelou a não distinção entre os morfos verde e vermelho (Guimarães & Plastino 1999). A radiação UVB causou mudanças ultra-estruturais em *G. domingensis* cultivada em laboratório, incluindo um aumento no número de plastoglobulos, mudanças na organização mitocondrial, destruição da organização interna do cloroplasto e o desaparecimento dos ficobilissomos (Schmidt *et al.* 2010).

Os efeitos das concentrações de ágar, bem como de fitorreguladores e irradiância, foram avaliados sobre o crescimento e a morfogênese dos morfos verde e vermelho de *Gracilaria domingensis* cultivados *in vitro*. A adição de ágar no meio de cultura induziu a formação de três tipos de calo (calo apical, calo basal e calo intermediário) em ambos os morfos de cor, desempenhando um papel regulatório em processos morfogenéticos dos

morfos pigmentares desta espécie (Ramlov *et al.* 2009). Em linhas gerais, os fitorreguladores estiveram relacionados à taxa de crescimento e à taxa de regeneração direta de segmentos apicais e intercalares dos morfos pigmentares de *G. domingensis*, sendo que os efeitos estimulatórios dos fitorreguladores ocorreram principalmente quando cultivados sob alta irradiância ($150 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Ramlov 2007).

A análise do desempenho somático e reprodutivo dos estádios do histórico de vida dos morfos verde, vermelho e marrons de *Gracilaria domingensis* revelou que o desempenho somático e reprodutivo de tetrásporófitos foi maior que o de gametófitos na maior parte das condições testadas (número de carpósporos e tetrásporos liberados; diâmetro de esporos; sobrevivência de carpósporos e tetrásporos; taxas de crescimento em diferentes condições nutricionais e de radiação ultra-violeta; atividade da nitrato redutase em diferentes condições nutricionais; taxas fotossintéticas e síntese de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em diferentes condições de radiação UVB) (Ferreira 2008). Além disso, os resultados obtidos neste estudo mostraram que os estádios do histórico de vida de *G. domingensis* têm características metabólicas distintas, o que confere às plantas uma maior plasticidade fenotípica.

Gracilaria domingensis foi cultivada nos litorais do Estado da Bahia (Accioly 2004) e de Santa Catarina (Yoshimura 2006, Salles *et al.* 2010), apresentando boas perspectivas econômicas. Salles *et al.* (2010) destacaram a susceptibilidade da espécie à herbivoria, sendo este um dos principais entraves para uma produção estável. O crescimento de *G. domingensis* também foi avaliado em viveiros de camarão, onde a mesma apresentou baixas taxas de crescimento nas estações chuvosa e seca, apresentando correlação negativa com a quantidade de amônio, ortofosfato e transparência da água nos locais de cultivo (Pereira *et al.* 2007).

O histórico de vida de *Gracilaria domingensis* é do tipo *Polysiphonia* (figura 2), com alternância de gerações isomórfica (Plastino *et al.* 1999), sendo dividido em três fases: duas diplóides (carposporófito e tetrásporófito) e uma haplóide (gametófito). Enquanto o gametófito e o tetrásporófito são estágios independentes, o carposporófito se desenvolve sobre o gametófito feminino (Plastino *et al.* 1999).

Gracilaria domingensis é uma espécie encontrada frequentemente na zona entre-marés, ficando exposta durante a maré baixa e submersa na maré alta. Como outras macroalgas, esta espécie é obrigada a suportar variações de temperatura, radiação solar e dessecação exibindo, desta forma, mecanismos adaptativos para sobreviver a estas variações. Os carotenóides e compostos fenólicos estão relacionados à proteção contra radiação, sendo que estes metabólitos apresentam variação quali e quantitativa segundo a sazonalidade (Abdala-Díaz *et al.* 2006), espécie (Schubert *et al.* 2006, Connan *et al.* 2007), distribuição na

região entre-marés (Connan *et al.* 2007) e tipo de tecido (Bianchi *et al.* 1997). Embora os estádios reprodutivos do histórico de vida de *G. domingensis* sejam isomórficos, é provável que existam diferenças entre eles em relação ao conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos. Ainda, visto que a abundância desta espécie diminui do litoral nordeste para o sul do Brasil (Prof. Dr. Paulo Antunes Horta, comunicação pessoal), o conhecimento da dinâmica quali/quantitativa de compostos fotoprotetores fornecerá informações importantes sobre o comportamento da população de *G. domingensis* da Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC.

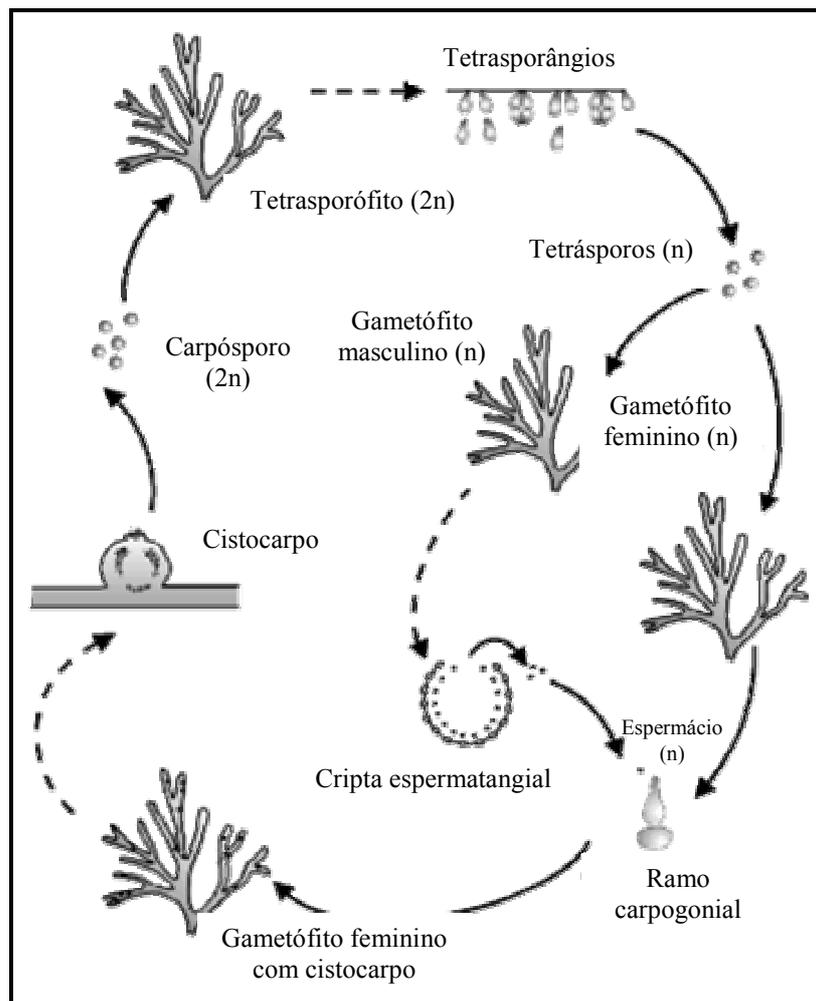


Figura 2: Histórico de vida de *Gracilaria domingensis* (adaptado de Oliveira & Plastino 1994).

1.2 - Compostos antioxidantes: carotenóides e compostos fenólicos

Assim como as plantas terrestres, as macroalgas marinhas não são capazes de se locomover para evitar as condições adversas do ambiente, sejam físicas, químicas ou biológicas, como competir com outras algas ou se defender do ataque de herbívoros, patógenos e epibiontes. Por isso, ao longo da evolução, as macroalgas marinhas desenvolveram outros mecanismos de defesa. Dentre estes mecanismos, encontra-se a defesa química, usualmente associada à presença de compostos do metabolismo secundário (Taiz & Zeiger 1991).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos sem função direta sobre o crescimento e desenvolvimento, mas com papel fundamental na sua interação com o meio ambiente (Verpoorte 2000). Esses metabólitos podem atuar como sinalizadores na interação das macroalgas com o meio abiótico e biótico, possuindo alta diversidade química (Verpoorte 2000, Hartmann 2007). Ainda, suas vias de síntese podem estar ativadas durante estágios particulares do crescimento e desenvolvimento, ou sob certas condições ecológicas e ambientais (Santos 2004).

O interesse pelo isolamento e caracterização química de metabólitos secundários é grande, uma vez que muitos destes compostos apresentam atividade biológica frente a várias patologias humanas. Segundo Harborne (1999), os metabólitos secundários podem ser divididos em três classes: compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides. Neste trabalho, duas classes são contempladas no estudo dos metabólitos secundários de *Gracilaria domingensis*: compostos fenólicos e carotenóides (uma subclasse dos terpenos), visto que são compostos amplamente estudados por apresentarem propriedades antioxidantes (Stahl & Sies 2005, Heim *et al.* 2002, Angelo e Jorge 2007, Guaratini 2008, Zhang *et al.* 2007, Zubia *et al.* 2007).

1.2.1 - Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais, derivados do isopreno, sendo caracterizados estruturalmente por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, geralmente contendo 40 átomos de carbono (tetraterpenos), sempre com uma ou duas estruturas cíclicas (anel β -ionona) que terminam em ligações conjugadas (Cardozo *et al.* 2007). Estes compostos são sintetizados por plantas, algas e alguns microorganismos, sendo que já foram descritas mais de 750 estruturas químicas diferentes, isoladas de fontes naturais (Britton *et al.* 2004). Os terpenos podem ser formados a partir de duas vias biossintéticas: a via clássica, conhecida como via do mevalonato, responsável pela formação dos sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos

(C₃₀). Esta via ocorre no citosol e os precursores são o piruvato e acetil-CoA. Alternativamente, estes compostos podem ser sintetizados a partir da via do metileritritol fosfato (MEP), conhecida como via alternativa, origina os monoterpenos (C₁₀), diterpenos (C₂₀) e tetraterpenos (C₄₀); ocorre nos plastídeos e os precursores são o piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Aharoni *et al.* 2006, Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000). Em ambas as vias há a formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), com cinco carbonos. A IPP é isomerizada a difosfato de dimetilalila (DMAPP), que serve de substrato para a formação de um composto de 20 carbonos, difosfato de geranylgeranila (GGPP), precursor do primeiro carotenóide de 40 carbonos, o fitoeno (Cunningham & Gantt 1998, Sandmann 2001, Bramley 2002). O fitoeno, por processos de dessaturação é transformado em licopeno, que é o substrato para as reações de ciclização. O processo de ciclização pode ocorrer em uma ou em ambas as extremidades da molécula. Os carotenóides, após o processo de ciclização, podem ser divididos em dois grupos: os carotenos e as xantofilas, que são formadas através da oxigenação dos carotenos, pela adição de grupamentos hidroxila, carbonila, éter, acetato e epóxido. Na figura 3 é apresentado o esquema da via biossintética dos carotenóides.

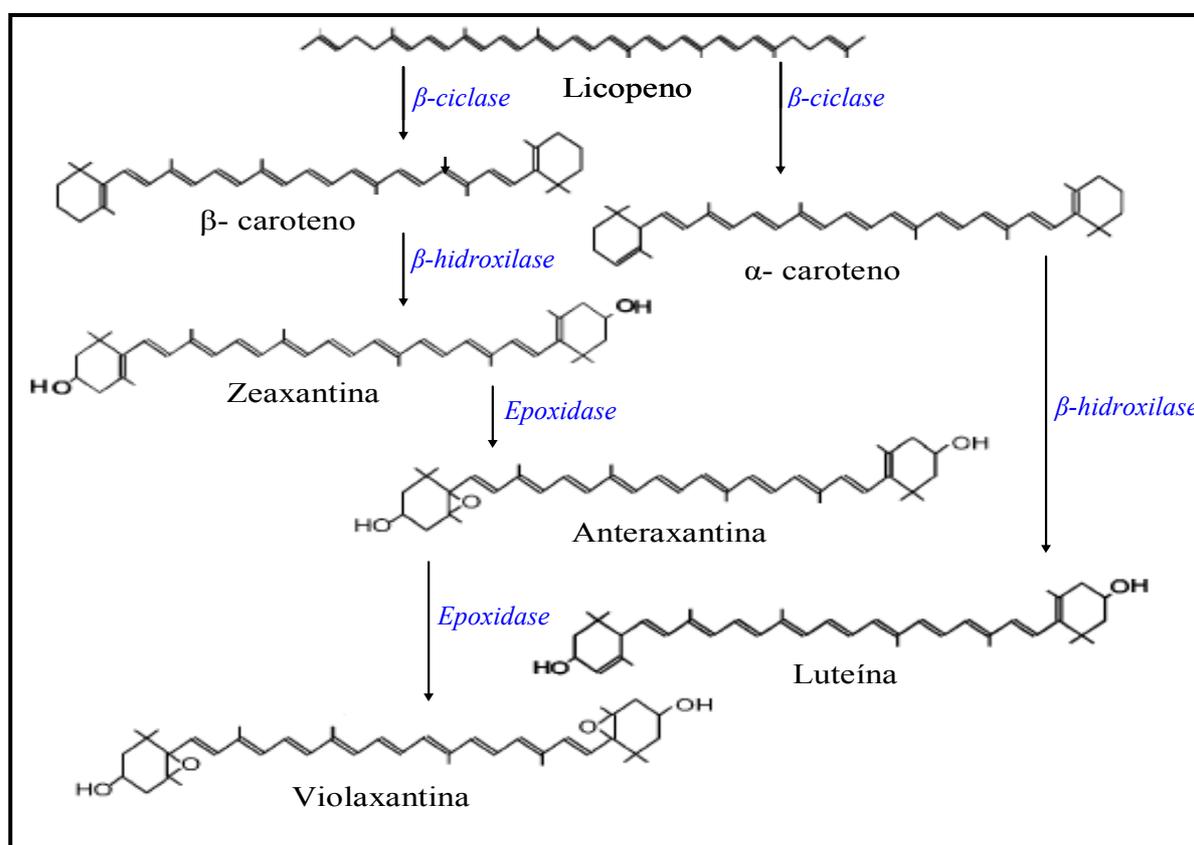


Figura 3: Ciclização do licopeno à α e β- caroteno e formação das xantofilas a partir do α e β- caroteno (adaptado de Römer *et al.* 2002).

As macroalgas marinhas, assim como outros organismos fotossintetizantes, estão expostas a mudanças bruscas de irradiância. Para evitar danos fotooxidativos e a fotoinibição, provocados pela exposição à alta irradiância, as macroalgas possuem mecanismos de fotoproteção que operam juntos. Um dos mecanismos relacionados à fotoproteção é a produção de carotenóides.

A fotoinibição é um termo que descreve o declínio na viabilidade fotossintética em decorrência ao excesso de iluminação (Araújo & Deminicis 2009). Este termo é utilizado para designar o processo de fotooxidação erroneamente. A fotooxidação consiste na fotodestruição dos pigmentos fotossintetizantes, causada pelo excesso de oxigênio e luz. Portanto, a fotoinibição da fotossíntese não é consequência da destruição do reservatório de pigmentos, mas, ao contrário, a descoloração dos pigmentos ocorre depois que dado grau de fotoinibição ocorreu (Hendrey *et al.* 1987). A formação de radicais livres ocorre como resposta ao estresse causado pelo excesso de luz e mecanismos de fotoproteção devem atuar a fim de inibir o processo de fotoinibição e conseqüentemente, a fotooxidação dos pigmentos. Um dos mecanismos utilizados na proteção das células é a síntese de carotenóides.

Os carotenóides atuam como pigmentos acessórios, captando a energia na região espectral em que as clorofilas absorvem pouco e transferem-na para os centros de reação do fotossistema II (Mathews-Roth 1997, Lesser 2006). São também importantes à conjugação e estabilidade de alguns complexos pigmentos-proteínas fotossintetizantes (função estrutural). Outra função destes pigmentos é a fotoproteção do aparato fotossintetizantes contra danos oxidativos, através do seqüestro do excesso de energia (*quenching*) do triplete da clorofila, evitando assim a formação do oxigênio singlete (1O_2) (Uenojo *et al.* 2007). Ainda, o ciclo das xantofilas é considerado um mecanismo de adaptação a condições de alta exposição à luz solar, onde parte do excesso de energia luminosa captada pelas antenas é dissipada na forma de calor. O funcionamento do ciclo das xantofilas envolve a de-epoxidação de uma xantofila, induzida por excesso de luz, e sua reconversão (epoxidação) em condições de baixa luminosidade (ou escuro) (Esteban *et al.* 2009, Jahns *et al.* 2009).

Segundo Esteban *et al.* (2009), seis ciclos das xantofilas são descritos, sendo dois baseados em α -xantofilas (ciclo luteína-epóxido e luteína-sifonoxantina) e quatro baseados em β -xantofilas (ciclo diadinoxantina, ciclo violaxantina, ciclo violaxantina truncado e ciclo anteraxantina-zeaxantina). Para as algas vermelhas já foi observada a ocorrência dos três últimos ciclos.

Com relação à saúde humana, os carotenóides estão envolvidos na prevenção de doenças degenerativas, devido a sua propriedade antioxidante (Römer *et al.* 2002). Estes compostos têm capacidade de desativar o 1O_2 e seqüestrar radicais peroxila, inibindo assim

processos oxidativos. A eficácia dos carotenóides como antioxidantes está relacionada ao número de duplas ligações conjugadas e à sua polaridade (Tapiero *et al.* 2002, Barreiros *et al.* 2006). Carotenóides formados por moléculas que possuem grupamentos polares apresentam maior eficiência na prevenção da oxidação das membranas, enquanto que aquelas que possuem grupamentos apolares (como por exemplo, o licopeno e o β -caroteno) são mais eficientes no combate aos radicais livres no interior da membrana, sendo mais regeneradores que preventivos (Woodall *et al.* 1997). Efeitos benéficos contra cânceres (Gomes 2007), doenças de coração (Machlin 1995) e degeneração macular (Leung 2008) também foram reportados para estes compostos, bem como sua atuação como precursores na síntese de compostos retinóides (Ambrosio *et al.* 2006, Uenojo *et al.* 2007).

As algas vermelhas, assim como outros organismos fotossintetizantes, produzem carotenóides para se protegerem contra o excesso de luminosidade. Alguns autores relatam que as algas vermelhas deveriam possuir o ciclo das xantofilas ativo, no entanto, a sua existência é controversa e não foi conclusivamente demonstrada, exceto para *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira, onde em experimentos de incubações da espécie no claro ($85 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e no escuro (total), pode-se observar a presença de zeaxantina, anteraxantina e violaxantina. A produção de maiores concentrações de violaxantina, em incubações no escuro, e de maiores concentrações de zeaxantina, em incubações no claro, indicou a presença do ciclo violaxantina ativo em *G. birdiae* (Ursi *et al.* 2003).

Os primeiros estudos realizados com espécies do gênero *Gracilaria* em relação a presença ou não do ciclo violaxantina foram realizados após o trabalho de Brown & McLachlan (1982), onde os autores observaram a presença de anteraxantina e violaxantina em *G. lichenoides* Grev., sendo que anteraxantina foi o carotenóide majoritário na espécie. Estes resultados foram contraditórios aos obtidos em estudos anteriores, que definiram o perfil de carotenóides em espécies deste gênero como sendo: α - caroteno, β - caroteno, zeaxantina e luteína, sendo esta última o carotenóide majoritário. A tabela 1 mostra os principais resultados relacionados ao ciclo das xantofilas em espécies do gênero *Gracilaria*.

Andersson *et al.* (2006) estudaram a dinâmica de carotenóides de *Gracilaria domingensis* coletadas na Suécia e mantidas em cultura por um período de 4 anos. Em experimentos cultivando a alga no claro (depois de aclimatada por 30 min no escuro a alga foi submetida a pulsos de luz de 0 a $2000 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e no escuro (depois de receber o pulso de luz a alga foi colocada novamente no escuro total por 30 min), pode-se observar que o carotenóide predominante foi a anteraxantina, seguido de β -caroteno. Observaram também a presença de zeaxantina, violaxantina, β -criptoxantina e de um carotenóide na posição do licopeno (Carotenoid at Lycopene Position, CLP) e ausência de luteína e α -

caroteno. Os autores chegaram à conclusão de que o ciclo violaxantina não estava ativo para esta espécie, uma vez que não foi observada a interconversão dos pigmentos participantes do ciclo.

O perfil carotenóidico de *Gracilaria domingensis* foi determinado também para espécimes coletados na Praia do Cotovelo, Natal, e para morfos pigmentares coletados no município de Rio do Fogo, ambos localizados no Rio Grande do Norte, Brasil (Guaratini 2008, Pereira 2009). A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou que para os espécimes coletados na Praia do Cotovelo, o carotenóide majoritário foi a zeaxantina seguido de anteraxantina (0,249 e 0,224 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de massa seca, respectivamente), e violaxantina, aloxantina e β -caroteno também foram detectados (Guaratini 2008). Com relação aos morfos pigmentares de *G. domingensis* coletados nas praias de Rio do Fogo, pode-se observar maiores concentrações de β -caroteno, em seguida, de zeaxantina, bem como a presença de violaxantina e anteraxantina. A dinâmica dos carotenóides diferiu entre os morfos pigmentares desta espécie, o que remete a distintos padrões de tolerância à radiação (Pereira 2009). Em ambos os trabalhos não foram detectadas a presença de luteína e de α -caroteno.

Tabela 1: Resultados referentes à ocorrência do ciclo violaxantina em espécies do gênero *Gracilaria*.

Espécie	Experimento	Resultados	Referência
<i>G. verrucosa</i> (Huds.) Papenf.	incubações no claro e escuro	presença de zeaxantina; ausência de anteraxantina e violaxantina	Vershinin & Kamnev (1996)
<i>G. gracilis</i> (Stackh.) Steentoft, L.M. Irvine & Farnham	presença de carotenóides em espécimes com e sem fotoinibição	redução de anteraxantina e aumento de zeaxantina; ausência de violaxantina	Rmiki <i>et al.</i> (1996)
<i>G. multipartita</i> (Clemente) Harv.	presença de carotenóides em espécimes com e sem fotoinibição	redução de anteraxantina e aumento de zeaxantina; ausência de violaxantina	Rmiki <i>et al.</i> (1996)
<i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> Zhang & B.M. Xia	mudança de irradiância – espécime aclimatada em 40 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e transferida para 500 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 10 dias; processo inverso também foi avaliado	zeaxantina (majoritário), β -caroteno e luteína; ausência de violaxantina e anteraxantina	Carnicas <i>et al.</i> (1999)
<i>G. gracilis</i> e <i>G. textorii</i> (Suringar) De Toni	composição carotenóidica de espécies coletadas em campo	acúmulo de zeaxantina ou anteraxantina - resposta de aclimação ao estresse causado pelo excesso de luz	Schubert <i>et al.</i> (2006)
<i>G. gracilis</i>	fotoinibição – espécie é aclimatada no escuro e submetida a irradiância de 1300 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em diferentes períodos, por 60 minutos	cinética de diminuição e recuperação da eficiência máxima da fotossíntese foi menor no grupo zeaxantina (<i>Gracilaria</i>) – contrário para grupo luteína/anteraxantina	Schubert & García-Mendoza (2008)

1.2.2 - Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos têm grande importância nos processos fisiológicos, e nas algas marinhas estão envolvidos principalmente na proteção contra a radiação UV, defesa antiherbivoria, resistência a patógenos e defesa contra o crescimento de epífitas (Amsler & Fairhead 2006). Estes compostos formam um grupo amplamente distribuído, com mais de 8000 estruturas químicas conhecidas, que possuem em comum pelo menos um anel benzênico ligado a grupo(s) hidroxila(s) (Kuskoski *et al.* 2005). Este esqueleto básico pode ser modificado, originando uma grande diversidade de compostos, normalmente polares, que

podem ter sua solubilidade aumentada pela associação com glicosídeos (unidades de monossacarídeos, por exemplo).

Os compostos fenólicos são sintetizados pela via do ácido chiquímico, em que se origina o aminoácido aromático fenilalanina, intermediário inicial na via de síntese de fenilpropanóides. Pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) a fenilalanina origina o ácido cinâmico, que é hidroxilado a ácido *p*-cumárico, sendo este convertido a *p*-cumaroil-CoA, que é o substrato utilizado para a síntese das classes de compostos fenólicos. O *p*-cumaroil-CoA ainda pode ser sintetizado a partir da via do acetil-CoA/malonil-CoA (Vermerris & Nicholson 2008) (Figura 4).

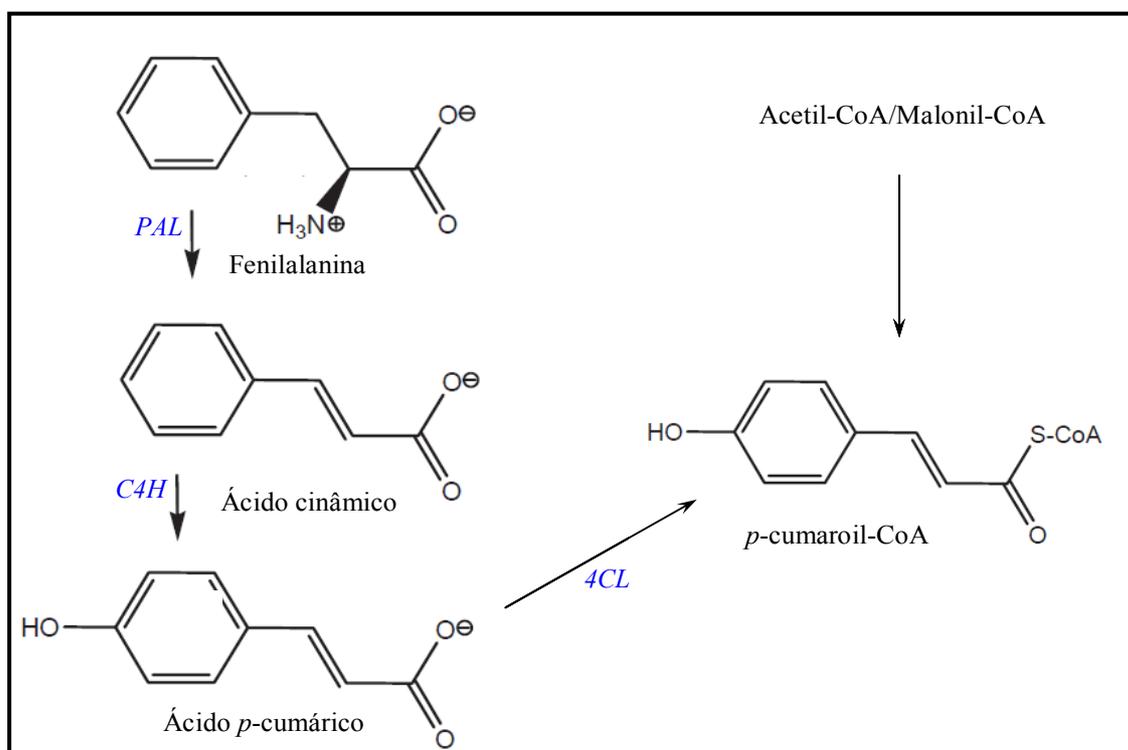


Figura 4: Via de biossíntese de compostos fenólicos (adaptado de Vermerris & Nicholson 2008 – Enzimas: PAL= fenilalanina amônia liase; C4H= cinamato 4-hidroxilase; 4CL= 4-cumaroil-Coa ligase).

Segundo Shahidi & Nacz (2006), os compostos fenólicos podem ser divididos em seis subclasses baseado na sua estrutura química, representados na Figura 5: ácidos fenólicos (5A - $\text{C}_6\text{-C}_1$), flavonóides (5B- $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_1$), estilbenos (5C- $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$), lignanas ($5\text{D- C}_6\text{-C}_3$)₂, taninos ($5\text{E- C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$)_n e cumarinas (5F- $\text{C}_6\text{-C}_3$). Os flavonóides representam a maior classe de compostos fenólicos e podem ser divididos em outras subclasses de acordo com as variações que ocorrem no seu anel heterocíclico (Rossi & Kasum 2002, Tapiero *et al.* 2002).

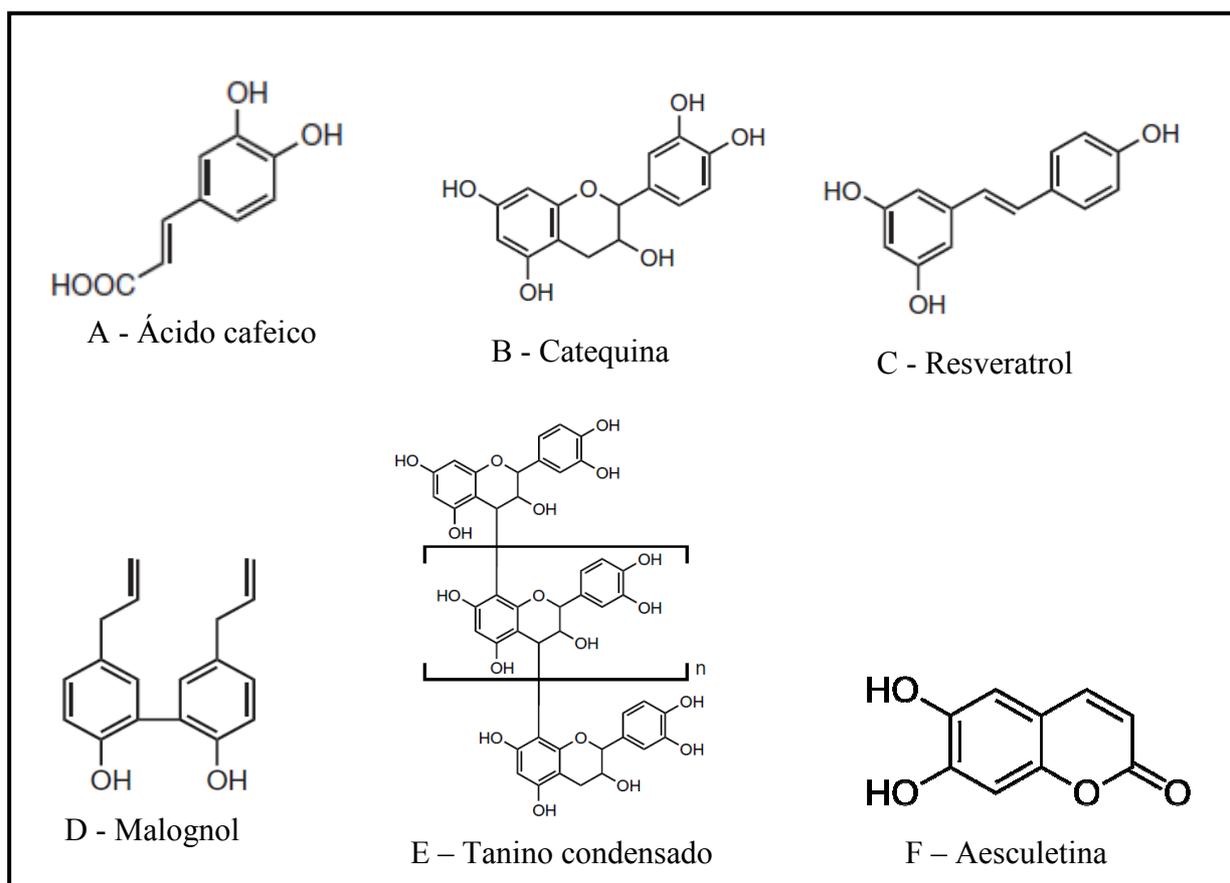


Figura 5: Exemplos de estruturas químicas representativas das classes de compostos fenólicos (adaptado de Shahidi & Naczk 2006).

Os compostos fenólicos, assim como os carotenóides, estão envolvidos na prevenção de inúmeras patologias, devido a sua alta capacidade antioxidante (Heim *et al.* 2002, Tabart *et al.* 2009). Estes compostos atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis (Angelo & Jorge 2007). Os antioxidantes fenólicos interagem principalmente com os radicais peroxila, bem como têm a capacidade de quelar metais de transição. A atividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura, do grau de metoxilação e do número de hidroxilas presentes na molécula (Barreiros *et al.* 2006). Os compostos fenólicos são efetivos na prevenção de doenças cardiovasculares (Pozzi 2007) e apresentam atividade antitumoral, antiinflamatória, antiviral e antimutagênica (King & Young 1999, Yang *et al.* 2001).

As macroalgas, por viverem no ambiente marinho, que é rico em íons sulfato, cloreto, brometo e iodeto, possuem alta capacidade em sintetizar substâncias halogenadas e sulfatadas. As algas vermelhas são mais eficientes na produção destes compostos quando comparadas as algas verdes e pardas, sendo altamente eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados

(ágar e carragenana) (Carvalho & Roque 2000). No entanto, poucos trabalhos na literatura são encontrados com relação a compostos fenólicos em algas vermelhas, principalmente para o gênero *Gracilaria*.

Carvalho & Roque (2000) realizaram uma revisão bibliográfica com relação à ocorrência de fenóis halogenados e/ou sulfatados em espécies de algas vermelhas, pardas e verdes. Entretanto, nenhuma espécie do gênero *Gracilaria* foi citada nesta revisão. Novoa *et al.* (2001) avaliaram a atividade antioxidante de *Bryothamnion triquetum* (S.G. Gmel.) M. Howe e os possíveis compostos fenólicos relacionados a esta atividade, e observaram a presença dos ácidos *trans*-cinâmico, *p*-cumárico e ferúlico no extrato aquoso da espécie.

Com relação às espécies do gênero *Gracilaria*, Yoshie *et al.* (2000) estudaram a distribuição de catequinas em algas vermelhas, verdes e pardas coletadas no Japão e observaram a ocorrência de epigalocatequina e epigalocatequina galato em *G. textorii*. Os trabalhos realizados por Zhang *et al.* (2007) e Zubia *et al.* (2007) tiveram como objetivos verificar a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais no extrato de várias espécies. Os autores observaram que os extratos de *G. gracilis*, *G. lemaneiformis* (Bory) Grevil., *G. textorii*, *G. vermiculophylla* (Ohmi) Papenf., *G. bursa-pastoris* (S.G.Gmel.) P.C.Silva, *G. caudata* J. Agardh, *G. cornea* J. Agardh, *G. cylindrica* Børgesen e *G. tikvahiae* McLachlan apresentavam baixa atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos totais quando comparados a outras espécies de algas vermelhas, verdes e pardas. A fração éter de petróleo do extrato de *G. edulis* (G.S.Gmel.) P.C.Silva apresentou alto conteúdo de compostos fenólicos (16,26 mg equivalentes de ácido gálico/g extrato) comparativamente a outras espécies de algas vermelhas.

1.3 - Estudos ecofisiológicos em espécies de *Gracilaria*

A produtividade de um sistema de cultivo de macroalgas marinhas pode ser controlada por processos fisiológicos, bem como por fatores bióticos e abióticos que podem influenciar o seu metabolismo. Com isso, a caracterização fisiológica de espécies que apresentam importância econômica, como as espécies do gênero *Gracilaria* é um requisito fundamental, uma vez que as informações obtidas auxiliarão na seleção de locais e métodos adequados para os cultivos em média e larga escala. A determinação dos limites de tolerância e dos valores ótimos para o crescimento frente a diferentes fatores ainda contribui para a compreensão dos padrões de distribuição e ocorrência de uma determinada espécie (Lobban & Harrison 1994). Fatores como temperatura, salinidade irradiância e disponibilidade de nutrientes são determinantes do crescimento e produtividade de uma população, bem como de sistemas de

cultivo, uma vez que estão envolvidos nos processos fotossintetizantes (Kirst 1989, Lee *et al.* 2007).

Dentro deste contexto, o cultivo de macroalgas marinhas em laboratório torna-se uma importante ferramenta, uma vez que os fatores citados acima podem ser manipulados e controlados, o que permite avaliar seus efeitos no desempenho vegetativo e reprodutivo de uma espécie. Yokoya & Oliveira (1993) enfatizaram a necessidade de estudar a influência destes fatores em diferentes fases do desenvolvimento da alga, como por exemplo, em plântulas derivadas da germinação de esporos e em indivíduos adultos, uma vez que ambas as fases apresentam respostas distintas com relação aos limites de tolerância e dos valores ótimos de crescimento.

Yokoya e Oliveira (1993) estudaram a influência da temperatura no crescimento de plântulas derivadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos em algumas espécies do gênero *Gracilaria* coletadas em diferentes regiões subtropical e temperada da América do Sul (tabela 2). As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. caudata* (Ubatuba, SP) toleraram temperaturas de 14 a 30°C, tendo seu ótimo de crescimento a 30°C. Já as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos não sobreviveram a temperaturas iguais e inferiores a 18°C e seu crescimento máximo ocorreu a 26°C. Para *G. chilensis* C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira (proveniente do Chile), foi observado que as plântulas derivadas da germinação de carpósporos toleraram temperaturas entre 14 e 26°C, não sobrevivendo a 30°C, e o ótimo de crescimento foi observado a 18 e 22°C. As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. verrucosa* (proveniente da Argentina) apresentaram ampla tolerância a diferentes temperaturas (14 a 30°C), tendo seu ótimo de crescimento a 26°C. Orduña-Rojas & Robledo (1999) observaram que a combinação das temperaturas de 25 e 28°C e baixos níveis de irradiância (10, 25 e 50 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foram as condições ótimas para o crescimento de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. cornea*.

Com relação aos efeitos da variação de salinidade (tabela 2), foi observado que plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. caudata* toleraram limites mais amplos de salinidade (20 a 55 ups) quando comparados às plântulas derivadas da germinação de tetrásporos (30 a 55 ups) (Yokoya & Oliveira 1993). Para *Gracilaria* sp. foi observado que as plântulas derivadas da germinação de carpósporos toleraram variação de salinidades entre 25 e 45 ups, e tiveram melhor desenvolvimento nas salinidades de 30 a 40 ups (Yokoya & Oliveira 1993).

Estudos realizados com plantas adultas evidenciaram que a temperatura é um fator limitante para a distribuição das espécies e que os ótimos de crescimento geralmente são característicos do local onde as espécies são encontradas (tabela 3). Yokoya & Oliveira

(1992a) observaram que *Gracilaria cornea* e *G. caudata* coletadas no Brasil apresentaram valores ótimos para o crescimento nas temperaturas de 26 e 30°C, diferentemente de *G. chilensis* e *G. verrucosa* que apresentaram o maior crescimento a 22°C, apresentando branqueamento do talo a 30°C. Para *G. gracilis* e *G. aculeata* (Hering) Papenf., ambas as espécies coletadas na África do Sul, as maiores taxas de crescimento foram observadas quando submetidas à temperatura de 22°C (Wilson & Critchley 1997). Raikar *et al.* (2001) observaram que espécies de *Gracilaria* coletadas no Japão, Malásia e Índia apresentaram valores ótimos para o crescimento em diferentes temperaturas, sendo que as espécies coletadas no Japão apresentaram maior crescimento a 20°C enquanto que espécies coletadas na Índia e Malásia tem seus ótimos de crescimento a 25 e 30°C. *Gracilaria chorda* Holmes e *G. verrucosa* coletadas na Korea apresentaram maiores taxas de crescimento nas temperaturas de 17, 25 e 30°C, sendo que o crescimento ótimo ocorreu na temperatura de 25°C (Choi *et al.* 2006). Foi observado que o crescimento ótimo de *G. chorda* coletada no Japão ocorreu entre as temperaturas de 18 a 24°C (Kakita & Kamishima 2006). Para os morfos de coloração vermelha de *G. birdiae* coletados nos Estados do Ceará e Espírito observou-se que o morfo proveniente do Ceará apresentou melhor desempenho a 32,7°C quando comparado ao morfo proveniente do Espírito Santo, e a resposta foi inversa a 17,9°C, sugerindo uma possível diferenciação ecotópica (Ursi 2005).

A salinidade é outro fator que interfere nos processos biológicos, afetando a osmorregulação e a concentração de íons. Desta forma, este parâmetro tem um papel determinante na distribuição das macroalgas em diversos ambientes (tabela 3), bem como na seleção de locais para a implantação de cultivos comerciais. Yokoya & Oliveira (1992b) observaram que *Gracilaria caudata* e *Gracilaria* sp. toleraram uma ampla variação na salinidade (10 a 60 ups) e tiveram seus ótimos de crescimento a 35 ups. *Gracilaria gracilis* e *G. aculeata* não toleraram salinidades de 5 ups e tiveram crescimento lento a 15 ups. O crescimento ótimo ocorreu a 35 ups para *G. aculeata* e a 30 ups para *G. gracilis* (Wilson & Critchley 1997). Para *Gracilaria* spp. coletadas no Japão, Índia e Malásia foi observada a morte dos explantes na salinidade de 10 ups, crescimento lento a 15 ups e ótimo de crescimento a 25 ups. Em salinidades acima de 25 ups foi observado o decréscimo da taxa de crescimento (Raikar *et al.* 2001). *Gracilaria chorda* e *G. verrucosa* toleraram salinidades de 5 a 35 ups, tendo seu crescimento ótimo a 25 ups (Choi *et al.* 2006).

A irradiância afeta a fotossíntese e por conseqüência o crescimento das espécies de algas marinhas bentônicas. As espécies de *Gracilaria* estão distribuídas em uma ampla variedade de habitats, ocorrendo desde águas oceânicas até estuários. *Gracilaria gracilis* teve suas maiores taxas de crescimento quando submetidas à irradiância de 170 μmol de fótons. m^{-2}

$^2.s^{-1}$, diferentemente de *G. aculeata* que teve as maiores taxas de crescimento sob irradiância de $70 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.s^{-1}$ (Wilson & Critchley 1997). *Gracilaria chorda* apresentou maiores taxas de crescimento em irradiâncias de 60 a $120 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.s^{-1}$, tendo seu crescimento reduzido quando cultivada sob irradiância de 20 e $40 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.s^{-1}$ (Kakita & Kamishima 2006). Experimentos em laboratório relacionados aos morfos pigmentares de *Gracilaria* spp. e irradiância demonstraram que as taxas de crescimento dos morfos de cor de *G. birdiae* provenientes de populações do Ceará e do Espírito Santo foram diferenciadas quando cultivados em irradiâncias de 100 e $200 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.s^{-1}$ (Ursi 2005).

Os níveis de nutrientes são fatores limitantes para o crescimento das algas marinhas bentônicas, onde o nitrogênio é considerado o principal nutriente limitante (Hanisak 1990, Lee *et al.* 2007), e a captação deste elemento pode ser limitada por diversos parâmetros ambientais, tais como temperatura e salinidade (Wilson & Critchley 1997). O crescimento de estágios reprodutivos de *Gracilaria birdiae* foi avaliado em laboratório por Ursi & Plastino (2001) em dois meios de cultura comumente utilizados para o cultivo de macroalgas marinhas: Provasoli e von Stosch. Gametófitos masculinos e tetrasporófitos tiveram crescimento superior em meio Provasoli enquanto que os gametófitos femininos tiveram crescimento superior em von Stosch, sugerindo que os estágios reprodutivos apresentam necessidades nutricionais distintas (Ursi & Plastino 2001). Em gametófitos femininos do morfo vermelho de *G. birdiae* provenientes do Ceará e Espírito Santo foram observadas taxas de crescimento superiores quando cultivadas em von Stosch 12,5% e 25% comparativamente às concentrações de 50%, 75% e 100% (Ursi 2005). Gametófitos femininos dos morfos verde e vermelho de *G. cornea* apresentaram maiores taxas de crescimento em von Stosch 12,5% quando comparada a concentração de 25% (Ferreira *et al.* 2006). Gametófitos femininos vermelhos de *G. domingensis* também apresentaram maiores taxas de crescimento quando cultivadas em von Stosch 12,5% e 25% (Ferreira 2008).

Tabela 2: Valores ótimos de temperatura e salinidade para o desenvolvimento de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de espécies do gênero *Gracilaria*.

Espécie	Procedência	Local de coleta	Temperatura (°C)	Salinidade (ups)	Referência
<i>G. caudata</i>	Ubatuba, SP, Brasil	Região entre-marés	30	20-40	Yokoya & Oliveira (1993)
<i>G. verrucosa</i>	Puerto Madrin, Argentina	-	26	-	Yokoya & Oliveira (1993)
<i>G. chilensis</i>	Rio Tubul, Chile	-	18 e 22	-	Yokoya & Oliveira (1993)
<i>Gracilaria</i> sp.	Araruama, RJ, Brasil	Lagoa		30-40	Yokoya & Oliveira (1993)
<i>G. cornea</i>	Yucatan, México	Infralitoral	25 e 28	-	Orduña-Rojas & Robledo (1999)

-: Dados ausentes

Tabela 3: Valores ótimos de temperatura e salinidade para o desenvolvimento de plantas adultas de espécies do gênero *Gracilaria*.

Espécie	Procedência	Local de coleta	Temperatura (°C)	Salinidade (ups)	Referência
<i>G. cornea</i>	Natal, RN, Brasil	Região entre-marés	26 e 30	-	Yokoya & Oliveira (1992a)
<i>G. caudata</i>	Ubatuba, SP, Brasil	Região entre-marés	26 e 30	35	Yokoya & Oliveira (1992a, b)
<i>G. chilensis</i>	Rio Tubul, Chile	-	22	-	Yokoya & Oliveira (1992a)
<i>G. verrucosa</i>	Puerto Madrin, Argentina	-	22	-	Yokoya & Oliveira (1992a)
<i>Gracilaria</i> sp.	Araruama, RJ, Brasil	Lagoa	-	35	Yokoya & Oliveira (1992b)
<i>G. gracilis</i>	Luderitz, Namibia, África do Sul	Região entre-marés	22	30	Wilson & Critchley 1997
<i>G. aculeata</i>	Palm Beach, KwaZulu-Natal, África do Sul	Franja inferior da região entre-marés	22	35	Wilson & Critchley 1997
<i>G. vermiculophylla</i>	Nagasaki, Japão	Região entre-marés	25	15	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. arcuata</i> Zanardini	Nagasaki, Japão	Região entre-marés	20	25-30	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. incurvata</i> Okamura	Nagasaki, Japão	Região entre-marés	25	30	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. textorii</i>	Nagasaki, Japão	Região entre-marés	20	20-30	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. lichenoides</i>	Penang, Malásia	Região entre-marés	30	25	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. edulis</i>	Mandapam, Índia	Região entre-marés	30	30	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. follifera</i> (Forssk.) Børgesen	Gopnath, Índia	Região entre-marés	25	30	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. corticata</i> J. Agardh	Diu, Índia	Região entre-marés	25	25	Raika <i>et al.</i> (2001)
<i>G. verrucosa</i>	Ihoijin Jangheung, Korea	Região entre-marés	25	15-25	Choi <i>et al.</i> (2006)
<i>G. chorda</i>	Ihoijin Jangheung, Korea	Região entre-marés	25	25	Choi <i>et al.</i> (2006)
<i>G. chorda</i>	Tokushima, Japão	Região entre-marés	18 e 24	-	Kakita & Kamishima 2006

-: dados ausentes

II. OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho buscou conhecer a dinâmica populacional de *Gracilaria domingensis* em seu limite sul de distribuição, bem como avaliar a variação sazonal de alguns metabólitos secundários com atividade antioxidante e avaliar os efeitos de fatores ambientais no desenvolvimento de plântulas derivadas germinação de carpósporos e de tetrásporos e de tetrásporófitos adultos em laboratório.

Para atingir o objetivo geral, foram delineados alguns objetivos específicos:

1. Caracterizar a variação fenológica da população ao longo de dois anos;
2. Determinar sazonalmente os perfis carotenóidico e fenólico, conteúdo de flavonóides totais e a atividade antioxidante de extratos organosolventes de espécimes pertencentes a diferentes estádios reprodutivos;
3. Avaliar os efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas originadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos, bem como no desenvolvimento de tetrásporófitos adultos;
4. Avaliar os efeitos de nutrientes e irradiância no acúmulo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrásporófitos adultos cultivados em laboratório.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Área de estudo

A praia da Lagoinha está localizada no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°35' S e 48°33' W) (Figura 6). Este município apresenta-se dividido em duas Baías (Baías Norte e Sul), com uma área superficial de 430 km² e 50 km de comprimento (PMF 2010). A área caracteriza-se pela presença de grande disponibilidade de substrato rochoso. O lado da Ilha que fica voltado para o Atlântico apresenta declive íngreme, com planícies bastante reduzidas, formando dunas e praias extensas. No lado voltado para oeste o declive é menos acentuado, formando planícies cujas águas drenam para as Baías da Ilha. As planícies arenosas são contornadas por costões rochosos e sofrem influência de rios com nascentes em morros próximos (Cruz, 1998). As planícies arenosas voltadas para a Baía Norte apresentam sedimentos compostos de areia média a cascalhos, enquanto a voltada para a Baía Sul contém sedimentos que variam de areias finas a cascalhos (Horn-Filho *et al.* 2000).

O regime de marés na região é do tipo micromarés, com 0,83 m de amplitude média para as marés de sizígia e 0,15 m para as marés de quadratura, sendo os ventos predominantes de N-NE seguidos pelos de maior intensidade, de S-SE, mais freqüentes e intensos durante o inverno (Cruz, 1998).

Através da análise de imagens de temperatura e concentração de clorofia na superfície do mar obtidas através de um sensor MODIS, Pereira *et al.* (2009) observaram que a distribuição superficial da temperatura na plataforma continental catarinense é mais homogênea no verão e que o outono e o inverno são caracterizados por apresentar menores valores de temperatura e maiores valores de clorofila devido a presença da frente costeira do Rio da Prata. Fenômenos de ressurgência foram observados ao sul da Ilha de Santa Catarina nos meses de novembro, janeiro e fevereiro.

Biogeograficamente a região está posicionada na província temperada quente (Horta *et al.* 2001), com a flora caracterizada pelo predomínio de algas vermelhas, destacando-se as populações de *Sargassum* e *Pterocladia* como as mais abundantes na franja inferior da região entre marés (Bouzon 2005).

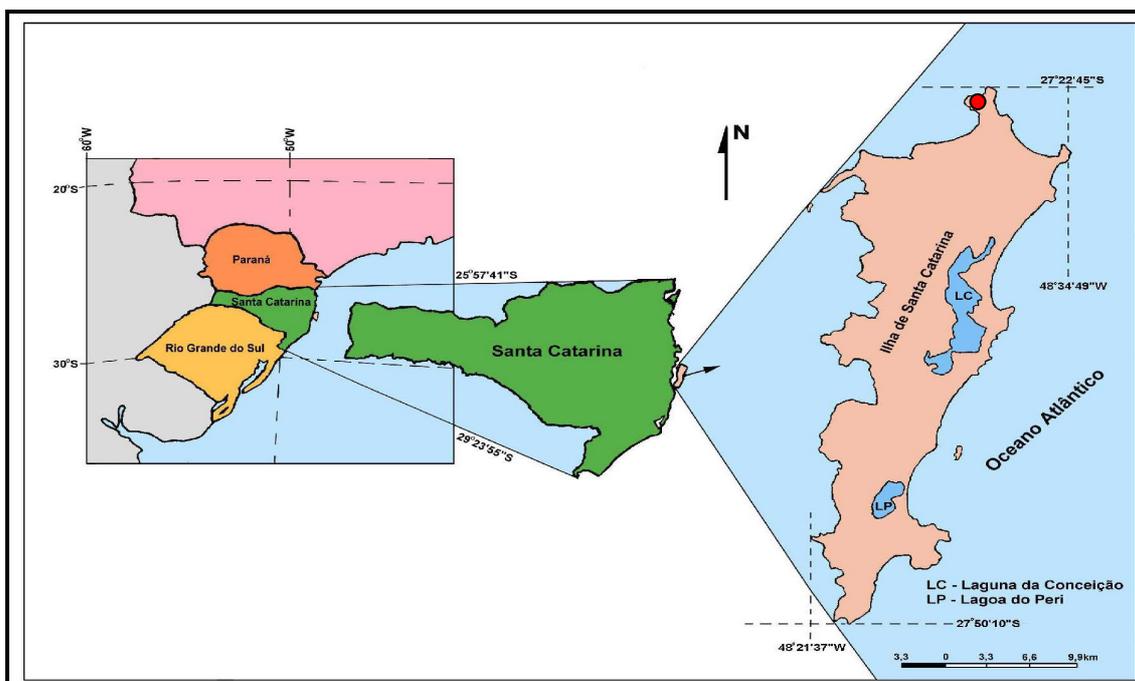


Figura 6: Mapa do município de Florianópolis com a localização da Praia da Lagoinha (em vermelho no mapa) (Horn-Filho 2002).

3.2 - Estudo fenológico e avaliação dos parâmetros ambientais

A fim de caracterizar os estádios do histórico de vida da população de *Gracilaria domingensis* em seu limite sul de distribuição foi selecionada a praia da Lagoinha, onde foram coletados aleatoriamente ramos de 20 espécimes, durante o período de maio/2008 (outono) a janeiro/2010 (verão) (tabela 4), amostrando em todas as épocas do ano, com exceção da coleta de primavera/2009, que devido as condições adversas do tempo não foi possível coletar as macroalgas. A área amostral foi delimitada por uma transecção de 10 m de comprimento paralela a linha da costa e por uma perpendicular de 5 m de comprimento. Dentro desta unidade amostral, realizou-se a amostragem considerando coordenadas aleatórias do respectivo eixo cartesiano (figura 7). Quando representantes da população não foram observados no ponto sorteado, amostrou-se o espécime mais próximo.

A população de *Gracilaria domingensis* cresce na região entre-marés e por este motivo, as coletas foram realizadas em períodos de maré baixa, de acordo com a tábua de marés para o Porto de Florianópolis. As coletas foram realizadas entre 8 e 10 h da manhã.

No laboratório, as algas foram separadas segundo os estádios do histórico de vida com o auxílio de lupa e quando necessário cortes à mão livre foram feitos para análise em microscópio óptico. Em seguida, foi realizada a biometria de cada espécime (comprimento do maior ramo e massa fresca).

Exemplares de cada coleta foram depositados no Herbário SP, do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, cujos dados (número de acesso, data de coleta e estação do ano) foram apresentados na tabela 4.

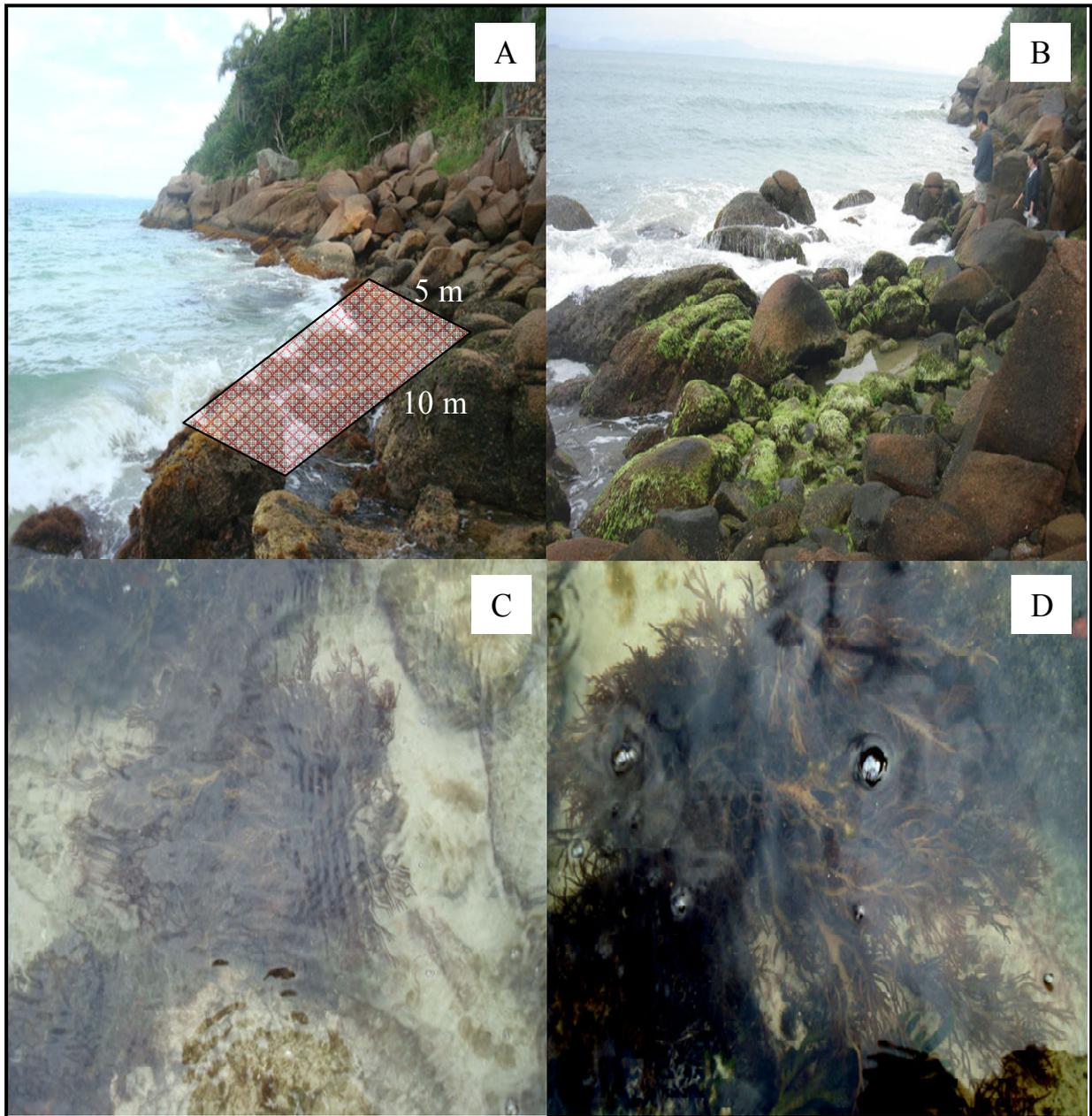


Figura 7: Área de coleta na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC (A e B), com esquema ilustrativo da unidade amostral (A) e aspecto geral da população de *Gracilaria domingensis* no local de coletas (C e D) (Fotos: F. Ramlov).

Tabela 4: Relação das estações do ano e datas de coletas de *Gracilaria domingensis* na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC e os números de acesso dos exemplares depositados no Herbário SP, Instituto de Botânica, SP.

Estação do Ano	Data de coleta	Número de acesso ao Herbário SP
Outono	20/05/2008	SP 400835
Inverno	23/07/2008	SP 400836
Primavera	14/10/2008	SP 400837
Verão	15/01/2009	SP 400838
Outono	12/05/2009	SP 400839
Inverno	24/07/2009	SP 400840
Primavera	16/10/2009	*
Verão	18/01/2010	SP 400885

*: as algas não foram coletadas

Para a avaliação dos parâmetros físico-químicos da água, foram analisados o O₂ dissolvido (Oxímetro WTW Oxi 315i), pH (pHmetro WTW 330i/SET), temperatura (termômetro de mercúrio 0,5° C de precisão), salinidade (refratômetro SZJ- S10 ATC) e os nutrientes dissolvidos na água do mar (ortofosfato, nitrato e N-amoniaco). Para a análise dos nutrientes da água do mar, as amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas estéreis e armazenadas com gelo durante o transporte ao laboratório. No laboratório, a água do mar foi filtrada em filtro GF-52C (Schleicher & Schuell) e congelada para posterior análise. As amostras de água do mar foram analisadas no Laboratório de Ficologia (CCB-UFSC) segundo metodologia proposta por Grasshoff *et al.* (1983). Essas análises foram realizadas com a colaboração da Dra. Alessandra Fonseca.

Para avaliação dos parâmetros ambientais, dados relacionados à insolação total mensal (horas de brilho solar), precipitação pluviométrica total mensal (mm), número total de dias de chuva por mês (NDC), média mensal da temperatura mínima e máxima absoluta (°C) e média mensal da velocidade dos ventos (ms) foram solicitados e gentilmente cedidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia (CIRAM) da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Todos os dados foram coletados na estação meteorológica de Florianópolis, com exceção da insolação total mensal, onde a estação está localizada no município de São José (grande Florianópolis). Os dados relacionados à maré baixa mensal foram baseados no número de dias no mês de coleta que a maré esteve menor do que 0,2, de acordo com a tábua de marés para o Porto de Florianópolis.

3.3 – Material biológico

O material biológico utilizado para extração de carotenóides e compostos fenólicos foram tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis*. Na população de *G. domingensis* da praia da Lagoinha não foi observada a existência dos morfos pigmentares desta espécie, que são geralmente encontrados nas populações que ocorrem na região nordeste do Brasil. Os indivíduos coletados apresentavam coloração que variavam de vermelho a marrom-avermelhado.

3.4 – Preparo das amostras e relação massa fresca/massa seca

Após a remoção dos epibiontes, os espécimes de um mesmo estágio reprodutivo foram lavados em água destilada, reunidos, picados e homogeneizados. Deste homogeneizado foram feitas sub-amostras de 1 g (massa fresca). Em seguida, as amostras foram congeladas a -20°C para posterior extração e análise do conteúdo de carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides e da atividade antioxidante que foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Maraschin, CCA, UFSC.

O extrato para quantificação destes compostos foi sempre preparado a partir de 1 g (massa fresca) para 10 mL de solvente extrator. As análises dos conteúdos de carotenóides, compostos fenólicos e flavonóides foram realizadas em triplicata.

Para a obtenção da relação massa fresca/massa seca (MF/MS), em cada coleta foram selecionadas 3 amostras de 1 g de cada estágio reprodutivo, que foram colocados em pacotes de alumínio abertos, dentro de uma estufa a 60°C por 48 horas. Posteriormente, a massa seca das amostras foi novamente determinada.

O valor obtido para a relação MF/MS é apresentado na tabela 5. Estes valores foram utilizados para converter unidades entre massa fresca e massa seca utilizados no presente trabalho.

Tabela 5: Relação massa fresca/massa seca (MF/MS) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (n=3).

	Relação MF/MS						
	Ano 1				Ano 2		
	Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
Tetrasporófito	0,121 \pm 0,008	0,116 \pm 0,012	0,101 \pm 0,005	0,100 \pm 0,008	0,125 \pm 0,005	0,113 \pm 0,004	0,101 \pm 0,008
Gametófito feminino com cistocarpio	0,107 \pm 0,004	0,087 \pm 0,008	0,103 \pm 0,004	0,105 \pm 0,004	0,110 \pm 0,006	0,090 \pm 0,004	0,101 \pm 0,006
Gametófito masculino	-	0,087 \pm 0,008	0,099 \pm 0,005	0,100 \pm 0,002	-	0,086 \pm 0,005	0,104 \pm 0,003
Não-fértil	-	-	**	0,100 \pm 0,002	-	-	-

* - indivíduos ausentes

** - biomassa insuficiente (n = 1)

3.5 - Extração e quantificação de carotenóides

As amostras foram preparadas segundo Aman *et al.* (2005), com modificações. Amostras de cada estágio do histórico de vida de *Gracilaria domingensis* foram primeiramente dessalinizadas pela adição de formiato de amônio 0,5 M por 30 segundos, seguida por três lavagens com água destilada. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas com o auxílio de bolinhas de vidro, em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100 mg.L⁻¹ de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de N₂ gasoso. O extrato recuperado foi ressuspensão em 3 mL de hexano e submetido a saponificação.

3.5.1 - Saponificação

A saponificação foi realizada através da adição de 100 μ L da solução metanólica de hidróxido de potássio 10% a 1 mL de extrato, durante três horas, a temperatura ambiente e em local protegido da luz. Após este período, as amostras foram lavadas em funil de separação (por quatro vezes com água ultrapura). A fração remanescente foi transferida para frasco âmbar, seguido da remoção do solvente sob fluxo de N₂ gasoso e ressuspensão em 100 μ L de hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100 mg.L⁻¹ de BHT para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.5.2 - Detecção de carotenóides por CLAE

Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm Ø interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e detector espectrofotométrico UV-visível (UV-vis) operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL.min⁻¹. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina, β e α-caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A identificação de β-criptoxantina foi feita tentativamente por comparação com outros trabalhos que analisaram a composição de carotenóides por RP-HPLC-UV-vis em condições semelhantes às utilizadas no presente trabalho (Scott & Eldridge 2005, Hulshof *et al.* 2007). A quantificação dos carotenóides foi feita utilizando-se curva padrão externa de luteína (2,5 a 50 µg.mL⁻¹ - r² = 0,99; y = 7044x) e β – caroteno (0,01 a 5 µg.mL⁻¹ - r² = 0,99; y = 1019x) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de carotenóides foi expressa em µg por g de massa seca.

3.6 - Extração e quantificação de compostos fenólicos

Amostras de cada estágio do histórico de vida de *Gracilaria domingensis* foram dessalinizadas e lavadas como descrito no item 3.5. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido, e maceradas com o auxílio de bolinhas de vidro com soluções (10 mL) de metanol 80% (MeOH 80%), ou metanol 80% acidificado pela adição de ácido clorídrico 1% (MeOH 80% – HCl 1%, v/v) ou água. Após a maceração, as amostras foram mantidas sob agitação por 2 horas no escuro. Em seguida, as amostras foram filtradas sob vácuo. O extrato recuperado foi submetido à espectrofotometria UV-vis (Hiatachi U-1800) para determinação do perfil espectral de varredura (190-750 nm).

3.6.1 - Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rhandir *et al.* (2002). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL do extrato metanólico (metanol 80%, devido a sua maior eficiência de extração) de cada amostra e 5 mL de metanol 95%, seguido de agitação no vórtex. Dessa solução, foi retirado 1

mL e a este adicionaram-se 5 mL de água ultrapura, 1 mL de etanol 95% e 0,5 mL do reativo de Folin- Ciocalteu, seguido de agitação e repouso de 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 5% (p/v), seguido de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura. Em seguida procedeu-se a leitura das amostras a 725 nm em espectrofotômetro UV-vis (Hiatachi U-1800). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $r^2 = 0,99$; $y = 1,254x$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de ácido gálico por g de massa seca.

A quantificação de compostos fenólicos totais é comumente realizada pela utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. O reativo de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (cor amarela); porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis (Huang *et al.* 2005).

3.6.2 - Detecção de compostos fenólicos por CLAE

Para uma melhor resolução do perfil espectral da CLAE, as amostras foram submetidas a um procedimento de *clean-up*, previamente à análise cromatográfica. Para tal, um cartucho de extração em fase sólida de fase reversa (SPE-C₁₈, 3mL - J.T. Baker) foi condicionado com 3 volumes de hexano e metanol, sequencialmente. Em seguida, 3 mL do extrato metanólico foram adicionados ao cartucho, permanecendo por 5 minutos em contato com o mesmo. A eluição das amostras foi realizada pela adição de 3 mL de metanol 80%, acidificado pela adição de ácido clorídrico 1% (v/v). Aliquotas (20 μL) de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm \varnothing interno) e detector espectrofotométrico UV-vis operando em 280 nm. A eluição utilizou água: ácido acético: η -butanol (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel, com fluxo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a identificação dos compostos de interesse foi realizada através de co-cromatografia e comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (ácido gálico, epicatequina, galocatequina - Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos compostos fenólicos utilizou curva padrão externa de galocatequina (2,5 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $r^2 = 0,99$; $y = 795,09x$) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de compostos fenólicos foi expressa em μg por g de massa seca.

3.7 - Determinação do conteúdo de flavonóides totais

A determinação do conteúdo de flavonóides totais foi feita de acordo com Zacarias *et al.* (2007), com modificações. Amostras de cada estágio do histórico de vida de *Gracilaria domingensis* foram dessalinizadas e lavadas como descrito no item 3.5. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido, e maceradas com o auxílio de bolinhas de vidro, em 10 mL de etanol e foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura. O extrato foi filtrado sob vácuo e o solvente foi rotaevaporado. O extrato recuperado foi ressuspense em 10 mL de metanol. Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato foi utilizada para a determinação do conteúdo de flavonóides totais, na presença de 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2% em metanol) e 2,5 mL de etanol. Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro UV-vis (Hiatachi U-1800). A quantificação dos flavonóides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (0,5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – $r^2 = 0,99$; $y = 0,009x$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de quercetina por g de massa seca.

A complexação dos flavonóides com metais, como o íon Al^{3+} , é uma técnica comumente empregada no estudo dos flavonóides. Os deslocamentos batocrômicos causados pela formação do complexo Al^{3+} - flavonóide podem ser observados no espectro UV-vis (Deng & Van Berkel 1998).

3.8 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

3.8.1 - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A fim de avaliar a capacidade antioxidante, o extrato metanólico foi submetido ao teste do DPPH \bullet . Este modelo é baseado na capacidade do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ($\text{DPPH}\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\bullet$), incluindo compostos fenólicos (Roginsky & Lissi 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (Sánchez-Moreno *et al.* 1998, Mensor *et al.* 2001). O consumo de DPPH \bullet é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorbância a 517 nm diminui como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes no extrato através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (Espín *et al.* 2000).

A metodologia utilizada foi descrita por Kim *et al.* (2002). Uma alíquota de 2,9 mL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida a 0,1 mL da amostra (em metanol 80%). O decréscimo da absorbância em 517 nm foi medido em espectrofotômetro (Hiatachi U-1800) após 30 minutos de incubação da amostra. O BHT foi utilizado com padrão. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição: } \frac{[(Abs \text{ controle} - Abs \text{ final da amostra}) / Abs \text{ controle}] \times 100}{}$$

3.8.2 - Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante do extrato organossolvente carotenoídico foi avaliada pelo método de descoloramento do β -caroteno, induzido pelo produto de degradação oxidativa de um ácido graxo (ácido linoléico), segundo procedimento descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971).

O sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico simula a oxidação dos componentes celulares da membrana lipídica em presença de antioxidantes, assim como, a capacidade de inibição da formação de radicais peróxidos a partir da oxidação do ácido linoléico (Mata *et al.* 2007). Este teste de avaliação da atividade antioxidante consiste em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. O sistema β -caroteno/ácido linoléico estima a habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes nos extratos em seqüestrar o radical peróxido do ácido linoléico (LOO^{\bullet}), que oxida o β -caroteno presente na emulsão (Duarte-Almeida *et al.* 2006). Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de diversos extratos (Silva *et al.* 1999).

Por ser um sistema constituído por uma emulsão, é considerado um sistema aquoso-lipídico. Neste método a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou antioxidante inibir o processo de oxidação do ácido linoléico, ao longo de um período de 2h.

Foi utilizado como substrato uma emulsão de β -caroteno (Sigma) e ácido linoléico (Fluka). Para o preparo da emulsão 20 μ L da solução de β -caroteno (20 mg. mL⁻¹ em clorofórmio) foram adicionados de 40 μ L de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 20 (Vetec). Após homogeneização e evaporação do clorofórmio em N₂ gasoso, foram adicionados 30 mL de água previamente saturada de oxigênio durante 30 minutos. A

absorbância da solução foi ajustada entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Na cubeta, foram adicionados 2,7 mL desta emulsão e 0,3 mL do extrato carotenóidico. Após ser homogeneizada, uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição do extrato e do padrão ao sistema. As cubetas foram posteriormente colocadas em banho-maria a 50°C e as demais leituras foram realizadas a cada 15 minutos por um período de 2 horas. O BHT foi utilizado como padrão. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$A_c = \text{Abs inicial controle} - \text{Abs final controle}$

$A_{am} = \text{Abs inicial amostra} - \text{Abs final amostra}$

$$\% \text{ inibição: } \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

3.9 - Metodologia geral de cultivo em laboratório

Neste item, serão descritos os métodos gerais de cultivo das algas em laboratório utilizados nos experimentos de caracterização fisiológica.

3.9.1 - Coleta e esterilização da água do mar

A água do mar foi coletada na Praia do Lamberto, pelo sistema de captação da Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, em Ubatuba (SP). A água do mar apresentou salinidade de 32-34 ups e pH 8,0.

No laboratório, a água do mar foi filtrada em membrana Millipore AP 20 e aquecida em banho-maria durante 60 minutos, contados a partir do momento da fervura. Posteriormente, a água do mar foi deixada esfriar até atingir a temperatura ambiente e submetida ao banho-maria por mais 60 minutos. A água do mar submetida a tal processo será referida neste trabalho como água do mar esterilizada.

Em todos os experimentos relacionados à caracterização fisiológica de plântulas derivadas da germinação de carpóporos e de tetrásporos e de tetrásporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* foi utilizado o mesmo lote de água do mar.

3.9.2 - Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch (VSES) preparada segundo Edwards (1970) com modificações segundo Yokoya (1996) - redução de 50% nas concentrações de tiamina HCl, biotina e cianocobalamina (tabela 6). O enriquecimento foi feito em concentrações de 2 mL de VSES (25%) por litro de água do mar esterilizada para a manutenção das culturas unialgáceas. Para os experimentos de nutrientes e irradiância, foram utilizadas além de VSES 25%, outras duas concentrações: VSES 50% (4 mL.L⁻¹) e VSES 100% (8 mL.L⁻¹).

Tabela 6: Composição química da solução de nutrientes de von Stosch (VSES) preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996).

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

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

3.9.3 - Coleta das algas, isolamento de esporos e manutenção das culturas unialgáceas

Espécimes férteis de *Gracilaria domingensis* foram coletados na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC. Os espécimes coletados foram acondicionados em frascos contendo água do mar filtrada e transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Culturas de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP. As plantas foram lavadas em água do mar esterilizada para remoção de impurezas e limpas manualmente para a retirada de epibiontes. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, foram selecionados segmentos saudáveis de quatro gametófitos femininos com cistocarpos maduros e de quatro tetrasporófitos para proceder à liberação de esporos.

Para cada espécime, foram preparadas placas de Petri contendo lâminas de vidro com VSES 25% acrescida de GeO₂ (1mg.L⁻¹). Os segmentos do talo de gametófitos femininos com cistocarpos e de tetrasporófitos férteis permaneceram sobre as lâminas por aproximadamente

12 horas para a liberação de carpósporos e de tetrásporos, respectivamente. Após a liberação, os segmentos foram removidos e as lâminas que apresentavam a maior quantidade de esporos fixados foram selecionadas para os experimentos.

Ao final do experimento (item 3.10), as plântulas foram retiradas das lâminas e cultivadas com VSES 25% durante todo o período de cultivo. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente. Foram utilizados frascos com boca larga (6 x 8 cm – diâmetro x altura, volume de 100 mL). Estes frascos foram vedados com filme de PVC transparente. Toda a vidraria utilizada foi autoclavada a 121°C durante 30 minutos e os instrumentos utilizados no manuseio das algas foram esterilizados em etanol 70% e flambados.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, as culturas foram mantidas nas seguintes condições: temperatura média de 22±2°C, 34 ups, fotoperíodo de 14 h, irradiância de 70 a 80 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes “luz do dia” (Philips 40 W), dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. A irradiância foi mensurada com um sensor esférico sub-aquático submerso na água, Li-COR (LI 193SA) conectado a um medidor de quanta Li-COR (LI-185).

3.10 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas e tetrásporófitos adultos

O procedimento para obtenção dos esporos para o início dos experimentos foi realizado de acordo com o descrito no item 3.9.3.

A água do mar utilizada para estes experimentos foi proveniente de um único lote para uma padronização e esterilizada conforme o item 3.9.1.

Para os experimentos com plântulas, foram avaliadas quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C), doze salinidades (de 5 a 60 ups, em intervalos de 5 ups) e três concentrações de VSES (25%, 50% e 100%) combinados com três níveis de irradiância (50, 100 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para os experimentos com tetrásporófitos adultos foram avaliadas quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C), seis salinidades (de 10 a 60 ups, em intervalos de 10 ups) e duas concentrações de VSES (25% e 50%) combinados com dois níveis de irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As demais condições experimentais foram as mesmas utilizadas para a manutenção das culturas unialgáceas (item 3.9.3).

O experimento com diferentes temperaturas foi realizado em câmaras de cultivo (Fanem – 347CDG). Para o experimento de salinidade, o método de congelamento e descongelamento proposto por Yokoya & Oliveira (1993) foi utilizado para obtenção das diferentes salinidades testadas.

Nos experimentos com plântulas, os efeitos da temperatura e salinidade foram testados com três repetições simultâneas, onde cada repetição foi composta por uma lâmina com carpósporos ou tetrásporos. Para o experimento de irradiância e nutrientes foram testadas quatro repetições simultâneas para carpósporos e três repetições simultâneas para tetrásporos. Para estes experimentos, cada repetição foi constituída de uma lâmina com esporos de um espécime de gametófitos femininos ou tetrásporófitos cultivados separadamente, sendo que três ou quatro espécimes de cada estágio reprodutivo foram utilizados. Os esporos foram inoculados em 50 mL de meio de cultura e a troca de meio foi realizada semanalmente. Com exceção dos fatores avaliados, as demais condições experimentais foram as mesmas descritas no item 3.8.3. Durante quatro semanas, foram avaliados o diâmetro do disco basal e o comprimento do eixo ereto de 10 plântulas para cada repetição. As medidas foram feitas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E-200) com retículo micrométrico na ocular.

Os experimentos com tetrásporófitos adultos foram testados com três repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. O volume de meio de cultura utilizado foi de 70 mL, e a troca de meio foi realizada semanalmente. Após 4 semanas, foram analisadas a massa da matéria fresca (para o cálculo da taxa de crescimento) e o comprimento dos segmentos. Os segmentos foram fotografados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Sony DSC-W80) e analisados no software Axiovision v. 4.6 (Carl Zeiss).

A taxa de crescimento foi calculada utilizando a seguinte equação (Brinkhuis 1985):

$$TC = (l_n X_{final} - l_n X_{inicial}) / (Tempo_{final} - Tempo_{inicial}) \times 100$$

Onde X = massa da matéria fresca, diâmetro do disco basal ou comprimento do eixo ereto

3.11 - Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrásporófitos adultos cultivados em laboratório

Para este experimento, foram testadas duas concentrações de VSES (25% e 50%) combinados com dois níveis de irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições descritas no item 3.9.3, com exceção da irradiância e das concentrações de VSES. Cada tratamento constituiu-se de seis repetições com seis segmentos apicais de 2 cm de comprimento que foram inoculados em 300 mL de meio de cultura cuja troca foi realizada semanalmente. Após 4 semanas, foram analisadas a massa da matéria fresca (para o cálculo da taxa de crescimento) e as amostras de

cada repetição foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para posterior análise de pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis totais (item 3.12 e 3.13, respectivamente) e carotenóides (item 3.5).

3.12 - Extração e dosagem de clorofila a e pigmentos fotossintetizantes

A extração dos pigmentos foi realizada através da trituração de 75 mg (massa fresca) de cada amostra em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 1mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C . A solução foi centrifugada por 20 minutos (14000 rpm a 4°C), e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; $\lambda = 498,5, 615$ e 651 nm). O sedimento foi ressuspensionado em 750 μL de acetona 90%, até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi centrifugada (10000 rpm a 4°C) durante 15 minutos, e o sobrenadante, contendo a clorofila *a*, foi transferido para tubos de eppendorfs vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 630, 647$ e 664 nm). A determinação da concentração das ficobiliproteínas foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Kursar *et al.* (1983) e da concentração de clorofila *a* utilizando-se a fórmula descrita por Jeffrey & Humphrey (1975). Os resultados foram expressos em μg de pigmentos por g de massa fresca.

3.13 - Extração e dosagem de proteínas solúveis totais

A extração das proteínas solúveis totais foi realizada através da trituração das amostras (75 mg – massa fresca) em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1mM DTT) na proporção de 1g de massa fresca por 10 mL de tampão. A solução foi centrifugada (12000 rpm a 4°C) por 15 minutos. A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria UV-vis (Shimadzu – UV 1800) a 595 nm, após a adição de solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo o método de Bradford (1976). A concentração protéica foi determinada com a utilização de curva-padrão externa, utilizando-se soro albumina bovina (BSA, Bio-Rad) como padrão (2 a $10 \mu\text{L.mL}^{-1} - r^2 = 0,99; y = 0,035x$) e os resultados foram expressos em mg de proteína por g de massa fresca.

3.14 - Análise estatística dos resultados

Os dados foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade e homogeneidade de variância (Teste de Levene). Uma vez validados, para verificar a ocorrência de flutuação temporal da biomassa e do comprimento dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para n desigual, e para testar a proporção entre algas femininas e masculinas foi utilizado o Teste do X^2 .

Para verificar a variação sazonal dos compostos carotenóidicos e fenólicos bem como avaliar a influência da temperatura, salinidade e irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas e tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. As análises foram feitas considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises de variância foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

A correlação de Pearson foi utilizada para se correlacionar os parâmetros ambientais e os descritores da população em questão (comprimento e biomassa), bem como para correlacioná-los ao conteúdo de compostos carotenóidicos e fenólicos. Estas análises foram realizadas utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

As concentrações de carotenóides e compostos fenólicos dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* foram submetidas à análise de componentes principais (PCA), visando determinar o grau de similaridade entre as mesmas, e ilustrar eventuais padrões temporais no seu acúmulo, utilizando a matriz de covariância, a partir de dados centrados e do cálculo da distância Euclidiana. A análise foi feita a partir do biplote gerado com auxílio do programa MVSP (versão 3.1).

IV. RESULTADOS

4.1 - Avaliação dos parâmetros ambientais

Com relação aos dados ambientais cedidos pelo CIRAM, pode-se observar que os maiores índices pluviométricos registrados durante o período de amostragem foram nos meses de novembro/2008 (642,2 mm) e abril/2009 (307 mm), e os menores índices foram observados nos meses de julho/2008 (7,3 mm) e junho/2009 (48,7 mm) (figura 8). A temperatura do ar foi maior nos períodos de janeiro a março/2009 e de novembro/2009 a janeiro/2010 (figura 9). As temperaturas mínimas foram registradas nos meses de maio a setembro/2008 e de junho a agosto/2009 (figura 9). A insolação total mensal foi maior no mês de dezembro/2008 (238,5 h de brilho solar), seguida dos meses de março (204 h de brilho solar) e abril/2009 (202,9 h de brilho solar) (figura 10), e os menores valores foram observados nos meses de outubro (78,3 h de brilho solar) e novembro/2008 (98,3 h de brilho solar) (figura 10). A velocidade dos ventos foi maior no período de agosto a novembro/2009 ($3,29 \pm 0,34$ ms), o que juntamente com a maré alta do respectivo período acabou por impossibilitar a coleta das algas na primavera/2009 (figura 10).

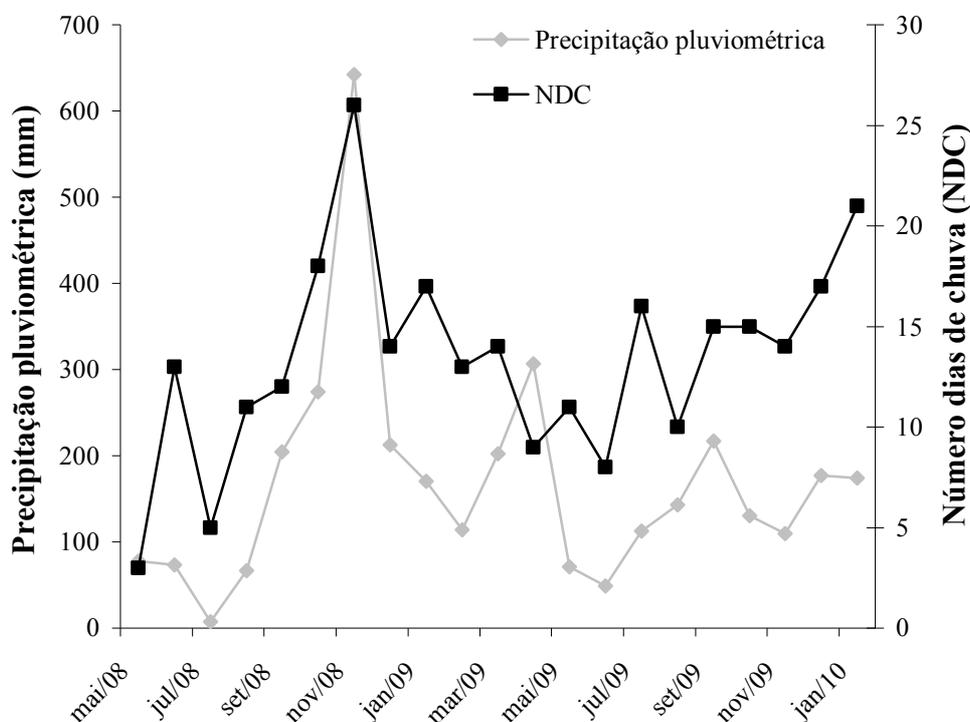


Figura 8: Variação mensal dos valores de precipitação pluviométrica total mensal (mm) e do número total de dias de chuva (NDC) no município de Florianópolis, Santa Catarina.

Os parâmetros físico-químicos da água do mar foram analisados no dia da coleta, incluindo as análises do O₂ dissolvido, pH, temperatura da água, salinidade e os nutrientes dissolvidos na água do mar (ortofosfato, nitrato e N-amoniaco). A temperatura da água foi maior nas coletas de verão e menores nas coletas de inverno. Com relação ao O₂ dissolvido e ao pH, os menores valores foram observados nas coletas da primavera e verão e os maiores valores nas coletas do outono. A salinidade se manteve entre 32 e 34 ups durante todas as coletas (tabela 7). As concentrações de ortofosfato, nitrato e N-amoniaco da água do mar de cada coleta realizada estão sumarizadas na tabela 8.

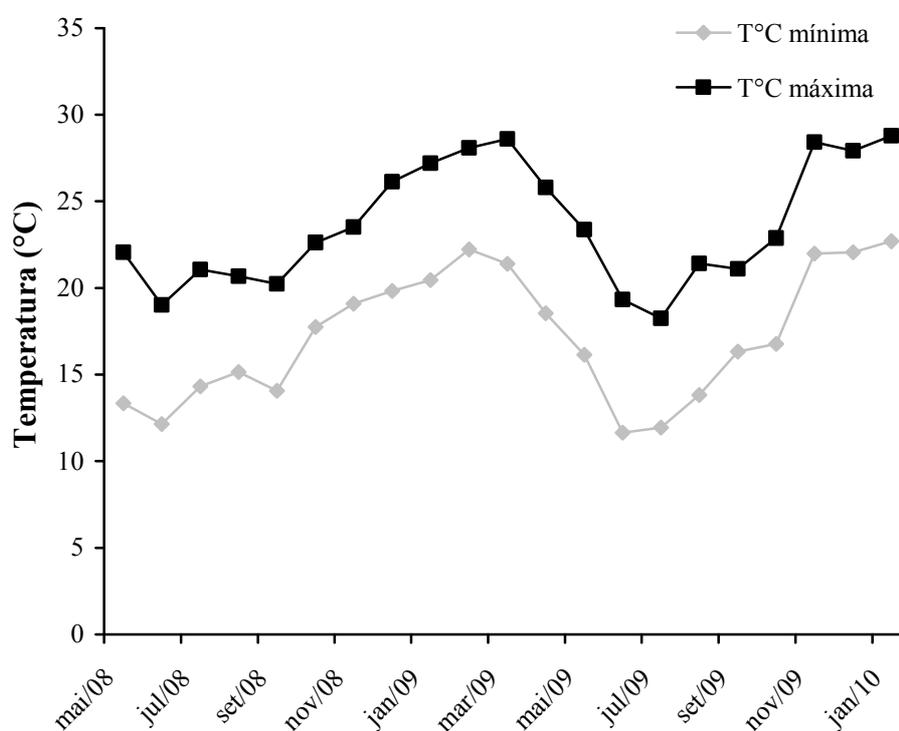


Figura 9: Variação mensal das médias de temperatura (máxima e mínima) do ar no município de Florianópolis, Santa Catarina.

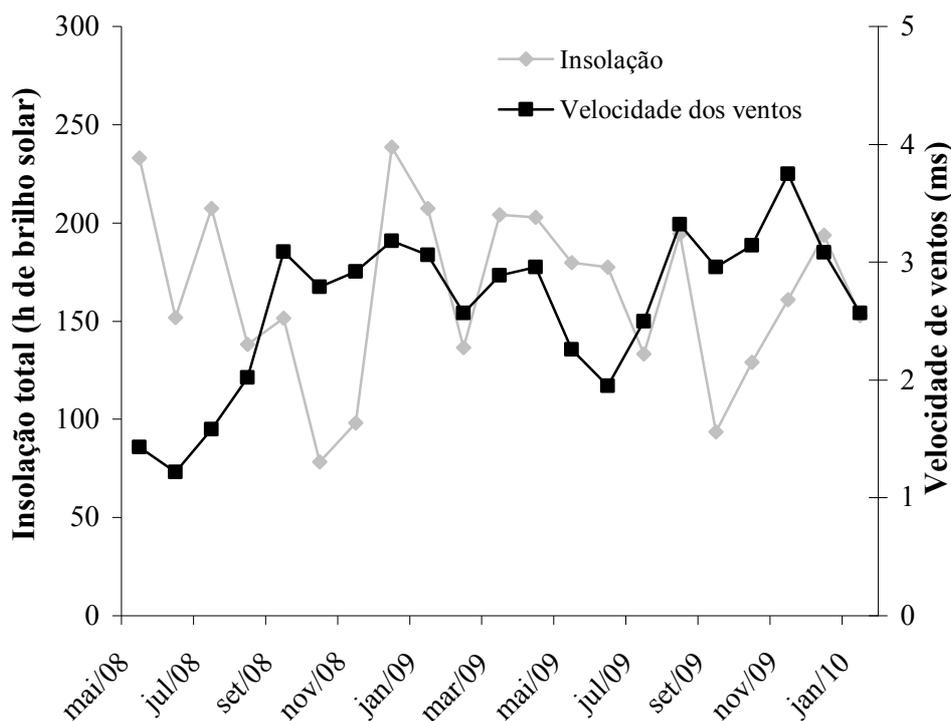


Figura 10: Variação mensal dos valores de insolação total (horas de brilho solar) no município de São José e médias da velocidade dos ventos (ms) no município de Florianópolis, Santa Catarina.

Tabela 7: Valores médios \pm desvio padrão ($n=3$) da temperatura, O_2 dissolvido, pH, salinidade da água do mar e maré baixa (n° dias/mês; maré $\leq 0,2$) obtidos durante o período de coleta de *Gracilaria domingensis* na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010.

Parâmetro	Ano 1				Ano 2		
	Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
T°C água	20,9 \pm 0,1	17,8 \pm 0,1	22,3 \pm 0,4	25,6 \pm 0,1	23,3 \pm 0,1	21,3 \pm 0,1	25,2 \pm 0,3
O_2 dissolvido	8,80 \pm 0,01	8,12 \pm 0,03	7,91 \pm 0,01	7,01 \pm 0,02	8,90 \pm 0,03	8,31 \pm 0,01	8,00 \pm 0,01
pH	8,06 \pm 0,02	8,01 \pm 0,01	7,89 \pm 0,08	7,91 \pm 0,01	8,04 \pm 0,06	8,01 \pm 0,01	7,92 \pm 0,03
Salinidade	34 \pm 0,00	32 \pm 0,00	34 \pm 0,00	32 \pm 0,00	32 \pm 0,00	34 \pm 0,00	32 \pm 0,00
Maré baixa	5	18	4	6	3	17	7

Tabela 8: Concentração dos nutrientes dissolvidos na água do mar obtidos durante o período de coleta de *Gracilaria domingensis* na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores correspondem a média \pm desvio padrão ($n=3$).

Nutrientes dissolvidos (μM)	Ano 1				Ano 2		
	Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
Ortofosfato	20,9 \pm 0,1	17,8 \pm 0,1	22,3 \pm 0,4	25,6 \pm 0,1	23,3 \pm 0,1	21,3 \pm 0,1	25,2 \pm 0,3
Nitrato	8,80 \pm 0,01	8,12 \pm 0,03	7,91 \pm 0,01	7,01 \pm 0,02	8,90 \pm 0,03	8,31 \pm 0,01	8,00 \pm 0,01
N-amoniaco	8,06 \pm 0,02	8,01 \pm 0,01	7,89 \pm 0,08	7,91 \pm 0,01	8,04 \pm 0,06	8,01 \pm 0,01	7,92 \pm 0,03

4.2 - Variação fenológica da população

Durante o período de coletas foram encontrados indivíduos férteis tetrasporófitos e gametófitos (femininos com cistocarpos e masculinos) e um número muito pequeno de indivíduos não-férteis. Em todas as coletas, 20 indivíduos foram amostrados, no entanto, a quantidade de indivíduos de cada estágio reprodutivo não foi igual. Desta forma e quando pertinente, foi utilizado o teste de separação de médias para n desigual.

Independentemente da estação do ano, foi observado o predomínio de tetrasporófitos na população. Gametófitos masculinos não foram coletados no outono e indivíduos não-férteis foram coletados somente na primavera (um indivíduo) e no verão/2009 (três indivíduos) (figura 11). Com relação aos indivíduos gametófitos, a proporção entre gametófitos femininos e masculinos foi de 1:1 ($X^2= 10,67; p>0,05$).

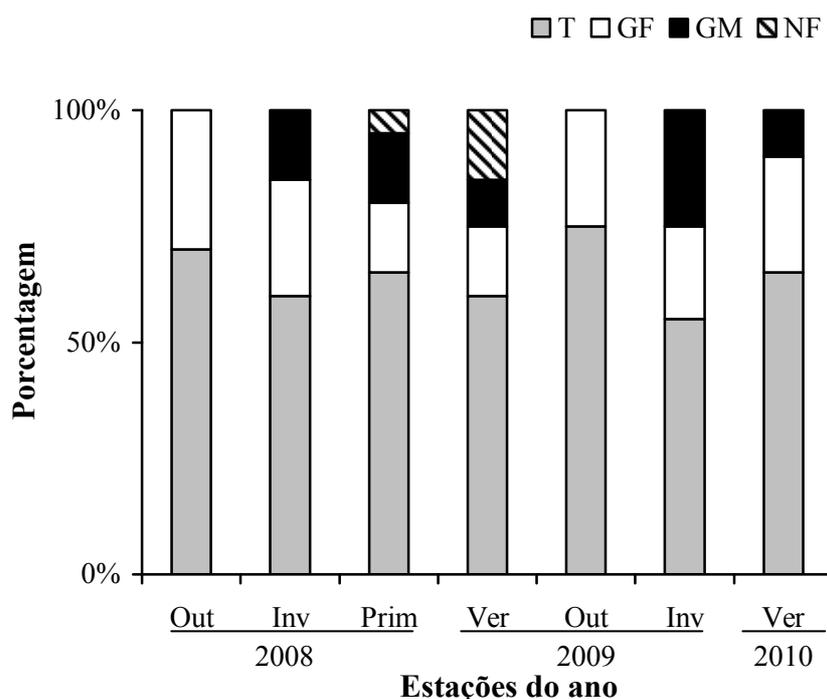


Figura 11: Proporção dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada coluna representa a porcentagem total referente a n=20 indivíduos. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil.

O comprimento do talo dos diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* variou sazonalmente (figura 12). Houve uma grande variação nos valores de comprimento dos indivíduos coletados, sendo que as médias apresentaram valores elevados

de desvio-padrão. A variação do comprimento do talo dos tetrasporófitos foi influenciada significativamente pelo período do ano, sendo que estes indivíduos apresentaram-se maiores na primavera/2008 e no verão e outono/2009. O comprimento do talo de gametófitos femininos com cistocarpos ($F= 1,762, p= 0,148$) e masculinos ($F= 2,387, p= 0,121$) não variou significativamente nas diferentes épocas do ano. O indivíduo não-fértil coletado na primavera/2008 apresentou comprimento de 16 cm e os coletados no verão/2009 apresentaram comprimento médio de $10,30 \pm 1,75$ cm ($n=3$).

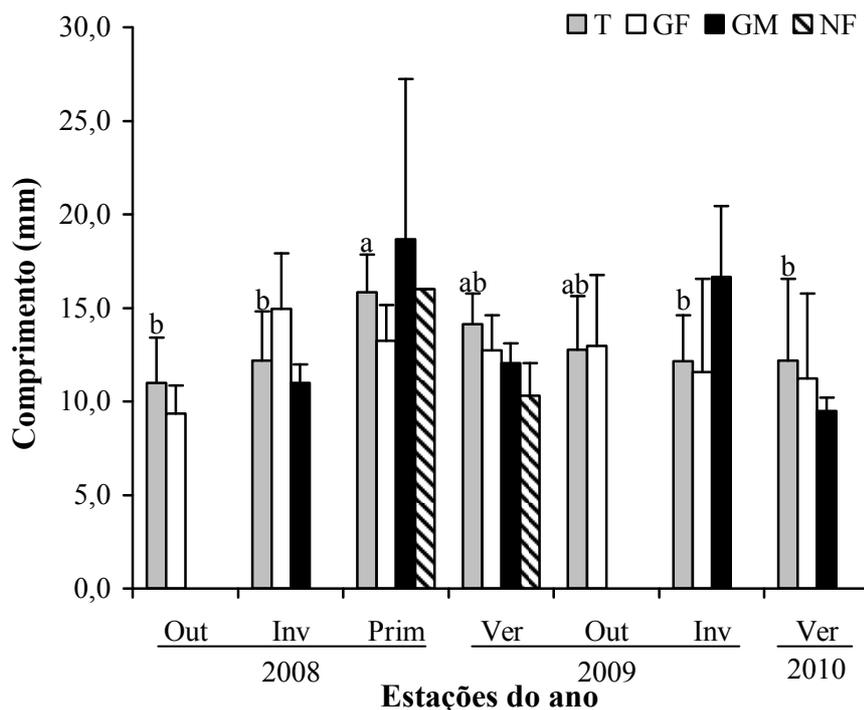


Figura 12: Variação do comprimento (cm) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão. As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey para n desigual. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil.

A biomassa individual dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* não foi influenciada pela sazonalidade durante o período amostral (tetrasporófito: $F= 1,7382, p= 0,122$; gametófito feminino com cistocarpos: $F= 1,563, p= 0,180$; gametófito masculino: $F= 0,117, p= 0,973$) (figura 13). Isto se deve a grande variação na biomassa dos indivíduos coletados. Com relação aos indivíduos não-férteis, o indivíduo coletado na primavera apresentou 8,72 g de massa fresca e os coletados no verão/2009 apresentaram valor médio de $7,84 \pm 0,82$ g ($n=3$).

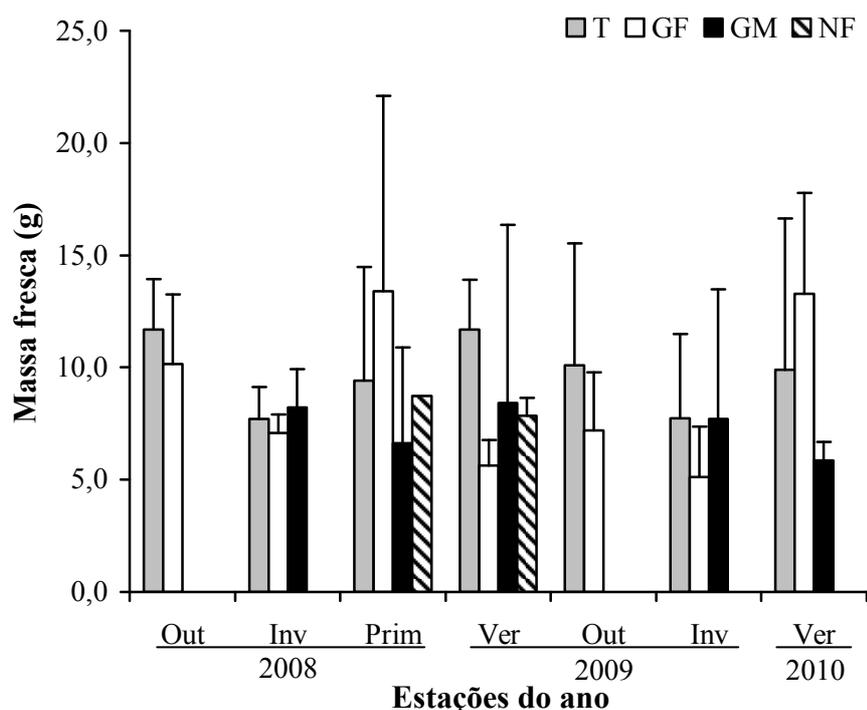


Figura 13: Variação da massa fresca (g) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes épocas do ano na praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; GM: gametófito masculino; NF: não-fértil.

4.3 - Variação sazonal do perfil carotenóidico e fenólico

4.3.1 – Carotenóides

A análise cromatográfica visando à identificação e quantificação dos carotenóides revelou ser o isômero *trans* do β -caroteno o carotenóide predominante nos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, sendo possível também a detecção do isômero *cis* do β -caroteno e α -caroteno e das xantofilas luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (figura 14).

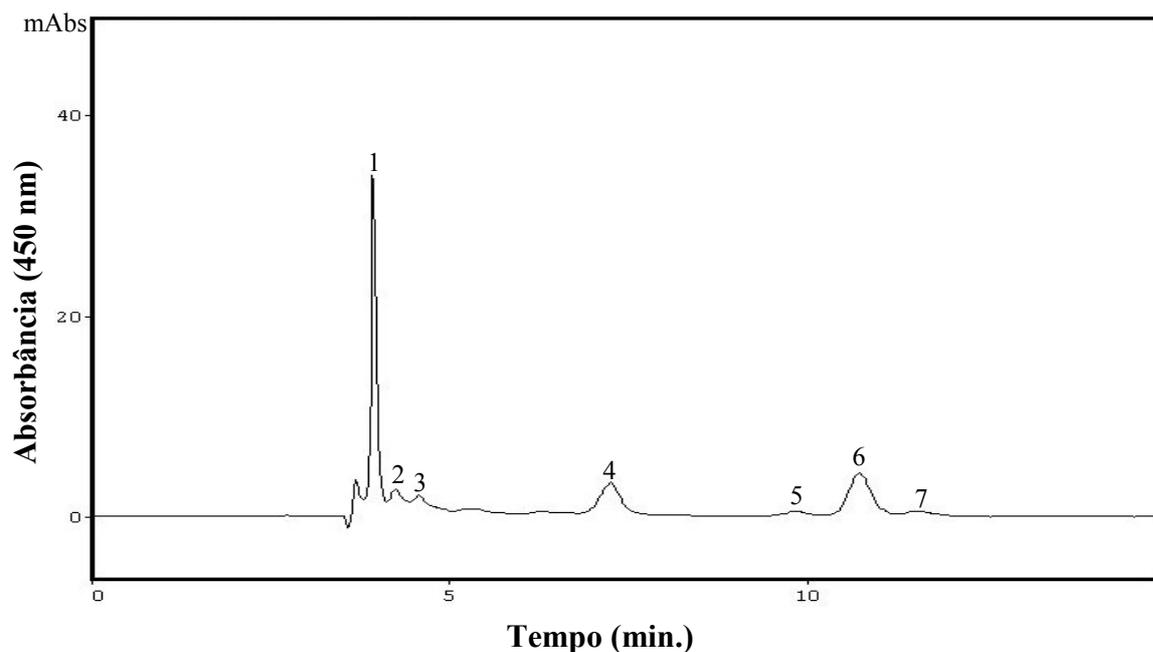


Figura 14: Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* coletados no outono/2008 (Picos: 1 – luteína; 2 – zeaxantina livre; 3 – zeaxantina esterificada; 4 – β -criptoxantina; 5 – α -caroteno; 6 – *trans*- β -caroteno; 7 – *cis*- β -caroteno).

As concentrações de carotenóides em indivíduos tetrasporofíticos de *Gracilaria domingensis* variaram significativamente nos diferentes períodos de coleta, como pode ser observado na tabela 9 e figura 15. Durante o **primeiro ano de coletas** foi observada uma variação nas concentrações dos compostos carotenóidicos, com algumas exceções. De maneira geral, as concentrações de carotenóides foram maiores no outono, diminuindo no inverno e aumentando na primavera e no verão. A exceção foi a concentração de luteína que diminuiu e se manteve semelhante no inverno, primavera e verão. Durante o **segundo ano de coletas** foi observada uma variação nas concentrações dos compostos carotenóidicos diferente da observada para o primeiro ano, onde o acúmulo destes compostos foi maior durante o outono, diminuindo no inverno e no verão.

Tabela 9: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ($10 \mu\text{L}$) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

		Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)							
Pico	Composto	Rt (min)	Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Luteína	3,8	$2,12 \pm 0,02^a$	$1,42 \pm 0,18^b$	$1,33 \pm 0,04^b$	$1,41 \pm 0,14^b$	$2,13 \pm 0,38^a$	$0,27 \pm 0,00^b$	$0,29 \pm 0,01^b$
2	Zeaxantina livre	4,1	$0,64 \pm 0,02^a$	$0,25 \pm 0,03^c$	$0,44 \pm 0,01^b$	$0,61 \pm 0,02^a$	$2,00 \pm 0,25^a$	$0,86 \pm 0,01^b$	$0,67 \pm 0,02^c$
3	Zeaxantina esterificada	4,4	$0,88 \pm 0,07^a$	$0,38 \pm 0,02^d$	$0,49 \pm 0,02^c$	$0,64 \pm 0,03^b$	$1,72 \pm 0,15^a$	$0,81 \pm 0,02^b$	$0,66 \pm 0,02^c$
4	β -criptoxantina	7,2	$0,44 \pm 0,01^a$	n.d	$0,16 \pm 0,02^c$	$0,27 \pm 0,01^b$	$0,82 \pm 0,03^a$	$0,39 \pm 0,02^b$	$0,33 \pm 0,00^c$
5	α -caroteno	9,7	n.d	n.d	n.d	n.d	traços*	traços*	traços*
6	<i>trans</i> - β -caroteno	10,8	$6,53 \pm 0,12^a$	$0,68 \pm 0,04^d$	$2,86 \pm 0,29^c$	$5,22 \pm 0,14^b$	$19,28 \pm 0,74^a$	$10,34 \pm 0,01^b$	$6,39 \pm 0,22^c$
7	<i>cis</i> - β -caroteno	11,7	$1,02 \pm 0,04^a$	n.d	n.d	$0,16 \pm 0,02^b$	$5,30 \pm 0,74^a$	$1,24 \pm 0,01^b$	n.d
	Carotenóides totais**		$11,63 \pm 0,22^a$	$2,73 \pm 0,22^d$	$5,28 \pm 0,37^c$	$8,31 \pm 0,29^b$	$31,40 \pm 0,19^a$	$13,92 \pm 0,05^b$	$8,34 \pm 0,22^c$

n.d: não detectado

* - concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração

** - soma dos carotenóides identificados por CLAE

O acúmulo de carotenóides em gametófitos femininos com cistocarpos também foi influenciado pela sazonalidade (tabela 10, figura 15). Em relação **ao primeiro ano de coletas**, pode-se observar uma dinâmica no acúmulo de compostos carotenóidicos diferente daquela observada para indivíduos tetrasporofíticos. Salvo as exceções, o acúmulo de carotenóides foi maior no outono, seguida de uma queda no inverno. Um aumento no acúmulo destes compostos foi observado na primavera, seguida de uma nova diminuição no verão. As concentrações de zeaxantina esterificada se mantiveram semelhantes em todas as estações. Os compostos β -criptoxantina e *trans*- β -caroteno não foram detectados no verão, enquanto a presença de α -caroteno não foi observada no inverno, primavera e verão. O isômero *cis* do β -caroteno não foi detectado no inverno e na primavera. Para o **segundo ano de coletas**, não foi possível observar se o acúmulo de carotenóides se manteria como o observado para o primeiro ano, pois as condições do mar não permitiram a coleta das algas na primavera/2009. As concentrações dos compostos carotenóidicos foram superiores no outono, diminuindo no inverno e se manteve inferior no verão. Não foi observada a presença de α -caroteno no inverno e no verão, bem como a presença da forma *cis* do β -caroteno no inverno.

Em decorrência da ausência de gametófitos masculinos nas coletas de outono e da falta de dados para o período de primavera referente ao segundo ano de coletas, a análise da dinâmica no acúmulo de compostos carotenóidicos em gametófitos masculinos ficou prejudicada por causa dessas lacunas. Foi observada uma flutuação nas concentrações destes compostos em relação à sazonalidade (tabela 11, figura 15). Durante o **primeiro ano de coletas** foi observada que a concentração de luteína foi superior e semelhante durante o inverno e a primavera, com uma queda no verão. O acúmulo do isômero *trans* do β -caroteno foi inferior no inverno e na primavera e superior no verão. A concentração de β -criptoxantina foi maior na primavera do que no inverno e no verão. A concentração dos demais compostos não variou sazonalmente, bem como a concentração de carotenóides totais. Para o **segundo ano de coletas**, foi observado que as concentrações de zeaxantina livre, dos isômeros *cis* e *trans* do β -caroteno e a concentração de carotenóides totais foram maiores no inverno em relação ao verão e as concentrações de luteína e zeaxantina esterificada foram maiores no verão. A concentração de β -criptoxantina não diferiu significativamente entre as estações e a presença de α -caroteno não foi detectada no inverno.

Tabela 10: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ($10 \mu\text{L}$) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

		Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)							
Pico	Composto	Rt (min)	Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Luteína	3,8	$3,64 \pm 0,05^a$	$1,30 \pm 0,06^b$	$3,35 \pm 0,38^a$	$0,54 \pm 0,01^c$	$14,13 \pm 0,10^a$	$0,22 \pm 0,00^b$	$0,24 \pm 0,00^b$
2	Zeaxantina livre	4,1	$0,57 \pm 0,02^b$	$0,24 \pm 0,02^d$	$0,97 \pm 0,05^a$	$0,44 \pm 0,01^c$	$2,47 \pm 0,72^a$	$0,89 \pm 0,04^b$	$0,62 \pm 0,00^b$
3	Zeaxantina esterificada	4,4	$1,04 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,33$	$3,23 \pm 0,28^a$	$0,51 \pm 0,01^b$	$0,65 \pm 0,01^b$
4	β -criptoxantina	7,2	$1,05 \pm 0,00^a$	traços*	$0,11 \pm 0,00^b$	n.d	$3,16 \pm 0,02^a$	$0,29 \pm 0,02^b$	$0,22 \pm 0,01^b$
5	α -caroteno	9,7	traços*	n.d	n.d	n.d	traços*	n.d	n.d
6	<i>trans</i> - β -caroteno	10,8	$11,07 \pm 0,10^a$	$0,80 \pm 0,09^c$	$1,95 \pm 0,30^b$	n.d	$22,00 \pm 0,74^a$	$7,51 \pm 0,30^b$	$6,14 \pm 0,07^b$
7	<i>cis</i> - β -caroteno	11,7	$1,26 \pm 0,09^b$	n.d	n.d	$2,08 \pm 0,40^a$	$6,01 \pm 0,16^a$	n.d	$0,60 \pm 0,00^b$
	Carotenóides totais**		$18,63 \pm 0,28^a$	$2,83 \pm 0,21^d$	$7,16 \pm 0,62^b$	$4,06 \pm 0,75^c$	$50,82 \pm 0,23^a$	$9,42 \pm 0,36^b$	$8,45 \pm 0,06^c$

n.d: não detectado

* - concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração

** - soma dos carotenóides identificados por CLAE

Tabela 11: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ($10 \mu\text{L}$) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Pico	Composto	Rt (min)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
			Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Luteína	3,8	-	$4,45 \pm 0,18^a$	$4,17 \pm 0,19^a$	$1,17 \pm 0,10^b$	-	$0,28 \pm 0,00^b$	$0,32 \pm 0,00^a$
2	Zeaxantina livre	4,1	-	$1,15 \pm 0,51$	$1,31 \pm 0,10$	$0,90 \pm 0,03$	-	$1,35 \pm 0,03^a$	$1,07 \pm 0,03^b$
3	Zeaxantina esterificada	4,4	-	$1,74 \pm 0,49$	$1,07 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,03$	-	$0,73 \pm 0,01^b$	$1,02 \pm 0,08^a$
4	β -criptoxantina	7,2	-	$0,40 \pm 0,06^b$	$0,53 \pm 0,01^a$	$0,34 \pm 0,02^b$	-	$0,69 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,06$
5	α -caroteno	9,7	-	n.d	$0,61 \pm 0,00$	n.d	-	n.d	$0,35 \pm 0,02$
6	<i>trans</i> - β -caroteno	10,8	-	$7,28 \pm 1,05^b$	$7,86 \pm 0,03^b$	$10,21 \pm 0,34^a$	-	$15,27 \pm 0,34^a$	$10,60 \pm 0,83^b$
7	<i>cis</i> - β -caroteno	11,7	-	$1,08 \pm 0,28$	$1,07 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,01$	-	$1,91 \pm 0,16^a$	$1,00 \pm 0,00^b$
	Carotenóides totais**		-	$16,20 \pm 1,54$	$16,62 \pm 0,07$	$15,50 \pm 0,23$	-	$20,22 \pm 0,47^a$	$14,85 \pm 0,96^b$

-: indivíduos ausentes

n.d: não detectado

** - soma dos carotenóides identificados por CLAE

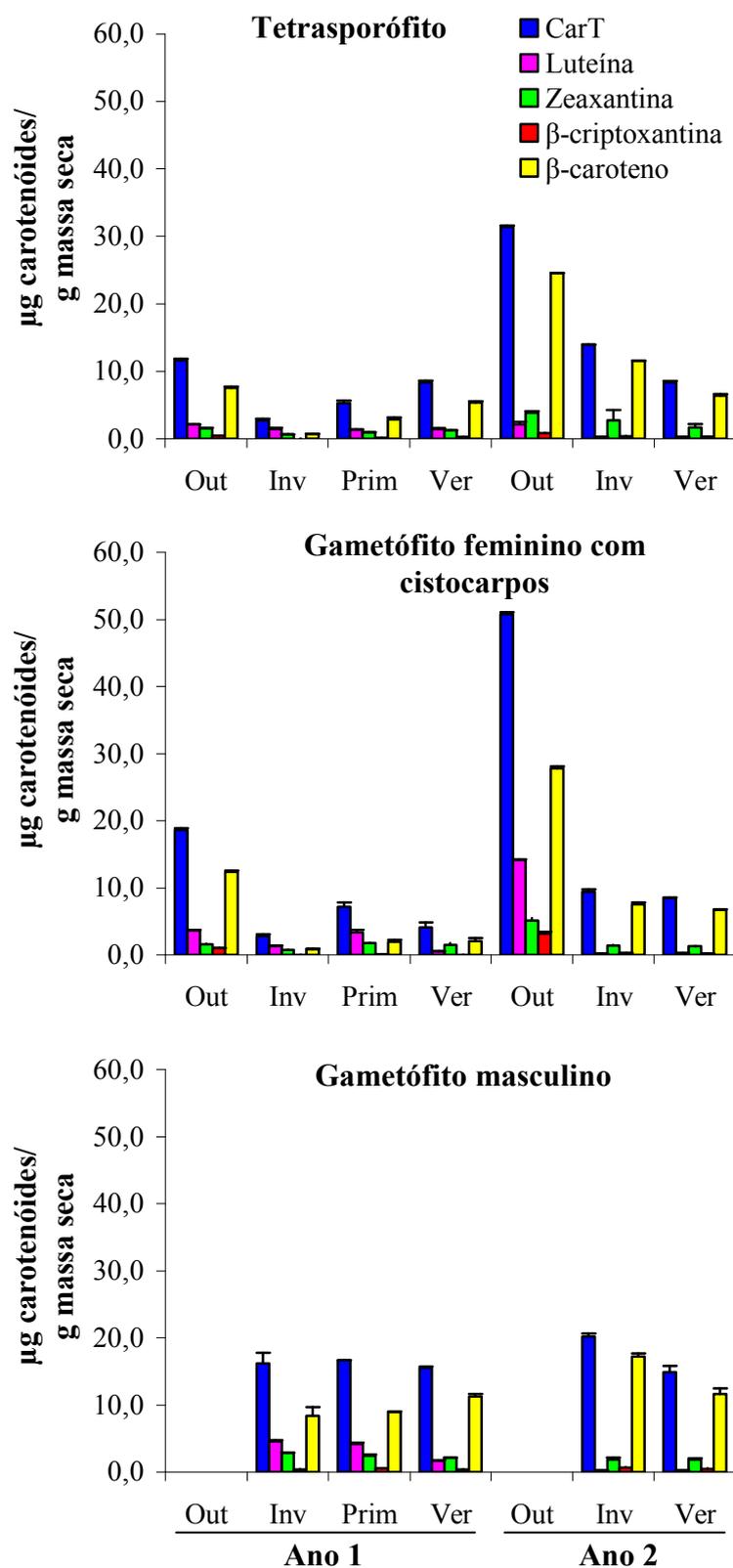


Figura 15: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ($10 \mu\text{L}$) \pm desvio padrão. Os dados referentes à zeaxantina representam a somatória das médias de zeaxantina livre e esterificada; os dados referentes ao β -caroteno representam a somatória das médias das formas isoméricas *cis* e *trans*. CarT: carotenóides totais.

Em indivíduos que não se encontravam férteis no momento da coleta, embora não se tenha feito teste estatístico por conta do número de indivíduos coletados (n=1 e n=3, na primavera/2008 e verão/2009, respectivamente), pode-se observar que as concentrações de luteína, β -criptoxantina e do isômero *trans* do β -caroteno foram maiores na primavera de 2008 e que as concentrações de zeaxantina (livre e esterificada) e do isômero *cis* do β -caroteno foram maiores no verão de 2009. Não foi detectada a presença de α -caroteno em ambas as estações do ano (tabela 12).

Tabela 12: Concentração dos carotenóides ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de indivíduos não-férteis de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão.

Pico	Composto	Rt (min)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)	
			Primavera 2008	Verão 2009
1	Luteína	3,8	3,15 \pm 0,04	1,33 \pm 0,11
2	Zeaxantina livre	4,1	0,66 \pm 0,04	1,47 \pm 0,05
3	Zeaxantina esterificada	4,4	0,84 \pm 0,04	0,93 \pm 0,03
4	β -criptoxantina	7,2	0,37 \pm 0,00	0,15 \pm 0,01
5	α -caroteno	9,7	n.d	n.d
6	<i>trans</i> - β -caroteno	10,8	6,47 \pm 0,10	0,47 \pm 0,01
7	<i>cis</i> - β -caroteno	11,7	1,73 \pm 0,12	5,43 \pm 0,32
	Carotenóides totais **		13,22 \pm 0,27	9,78 \pm 0,49

n.d: não detectado

** - soma dos carotenóides identificados por CLAE

4.3.2 - Compostos fenólicos

Para caracterizar o conteúdo de compostos fenólicos dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, o primeiro passo realizado foi a determinação de um solvente adequado para a extração. Usualmente, são empregados como solventes água, acetona, clorofórmio, metanol ou etanol, com a adição de pequenas quantidades de ácido clorídrico ou ácido fórmico (Giusti & Wrolstad 2001).

A figura 16 mostra o perfil espectral dos extratos brutos de tetrasporófitos coletados no verão/2009, obtidos com a utilização de MeOH 80%, MeOH 80% - HCl (1% - v/v) e água. Analisando-se esta figura, constata-se que o solvente mais adequado à extração dos

compostos fenólicos foi o MeOH 80%, em função dos altos valores de absorbância na faixa espectral característica destes compostos, isto é, de 280 a 320 nm.

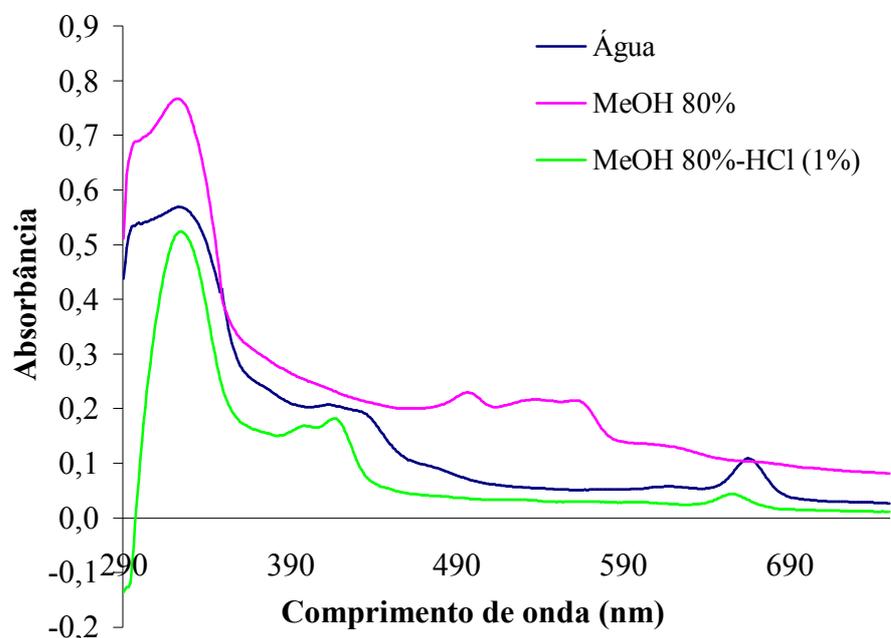


Figura 16: Perfis de absorbância UV-vis dos extratos aquoso, MeOH 80% e MeOH 80% HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* coletados no verão/2009, na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, para a janela espectral de 290 a 750 nm.

Como os altos valores de absorbância na faixa espectral de 280 a 320 nm são indicativos da presença de flavonóides, uma sub-classe de compostos fenólicos, optou-se por fazer a determinação do conteúdo de flavonóides totais juntamente com quantificação de fenólicos totais, uma vez que ambos os testes utilizam metodologias distintas para a quantificação dos compostos.

O conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides totais foram determinados para todos os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* e em todos os períodos de coleta. Os resultados foram apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Concentração de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g/g}$ – massa seca) determinada por espectrofotometria de UV-vis dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata).

	Concentração de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
	Ano 1				Ano 2		
	Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
Tetrasporófito	0,80 \pm 0,05	1,52 \pm 0,14	1,41 \pm 0,05	0,93 \pm 0,05	0,61 \pm 0,05	1,19 \pm 0,00	1,39 \pm 0,12
Gametófito feminino com cistocarpio	0,55 \pm 0,11	1,33 \pm 0,11	1,16 \pm 0,05	1,09 \pm 0,05	1,00 \pm 0,06	0,62 \pm 0,00	0,57 \pm 0,06
Gametófito masculino	-	1,59 \pm 0,14	0,77 \pm 0,05	0,72 \pm 0,00	-	0,20 \pm 0,00	0,78 \pm 0,21
Não-fértil	-	-	**	0,66 \pm 0,20	-	-	-

* - indivíduos ausentes

** - biomassa insuficiente (n = 1)

Tabela 14: Concentração de flavonóides totais ($\mu\text{g/g}$ – massa seca) determinada por espectrofotometria de UV-vis dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata).

	Concentração de flavonóides totais ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
	Ano 1				Ano 2		
	Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
Tetrasporófito	2,51 \pm 0,01	1,19 \pm 0,01	1,23 \pm 0,02	0,87 \pm 0,01	1,63 \pm 0,04	1,72 \pm 0,03	0,69 \pm 0,11
Gametófito feminino com cistocarpio	2,77 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01	1,84 \pm 0,01	1,30 \pm 0,00	2,10 \pm 0,08	1,51 \pm 0,04	1,14 \pm 0,12
Gametófito masculino	-	1,85 \pm 0,01	2,22 \pm 0,04	1,18 \pm 0,05	-	2,81 \pm 0,20	0,47 \pm 0,07
Não-fértil	-	-	**	1,15 \pm 0,00	-	-	-

* - indivíduos ausentes

** - biomassa insuficiente (n = 1)

Os dados apresentados nas tabelas 13 e 14 são dados brutos, não tratados estatisticamente. Decidiu-se apresentá-los desta forma, pois o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides determinados pela espectrofotometria de UV-vis foram inferiores aos determinados pela CLAE, o que não era esperado, uma vez que a espectrofotometria UV-vis é uma técnica que superestima os resultados, devido à possibilidade de existência de outros compostos no extrato que absorvem no mesmo comprimento de onda. O próprio método de Folin-Ciocalteu superestima a quantificação de compostos fenólicos, uma vez que se conhecem interferentes não-fenólicos, como por exemplo, o ácido ascórbico (Oliveira *et al.* 2009). Desta maneira, a fim de se avaliar a variação sazonal dos compostos fenólicos presentes nos estágios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, optou-se por utilizar os resultados obtidos pelo método de CLAE.

A CLAE foi empregada visando à quantificação e identificação do conteúdo de compostos fenólicos presentes nos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* em diferentes épocas do ano. As catequinas epicatequina e galocatequina e um composto ainda não identificado (denominado composto X, com tempo de retenção (Rt) em 4,4 min.) foram os principais compostos detectados nos estádios reprodutivos de *G. domingensis* (figura 17). Além desses, o ácido gálico foi detectado em pequenas quantidades em todos os estádios reprodutivos, porém, apenas na primavera/2008 e no verão/2010.

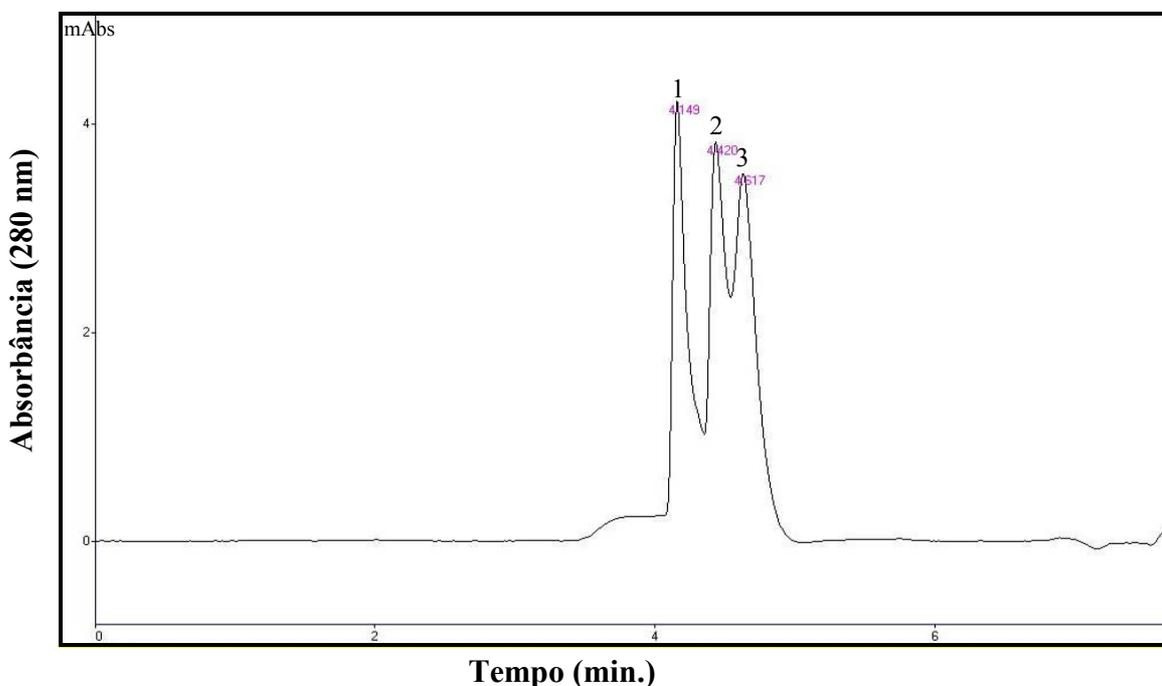


Figura 17: Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (CLAE, 280 nm) do extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* coletados no inverno/2008 (Picos: 1 – epicatequina; 2 – composto X; 3 – galocatequina).

O acúmulo de compostos fenólicos em tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* variou sazonalmente (tabela 15, figura 18). No entanto, não foi observado o mesmo padrão na dinâmica de acúmulo destes compostos ao longo dos dois anos de coleta. No **primeiro ano de coletas**, a concentração de epicatequina foi menor no outono em relação ao inverno, no entanto, na primavera a concentração deste composto não diferiu em relação ao observado no outono e inverno. No verão, foi observada uma diminuição na concentração deste composto. A concentração mais baixa do composto X foi observada no outono, sendo que o seu acúmulo aumentou no inverno e na primavera, decaindo no verão (a concentração deste composto no inverno não diferiu estatisticamente da concentração observada no verão). Concentrações inferiores de galocatequina foram observadas no outono; concentrações superiores deste composto foram observadas no inverno e na primavera, seguida de uma diminuição da sua concentração no verão. Traços de ácido gálico foram detectados apenas na primavera. A concentração de compostos fenólicos totais foi superior na primavera, sendo que concentrações inferiores foram observadas no outono, um aumento da mesma ocorreu no inverno e uma queda foi observada no verão. Para o **segundo ano de coletas**, a dinâmica no acúmulo de epicatequina foi similar à observada para o primeiro ano. Para o composto X foi observado um aumento da sua concentração entre o outono e o inverno, chegando a concentrações superiores no verão. Não foi detectada a presença de galocatequina e traços de ácido gálico foram detectados no verão. A concentração de compostos fenólicos totais aumentou progressivamente do outono para o verão.

Tabela 15: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 μL) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Pico	Composto	Rt (min)	Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
			Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Epicatequina	4,1	$3,47 \pm 0,25^b$	$4,15 \pm 0,16^a$	$3,92 \pm 0,29^{ab}$	$1,41 \pm 0,14^c$	$2,77 \pm 0,10^b$	$7,16 \pm 0,90^a$	$2,97 \pm 0,01^b$
2	Composto X (Rt 4.4min)	4,4	$1,62 \pm 0,31^c$	$3,03 \pm 0,39^b$	$4,77 \pm 0,21^a$	$3,55 \pm 0,69^b$	$2,89 \pm 0,07^c$	$6,14 \pm 0,11^b$	$14,64 \pm 2,20^a$
3	Galocatequina	4,6	$1,66 \pm 0,24^d$	$4,62 \pm 0,36^b$	$6,30 \pm 0,04^a$	$3,21 \pm 0,54^c$	n.d	n.d	n.d
4	Ácido gálico	5,4	n.d	n.d	traços*	n.d	n.d	n.d	traços*
	Fenólicos totais**		$6,88 \pm 0,74^d$	$11,80 \pm 0,88^b$	$14,99 \pm 0,53^a$	$8,80 \pm 0,12^c$	$5,66 \pm 0,11^c$	$13,80 \pm 0,14^b$	$17,61 \pm 2,21^a$

n.d: não detectado

* - concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração

** - soma dos compostos fenólicos identificados por CLAE

Para os gametófitos femininos com cistocarpos, a sazonalidade também contribuiu para as diferenças observadas no perfil de compostos fenólicos (tabela 16, figura 18). A dinâmica no acúmulo destes compostos para o primeiro ano de coletas foi contrária à observada no segundo ano de coletas. Durante o **primeiro ano de coletas**, foi observada uma diminuição na concentração de epicatequina e galocatequina do outono para o verão, sendo que as concentrações destes compostos não diferiram no inverno e na primavera. As concentrações do composto X diminuiu no inverno em relação ao outono, seguida de uma recuperação na primavera e queda no verão. Traços de ácido gálico foram detectados na primavera. De modo geral, a concentração de fenólicos totais foi superior no outono, com uma considerável diminuição no inverno. O acúmulo destes compostos foi maior na primavera, apresentando uma nova queda durante o verão. No **segundo ano de coletas**, o acúmulo dos compostos fenólicos foi maior no verão, comparativamente ao outono e ao inverno. Foram detectados traços de ácido gálico no verão.

A influência da sazonalidade também pode ser observada no acúmulo de compostos fenólicos em gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis* (tabela 17, figura 18). Embora não se tenha dados sobre o outono do **primeiro ano de coletas**, o acúmulo de compostos fenólicos aumentou do inverno para a primavera, onde foram observadas as maiores concentrações de epicatequina, composto X e galocatequina, e diminuiu consideravelmente no verão, tal como foi observado em tetrasporófitos. Foi detectada a presença de ácido gálico na primavera. No **segundo ano de coletas**, assim como para tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos, verificou-se uma concentração maior de compostos fenólicos no verão, sendo que a concentração destes foi aproximadamente 2x maior do que as concentrações encontradas nos demais estádios reprodutivos de *G. domingensis*. Não foi detectada a presença de galocatequina e traços de ácido gálico foram detectados no verão.

Para os indivíduos não-férteis coletados no verão de 2009 (n= 3) foi detectado a epicatequina ($3,51 \pm 0,28 \mu\text{g/g}$ – massa seca), o composto X ($3,55 \pm 0,69 \mu\text{g/g}$) e a galocatequina ($3,21 \pm 0,54 \mu\text{g/g}$) compondo o seu perfil de compostos fenólicos.

Tabela 16: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 μL) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

			Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
Pico	Composto	Rt (min)	Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Epicatequina	4,1	5,05 \pm 0,11 ^a	3,52 \pm 0,54 ^b	3,92 \pm 0,23 ^b	2,01 \pm 0,04 ^c	3,31 \pm 0,38 ^b	5,99 \pm 1,04 ^a	6,47 \pm 0,20 ^a
2	Composto X (Rt 4.4min)	4,4	5,38 \pm 0,16 ^a	2,10 \pm 0,01 ^c	3,08 \pm 0,22 ^b	0,72 \pm 0,02 ^d	4,01 \pm 0,34 ^b	4,18 \pm 0,28 ^b	10,18 \pm 1,23 ^a
3	Galocatequina	4,6	4,53 \pm 0,45 ^a	2,34 \pm 0,19 ^b	2,54 \pm 0,36 ^b	0,73 \pm 0,01 ^c	n.d	n.d	n.d
4	Ácido gálico	5,4	n.d	n.d	traços [*]	n.d	n.d	n.d	traços [*]
	Fenólicos totais ^{**}		14,95 \pm 0,72 ^a	8,07 \pm 0,53 ^c	9,54 \pm 0,19 ^b	3,45 \pm 0,07 ^d	7,32 \pm 0,32 ^c	10,16 \pm 1,01 ^b	16,64 \pm 1,43 ^a

Tabela 17: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH – HCl (1%, v/v) de gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 μL) \pm desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

			Concentração ($\mu\text{g/g}$ - massa seca)						
Pico	Composto	Rt (min)	Ano 1				Ano 2		
			Outono 2008	Inverno 2008	Primavera 2008	Verão 2009	Outono 2009	Inverno 2009	Verão 2010
1	Epicatequina	4,1	-	2,81 \pm 0,49 ^b	4,06 \pm 0,05 ^a	1,54 \pm 0,02 ^c	-	5,24 \pm 0,19 ^b	18,18 \pm 0,28 ^a
2	Composto X (Rt 4.4min)	4,4	-	1,91 \pm 0,34 ^b	4,93 \pm 1,08 ^a	0,63 \pm 0,01 ^b	-	3,87 \pm 0,31 ^b	14,20 \pm 1,56 ^a
3	Galocatequina	4,6	-	2,71 \pm 0,71 ^b	6,45 \pm 0,09 ^a	0,61 \pm 0,01 ^c	-	n.d	n.d
4	Ácido gálico	5,4	-	n.d	traços [*]	n.d	-	n.d	traços [*]
	Fenólicos totais ^{**}		-	7,71 \pm 1,02 ^b	15,43 \pm 1,22 ^a	2,75 \pm 0,25 ^c	-	9,12 \pm 0,43 ^b	32,38 \pm 1,40 ^a

-: indivíduos ausentes

n.d: não detectado

* - concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração

** - soma dos compostos fenólicos identificados por CLAE

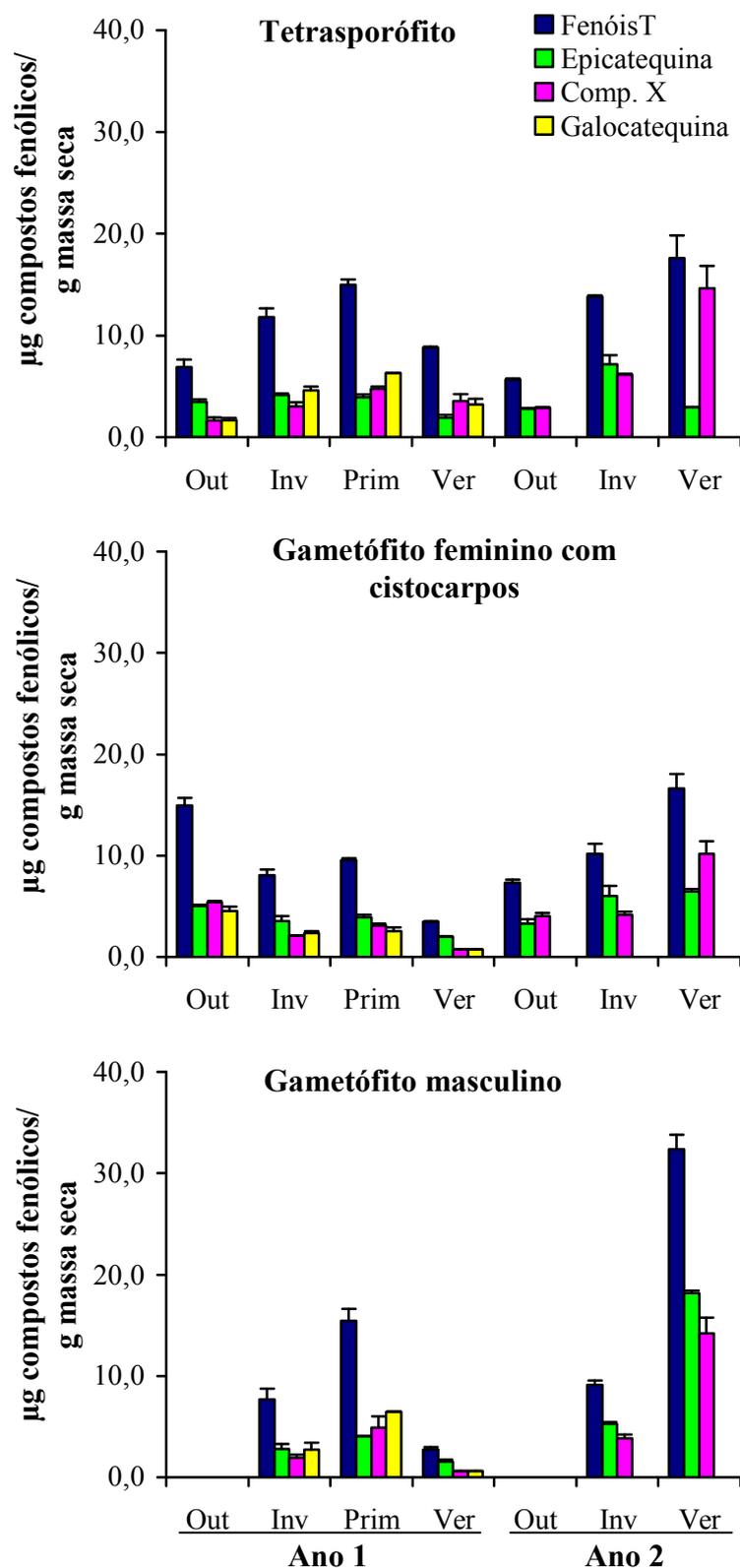


Figura 18: Concentração dos compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH 80% – HCl (1%, v/v) de tetrasporófitos, gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC), no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções (20 μL) \pm desvio padrão. FenóisT: compostos fenólicos totais.

4.3.3 - Análise de correlações

Para o **primeiro ano de coletas** foram observadas algumas correlações entre os parâmetros ambientais testados e os compostos carotenóidicos e fenólicos. No entanto, tomando como referência valores acima de 0,75 como alto índice de correlação, grande parte das correlações observadas apresentaram baixo índice de correlação. Pode-se observar que os componentes de um mesmo grupo de metabólitos secundários não estiveram sempre relacionados ao mesmo parâmetro ambiental. Os carotenóides foram menos suscetíveis as variações dos fatores ambientais em estudo comparativamente aos compostos fenólicos. Dentre os carotenóides, a luteína foi o composto que apresentou maior sensibilidade as variações dos parâmetros ambientais, não se correlacionando apenas com a insolação total mensal e a velocidade dos ventos. Já os compostos fenólicos se correlacionaram negativamente com a insolação total mensal, temperaturas máximas e mínimas, temperatura da água, salinidade, fosfato e N-amoniacal. Estes compostos apresentaram correlação positiva apenas com o O₂ dissolvido na água do mar (tabela 18).

Em relação **ao segundo ano de coletas**, foi observado um número maior de correlações entre os parâmetros ambientais e os carotenóides e compostos fenólicos (tabela 19). Grande parte dos compostos carotenóidicos correlacionou-se positivamente com a insolação total mensal, O₂ dissolvido e salinidade e negativamente com a precipitação pluviométrica mensal, velocidade dos ventos, nitrato e N-amoniacal. Os compostos fenólicos estiveram correlacionados positivamente com a precipitação pluviométrica mensal, temperaturas máximas e mínimas (com exceção da epicatequina), velocidade de ventos, temperatura da água (exceto epicatequina) e pH e negativamente ao O₂ dissolvido e salinidade. Como a concentração de fosfato não variou ao longo do segundo ano de coletas, não foi observada correlação entre esta variável e os carotenóides e compostos fenólicos.

Tabela 18: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros ambientais e os compostos carotenóidicos e fenólicos, referentes ao primeiro ano de coletas dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em **negrito**, correlação significativa.

Parâmetros ambientais	L	ZE	ZL	β -Cr	α -Ca	β -Car (<i>trans</i>)	β -Car (<i>cis</i>)	CarT	Epicat	Comp.X	Galocat	FenóisT
Maré baixa (n° dias/mês)	0,007	-0,039	-0,330	-0,307	-0,208	-0,243	-0,210	-0,273	0,018	-0,271	-0,017	-0,103
Insolação total mensal	-0,274	0,153	-0,210	0,163	-0,040	0,119	0,259	0,091	-0,268	-0,452	-0,595	-0,522
Precipitação pluviométrica mensal	0,013	-0,045	0,365	-0,061	0,055	-0,023	0,067	0,029	-0,055	0,328	0,225	0,216
T°C mínima mensal	-0,421	0,063	0,321	-0,371	-0,306	-0,217	-0,353	-0,146	-0,614	-0,127	-0,332	-0,360
T°C máxima mensal	-0,508	0,136	0,264	-0,190	-0,233	-0,089	-0,484	-0,030	-0,681	-0,265	-0,570	-0,544
Velocidade de ventos	-0,321	0,028	0,354	-0,338	-0,242	-0,199	0,279	-0,127	-0,494	-0,001	-0,174	-0,208
T°C água	-0,436	0,132	0,301	-0,057	-0,112	0,003	-0,474	0,059	-0,581	-0,165	-0,498	-0,447
O ₂ dissolvido	0,492	-0,075	-0,254	0,472	0,413	0,288	0,366	0,220	0,703	0,252	0,431	0,477
pH	0,175	-0,017	-0,386	0,105	0,033	0,042	-0,235	-0,021	0,290	-0,164	0,034	0,029
Salinidade	0,354	0,186	0,111	0,301	0,101	0,238	0,473	0,252	-0,397	-0,256	-0,618	-0,493
Nitrato	-0,169	-0,040	-0,382	-0,022	-0,051	-0,047	-0,273	-0,103	0,263	-0,164	0,081	0,045
Fosfato	-0,476	0,192	0,003	0,048	-0,132	0,062	-0,468	0,074	-0,564	-0,463	-0,752	-0,675
N-amoniacal	-0,426	0,041	-0,239	0,048	-0,083	0,008	0,258	-0,034	-0,256	-0,426	-0,606	-0,515

Legenda: L: luteína; ZE: zeaxantina esterificada; ZL: zeaxantina livre; β -Cr: β -criptoxantina; α -Ca: α -caroteno; β -Car (*trans*): *trans*- β -caroteno; β -Car (*cis*): *cis*- β -caroteno; CarT: carotenóides totais; Epicat: epicatequina; Comp. X: composto não identificado com Rt em 4,4 min; Galocat: galocatequina; FenóisT: fenólicos totais

Tabela 19: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros ambientais e os compostos carotenóidicos e fenólicos referentes ao segundo ano de coletas dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em **negrito**, correlação significativa.

Parâmetros ambientais	L	ZE	ZL	β -Cr	α -Ca	β -Car (<i>trans</i>)	β -Car (<i>cis</i>)	CarT	Epicat	Comp.X	Galocat	FenóisT
Maré baixa (n° dias/mês)	-0,202	-0,188	-0,272	-0,208	-0,122	-0,259	-0,216	-0,287	0,068	-0,214	*	-0,075
Insolação total mensal	0,662	0,749	0,706	0,645	0,644	0,646	0,706	0,672	-0,240	-0,105		-0,199
Precipitação pluviométrica mensal	-0,568	-0,589	-0,778	-0,502	-0,459	-0,646	-0,656	-0,637	0,517	0,889		0,786
T°C mínima mensal	-0,078	-0,034	-0,255	-0,025	0,018	-0,167	-0,134	-0,140	0,338	0,810		0,638
T°C máxima mensal	-0,009	0,041	-0,175	0,040	0,080	-0,097	-0,058	-0,068	0,301	0,766		0,592
Velocidade de ventos	-0,724	-0,781	-0,897	-0,668	-0,637	-0,773	-0,809	-0,779	0,488	0,693		0,663
T°C água	0,017	0,070	-0,144	0,065	0,104	-0,069	-0,030	-0,040	0,286	0,748		0,573
O ₂ dissolvido	0,689	0,735	0,878	0,628	0,592	0,749	0,777	0,750	-0,509	-0,774		-0,719
pH	-0,275	-0,253	-0,477	-0,212	-0,167	-0,366	-0,347	-0,344	0,432	0,897		0,740
Salinidade	0,748	0,819	0,885	0,703	0,680	0,777	0,823	0,790	-0,428	-0,522		-0,535
Nitrato	-0,682	-0,768	-0,738	-0,661	-0,657	-0,672	-0,730	-0,696	0,268	0,160		0,245
Fosfato	**											
N-amoniacal	-0,410	-0,493	-0,348	-0,427	-0,448	-0,353	-0,411	-0,385	-0,013	-0,350		-0,197

Legenda: L: luteína; ZE: zeaxantina esterificada; ZL: zeaxantina livre; β -Cr: β -criptoxantina; α -Ca: α -caroteno; β -Car (*trans*): *trans*- β -caroteno; β -Car (*cis*): *cis*- β -caroteno; CarT: carotenóides totais; Epicat: epicatequina; Comp. X: composto não identificado com Rt em 4,4 min; Galocat: galocatequina; FenóisT: fenólicos totais

* - O composto galocatequina não foi detectado no segundo ano de coletas

** - Fosfato não apresentou correlação com os carotenóides e compostos fenólicos

4.3.4 - *Análise de Componentes Principais (PCA)*

Os valores dos conteúdos médios para os compostos estudados (luteína, zeaxantina livre e esterificada, β -criptoxantina, β -caroteno *trans* e *cis*, carotenóides totais, epicatequina, composto X, galocatequina e fenóis totais) foram utilizados para a análise dos componentes principais (PCAs), visando o agrupamento das amostras em função da similaridade da composição química. Para o cálculo das PCAs, o conjunto de dados de composição química do primeiro ano foi analisado separadamente daquele para o segundo ano, uma vez que a coleta da primavera de 2009 não foi realizada devido às condições adversas do tempo. Esta separação também foi mantida, uma vez que a análise conjunta dos dados bianuais comprometeu a dispersão das amostras.

A dispersão das variáveis (estádios reprodutivos coletados em diferentes períodos do ano) projetada na forma bidimensional nos eixos cartesianos de PC1 e PC2 para o **primeiro ano de coletas** é mostrada na figura 19. O componente principal 1 (PC1) apresenta a amplitude de valores para fenóis totais, galocatequina, composto X e epicatequina sendo o componente de maior contribuição à explicação da variância total dos dados (62,47%). O componente principal 2 (PC2), que corresponde à concentração de carotenóides totais e *trans*- β -caroteno explicou em 28,81% a variância dos resultados. Dessa forma, os gametófitos masculinos coletados no inverno/2008 e no verão/2009 que apresentaram os maiores teores de carotenóides totais e do isômero *trans* do β -caroteno, e baixos teores de compostos fenólicos totais, agruparam-se em PC1 (+) e PC2 (-). Os gametófitos masculinos coletados na primavera/2008 e femininos coletados no outono/2008 agruparam-se em PC1 e PC2 (+) devido aos elevados teores de compostos fenólicos, embora apresentem teores elevados de carotenóides totais. Os agrupamentos formados por tetrasporófitos e gametófitos femininos coletados no inverno e na primavera/2008 e os indivíduos não férteis coletados no verão/2009 (agrupados em PC1 - e PC2 +) são referentes a baixos teores de carotenóides totais, sendo que os indivíduos coletados no inverno apresentaram os menores teores. O agrupamento formado em PC1 e PC2 (-) com os tetrasporófitos e gametófitos femininos coletados no verão/2009 é relativo aos baixos teores de compostos fenólicos, sendo que os gametófitos femininos apresentaram teores inferiores aos encontrados em tetrasporófitos. Os tetrasporófitos coletados no outono/2008 apresentaram contribuições fatoriais próximos à região negativa de PC2, indicando que o seu conteúdo de compostos fenólicos totais é relativamente baixo quando comparado aos demais indivíduos.

coletados no outono/2009 localizaram-se no gráfico das contribuições fatoriais, próximos à região positiva de PC1, indicando que o seu conteúdo de compostos fenólicos é relativamente baixo quando comparado aos demais indivíduos.

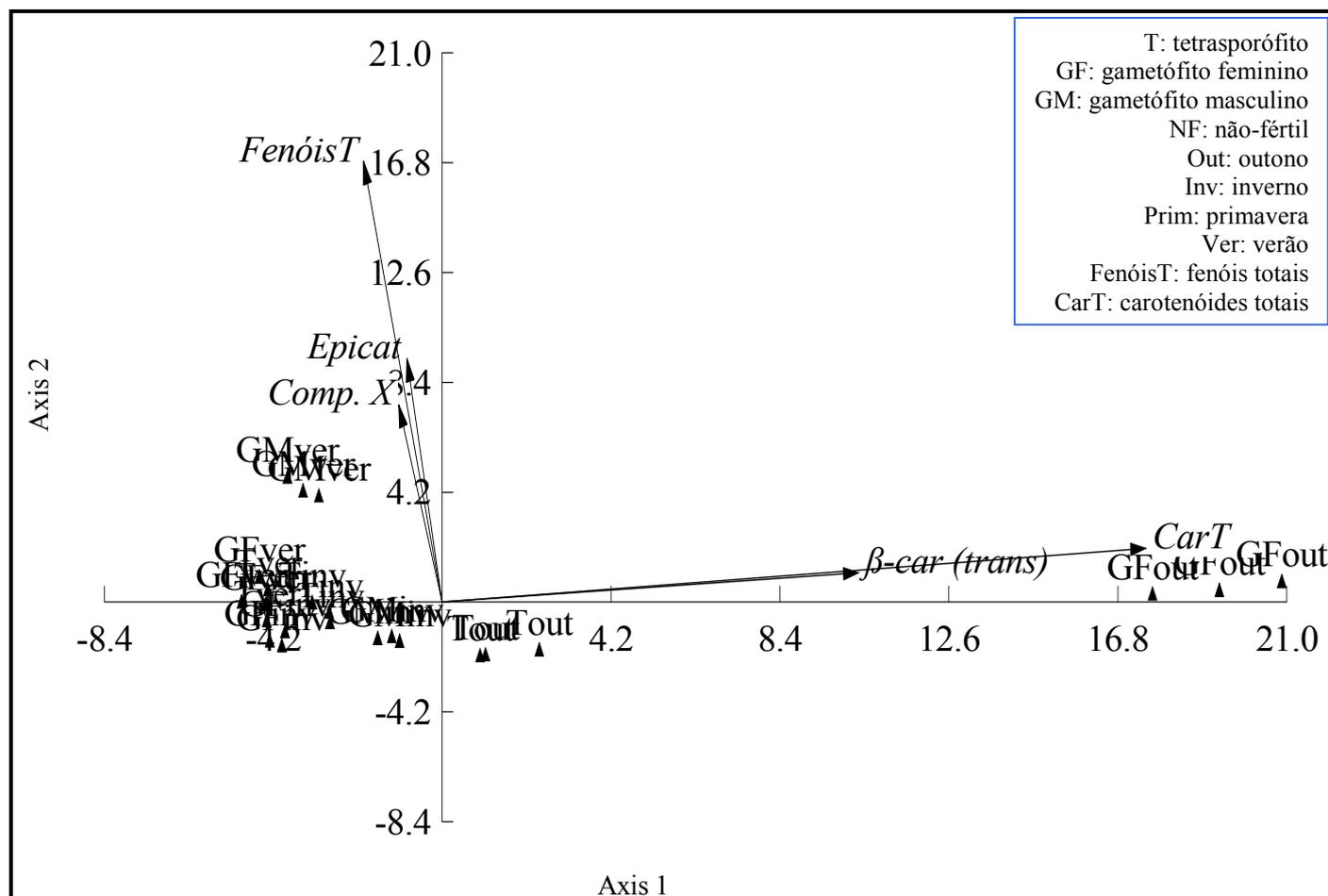


Figura 20: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de carotenóides e compostos fenólicos determinado por CLAE encontrados nos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* durante o segundo ano de coletas (outono e inverno/2009 e verão/2010) na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC.

4.4 - Atividade antioxidante dos extratos

Os extratos de *Gracilaria domingensis* foram testados para avaliação de sua atividade antioxidante por dois métodos distintos: inibição do radical DPPH (realizado para os extratos em MeOH 80% - compostos fenólicos) e inibição da oxidação lipídica – sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico (realizado para os extratos em hexano:acetona - carotenóides).

4.4.1 - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Os extratos dos estágios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, preparados em MeOH 80%, foram testados frente a sua capacidade em inibir o radical DPPH. Os resultados podem ser vistos na tabela 20.

Tabela 20: Inibição do radical DPPH para o extrato MeOH 80% dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC) no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata). As letras (mesma coluna) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

		% Inibição do radical DPPH		
		Tetrasporófito	Feminino com cistocarpo	Masculino
Ano 1	Outono 2008	1,18 \pm 0,84 ^b	2,81 \pm 1,05 ^b	-
	Inverno 2008	3,27 \pm 0,11 ^a	1,37 \pm 0,64 ^c	2,36 \pm 0,97 ^b
	Primavera 2008	3,79 \pm 0,11 ^a	4,44 \pm 0,34 ^a	4,52 \pm 0,23 ^a
	Verão 2009	2,99 \pm 0,63 ^a	2,39 \pm 0,21 ^b	2,76 \pm 0,32 ^b
Ano 2	Outono 2009	4,17 \pm 0,21 ^b	2,38 \pm 0,21 ^b	-
	Inverno 2009	2,33 \pm 0,34 ^c	2,57 \pm 1,14 ^b	2,33 \pm 0,34 ^b
	Verão 2010	6,57 \pm 0,14 ^a	7,47 \pm 0,00 ^a	6,77 \pm 0,43 ^a

-: indivíduos ausentes

A inibição do radical livre DPPH para os tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* coletados durante o **primeiro ano de coletas** foi maior nos extratos obtidos no inverno, primavera e verão que não apresentaram diferenças significativas entre si. A menor porcentagem de inibição foi obtida para o extrato do outono. Os gametófitos femininos com cistocarpos e masculinos apresentaram extratos com maior porcentagem de inibição do DPPH na primavera. Para o **segundo ano de coletas**, em ambos os estádios reprodutivos foi observado maior porcentagem de inibição do DPPH em extratos da coleta de verão. O extrato dos indivíduos não-férteis coletados no verão/2009 apresentou uma porcentagem de inibição do radical DPPH de $2,14 \pm 0,73\%$.

O BHT, controle positivo utilizado para comparação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* apresentou porcentagem de inibição do radical DPPH a $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de $85,51 \pm 2,02\%$ e $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de $91,21 \pm 0,91\%$.

A análise de correlação de Pearson evidenciou que não há uma correlação significativa entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração de compostos fenólicos totais para os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (tabela 21).

Tabela 21: Coeficientes de correlação de Pearson entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração de compostos fenólicos totais dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em **negrito**, correlação significativa.

	Correlação Pearson
Tetrasporófito	0,349
Feminino com cistocarpo	-0,460
Masculino	-0,071

4.4.2 - Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

Os resultados de inibição da oxidação lipídica dos extratos brutos dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados em diferentes períodos do ano são apresentados na tabela 22.

Tabela 22: Inibição da oxidação lipídica para o extrato hexano:acetona (1:1, v/v) dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. As amostras foram coletadas sazonalmente na Praia da Lagoinha (Florianópolis, SC) no período de maio/2008 a janeiro/2010. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (triplicata). As letras (mesma coluna) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

		% Inibição da oxidação lipídica		
		Tetrasporófito	Feminino com cistocarpo	Masculino
Ano 1	Outono 2008	14,41 \pm 3,07 ^b	13,92 \pm 1,91 ^a	-
	Inverno 2008	3,26 \pm 0,66 ^c	1,40 \pm 0,66 ^b	11,19 \pm 1,32 ^a
	Primavera 2008	14,18 \pm 3,14 ^b	5,83 \pm 1,98 ^b	7,80 \pm 0,31 ^b
	Verão 2009	29,71 \pm 06,88 ^a	7,56 \pm 2,42 ^b	13,31 \pm 1,71 ^a
Ano 2	Outono 2009	29,46 \pm 3,79	19,64 \pm 2,53	-
	Inverno 2009	24,11 \pm 6,31	20,54 \pm 1,26	18,41 \pm 1,91
	Verão 2010	33,33 \pm 5,46	21,13 \pm 6,37	11,38 \pm 1,69

-: indivíduos ausentes

No **primeiro ano de coletas**, os tetrásporófitos apresentaram porcentagem de inibição lipídica superior no verão e inferior no inverno. A porcentagem de inibição lipídica dos extratos do outono e da primavera não diferiu estatisticamente. Os gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram porcentagens de inibição lipídica superiores no outono. As demais estações não apresentaram diferenças significativas. Os gametófitos masculinos apresentaram porcentagem de inibição lipídica superiores no inverno e no verão e inferior na primavera. Para o **segundo ano de coletas**, os extratos provenientes das diferentes estações do ano, para todos os estádios reprodutivos de *G. domingensis* não apresentaram diferenças significativas em relação à porcentagem de inibição lipídica. O extrato dos indivíduos não-férteis coletados no verão/2009 apresentou uma porcentagem de inibição lipídica de $7,04 \pm 3,18\%$.

Os resultados para todos os extratos testados foram inferiores ao do BHT, utilizado como controle positivo (BHT a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ - $91,71 \pm 0,51\%$).

A análise de correlação de Pearson mostrou não haver uma correlação significativa entre a porcentagem de inibição lipídica e o conteúdo de carotenóides totais para tetrásporófito e gametófitos masculinos de *Gracilaria domingensis*. Para os gametófitos femininos, a inibição da oxidação lipídica se mostrou positivamente relacionada ao conteúdo de carotenóides totais presente nos extratos (tabela 23).

Tabela 23: Coeficientes de correlação de Pearson entre a % de inibição da oxidação lipídica e a concentração de carotenóides totais dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Cada célula da tabela corresponde ao valor do coeficiente de correlação ($p < 0,05$). Em **negrito**, correlação significativa.

	Correlação Pearson
Tetrásporófito	0,458
Feminino com cistocarpo	0,517
Masculino	-0,223

4.5 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas tetrásporofíticas e gametofíticas

Na maioria dos tratamentos, as plântulas derivadas da germinação de carpósporos e tetrásporos de *Gracilaria domingensis* já apresentavam um disco basal bem desenvolvido aos sete dias de cultivo e o desenvolvimento do eixo ereto já foi observado aos 14 dias de cultivo.

As figuras 21 e 22 ilustram o aspecto geral do desenvolvimento das plântulas derivadas da germinação de carpósporos e tetrásporos ao longo de 28 dias de cultivo.



Figura 21: Aspecto geral de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em VSES 25%, (A e B) 35 ups, (C e D) 40 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h, irradiância de $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Escala: A-B: 25 μm ; C-D: 100 μm .

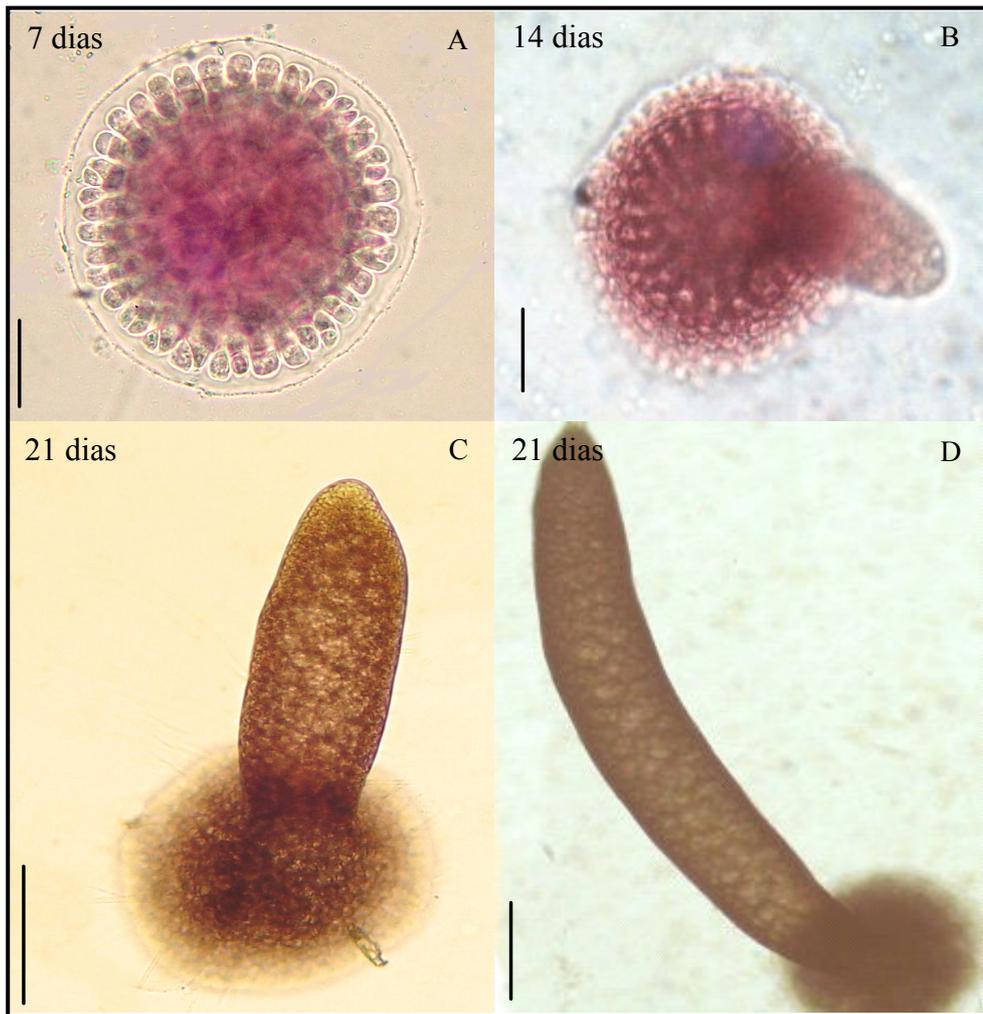


Figura 22: Aspecto geral de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos (A-D) de *Gracilaria domingensis* após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em VSES 25%, (A e B) 20°C, (C e D) 25 °C, 34 ups, fotoperíodo de 14 h, irradiância de $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Escala: A-B: 25 μm ; C-D: 100 μm .

4.5.1 - Plântulas derivadas da germinação de carpósporos

Temperatura: As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* submetidas às temperaturas de 15 e 20°C morreram antes do 7º dia de cultivo. O disco basal das plântulas cultivadas nas temperaturas de 25 e 30°C apresentaram crescimento linear, sendo que a taxa de crescimento do disco basal foi maior na temperatura de 30°C (figura 23). Com relação ao crescimento do eixo ereto, pode-se observar que as plântulas cultivadas à temperatura de 30°C tiveram crescimento exponencial, enquanto que as plântulas cultivadas à 25°C apresentaram crescimento linear. A taxa de crescimento do eixo ereto maior

na temperatura de 30°C, quando comparada a taxa de crescimento das plântulas cultivadas à 25°C (figura 24).

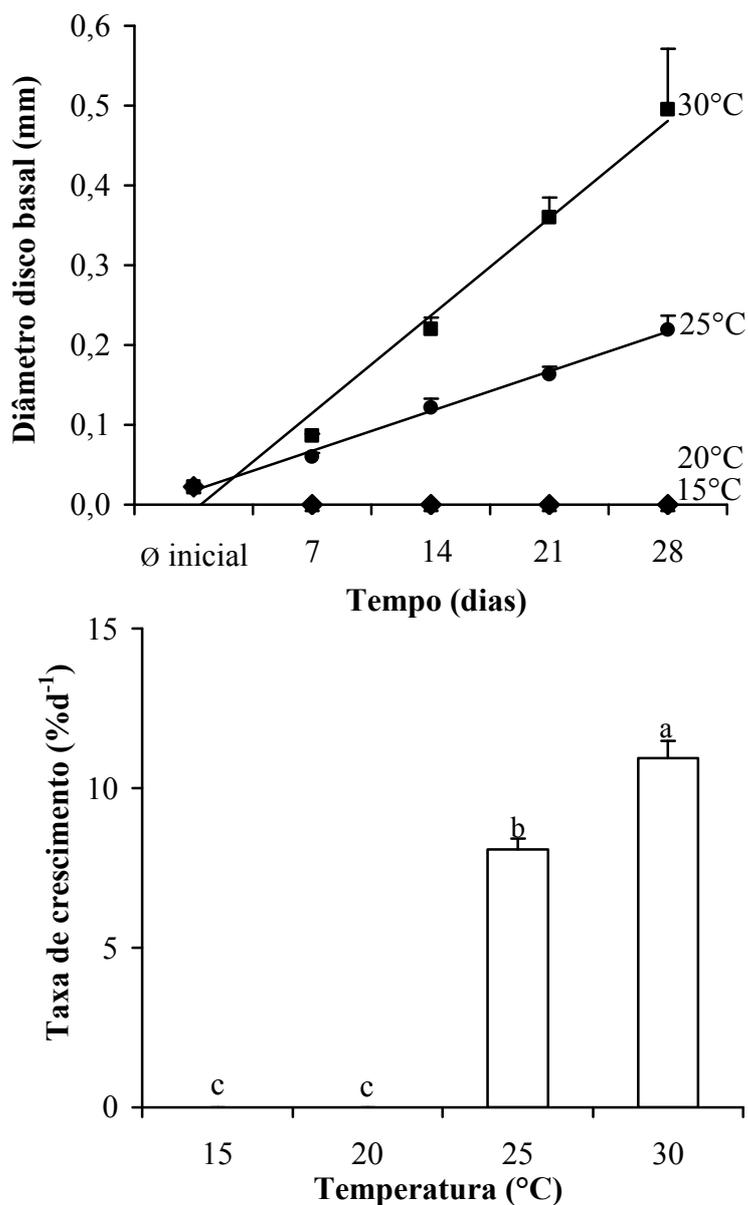


Figura 23: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

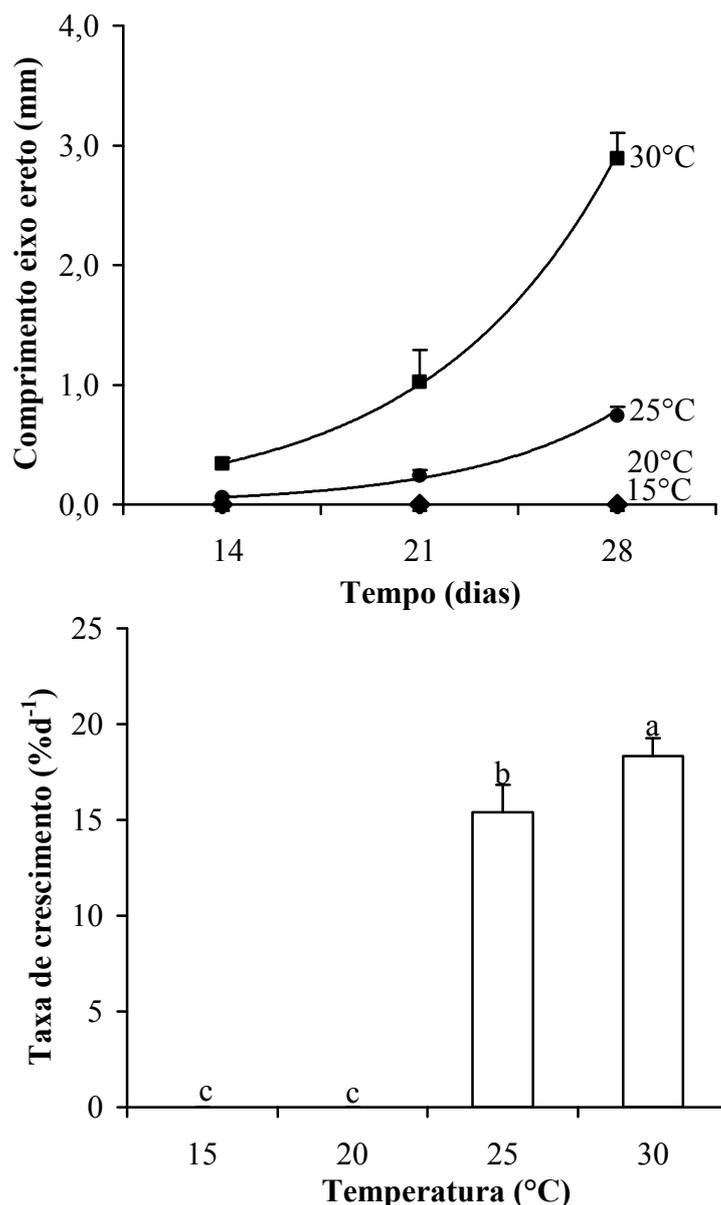


Figura 24: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Salinidade: As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* apresentaram tolerância às salinidades de 25 a 60 ups, sendo que não foi observado o desenvolvimento de eixo ereto nas salinidades de 55 e 60 ups (figuras 25 e 26). As plântulas que se desenvolveram na salinidade de 60 ups apresentaram poucas divisões celulares. As plântulas cultivadas na salinidade de 5 ups sobreviveram apenas 7 dias, enquanto que as cultivadas em 10, 15 e 20 ups sobreviveram 14 dias. Considerando a variação do diâmetro do

disco basal, o crescimento das plântulas cultivadas nas salinidades de 25 a 50 ups foi potencial, enquanto que nas salinidades de 55 e 60 ups o crescimento foi exponencial e linear, respectivamente (figura 25). A taxa de crescimento do disco basal foi maior em salinidades mais altas (25 a 50 ups), sendo que a maior taxa de crescimento foi observada à 30 ups, e a menor em 60 ups (figura 25). O crescimento do eixo ereto foi exponencial nas salinidades de 30 e 50 ups, potencial nas salinidades de 25, 35 e 40 ups e linear na salinidade de 45 ups (figura 28). A taxa de crescimento foi maior nas salinidades entre 25 e 40 ups, sendo que a maior taxa de crescimento foi observada a 30 ups. As menores taxas de crescimento foram observadas nas salinidades mais altas (45 e 50 ups) (figura 26).

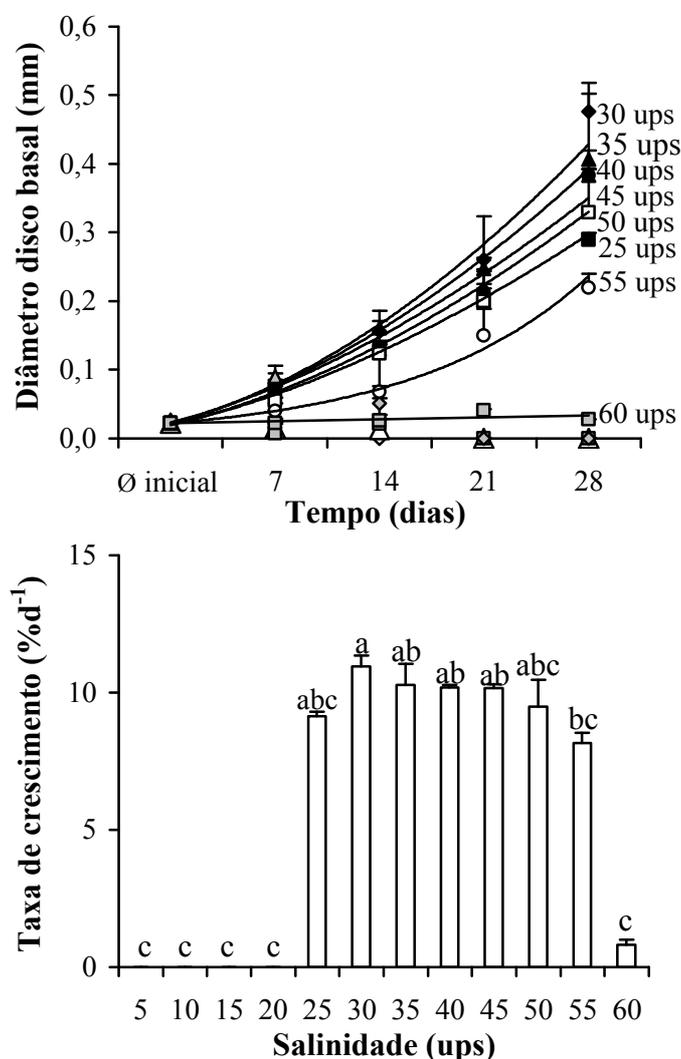


Figura 25: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

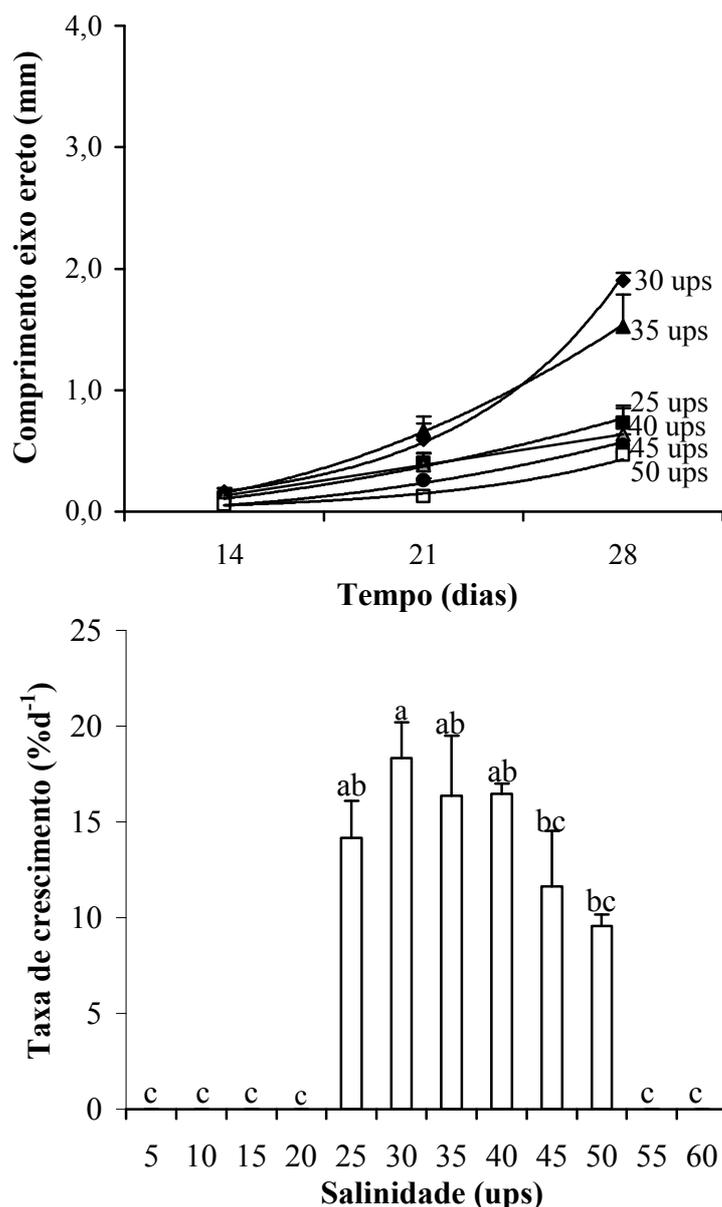


Figura 26: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n=3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Irradiância e nutrientes: A taxa de crescimento referente ao diâmetro do disco basal de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* foi influenciada tanto pela concentração de VSES quanto pelo nível de irradiância (figura 27, tabela 25). A maior taxa de crescimento foi observada em plântulas cultivadas em meio VSES 25% sob a irradiância de 150 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Com relação ao eixo ereto, as maiores taxas de crescimento ocorreram nos tratamentos com VSES 25% e 50% cultivados sob a irradiância de

50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 27, tabela 24). Tanto para o disco basal quanto para o eixo ereto, as menores taxas de crescimento foram observadas no tratamento com maior concentração de VSES (100%).

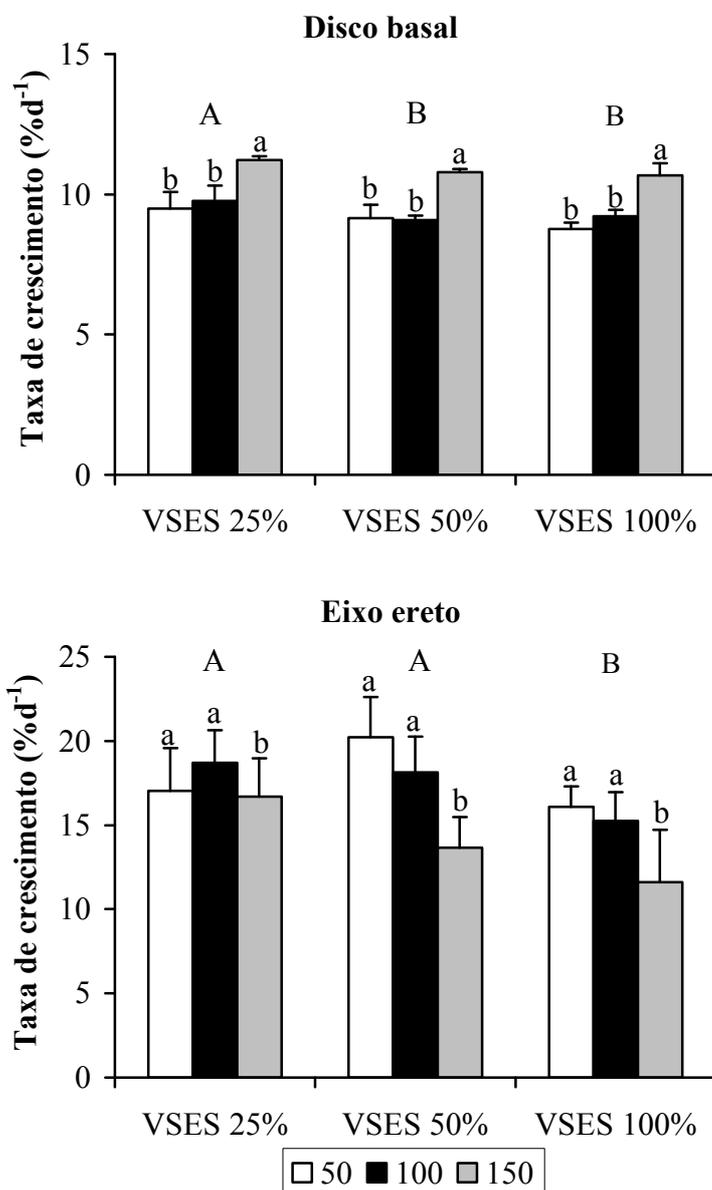


Figura 27: Efeito da irradiância (50, 100 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES) na taxa de crescimento ($\%\text{d}^{-1}$) do disco basal e eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n=4$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES).

Tabela 24: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento do disco basal e do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50, 100 e 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES). Em **negrito**, efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	Disco basal		Eixo ereto	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentração VSES	2	9,100	0,0009	8,082	0,001
Irradiância	2	81,911	0,0000	10,935	0,0003
Interação VSES x I	4	0,582	0,677	2,154	0,101

4.5.2 - Plântulas derivadas da germinação de tetrásporos

Temperatura: As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* submetidas à temperaturas de 15°C morreram antes do 7º dia de cultivo. O disco basal das plântulas cultivadas nas temperaturas de 20 e 25°C apresentaram crescimento potencial, e as plântulas cultivadas a 30°C apresentaram crescimento linear (figura 28). A taxa de crescimento do disco basal foi maior na temperatura de 30°C (figura 28). Com relação ao crescimento do eixo ereto, pode-se observar que as plântulas cultivadas à temperatura de 20 e 25°C cresceram linearmente, enquanto que as plântulas cultivadas à 30°C apresentaram crescimento potencial (figura 29). A taxa de crescimento do eixo ereto foram maiores nas temperaturas de 20 e 25°C quando comparada a 30°C (figura 29).

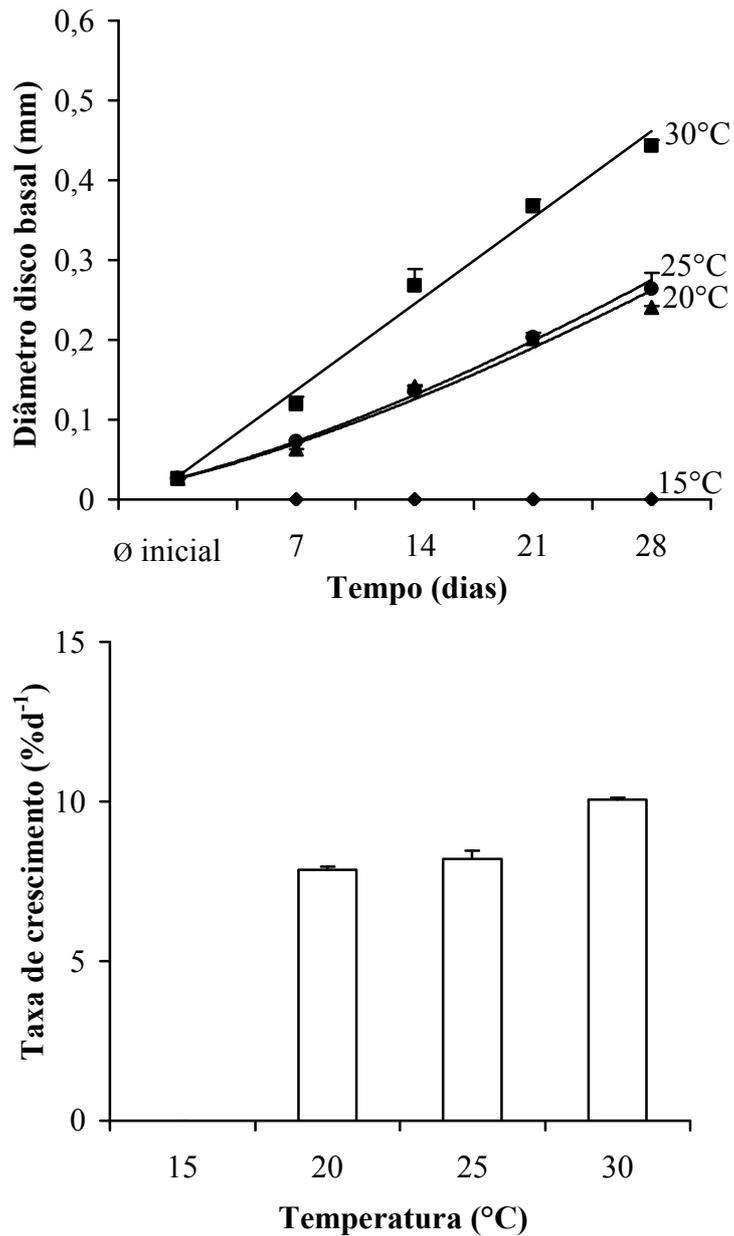


Figura 28: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=2).

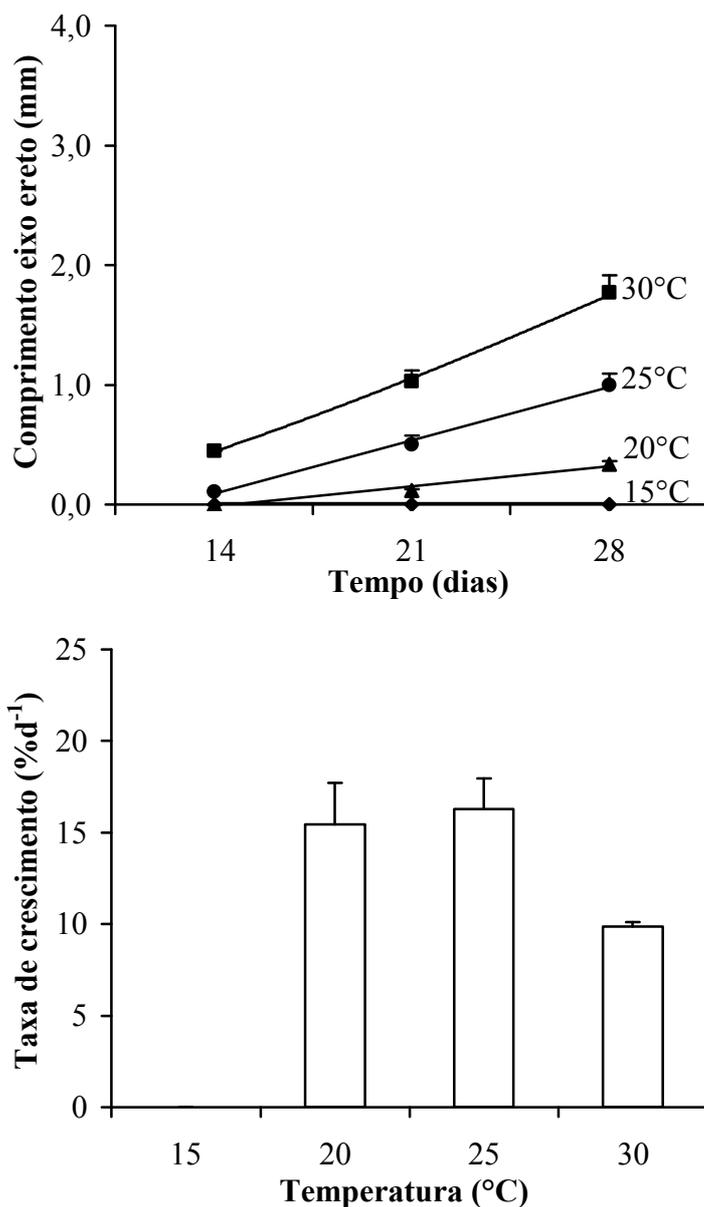


Figura 29: Variação do comprimento (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes temperaturas. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=2).

Salinidade: As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* apresentaram tolerância às salinidades de 25 a 55 ups, e as plântulas cultivadas a 55 ups não desenvolveram o eixo ereto (figuras 30 e 31). As plântulas cultivadas nas salinidades de 5 a 20 ups sobreviveram apenas por 7 dias. Considerando a variação do diâmetro do disco basal, o crescimento das plântulas cultivadas nas salinidades de 25 e 30 ups, bem como as plântulas cultivadas nas salinidades de 40 a 55 ups foi potencial, enquanto que nas salinidades de 25 e 55 ups o crescimento foi linear (figura 30). A taxa de crescimento do disco basal, embora não

testada estatisticamente, foi maior nas salinidades de 40 e 45 ups (figura 30). O crescimento do eixo ereto foi linear nas salinidades de 25 a 50 ups (figura 31). A taxa de crescimento foi maior nas salinidades entre 40 e 50 ups. As menores taxas de crescimento foram observadas nas salinidades mais baixas (25 a 35 ups) (figura 31).

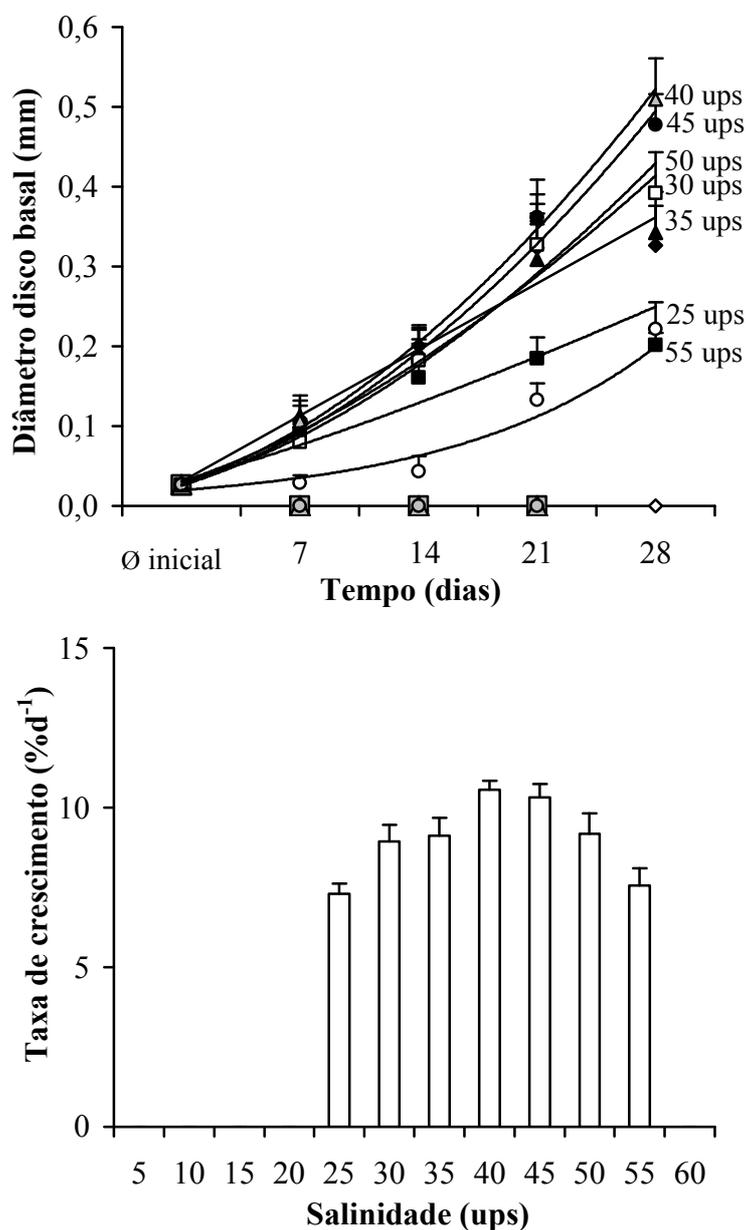


Figura 30: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão de 20 plântulas de uma repetição (n=1).

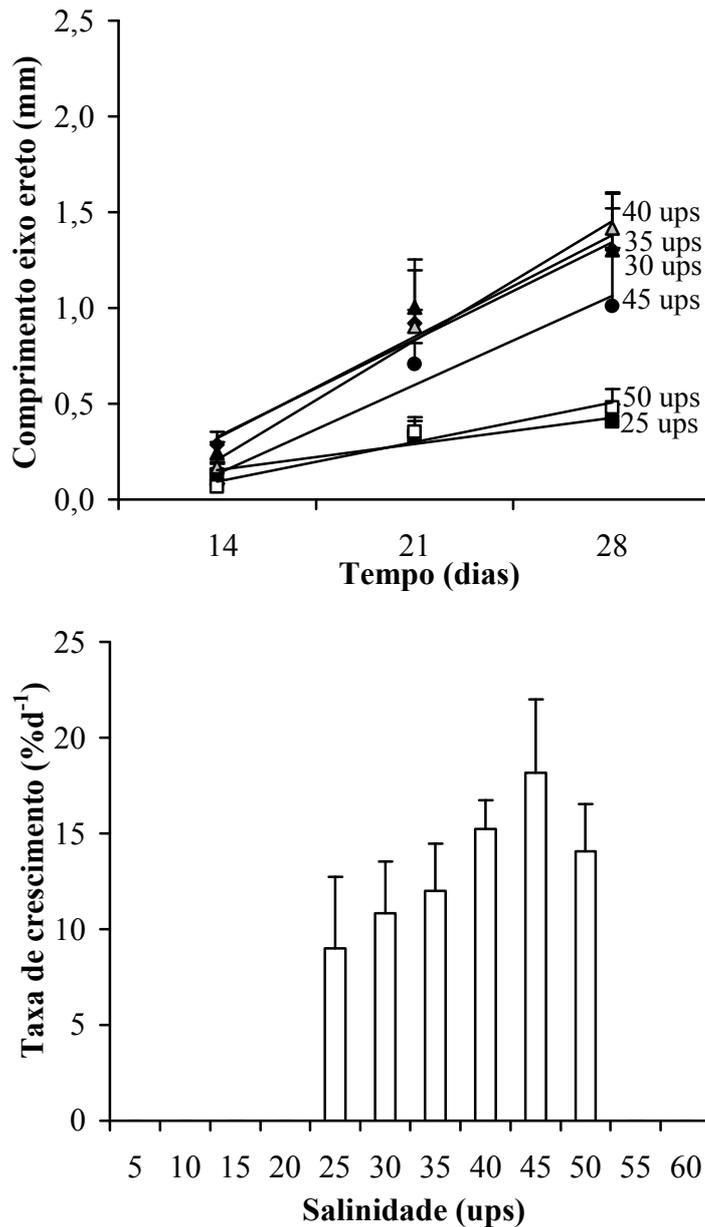


Figura 31: Variação do diâmetro (mm) e taxa de crescimento (%d⁻¹) do eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão de 20 plântulas de uma repetição (n=1).

Irradiância e nutrientes: As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* não sobreviveram quando cultivadas sob a irradiância de 150 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ (figura 32). A taxa de crescimento do diâmetro do disco basal de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos apresentou uma tendência de ser maior quando cultivadas em meio VSES 25% e 50% sob a irradiância de 100 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ (figura 32). Com relação ao eixo ereto, as taxas de crescimento das plântulas cultivadas em VSES 25% sob a irradiância

de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ se mostraram superiores comparativamente aos demais tratamentos (figura 32).

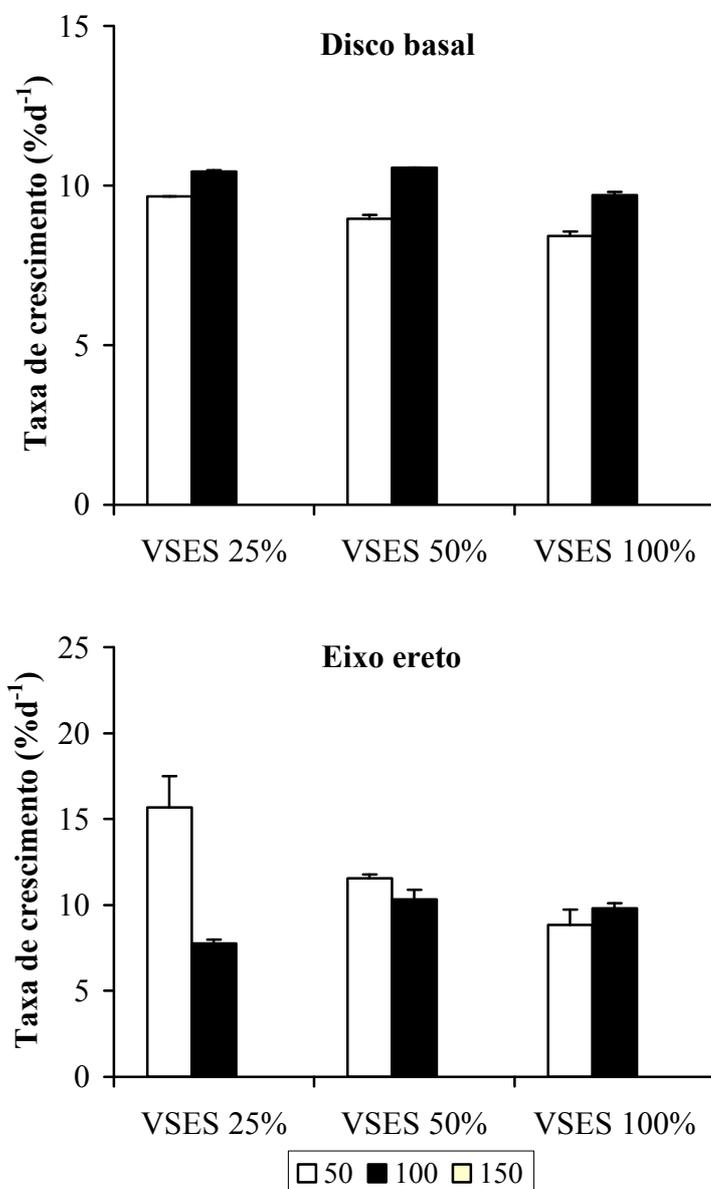


Figura 32: Efeito da irradiância (50, 100 e 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25%, 50% e 100% de VSES) na taxa de crescimento (%d⁻¹) do disco basal e eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, 22 \pm 2°C, fotoperíodo 14 h. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n= 2).

4.6 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes em tetrasporófitos adultos

Temperatura: Os tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* foram tolerantes às temperaturas de 15 a 30°C. As temperaturas ótimas para o crescimento avaliadas pela variação da massa fresca e pelo comprimento foram 20 e 25°C, e os valores extremos (15 e 30°C) inibiram o crescimento dos tetrasporófitos (figura 33). Na temperatura de 30°C, os ápices estavam esbranquiçados após 21 dias de experimento.

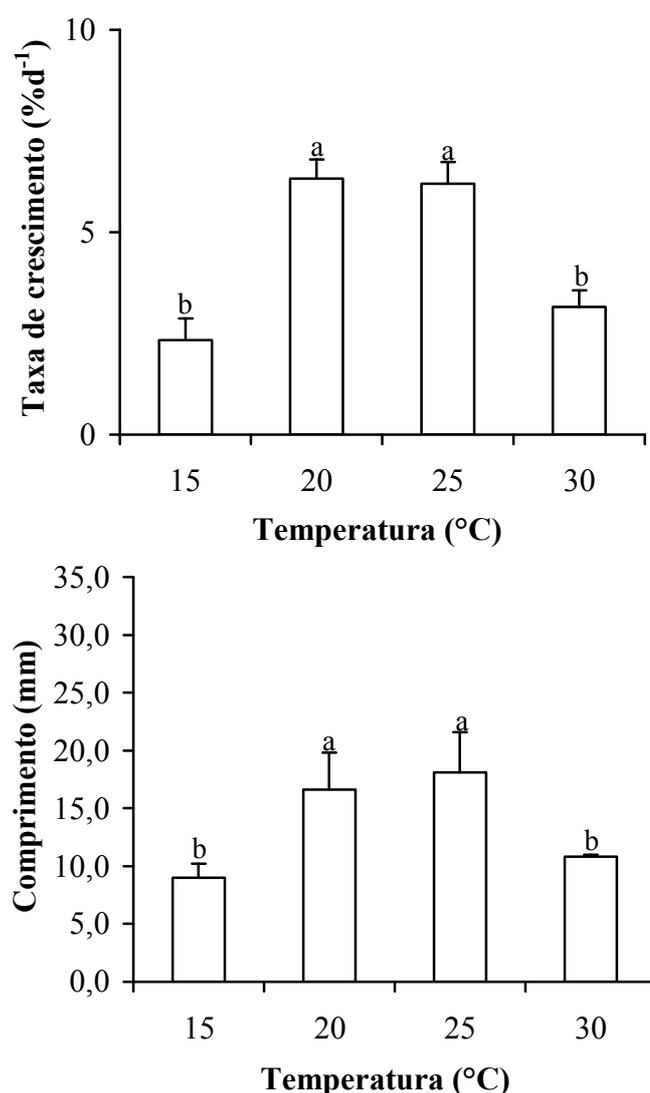


Figura 33: Efeito da temperatura na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: meio VSES 25%, 34 ups, fotoperíodo 14 h e irradiância $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Salinidade: Os tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* apresentaram amplo limite de tolerância às salinidades testadas, desenvolvendo-se nas salinidades de 10 a 50 ups. Nestes tratamentos os segmentos apicais apresentavam um aspecto saudável e ausência de necroses. Este comportamento não foi observado na salinidade de 60 ups, onde aos 21 dias de cultivo os segmentos apicais se apresentavam despigmentados e, ao final do experimento, os mesmos já estavam mortos (figura 34).

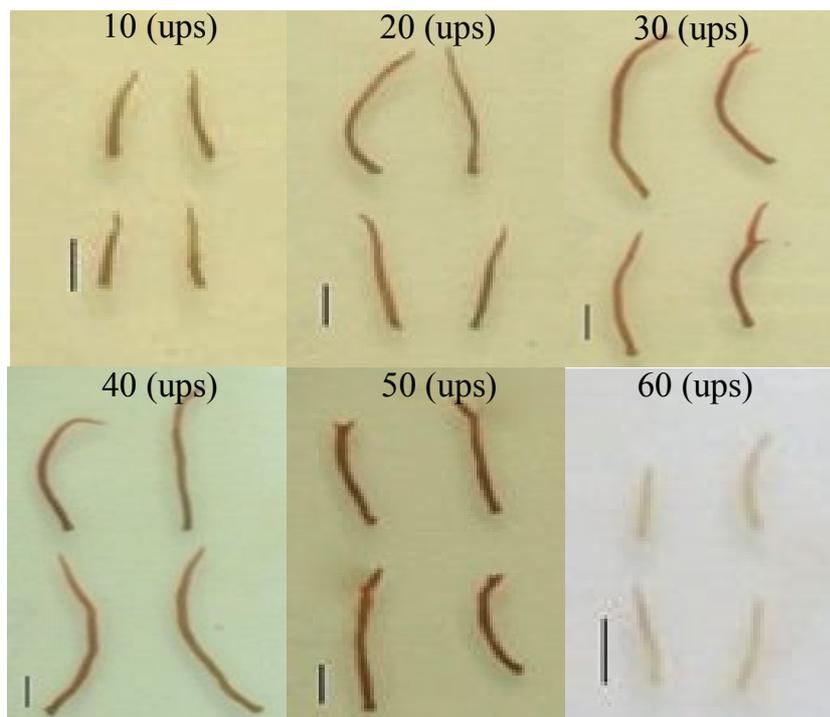


Figura 34: Aspecto geral de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes salinidades. Condições experimentais: meio VSES 25%, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h e irradiância $75 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Escala: 5 mm.

A taxa de crescimento (variação da massa fresca) dos segmentos apicais foi menor nas salinidades mais baixas (10 e 20 ups). Nas salinidades de 30 a 50 ups foi observado um incremento da taxa de crescimento, sendo que a maior taxa de crescimento foi observada na salinidade de 40 ups. O crescimento em comprimento também foi influenciado pelas diferentes salinidades testadas, sendo que o crescimento máximo foi observado na salinidade de 40 ups e o menor, na salinidade de 10 ups (figura 35).

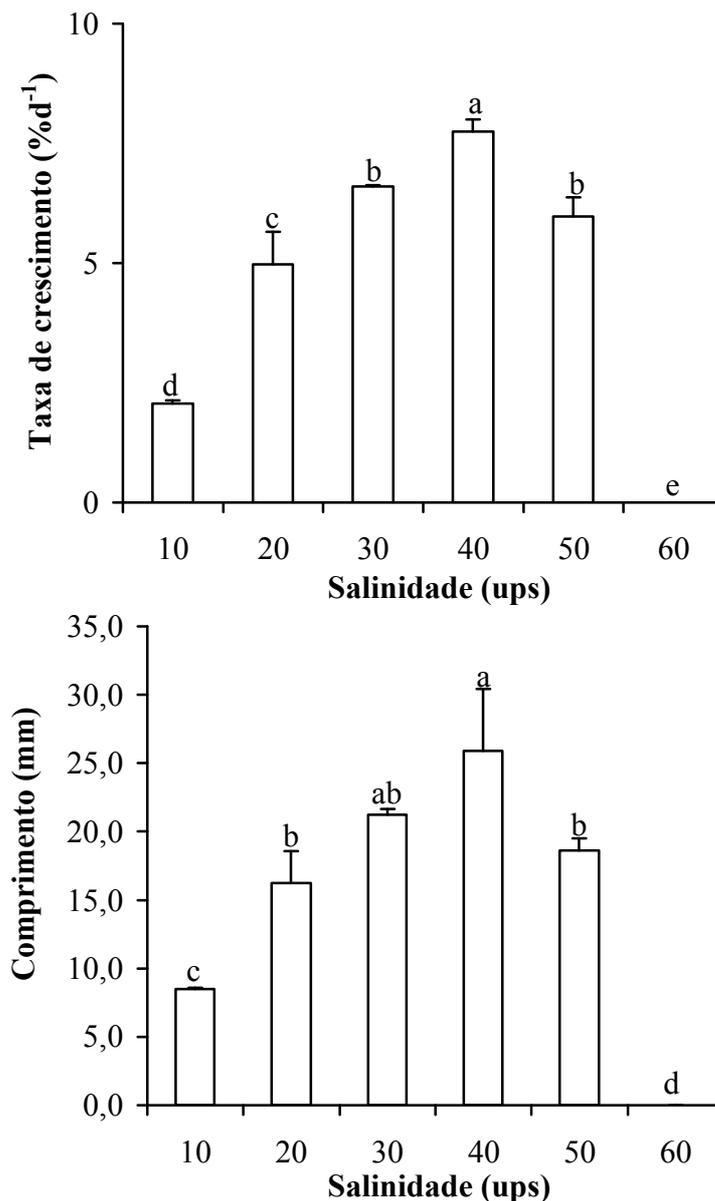


Figura 35: Efeito da salinidade (ups) na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em meio VSES 25%. Condições experimentais: meio VSES 25%, 22 ± 2°C, fotoperíodo 14 h e irradiância 75 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repetição. Cada valor corresponde à média ± desvio padrão (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Irradiância e nutrientes: A taxa de crescimento (variação da massa fresca) e o comprimento de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* foram influenciados significativamente apenas pelos níveis de irradiância testados. Os segmentos apicais cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ apresentaram as maiores taxas de

crescimento e os maiores valores em comprimento, independentemente da concentração de VSES, quando comparados aos cultivados sob a irradiância de 50 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 36, tabela 25).

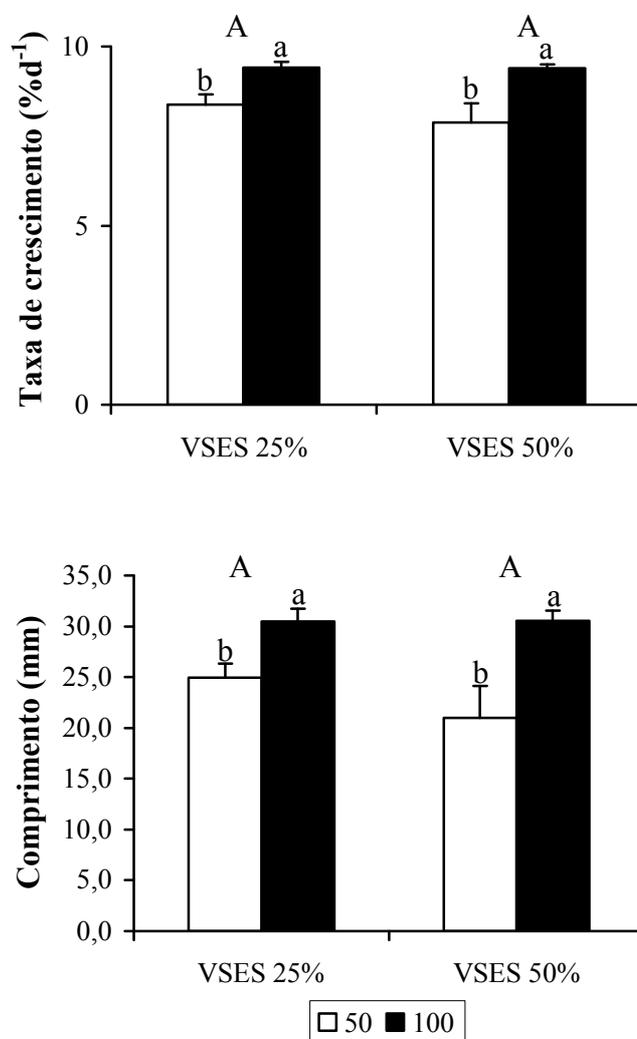


Figura 36: Efeito da irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25% e 50% de VSES) na taxa de crescimento (massa fresca, %d⁻¹) e no comprimento (mm) de segmentos apicais de tetraspor\u00f3fitos adultos *Gracilaria domingensis* ap\u00f3s 28 dias de cultivo. Condi\u00e7\u00f5es experimentais: 34 ups, 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, fotoper\u00edodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repeti\u00e7\u00f5es simult\u00e2neas com 4 segmentos apicais de 5 mm em cada repeti\u00e7\u00e3o. Cada valor corresponde \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o (n= 3). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls (letras min\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre os n\u00edveis de irradi\u00e2ncia; letras mai\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre as concentra\u00e7\u00f5es de VSES).

Tabela 25: Análise de variância bifatorial da taxa de crescimento de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 mol de fótons.m⁻².s⁻¹) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em **negrito**, efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	Disco basal		Eixo ereto	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentração VSES	1	1,824	0,213	3,164	0,213
Irradiância	1	44,957	0,0001	48,370	0,0001
Interação VSES x I	1	1,583	0,243	3,432	0,243

4.7 - Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos adultos cultivados em laboratório

O conteúdo de pigmentos fotossintetizantes foi influenciado significativamente apenas pelos níveis de irradiância testados, sendo que as concentrações de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foram maiores em tetrasporófitos cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹, quando comparados aos cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ (figura 37, tabela 26). Não houve diferença significativa no conteúdo de clorofila *a* nos diferentes tratamentos testados (figura 37, tabela 26).

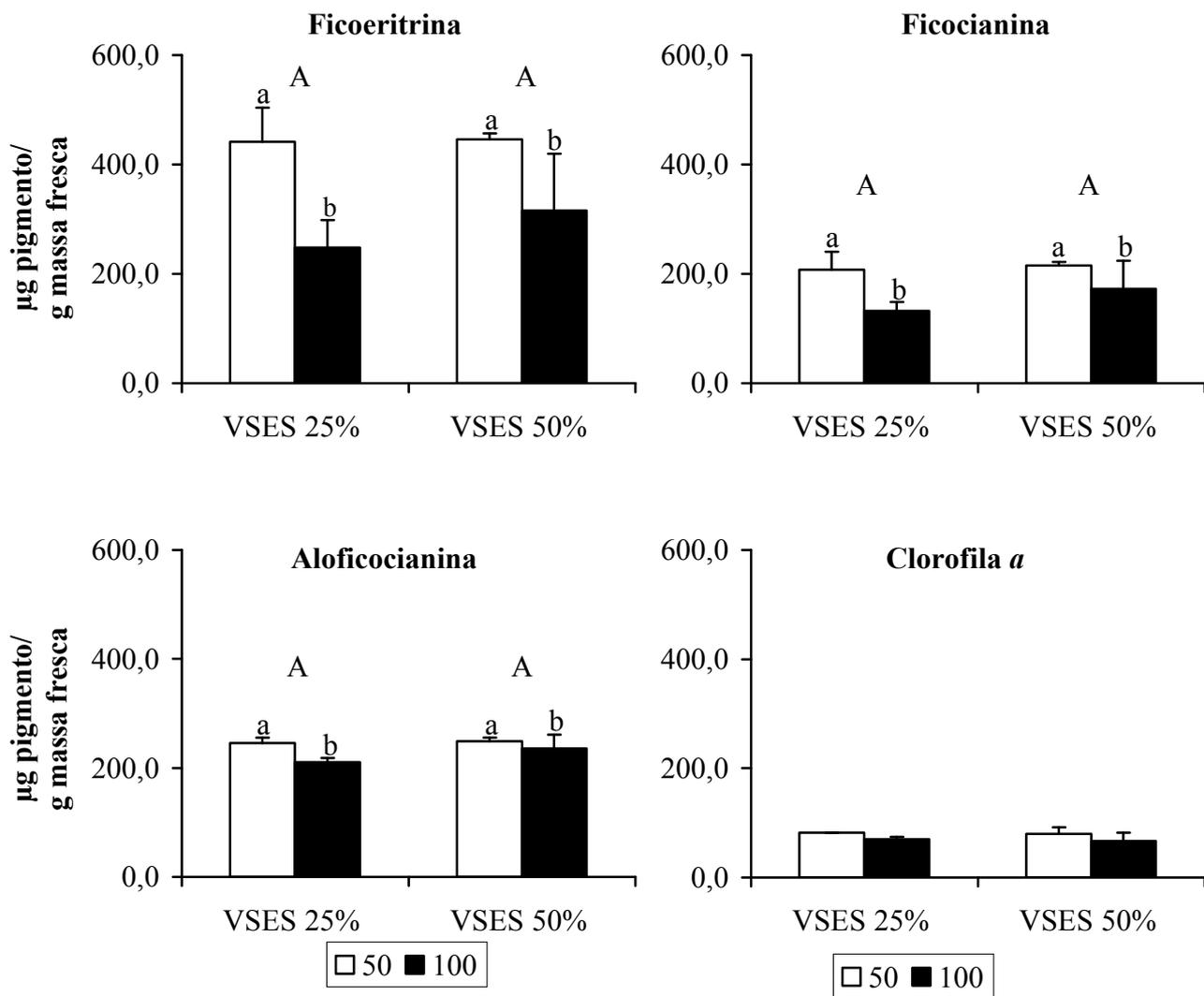


Figura 37: Efeitos da irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) no conte\u00fado de ficobiliprote\u00ednas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) e clorofila *a* de segmentos apicais de tetraspor\u00f3fitos adultos de *Gracilaria domingensis*, ap\u00f3s 28 dias de cultivo. Condi\u00e7\u00f5es experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repeti\u00e7\u00f5es simult\u00e2neas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repeti\u00e7\u00e3o. Cada valor corresponde \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n= 3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls (letras min\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre os n\u00edveis de irradi\u00e2ncia; letras mai\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre as concentra\u00e7\u00f5es de VSES).

Tabela 26: Análise de variância bifatorial do conteúdo de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) e clorofila *a* de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em **negrito**, efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	Ficoeritrina		Ficocianina		Aloficocianina		Clorofila <i>a</i>	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentração VSES	1	0,905	0,369	1,699	0,228	2,993	0,121	0,201	0,665
Irradiância	1	18,196	0,002	10,214	0,012	8,038	0,021	4,921	0,0573
Interação VSES x I	1	0,684	0,431	0,769	0,405	1,792	0,217	0,057	0,816

Foi observado que tanto as concentrações de VSES quanto os níveis de irradiância influenciaram o conteúdo de proteínas solúveis totais, embora não se tenha interação entre estes dois fatores. O conteúdo de proteínas solúveis totais foi maior em tetrasporófitos cultivados em VSES 50% sob irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do que em tetrasporófitos cultivados em VSES 25% sob irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (figura 38, tabela 27).

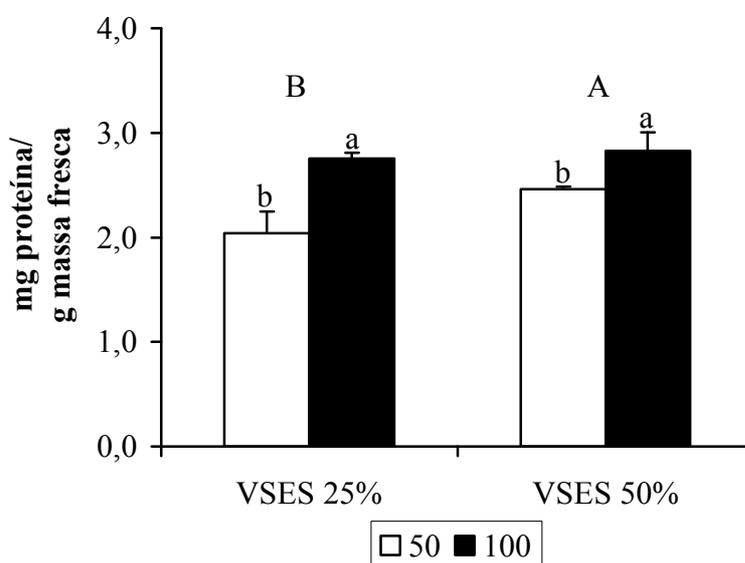


Figura 38: Efeitos da irradiância (50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) no conteúdo de proteínas solúveis totais de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo. Condições experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repetição. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n=3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls (letras minúsculas correspondem às diferenças entre os níveis de irradiância; letras maiúsculas correspondem às diferenças entre as concentrações de VSES).

Tabela 27: Análise de variância bifatorial do conteúdo de proteínas solúveis totais de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em **negrito**, efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	F	P
Concentração VSES	1	9,543	0,014
Irradiância	1	44,622	0,0001
Interação VSES x I	1	4,684	0,062

Outro parâmetro analisado neste experimento foi a produção de carotenóides. A análise cromatográfica das amostras foi realizada visando à identificação e quantificação dos compostos de interesse. A CLAE revelou ser a xantofila zeaxantina o carotenóide predominante (Figura 39), sendo possível também a detecção de luteína, β -criptoxantina e do isômero *trans* do β -caroteno.

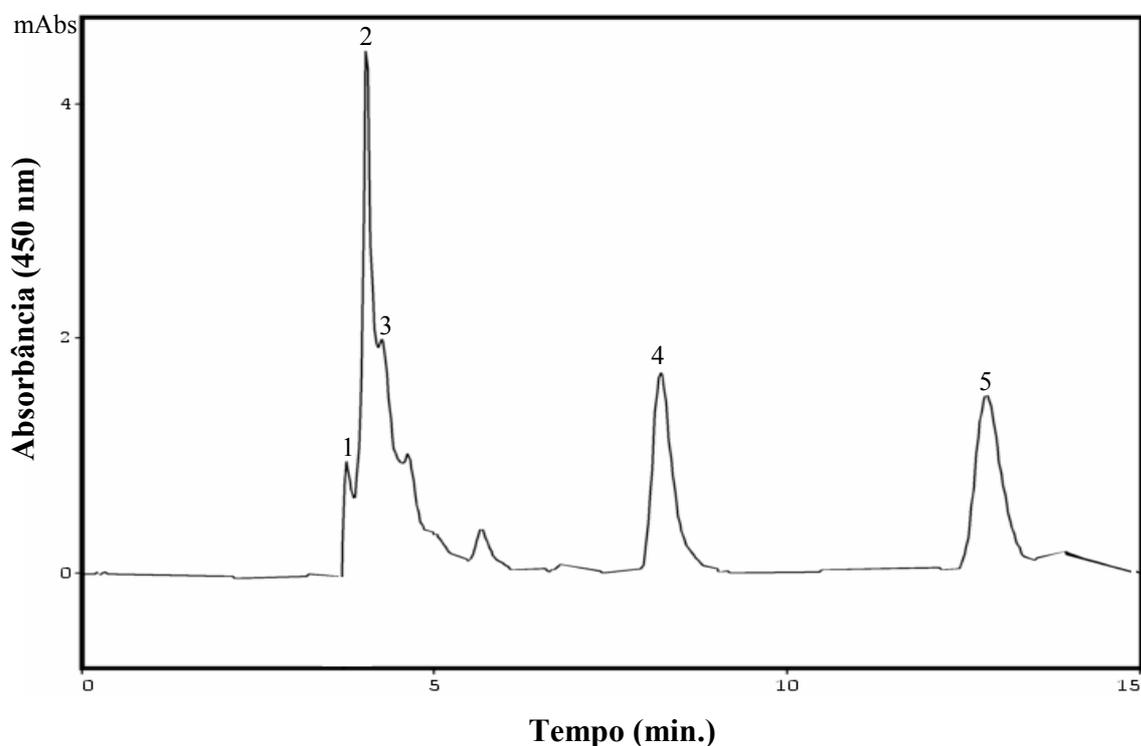


Figura 39: Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em meio VSES 25% sob a irradiância de 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h. (Picos: 1 – luteína; 2 – zeaxantina livre; 3 – zeaxantina esterificada; 4 – β -criptoxantina; 5 – *trans*- β -caroteno).

A análise de variância bifatorial foi realizada com o intuito de verificar o efeito da interação entre as concentrações de VSES e as irradiâncias testadas no conteúdo de carotenóides. Foi observado que apenas a irradiância influenciou a concentração de luteína, sendo que o seu acúmulo foi maior na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, quando comparada a de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, independentemente da concentração de VSES (figura 40, tabela 28).

As concentrações de zeaxantina livre foram influenciadas tanto pelas concentrações de VSES quanto pelos níveis de irradiância testados. Observou-se que o acúmulo deste carotenóide é maior em VSES 25% sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e menor quando os tetrasporófitos foram cultivados em VSES 25% sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com VSES 50% em ambas as irradiâncias testadas (figura 40, tabela 28).

Para os tetrasporófitos cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, as intensidades dos picos referentes à zeaxantina esterificada foram pequenas, não permitindo a sua quantificação. Quando cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o conteúdo deste composto foi maior em VSES 25% quando comparado a concentração de 50% (figura 40, tabela 28).

Com relação ao conteúdo de β -criptoxantina, ambos os fatores testados influenciaram a concentração deste composto, havendo efeito de interação. A concentração de β -criptoxantina foi menor nos tratamentos com VSES 25% e 50% cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e não foram observadas diferenças significativas entre estes dois tratamentos. Quando cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração de β -criptoxantina foi maior em VSES 50% comparativamente à concentração de 25% (figura 40, tabela 28).

Apenas a irradiância influenciou a concentração de *trans*- β -caroteno, sendo que a maior concentração deste composto foi observada em tetrasporófitos cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, independentemente da concentração de VSES (figura 40, tabela 28).

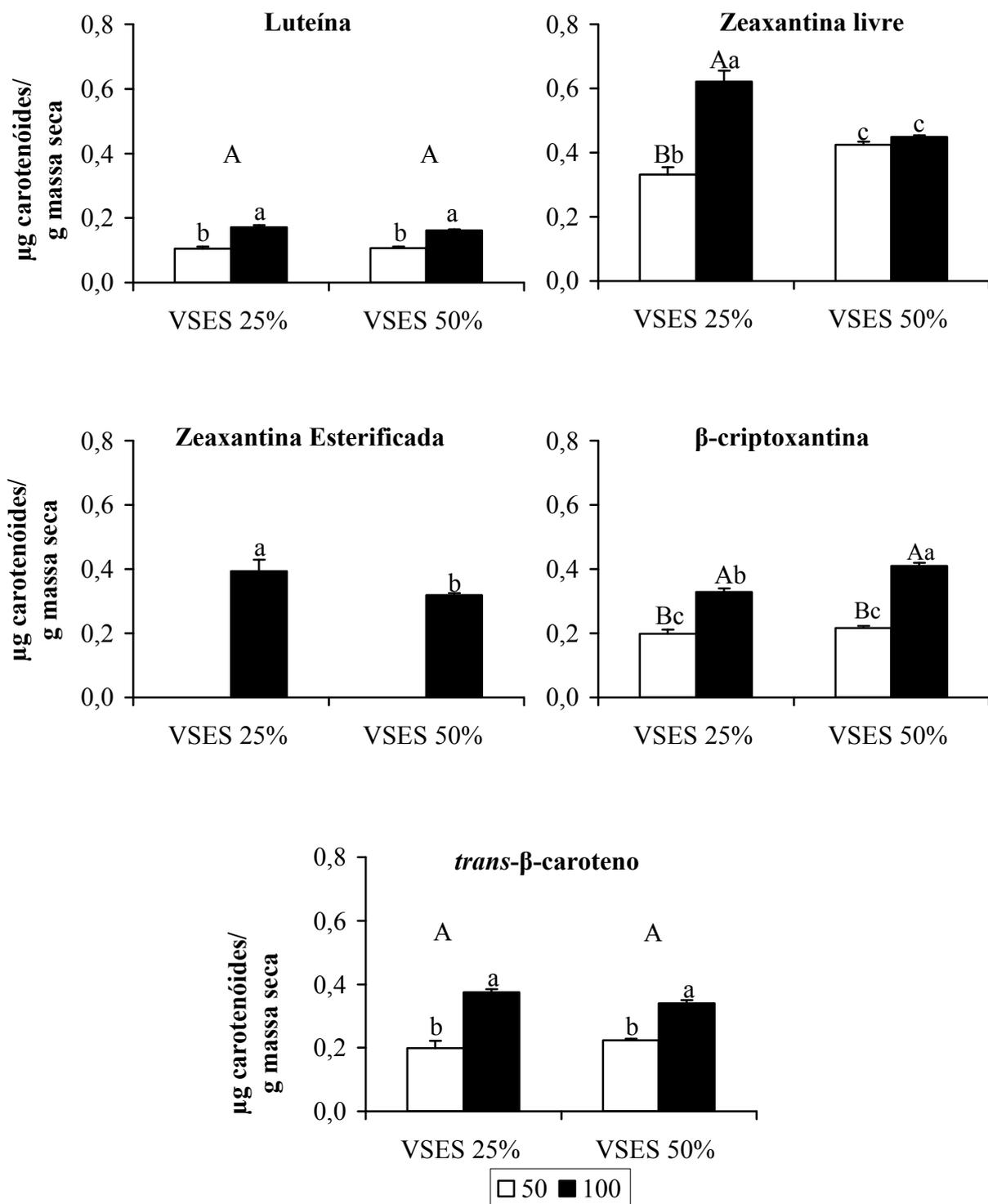


Figura 40: Efeitos da irradiância (50 e 100 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e nutrientes (25 e 50% de VSES) na concentra\u00e7\u00e3o de caroten\u00f3ides determinada por CLAE (lute\u00edna, zeaxantina livre, zeaxantina esterificada, β -criptoxantina e β -caroteno) de segmentos apicais de tetraspor\u00f3fitos adultos de *Gracilaria domingensis* ap\u00f3s 28 dias de cultivo. Condi\u00e7\u00f5es experimentais: 34 ups, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoper\u00edodo 14 h. Cada tratamento foi testado com 3 repeti\u00e7\u00f5es simult\u00e2neas com 6 segmentos apicais de 2 cm em cada repeti\u00e7\u00e3o. Cada valor corresponde \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$). As letras indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de compara\u00e7\u00e3o de Student-Newman-Keuls (letras min\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre os n\u00edveis de irradi\u00e2ncia; letras mai\u00fasculas correspondem \u00e0s diferen\u00e7as entre as concentra\u00e7\u00f5es de VSES).

Tabela 28: Análise de variância bifatorial do conteúdo de carotenóides (luteína, zeaxantina livre, zeaxantina esterificada, β -criptoxantina e *trans*- β -caroteno) de segmentos apicais de tetrasporófitos adultos *Gracilaria domingensis* após 28 dias de cultivo em diferentes irradiâncias (50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentrações de nutrientes (25% e 50% de VSES). Em **negrito**, efeito significativo.

Efeito	Graus de Liberdade	Luteína		Zeaxantina livre		β -criptoxantina		β -caroteno	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Concentração VSES	1	2,742	0,136	8,565	0,022	62,623	0,000047	0,343	0,574
Irradiância	1	327,370	0,000	135,584	0,000008	643,148	0,000	357,044	0,000
Interação VSES x I	1	2,379	0,161	95,728	0,000025	23,570	0,001	14,722	0,225

V. DISCUSSÃO

5.1 - Estudo fenológico da população

Durante o período de amostragem (dois anos) foi observada a predominância de tetrasporófitos na população de *Gracilaria domingensis* em relação aos gametófitos. Esta predominância foi ainda maior nas coletas realizadas no outono, onde não foi observada a ocorrência de gametófitos masculinos na população. Embora estudos em laboratório tenham comprovado que a taxa de liberação de carpósporos e tetrásporos seja semelhante (Ferreira 2008), os resultados obtidos no presente estudo indicam que a sobrevivência de plântulas depende da interação entre vários fatores. Um destes fatores pode ser a temperatura, que diminui nos meses do outono e inverno. A literatura relata que a temperatura pode influenciar a sobrevivência de esporos, e os limites de tolerância são diferentes para tetrásporos e carpósporos em espécies de *Gracilaria* (Yokoya & Oliveira 1992a). A ocorrência de indivíduos não-férteis de *G. domingensis* foi baixa quando comparada aos indivíduos férteis, sendo que do total de indivíduos coletados, apenas quatro indivíduos não-férteis foram encontrados. Estes resultados corroboram com o observado por Plastino (1985) e por Costa & Platino (2001), que observaram que a frequência de indivíduos não-férteis encontrados em populações naturais de *Gracilaria* spp. é geralmente baixa.

A predominância de tetrasporófitos na população estudada está de acordo com os resultados acerca do histórico de vida de outras espécies do gênero *Gracilaria*. Em um estudo com duas populações naturais de *G. verrucosa*, Destombe *et al.* (1989) sugeriram que os indivíduos diplóides possuem vantagens em relação aos indivíduos haplóides em aspectos como as taxas de sobrevivência e regeneração, o que explicaria a predominância de tetrasporófitos na população. Além disso, carpósporos de algas vermelhas (diplóides) por serem maiores, poderiam apresentar taxas de sedimentação maiores, o que possivelmente confere vantagens ecológicas a esses esporos, já que os mesmos alcançariam primeiro o substrato (Mshigeni 1976, Okuda & Neushul 1981). Luhan (1996) observou que 64% da população de *G. heteroclada* Zhang & B.M. Xia das Filipinas eram tetrasporófitos. Em uma população natural de *G. caudata* da Paraíba, Miranda (2000) também observou a predominância de indivíduos tetrasporofíticos. Na população de *G. damaecornis* J. Agardh de Punta Arenas, Venezuela também foi observado o predomínio da fase tetrasporofítica (Brito & Silva 2004). Araújo (2005) observou que 52% da população de *G. birdiae* da Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamangape na Paraíba é composta por indivíduos tetrasporofíticos. Para uma população natural de *G. gracilis* que ocorre na Sicília também foi

observada a predominância da fase tetrasporofítica em relação à fase gametofítica (Polifrone *et al.* 2006). Pinheiro-Joventino & Bezerra (1980) estudaram o padrão reprodutivo de populações naturais de *G. domingensis* no Estado do Ceará e também observaram a predominância de tetrasporófitos na população. Estes resultados foram similares aos encontrados por Guimarães *et al.* (2003) para duas populações de *G. domingensis* do Estado do Ceará.

A proporção de gametófitos masculinos e femininos observada no presente estudo correspondeu ao esperado, que é de 1:1. Guimarães *et al.* (1999) observaram uma razão de 1:1 entre gametófitos femininos e masculinos de *Gracilaria domingensis* cultivados em laboratório. O mesmo padrão foi observado para *G. birdiae* cultivadas em laboratório (Costa & Plastino 2001). Em estudos realizados em campo, Destombe *et al.* (1989) e Araújo (2005) observaram uma razão de 1:1 entre gametófitos femininos e masculinos de *G. verrucosa* e *G. birdiae*, respectivamente. Contudo, para *G. domingensis* (Pinheiro-Joventino & Bezerra 1980) e *G. caudata* (Miranda 2000) foi observado que o número de gametófitos femininos foi superior ao de gametófitos masculinos. Plastino *et al.* (2004) encontraram maior proporção de gametófitos masculinos e baixa ocorrência de indivíduos não-férteis em *G. birdiae* cultivadas em laboratório. A diferença observada na proporção entre gametófitos femininos e masculinos sugere que os fatores ambientais podem interferir no desenvolvimento destas fases e a temperatura pode estar relacionada à ausência de gametófitos masculinos na população de *G. domingensis* no outono.

Alguns autores caracterizaram a flutuação da biomassa de espécies do gênero *Gracilaria* em ciclos biológicos anuais, onde os maiores valores de biomassa são observados na primavera e verão (Romo *et al.* 1979, Poblete & Inostroza 1987, Givernaud *et al.* 1999). Embora a análise estatística não tenha apresentado diferenças sazonais com relação a biomassa da população de *Gracilaria domingensis* durante o período estudado, pode-se observar uma tendência à diminuição da biomassa no inverno e o aumento na primavera e no verão, com exceção dos gametófitos masculinos, que apresentaram um incremento da sua biomassa no inverno.

O comprimento dos tetrasporófitos variou sazonalmente, sendo que o comprimento dos indivíduos foi maior na primavera. Mesmo não havendo influência da sazonalidade no comprimento dos gametófitos femininos com cistocarpo e masculinos, há uma tendência do comprimento do talo dos gametófitos serem maiores na primavera. Segundo Hansen & Doyle (1976), o aumento do fotoperíodo, irradiância e nutrientes que ocorre na primavera vem acompanhado de um aumento no comprimento do talo e na produção de biomassa pelas macroalgas marinhas.

5.2 - *Variação sazonal do perfil carotenóidico e fenólico*

5.2.1 - *Carotenóides*

Este é o primeiro trabalho que relata a ocorrência de luteína e α -caroteno em *Gracilaria domingensis*. Os estudos realizados por Guaratini (2008) e Pereira (2009) com populações de *G. domingensis* de diferentes localidades do Estado do Rio Grande Norte descreveram a ocorrência de violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, aloxantina e β -caroteno. As comparações dos resultados devem ser feitas com cautela, pois a metodologia utilizada para a análise dos carotenóides nos trabalhos mencionados anteriormente foi muito diferente daquela utilizada no presente trabalho. Embora a identificação e quantificação destes compostos tenham sido realizadas por CLAE, o preparo dos extratos utilizou solventes diferentes, a coluna e o sistema de eluição apresentaram diferenças, bem como o comprimento de onda de detecção dos carotenóides. As diferenças observadas no perfil carotenóidico de populações de *G. domingensis* estão relacionadas provavelmente às respostas de fotoaclimação e fotoproteção da espécie a um determinado ambiente. Esta hipótese é coerente, uma vez que as condições climáticas do Rio Grande do Norte são muito distintas das encontradas no Estado de Santa Catarina, o que pode ocasionar respostas diferenciadas em uma mesma espécie.

No presente estudo, independentemente da época do ano ou estágio reprodutivo, o carotenóide majoritário foi o *trans*- β -caroteno. Entre as xantofilas, luteína e zeaxantina foram as mais abundantes, dependendo do período de coleta. O β -caroteno é um pigmento com alto poder fotoprotetor (Demming-Adams 1990) que confere capacidade para aclimação fotossintética a condições ambientais extremas (Gómez-Pinchetti *et al.* 1992). Os elevados teores de β -caroteno implicam em uma maior resistência à fotoinibição, ao custo de uma menor taxa fotossintética (Gómez-Pinchetti *et al.* 1992). Além disso, os níveis de β -caroteno podem ser modulados pela temperatura, e o sinergismo entre a irradiância e a temperatura também podem modular a sua síntese (Takagi *et al.* 1990). β -caroteno foi o carotenóide majoritário em variantes cromáticas de *Gracilaria domingensis* coletadas em Rio do Fogo, Rio Grande do Norte (Pereira 2009).

Durante o primeiro ano de coletas, a luteína foi a xantofila majoritária entre os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, exceto para os gametófitos femininos com cistocarpos e masculinos coletados no verão, que apresentaram concentrações superiores de zeaxantina. No segundo ano de coletas, a zeaxantina foi a xantofila majoritária, com exceção dos gametófitos femininos coletados no outono, que apresentaram concentrações superiores

de luteína. Assim como o β -caroteno, luteína e zeaxantina também desempenham o papel de fotoprotetores e estão envolvidos na dissipação térmica do excesso de energia (García-Plazaola *et al.* 2003). A mudança na concentração destes compostos pode representar uma estratégia dos estádios reprodutivos de *G. domingensis* frente às mudanças climáticas que ocorreram entre os anos de coletas.

Em outros estudos, com material *in vivo* e cultivados em laboratório, as espécies do gênero *Gracilaria* foram inseridas nos grupos onde zeaxantina e anteraxantina são os carotenóides majoritários (Carnicas *et al.* 1999, Ursi *et al.* 2003, Andersson *et al.* 2006, Schubert *et al.* 2006, Guaratini 2008, Schubert & García-Mendoza 2008). Segundo a literatura, as algas vermelhas apresentam um padrão na composição de carotenóides, sendo este padrão composto por α e β -caroteno e uma xantofila majoritária, luteína, zeaxantina ou anteraxantina (Marquardt & Hanelt 2004, Schubert *et al.* 2006, Esteban *et al.* 2009). Os resultados obtidos para *G. domingensis* apontam para a influência dos fatores ambientais na síntese de carotenóides, onde, dependendo do período de coleta, a via de síntese dos compostos derivados do α - caroteno se encontra mais ativa do que a via dos compostos derivados do β -caroteno.

No presente trabalho, a comparação entre os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* ficou comprometida, uma vez que não foram coletados gametófitos masculinos no outono durante os dois anos de coleta. A comparação na dinâmica de acúmulo dos carotenóides entre os anos também ficou prejudicada, uma vez que as condições climáticas impediram a coleta das algas na primavera do segundo ano. No entanto, várias observações puderam ser feitas a partir dos resultados obtidos. Comparando-se os tetrasporófitos e os gametófitos femininos com cistocarpos, observou-se que no primeiro ano de coletas ambos os estádios reprodutivos apresentaram maior acúmulo de carotenóides no outono e menor no inverno. Os tetrasporófitos apresentaram concentrações superiores destes compostos no verão em relação a primavera e os gametófitos femininos apresentaram teores superiores na primavera em relação ao verão. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de carotenóides entre as estações durante o primeiro ano de coletas para os gametófitos masculinos. Durante o segundo ano de coletas, as concentrações de carotenóides mantiveram-se altas no outono para tetrasporófitos e gametófitos femininos. O conteúdo destes compostos diminuiu no inverno em relação ao outono, e valores inferiores foram encontrados no verão para todos os estádios reprodutivos de *G. domingensis*. Em ambos os anos de coletas, as concentrações de carotenóides em gametófitos masculinos foram sempre superiores as observadas em tetrasporófitos e gametófitos femininos. Estes resultados sugerem que os estádios reprodutivos de *G. domingensis* apresentam diferenças bioquímicas e

estas diferenças podem estar relacionadas aos fatores ambientais. As diferenças observadas também podem estar relacionadas ao estágio reprodutivo, entretanto, a análise estatística comparando os diferentes estágios reprodutivos não foi realizada devido à ausência de gametófitos masculinos no outono dos dois anos de amostragem.

Os altos teores de carotenóides observados em tetrasporófitos e gametófitos femininos com cistocarpos de *Gracilaria domingensis* coletados no outono podem ser explicados pelo efeito combinado dos fatores ambientais analisados, principalmente a alta irradiância (233 horas de brilho solar – outono/2008 e 179,8 horas de brilho solar – outono/2009), a diminuição da temperatura que ocorre no outono (13,34 a 22,07°C – outono/2008 e 16,15 a 23,35°C outono de/2009) e a quantidade de oxigênio dissolvido na água (8,82 mg.L⁻¹ – outono/2008 e 8,90 mg.L⁻¹ – outono/2009), que foi maior nas coletas de outono comparativamente as demais coletas. É reconhecida a função fotoprotetora dos carotenóides e sua síntese é maior no verão, onde o aumento da temperatura e a exposição aos altos níveis de irradiância favorecem a carotenogênese (Rodriguez-Amaya *et al.* 2008). No entanto, a insolação no local de coleta (horas de brilho solar) é maior no outono em relação ao verão (embora não exista correlação entre a insolação mensal total e os carotenóides para o primeiro ano de coletas). Em temperaturas mais baixas, as algas de ambientes tropicais apresentam menores taxas fotossintetizantes (Simon *et al.* 1999, Nygård & Dring 2008). Possivelmente o excesso de energia é maior quando as taxas de fotossíntese líquida são menores, uma vez que baixas temperaturas limitam o transporte de elétrons e a fixação de carbono, reduzindo a habilidade da alga em utilizar a luz (Davison 1991). Neste contexto, os tetrasporófitos e gametófitos femininos de *G. domingensis* necessitariam de uma maior fotoproteção no outono. Além disso, o aumento no conteúdo de carotenóides no outono pode estar relacionado à concentração de oxigênio dissolvido na água do mar. A presença de radicais livres de oxigênio estimula a síntese de carotenóides, que tem a capacidade de proteger as células contra danos oxidativos (Nur *et al.* 1982).

Os teores inferiores de carotenóides observados em *Gracilaria domingensis* no inverno podem estar relacionada à aclimação da população frente aos fatores ambientais, principalmente aos já discutidos anteriormente. No entanto, durante o inverno também foi observada uma diminuição na salinidade. Embora pouco se conheça sobre a interferência da salinidade na síntese e acúmulo de carotenóides em macroalgas marinhas (Xia *et al.* 2004), há evidências de que o aumento na salinidade promove o acúmulo destes compostos em microalgas (Fazeli *et al.* 2006, Ranga Rao *et al.* 2007) e em algumas macroalgas (Banerjee *et al.* 2009). Como os carotenóides apresentaram correlação positiva com a salinidade para os

dois anos de coleta, a diminuição na salinidade pode estar relacionada com a diminuição da síntese de carotenóides no inverno.

A diminuição acentuada na concentração de carotenóides em *Gracilaria domingensis* coletadas no inverno, durante o primeiro ano de coletas também pode estar relacionada com os nutrientes dissolvidos na água do mar. O conteúdo de carotenóides em ambos os anos de coletas correlacionou-se negativamente com o fosfato e o N-amoniaco, mas no primeiro ano de coletas, a concentração de carotenóides também correlacionou-se negativamente com o nitrato, que apresentou o maior valor quando comparado aos valores obtidos nas demais coletas ($2,06 \pm 0,38 \mu\text{M}$). Este aumento na concentração de nitrogênio poderia ter provocado o aumento no crescimento do fitoplâncton, que contribuiu para a atenuação da luz na coluna d'água, como observado por Denault *et al.* (2000), diminuindo a síntese de carotenóides.

A concentração de carotenóides em *Gracilaria domingensis* diminuiu na primavera e no verão em comparação ao outono do primeiro ano de coletas. No segundo ano de coletas, também foi observada uma diminuição na concentração de carotenóides no verão, sugerindo que a fotodegradação é maior do que a carotenogênese nos meses onde a irradiância e a temperatura são mais elevadas (Rodriguez-Amaya *et al.* 2008).

5.2.2 - Compostos fenólicos

Assim como para os carotenóides, pouco se sabe sobre a dinâmica no acúmulo de compostos fenólicos em macroalgas, principalmente no que diz respeito às algas vermelhas. Este é o primeiro trabalho sobre compostos fenólicos em *Gracilaria domingensis* e as suas concentrações apresentaram ampla variação sazonal.

Os resultados obtidos durante o primeiro ano de coletas evidenciaram diferenças entre os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Tetrasporófitos e gametófitos masculinos apresentaram níveis superiores de compostos fenólicos na primavera e uma redução destes valores no inverno e no verão, e, os menores valores foram observados para tetrasporófitos coletados no outono. Para gametófitos femininos com cistocarpos, concentrações superiores de compostos fenólicos foram observadas no outono, intermediárias no inverno e na primavera e inferiores no verão. As concentrações de epicatequina, galocatequina e do composto X (Rt 4,4 min) foram bastante variáveis, sendo que a concentração dos referidos compostos foi modificada de acordo com a estação de coleta e estágio reprodutivo. Estes resultados evidenciam mais uma vez que os estádios reprodutivos de *G. domingensis* apresentam estratégias diferenciadas para se aclimatarem às mudanças climáticas.

De modo geral, o acúmulo de compostos fenólicos é maior no verão, sendo os menores valores encontrados no outono e no inverno, uma vez que estes compostos são positivamente correlacionados com a irradiância encontrada no campo (Connan *et al.* 2004, Abdala-Díaz *et al.* 2006, Plouguerné *et al.* 2006). Os resultados obtidos para os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* coletados no primeiro ano (maio/2008 a janeiro/2009) não estão de acordo com o exposto anteriormente, e o acúmulo destes compostos para este ano foi correlacionada negativamente com a irradiância, sendo que a primavera/2008 apresentou a menor irradiância quando comparada às demais coletas (78,3 horas de brilho solar). Além disso, os compostos fenólicos estiveram correlacionados negativamente com a salinidade e a temperatura (mínima, máxima e da água), e para as plantas terrestres, a temperatura está correlacionada positivamente com o acúmulo destes compostos (Bakhshi & Orakawa 2006, Dkhil & Denden 2010).

Uma hipótese para explicar os resultados obtidos no presente trabalho seriam as diferenças fisiológicas apresentadas pelos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*. Como mencionado anteriormente, a irradiância registrada no outono do primeiro ano foi a mais alta, o que possivelmente provocou o aumento do conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos em gametófitos femininos. Os carotenóides estariam associados à fotoproteção, enquanto que os compostos fenólicos poderiam estar relacionados aos mecanismos de proteção aos carpósporos que, como vistos em experimentos em laboratório, são sensíveis a temperaturas baixas. Os altos teores de compostos fenólicos observados na primavera em tetrasporófitos e gametófitos masculinos podem estar associados à maturação e/ou proteção das suas estruturas reprodutivas, uma vez que Plouguerné *et al.* (2006) observou um aumento na síntese de compostos fenólicos durante o período de reprodução de *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, relacionando os compostos fenólicos com a proteção dos receptáculos.

Em relação ao segundo ano de coletas, os resultados de acúmulo de compostos fenólicos em *Gracilaria domingensis* foi semelhante aos descritos na literatura para macroalgas marinhas (Connan *et al.* 2004, Abdala-Díaz *et al.* 2006, Plouguerné *et al.* 2006), sendo que concentrações elevadas destes compostos foram observadas no verão. Como discutido anteriormente, os altos níveis de irradiância favorecem a fotodegradação dos carotenóides, e, por este motivo, os estádios reprodutivos de *G. domingensis* aumentariam a síntese dos compostos fenólicos, evitando assim danos fotooxidativos. Como no verão do segundo ano de coletas foram observadas as maiores temperaturas (mínima = 22,7°C; máxima = 28,8°C), o aumento nas concentrações de compostos fenólicos pode ser um mecanismo de proteção contra a elevação da temperatura, uma vez que foi observado em laboratório que o crescimento de tetrasporófitos de *G. domingensis* é inibido em temperaturas altas (30°C).

5.2.3 – Análise de Componentes Principais (PCA)

Os agrupamentos formados na PCA com os dados obtidos para *Gracilaria domingensis* coletada durante o período de dois anos evidenciaram a influência dos fatores ambientais no conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos. Entretanto, esta influência é evidentemente maior em gametófitos femininos com cistocarpos e em gametófitos masculinos de *G. domingensis*. A PCA com os dados obtidos durante o primeiro ano apresentou a formação de dois grupos bem definidos, onde gametófitos masculinos coletados na primavera e femininos coletados no outono agruparam-se em função do elevado teor de compostos fenólicos. O segundo agrupamento é caracterizado por gametófitos masculinos coletados no inverno e no verão que apresentaram elevados teores de carotenóides. Para o segundo ano de coletas, os gametófitos femininos com cistocarpos coletados no outono aparecem separados devido ao seu elevado teor de carotenóides, enquanto que gametófitos masculinos coletados no verão encontram-se separados devido ao elevado teor de compostos fenólicos.

O emprego desta ferramenta estatística mostrou-se bastante eficiente na visualização das diferenças entre os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* nos diferentes períodos de coletas, e evidenciou que os estádios reprodutivos de *G. domingensis* não têm preferência por uma única via de síntese de metabólitos secundários. A maior ou menor ativação de uma das vias está relacionada às necessidades fisiológicas de um dado estágio reprodutivo frente às mudanças ambientais. É importante salientar que a fase tetrasporofítica é predominante em populações naturais de *Gracilaria*, e este fato pode estar relacionado ao dobro de material genético que indivíduos diplóides possuem, o que confere vantagens adaptativas a estes em relação aos espécimes haplóides (fase gametofítica) (Destombe *et al.* 1989). Desta forma, os indivíduos haplóides desenvolveriam estratégias para sobreviver às condições adversas, uma vez que eles estão mais susceptíveis a estas. Por esta razão, justificam-se as concentrações elevadas de carotenóides e compostos fenólicos em indivíduos haplóides (gametófitos femininos com cistocarpos e gametófitos masculinos).

O maior acúmulo de carotenóides e compostos fenólicos em gametófitos masculinos pode representar uma estratégia de sobrevivência, uma vez que estes indivíduos são pouco encontrados na população. Para garantir o sucesso reprodutivo da população, os gametófitos masculinos aumentam o acúmulo destes compostos, o que garantiria a sua sobrevivência às condições ambientais adversas.

Depois da fecundação do carpogônio (gameta feminino) pelo espermácio (gameta masculino), desenvolve-se a fase carposporofítica, que originará os carpósporos (2n). Os carpósporos de, por exemplo, *Gracilaria caudata* (Yokoya & Oliveira 1993) e *G. gracilis*

(Polifrone *et al.* 2006) são mais tolerantes às condições adversas que os tetrásporos (n), e provavelmente é o estabelecimento destes que mantém a população destas espécies, pois da germinação dos carpósporos é que se originam os tetrasporófitos (2n). Com a diminuição da temperatura no outono, o aumento no conteúdo de carotenóides ou compostos fenólicos nos gametófitos femininos com cistocarpos de *G. domingensis* funcionaria como um mecanismo de proteção aos carpósporos, pois estes são sensíveis a temperaturas baixas (15-20°C), conforme resultados obtidos em laboratório. Não há trabalhos que relacionam o acúmulo de carotenóides e compostos fenólicos como mecanismos de proteção ou aclimatação a diminuição da temperatura. Entretanto, a literatura relata que o acúmulo de carotenóides e compostos fenólicos é influenciado pelas mudanças na temperatura (Takagi *et al.* 1990, Bakhshi & Arawaka 2006).

5.3 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

A utilização de testes para mensurar a atividade antioxidante dos extratos em MeOH 80 % (compostos fenólicos) e hexano:acetona (carotenóides) foi importante, uma vez que o método β -caroteno/ácido linoléico é mais adequado para amostras mais apolares, enquanto que o método do DPPH apresenta melhor desempenho para amostras mais polares (Sultana *et al.* 2007). A utilização de solventes com baixa polaridade, como a acetona, pode interferir na porcentagem de inibição pelo método do DPPH (Molyneux 2004, Magalhães *et al.* 2008).

A porcentagem de inibição do radical DPPH foi baixa para os extratos de todos os estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, quando comparada à porcentagem de inibição do BHT ($0,05 \text{ mg.mL}^{-1} = 85,51 \pm 2,02\%$ e $0,1 \text{ mg.mL}^{-1} = 91,21 \pm 0,91\%$). A porcentagem de inibição dos extratos de tetrasporófitos variou de 1% a 6%, extratos de gametófitos femininos com cistocarpos apresentaram porcentagem de inibição que variou de 1% a 7%, enquanto que os extratos de gametófitos masculinos apresentaram variação de 2% a 6%. Durante o primeiro ano de coletas, os tetrasporófitos apresentaram porcentagem de inibição do radical DPPH semelhantes no inverno, primavera e verão e inferior no outono. Gametófitos femininos apresentaram porcentagem de inibição daquele radical superior na primavera, intermediária no outono e verão e inferior no inverno. Para gametófitos masculinos a maior porcentagem de inibição foi observada na primavera, enquanto que os valores obtidos no extrato de inverno foram semelhantes ao verão. Em relação ao segundo ano de coletas, a porcentagem de inibição foi superior no verão para ambos os estágios reprodutivos de *G. domingensis*. Embora a porcentagem de inibição do radical DPPH tenha sido obtida a partir de extratos brutos e que a porcentagem de inibição do radical DPPH não

tenha sido correlacionada com a quantidade de compostos fenólicos totais, deve-se destacar que para o primeiro ano de coletas tetrasporófitos e gametófitos masculinos apresentaram concentrações superiores de compostos fenólicos totais (obtidos por CLAE) na primavera, coincidindo com a maior porcentagem de inibição do radical DPPH. Esta relação também foi observada para o segundo ano de coletas, onde ambos os estágios reprodutivos desta alga apresentaram a maior porcentagem de inibição do radical DPPH e concentrações superiores de fenólicos totais no verão. Estes resultados refletem a atuação dos compostos fenólicos como antioxidantes para os estádios reprodutivos de *G. domingensis*, evitando assim os danos causados por fatores estressores que acompanham as variações ambientais em cada estação do ano.

Poucos são os trabalhos que abordam a atividade antioxidante de algas vermelhas e, geralmente, os dados não são comparáveis pelos diferentes métodos usados para mensurar esta atividade. Os trabalhos relacionados à atividade antioxidante de espécies do gênero *Gracilaria* frente à inibição do radical DPPH apontam para a baixa atividade antioxidante presentes nos extratos. Considerando as diferenças metodológicas, Yan *et al.* (1998) testou o extrato de *Gracilaria verrucosa* em clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol e observou que a inibição do DPPH foi inferior a 40% em todos os solventes. O extrato em metanol:clorofórmio (2:1, v/v) de *G. lemaneiformis* apresentou 19,1% de inibição do DPPH, enquanto *G. gracilis* apresentou 3,6% (Zhang *et al.* 2007). Espécies de *Gracilaria* coletadas na costa do México apresentaram atividade antioxidante baixa e valores de IC₅₀ altos, variando de 28,9 a 72,5 mg. mL⁻¹ (Zubia *et al.* 2007). O extrato metanólico de *G. edulis* apresentou 5,2% de inibição frente ao radical DPPH (Ganesan *et al.* 2008). Guaratini (2008) observou que o extrato metanólico de *G. domingensis* (2 mg. mL⁻¹) apresentou aproximadamente 45% de inibição do radical DPPH. Apenas o trabalho de Ganesan *et al.* (2008) relaciona a atividade antioxidante à presença de compostos fenólicos, sendo que o extrato de *G. edulis* apresentou 16,26 mg ácido gálico/g massa seca.

O sistema de co-oxidação do β-caroteno /ácido linoléico é um método que avalia a capacidade que as substâncias presentes em uma amostra têm de retardar o processo de oxidação lipídica em um sistema controlado. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os extratos dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* possuem baixa capacidade de inibir a oxidação lipídica, quando comparados ao BHT (0,1 mg.mL⁻¹ = 91,71 ± 0,51%). A porcentagem de inibição da oxidação lipídica variou de 3% a 33% em tetrasporófitos, de 1% a 21% para gametófitos femininos com cistocarpos e de 7% a 18% em gametófitos masculinos. A porcentagem de oxidação lipídica variou entre as estações do ano durante o primeiro ano de coletas e esta variação não foi correspondente a concentração de

carotenóides totais do extrato bruto, obtidos por UV-vis (dados não apresentados), nem com os dados obtidos por CLAE. Os tetrasporófitos e gametófitos masculinos apresentaram porcentagens de inibição da oxidação lipídica maiores no verão, enquanto que os gametófitos femininos apresentaram maior porcentagem de inibição no outono. Para o segundo ano de coletas, não foi observada variação na porcentagem de inibição da oxidação lipídica entre as estações de coleta. Estas diferenças podem ter ocorrido devido ao sinergismo dos carotenóides com outros componentes que estão envolvidos em sistemas que combatem o estresse oxidativo (Barreiros *et al.* 2006), como por exemplo, o α -tocoferol que é encontrado em algas vermelhas, inclusive em *G. domingensis* (Sousa *et al.* 2008). Durante os meses de verão, com o aumento da irradiância e da temperatura, há uma diminuição na concentração de carotenóides devido à fotodegradação (Rodriguez-Amaya *et al.* 2008). Provavelmente, isto faz com que os tetrasporófitos e gametófitos masculinos sintetizem outras substâncias que desempenhem papel antioxidante frente ao estresse causado pela irradiância e temperatura. Para os gametófitos femininos a maior porcentagem de inibição da oxidação lipídica observada no outono correspondeu às maiores concentrações de carotenóides. Esta resposta pode estar relacionada à necessidade que este estágio tem em alcançar o sucesso reprodutivo, uma vez que ele precisa manter os carpósporos viáveis durante o outono, onde as condições não são favoráveis ao seu desenvolvimento. Foi observada uma correlação positiva entre a concentração de carotenóides totais e a porcentagem de inibição da oxidação lipídica em indivíduos femininos, evidenciando que os carotenóides contribuem significativamente para a capacidade antioxidante desse estágio reprodutivo.

O sistema de co-oxidação do β -caroteno /ácido linoléico é pouco utilizado para estimar a atividade antioxidante em macroalgas marinhas e vale ressaltar a existência de diferenças metodológicas entre as publicações e o presente trabalho. Utilizando este sistema para estimar a atividade antioxidante, Huang & Wang (2004) observaram que o extrato lipofílico de *Rhodomela confervoides* (Huds.) P.C. Silva e *Symphyocladia latiuscula* (Harv.) Yamada, ambas algas vermelhas, apresentaram alta porcentagem de inibição da oxidação lipídica (68,8 e 64,9% em extratos com concentração de 100 ppm, respectivamente). Zhang *et al.* (2007) detectaram uma alta porcentagem de inibição da oxidação lipídica no extrato metanólico de *S. latiuscula* (85% na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e observaram correlação positiva entre a porcentagem de inibição e o conteúdo de compostos fenólicos totais. O extrato metanólico (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *R. confervoides* apresentou 84% de inibição da oxidação lipídica e esta inibição foi correlacionada positivamente com o conteúdo de compostos fenólicos (Wang *et al.* 2009).

5.4 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas

Os resultados referentes aos efeitos da temperatura, salinidade e interação entre irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas derivadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* evidenciaram que ambas as fases de desenvolvimento apresentaram respostas distintas com relação aos limites de tolerância e aos valores ótimos para o crescimento.

O experimento com tetrásporos foi realizado duas vezes, no entanto, a viabilidade dos tetrásporos foi tão baixa, que ao final do experimento não se obteve um número de repetições que permitisse a análise estatística dos resultados. Estes resultados corroboram com dados da literatura (Destombe *et al.* 1989, Brito & Silva 2005, Polifrone *et al.* 2006), que relacionam o maior vigor dos carpósporos pelo fato deste tipo de esporo possuir o dobro da ploidia dos tetrásporos. Esta explicação também pode ser aplicada para a população de *Gracilaria domingensis* da Praia da Lagoinha, justificando o predomínio de tetrásporófitos em relação aos gametófitos.

As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* não toleraram temperaturas baixas (15 e 20°C), morrendo durante a primeira semana de cultivo. A temperatura ótima para o crescimento do disco basal e do eixo ereto foi 30°C. Resultados semelhantes foram obtidos para carpósporos de *G. caudata*, que tiveram seu ótimo de crescimento a 30°C (Yokoya & Oliveira 1993). Plântulas derivadas da germinação de carpósporos de espécies de regiões temperadas, como *G. chilensis* (Chile) e *G. verrucosa* (Argentina), se desenvolveram melhor nas temperaturas de 18-22°C e 22-26°C, respectivamente (Yokoya & Oliveira 1993). As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. domingensis* não sobreviveram quando cultivadas na temperatura de 15°C. A taxa de crescimento do disco basal foi maior a 30°C, enquanto que o crescimento do eixo ereto foi maior nas temperaturas de 20 e 25°C. Yokoya & Oliveira (1993) observaram que tanto o disco basal quanto o eixo ereto de plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. caudata* apresentaram maiores taxas de crescimento na temperatura de 26°C. Os tetrásporos de *G. lemaneiformis*, proveniente da China, apresentaram maior crescimento do disco basal na temperatura de 15°C (Ye *et al.* 2006). Nossos resultados, embora obtidos em laboratório, sugerem que o ótimo fisiológico desta espécie para a germinação de esporos e desenvolvimento de plântulas de *G. domingensis* é diferente do encontrado no ambiente, uma vez que as temperaturas da água do mar registradas na Praia da Lagoinha durante o período de coletas variou de 17 a 25°C. Os resultados indicam que a Praia da Lagoinha não apresenta

condições de temperatura favoráveis para a germinação de esporos. Sendo assim, é provável que as baixas temperaturas encontradas na região sudeste e sul do Brasil limitem a ocorrência desta espécie na região, uma vez que a mesma é encontrada em abundância na região nordeste e tem sua distribuição ao sul limitada ao Estado de Santa Catarina.

As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis* apresentaram amplos limites de tolerância, crescendo em salinidades de 25 a 60 ups, apesar de não apresentarem a formação de eixo ereto nas salinidades de 55 e 60 ups. Este resultado diferiu daqueles descritos por Yokoya & Oliveira (1993) para *G. caudata* e *Gracilaria* sp., que não toleraram salinidades superiores a 55 ups. As plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. domingensis* não sobreviveram às salinidades inferiores a 25 ups, e as taxas de crescimento do disco basal e do eixo ereto foram maiores na salinidade de 30 ups. Estes resultados são semelhantes aos observados por Yokoya & Oliveira (1993) para plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. caudata* e *Gracilaria* sp. As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. domingensis* também apresentaram amplos limites de tolerância, no entanto, foram mais sensíveis à salinidades mais altas do que as plântulas derivadas da germinação de carpósporos, crescendo em salinidades de 25 a 55 ups. As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. domingensis* não sobreviveram às salinidades inferiores a 25 ups, e as taxas de crescimento do disco basal e do eixo ereto foram maiores nas salinidades de 40 e 45 ups. Estes resultados diferiram dos observados por Yokoya & Oliveira (1993), onde as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. caudata* não sobreviveram às salinidade inferiores a 30 ups. Os referidos autores observaram que as plântulas toleraram salinidades entre 30 e 50 ups, com crescimento máximo nas salinidades de 30 a 40 ups. As plântulas, por representarem estágios iniciais do desenvolvimento, apresentaram baixa tolerância às salinidades menores do que 20 ups. Em períodos de chuva, a diminuição na salinidade pode comprometer a sobrevivência dos esporos de *G. domingensis*, que crescem em áreas influenciadas pela água da chuva. O comprometimento da sobrevivência de gametas e esporos pela diminuição da salinidade já foi descrita para *Sargassum muticum* (Steen 2004).

Poucos são os trabalhos na literatura que relatam o efeito da interação entre luz e nutrientes no desenvolvimento de plântulas (Sousa *et al.* 2007). Os resultados obtidos no experimento combinando irradiância com concentrações de VSES apontam para a interação entre estes dois fatores, mostrando que VSES 25% na irradiância de $150 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi o tratamento que estimulou as maiores taxas de crescimento dos discos basais de plântulas derivadas de germinação de carpósporos de *Gracilaria domingensis*. Com relação ao crescimento do eixo ereto, as maiores taxas de crescimento foram observadas nos

tratamentos com VSES 25% e 50% nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As plântulas derivadas da germinação de tetrásporos de *G. domingensis* foram sensíveis a altas irradiâncias, não sobrevivendo quando cultivadas na irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estes resultados diferem do observado para as plântulas derivadas da germinação de carpósporos, que apresentaram as maiores taxas de crescimento do disco basal na irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As maiores taxas de crescimento do disco basal foram observadas nos tratamentos com VSES 25% e 50% na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e para o eixo ereto, as maiores taxas de crescimento foram observadas no tratamento com VSES 25% na irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Vale ressaltar que, a água do mar utilizada neste experimento foi proveniente de um único lote, mantendo-se constante a composição química da água do mar durante todo o período experimental. As altas taxas de crescimento observadas em plântulas derivadas da germinação de carpósporos de *G. domingensis* cultivadas em altas irradiâncias não eram esperadas, uma vez que vários estudos relatam que esporos e fases juvenis de *Gracilaria* estão aclimatados a baixas irradiâncias, de até 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Orduña-Rojas & Robledo 1999, Garza-Sánchez *et al.* 2000, Ye *et al.* 2006). Outros trabalhos descrevem espécies cuja sobrevivência de esporos não é afetada pela irradiância, como *Gelidium robustum* Santel. & I.A. Abbott (Pacheco-Ruiz *et al.* 2001), ou algas cujo recrutamento seja maior em irradiâncias mais altas (90 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), como *Ulva* sp. (descrita como *Enteromorpha* sp. por Sousa *et al.* 2007). Nossos resultados indicam a existência de diferenças fisiológicas entre as regiões do talo que formam uma plântula, uma vez que o disco basal apresentou maiores taxas de crescimento na irradiância de 150 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto o eixo ereto se desenvolveu melhor nas irradiâncias de 50 e 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Maiores taxas de crescimento nas menores concentrações de VSES também já foram reportadas na literatura (Ferreira *et al.* 2006), inclusive para *G. domingensis*, e as melhores concentrações de VSES para o crescimento foram de VSES 12,5%, 25% e 50% (Ferreira 2008), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Segundo Ferreira *et al.* (2006), as altas taxas de crescimento nas menores concentrações de VSES sugerem que a espécie está adaptada à ambientes com baixas concentrações de nutrientes.

Os resultados dos experimentos realizados com plântulas derivadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos de *Gracilaria domingensis* sugerem que os tetrásporos são mais sensíveis do que os carpósporos às variações de salinidade e irradiância, e, que os carpósporos são mais sensíveis a temperaturas baixas do que os tetrásporos. Novos experimentos com tetrásporos deverão ser realizados a fim de confirmar estas informações.

5.5 - Efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes em tetrasporófitos adultos

A temperatura é o principal fator que controla o crescimento e a distribuição geográfica das macroalgas marinhas (Lüning 1990). Os limites de tolerância e as temperaturas ótimas de crescimento podem estar relacionadas às características adaptativas da espécie ao seu habitat natural (Dawes *et al.* 1999, Raikar *et al.* 2001, Bulboa 2006).

Os tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* toleraram temperaturas entre 15 e 30°C, apresentando maiores taxas de crescimento a 20 e 25°C, enquanto que temperaturas de 15 e 30°C inibiram o crescimento da espécie. Estes resultados coincidem com a temperatura da água encontrada na Praia da Lagoinha, local onde se encontra a população de *G. domingensis*, que variaram de 17°C no inverno a 25°C no verão. Guimarães (2000) observou que morfos pigmentares de *G. domingensis*, provenientes do Estado do Ceará, apresentaram baixas taxas fotossintéticas em cultivos em laboratório em temperaturas extremas (16 e 34°C). No entanto, quando cultivadas a 20, 25 e 30°C apresentaram taxas fotossintéticas maiores e semelhantes. Os resultados observados para *G. domingensis* proveniente dos estados do Ceará e Santa Catarina podem estar relacionados às condições ambientais particulares de cada região. No Estado do Ceará, temperaturas inferiores a 20°C são praticamente inexistentes e em Santa Catarina, temperaturas inferiores a 15°C são raras, o que explicaria o menor desempenho a 15°C. Em relação ao desempenho a 30°C, a diferença era esperada, uma vez que as temperaturas máximas nos Estados da região nordeste são superiores do que as observadas na região sul. Estudos têm demonstrado a ocorrência de ecótipos, que são originados da pressão de diferentes fatores, principalmente os regimes de temperatura nas diferentes áreas geográficas (Pakker & Breeman 1996, Orfanidis & Breeman 1999, Orfanidis *et al.* 1999). A presença de ecótipos em espécies de *Gracilaria* foi registrada (Santelices & Ugarte 1990, Buschmann *et al.* 1992, Ursi 2005), no entanto, outras investigações são necessárias para averiguar se as duas populações de *G. domingensis* constituem ecótipos. Resultados onde as temperaturas ótimas para o crescimento em laboratório coincidem com as condições ambientais já foram descritos por Raikar *et al.* (2001), para outras espécies de *Gracilaria*.

O crescimento e a distribuição das macroalgas marinhas também são controlados pela salinidade. As flutuações na salinidade são maiores a nível local do que global, principalmente nas regiões costeiras (zona entre marés, estuários, poças de maré e manguezais) (Kirst 1989).

Os resultados obtidos no experimento de salinidade com tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis*, indicaram que a espécie é eurialina, sendo tolerante a uma ampla variação de salinidade (10 a 50 ups), não sobrevivendo apenas na salinidade de 60 ups. Estes resultados diferem daqueles observados por Yokoya & Oliveira (1992b) para *G. caudata* e *Gracilaria* sp., que apresentaram crescimento reduzido na salinidade de 60 ups, no entanto, os ápices se apresentaram saudáveis ao final do experimento. Os limites de tolerância a salinidade podem variar de espécie para espécie e estão relacionados ao potencial fisiológico que algumas espécies apresentam em sobreviver sem divisões celulares em salinidades desfavoráveis ao seu desenvolvimento (Kirst 1989). Por ser um gênero cosmopolita, as espécies de *Gracilaria* estão distribuídas em habitats com ampla variação de salinidade. A salinidade média encontrada nos oceanos varia de 34 a 37 ups (Raikar *et al.* 2001), entretanto, existem espécies desse gênero que apresentam seus ótimos de crescimento em salinidades mais baixas e até em salinidades mais altas do que as referidas anteriormente (Bird & McLachlan 1986).

Gracilaria domingensis desenvolveu-se melhor nas salinidades de 20 a 50 ups, apresentando taxas de crescimento (massa fresca) maiores nas salinidades entre 30 e 50 ups e crescimento em comprimento nos tratamentos de 20 a 50 ups. Para ambos os parâmetros citados, o melhor tratamento foi a salinidade de 40 ups. Grande parte dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Gracilaria* testou apenas salinidades até 35 ups, pois os mesmos têm caráter de fornecer informações para estudos de cultivo, que geralmente são implementados em áreas oceânicas, onde a salinidade máxima é em torno de 35 ups (Raikar *et al.* 2001, Choi *et al.* 2006). Os trabalhos realizados por Yokoya & Oliveira (1992b) e Wilson & Critchley (1997), que testaram salinidades superiores a 40 ups, descreveram valores ótimos para o crescimento entre 30 e 35 ups para as espécies de *Gracilaria* estudadas. Altas taxas de crescimento em laboratório na salinidade de 40 ups é um resultado interessante, uma vez que a ocorrência de uma população de *G. domingensis* foi registrada em um estuário hipersalino (com salinidades entre 40 e 50 ups) (Rio Tubarão) em Diogo Lopes, distrito do município de Marau, Rio Grande do Norte (Lucena *et al.* 2010). Segundo Capriles (2004), devido ao aquecimento global, a evaporação dos oceanos é alterada provocando o aumento da salinidade nas regiões mais próximas ao Equador. Apresentar limites amplos de tolerância a salinidade e ótimos de crescimento em salinidades mais altas podem conferir vantagens adaptativas aos tetrasporófitos de *G. domingensis*, considerando as mudanças climáticas previstas para os próximos anos.

Na análise de variância bi-fatorial dos resultados sobre os efeitos da irradiância e nutrientes, a irradiância mostrou ser um importante fator para o crescimento de tetrasporófitos

adultos de *Gracilaria domingensis*, sendo que as concentrações de VSES desempenharam um papel secundário neste processo. Para as plantas adultas, não foi observada diferenças significativas entre as taxas de crescimento de tetrasporófitos cultivados em VSES 25% e 50%, nem mesmo quando cultivados em diferentes níveis de irradiância. Alguns trabalhos já haviam evidenciado o melhor desempenho de espécies de *Gracilaria* nas menores diluições de VSES (Ursi & Plastino 2001, Costa 2005, Ferreira *et al.* 2006, Ferreira 2008), sugerindo uma adaptação destas espécies a ambientes com baixa concentração de nutrientes.

Apenas a irradiância influenciou as taxas de crescimento (massa fresca) e crescimento em comprimento dos tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis*, sendo que um incremento nos parâmetros citados acima foi observado na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O crescimento em altas irradiâncias já era esperado, uma vez que *G. domingensis* cresce em regiões entre-marés dos costões rochosos e, durante a maré baixa, fica sujeita a exposição a altos níveis de irradiância. Maiores taxas de crescimento quanto maior a irradiância testada já foram observadas para a mesma espécie por Guimarães (2000).

5.6 – Efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos adultos cultivados em laboratório

A taxa de crescimento de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* foi maior na irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do que na irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Este resultado já era esperado, uma vez que *G. domingensis* é uma espécie subtropical e que está sujeita à exposição à irradiâncias muito altas em seu habitat natural. Estes resultados estão de acordo com o observado por Guimarães (2000) e Ramlov (2007) para esta espécie. A taxa de crescimento não foi influenciada pelas concentrações de VSES. Resultado similar foi descrito por Ferreira (2008), que observou que o crescimento de *G. domingensis* foi semelhante quando cultivada em VSES 25% e 50%. Para *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* (Harv.) Taylor (Lapointe 1981) e para as linhagens selvagens e as variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Costa 2005) não foi observado incremento significativo nas taxas de crescimento com o aumento das concentrações de nitrato.

A concentração das ficobiliproteínas variou de acordo com a irradiância testada, sendo que seu conteúdo foi maior quando os tetrasporófitos foram cultivados sob a irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A concentração de VSES não influenciou o conteúdo de ficobiliproteínas. A relação entre o conteúdo pigmentar e a disponibilidade de nutrientes tem sido investigada em vários trabalhos (Jones *et al.* 1996, Gordillo *et al.* 2006), indicando que

as espécies do gênero *Gracilaria* são capazes de absorver nitrogênio, e quando o mesmo é encontrado em excesso no ambiente é capaz de estocá-lo na forma de proteínas ou pigmentos (Kosovel & Talarico 1979). No entanto, este não é o único fator determinante da concentração de pigmentos. A luz tem um papel fundamental e exerce um efeito oposto ao do nitrogênio (Talarico & Maranzana 2000), como foi observado em nossos resultados. Segundo Lapointe (1981), a interação entre estes dois fatores afeta as concentrações dos pigmentos, e o aumento ou a diminuição destas concentrações estão relacionados com a capacidade fotossintética. O aumento da concentração de ficobiliproteínas em baixa irradiância já foi relatada para outras espécies de *Gracilaria* (Guimarães 2000, Zou & Gao 2009) e está associada à fotoclimateação de *G. domingensis* à baixa irradiância. A concentração de clorofila *a* em *G. domingensis* não foi influenciada pela irradiância e pelas concentrações de VSES, mas foram menores do que as concentrações de ficobiliproteínas, como já descrito para *G. domingensis* (Pereira 2009).

Os resultados observados em relação à taxa de crescimento e ao conteúdo de pigmentos fotossintetizantes indicam que a irradiância é um fator limitante para o crescimento de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*, uma vez que mesmo quando cultivados sob irradiância de 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e apresentando alto conteúdo pigmentar, os tetrasporófitos não apresentaram taxa de crescimento semelhantes àsquelas encontradas quando cultivados sob irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O conteúdo de proteínas solúveis totais em tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis*, entretanto, foi influenciado tanto pela irradiância quanto pelas concentrações de VSES, sendo que as maiores concentrações de proteínas foram observadas nos tratamentos com VSES 50% cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Como discutido anteriormente, as espécies do gênero *Gracilaria* tem a capacidade de estocar nitrogênio durante os períodos de alta disponibilidade desse nutriente. Em condições ótimas para a fotossíntese, não há a necessidade de se estocar nitrogênio sob a forma de ficobiliproteínas, fazendo com que os tetrasporófitos de *G. domingensis* armazenem o excesso de nitrogênio preferencialmente sob a forma de proteínas. Andria *et al.* (1999) observaram que o conteúdo de proteínas solúveis totais de *Gracilaria* sp. diminuiu quando a espécie foi cultivada com pouca disponibilidade de nitrogênio. As linhagens verde-clara e marrom de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. acumularam proteínas com o aumento da concentração de nitrato (Martins 2007).

O perfil carotenóidico de tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* cultivados em laboratório apresentou diferenças em relação ao perfil observado em indivíduos coletados na natureza, que correspondem à ausência de α -caroteno e *cis*- β -caroteno. Essa diferença pode estar relacionada às condições de cultivo em laboratório, onde, por exemplo, a irradiância (quantidade e qualidade de luz) é inferior a aquela observada no campo. Este fato pode

contribuir para que os tetrasporófitos de *G. domingensis* desenvolvam estratégias de síntese de carotenóides diferenciadas dos indivíduos coletados na natureza.

O carotenóide majoritário encontrado em tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* cultivados em laboratório foi a zeaxantina, seguidos por β -criptoxantina, *trans*- β -caroteno e luteína. Não foram detectadas as presenças de violaxantina e anteraxantina. A concentração de todos os tipos de carotenóides foram maiores quando os tetrasporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* foram cultivados sob a irradiância de 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A concentração destes compostos foi inferior à concentração das ficobiliproteínas, evidenciando o papel dos carotenóides como fotoprotetores do aparato fotossintetizantes. Neste experimento, a via de síntese do β -caroteno esteve mais ativa, uma vez que as concentrações de zeaxantina, β -criptoxantina e do β -caroteno foram superiores às concentrações de luteína. Segundo Demming-Adams (1990), a zeaxantina é um pigmento chave envolvido na resposta fotoprotetora ao estresse por alta irradiância, sendo considerada a xantofila com maior eficiência na dissipação do excesso de energia (Frank *et al.* 2001). O elevado teor de zeaxantina em alta irradiância sugere uma resposta de aclimação ao estresse causado pelo excesso de luz em tetrasporófitos de *G. domingensis*. Em experimento semelhante, Carnicas *et al.* (1999) também observaram o aumento na concentração de zeaxantina com o aumento da irradiância em *G. tenuistipitata* var. *liui*.

A diminuição nas concentrações de zeaxantina livre em tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* cultivados sob 50 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em VSES 25% e a diminuição de β -criptoxantina, quando cultivados sob 100 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em VSES 25%, pode representar uma resposta do aparato fotossintetizantes da alga à diminuição ou ao aumento da irradiância em um meio com menor disponibilidade de nitrogênio, neste caso, VSES 25%.

É interessante salientar que os tetrasporófitos de *Gracilaria domingensis* acumularam quantidades baixas de zeaxantina e *trans*- β -caroteno, comparativamente à *G. tenuistipitata* e às variantes pigmentares verde-clara e marrom de *Hypnea musciformis* (cultivadas em VSES 50%, irradiância de 70 a 80 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura $22\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 14 h) (Profa. Dra. Nair S. Yokoya, comunicação pessoal). Ambas as espécies apresentaram respectivamente $1,08\pm 0,18 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ (massa seca), $3,45\pm 0,25 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$, $5,75\pm 0,19 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ referente ao conteúdo de zeaxantina. *G. tenuistipitata* apresentou traços de β -caroteno enquanto a linhagem verde-clara de *H. musciformis* apresentou $26,93\pm 2,51 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ e a marrom $8,19\pm 0,44 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$. As diferenças quantitativas podem estar associadas à morfologia do talo das espécies, uma vez que *G. domingensis* apresenta o talo mais espesso do que as demais espécies. A espessura do talo contribui para a atenuação da luz que chega até os cloroplastos e, sendo assim, algas que apresentam talo de espessura fina como *G. tenuistipitata* e *H. musciformis*

necessitam de uma quantidade maior de carotenóides para evitar os danos fotooxidativos provocados pelo excesso de luz.

VI. CONCLUSÕES

As espécies do gênero *Gracilaria* são alvos de inúmeros estudos, devido a sua relevância econômica como matéria-prima para extração de ágar. Juntamente ao interesse pela extração deste ficocolóide, o interesse pela pesquisa de compostos biologicamente ativos também cresceu, uma vez que as espécies deste gênero apresentam altas taxas de crescimento e fácil propagação vegetativa, que são características para o cultivo da espécie. Dentro deste contexto, é importante a busca por compostos do metabolismo secundário que apresente atividade biológica em espécies que sejam passíveis de ser cultivada, como *Gracilaria domingensis*, uma vez que além de evitar o extrativismo de bancos naturais, há a possibilidade de se agregar valor a matéria-prima que já é cultivada.

Desta forma, este trabalho teve como um dos objetivos avaliar a variação sazonal de carotenóides e de compostos fenólicos nos diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis*, bem como avaliar a sua atividade antioxidante. O presente trabalho é o primeiro a descrever a variação sazonal destes compostos por um período de dois anos e que avalia esta variação nas diferentes fases do histórico de vida de uma alga vermelha. Com relação a estas investigações, pode-se concluir que:

- A fase tetrasporofítica (diplóide) foi predominante na população de *G. domingensis* na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC;
- Este é o primeiro estudo que descreve a ocorrência de luteína e α -caroteno em *G. domingensis*. Violaxantina e anteraxantina não foram detectadas, indicando que o ciclo violaxantina não estaria ativo para esta espécie nas condições em que ela se encontra na natureza;
- O perfil de compostos fenólicos de *G. domingensis* foi formado predominantemente por catequinas, sendo descrito pela primeira vez neste estudo;
- A variação sazonal no conteúdo de carotenóides e de compostos fenólicos nos diferentes estádios reprodutivos de *G. domingensis* foi modulada pelas mudanças nos fatores ambientais que ocorreram durante os dois anos de monitoramento. O acúmulo de carotenóides esteve relacionado principalmente à fotoproteção e ao estresse causado pela diminuição da temperatura e o acúmulo de compostos fenólicos esteve relacionado à fotoproteção e a proteção e/ou maturação das estruturas reprodutivas dos estádios reprodutivos de *G. domingensis*;
- A utilização da PCA evidenciou as diferenças entre os estádios reprodutivos em diferentes épocas do ano e mostrou que a função dos carotenóides e compostos fenólicos

é mais evidente em gametófitos femininos com cistocarpos e masculinos. Se considerarmos a hipótese de que indivíduos diplóides apresentam vantagens sobre os indivíduos haplóides por possuírem o dobro de material genético (Destombe *et al.* 1989), os indivíduos haplóides necessitariam desenvolver mecanismos de proteção para sobreviverem as condições adversas do ambiente e alcançar o sucesso reprodutivo. Neste contexto, os gametófitos masculinos acumulariam estes compostos para garantir a sua sobrevivência às condições ambientais adversas, uma vez que a sua ocorrência é baixa na população. Os gametófitos femininos acumulariam maiores quantidades destes compostos no outono para proteção dos carpósporos, uma vez que estes são sensíveis a temperaturas baixas;

- Os extratos dos estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* apresentaram atividade antioxidante que pode ser considerada baixa quando comparada a outras espécies de Rhodophyta.

Este trabalho ainda teve como objetivo caracterizar fisiologicamente as diferentes fases de desenvolvimento (plântulas e plantas adultas) de *Gracilaria domingensis* em laboratório, visando fornecer informações sobre condições ótimas de crescimento e limites de tolerância frente a fatores que interferem na produtividade em sistemas de cultivo, como a temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes. A influência da irradiância e dos nutrientes no acúmulo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais também foi investigada. As principais conclusões foram as seguintes:

- A sobrevivência de tetrásporos foi baixa quando comparada a sobrevivência dos carpósporos. Os tetrásporos se mostraram mais sensíveis a salinidade e a irradiância do que os carpósporos, enquanto que os carpósporos foram mais sensíveis a baixas temperaturas;
- As plântulas derivadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos e os tetrasporófitos adultos apresentaram respostas diferenciadas com relação aos ótimos de crescimento e limites de tolerância. Estes resultados apontam para as diferentes necessidades metabólicas que ambas as fases possuem. Diferenças marcantes foram observadas com relação à temperatura. As plântulas derivadas da germinação de carpósporos não sobreviveram nas temperaturas de 15 e 20°C e tiveram seu ótimo de crescimento a 30°C, enquanto as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos não sobreviveram à temperatura de 15°C, apresentando maiores taxas de crescimento a 20 e 25°C. Os tetrasporófitos adultos toleraram temperaturas de 15 a 30°C, mas tiveram maiores taxas de crescimento em 20 e 25°C. Estes resultados sugerem que a temperatura

é um fator que limita a ocorrência de *G. domingensis* no sul do Brasil uma vez que a sobrevivência dos esporos diminui com o decréscimo da temperatura.

- As plântulas derivadas da germinação de carpóporos toleraram salinidades de 25 a 60 ups, enquanto que as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos toleraram salinidades de 25 a 55 ups. Os tetrásporófitos adultos toleraram de 10 a 50 ups. A salinidade ótima para o crescimento dessas duas fases também foi diferente, sendo que plântulas derivadas da germinação de carpóporos e tetrásporos se desenvolveram melhor nas salinidades de 30 e 40-45 ups, respectivamente, e tetrásporófitos adultos na salinidade de 40 ups. Estes resultados refletem que as fases iniciais do desenvolvimento de *G. domingensis* são mais sensíveis ao estresse osmótico causado pelas salinidades baixas. No entanto, quando submetidas às salinidades mais altas (55 e 60 ups), as fases iniciais do desenvolvimento são capazes de reduzir as divisões celulares sem comprometer a sua sobrevivência, o que não ocorre com os tetrásporófitos adultos.
- O desempenho de plântulas derivadas da germinação de carpóporos e tetrásporófitos adultos é semelhante em relação a concentração de VSES, sendo que o crescimento é semelhante em VSES 25% e 50%. No entanto, as duas fases apresentaram respostas distintas às variações de irradiância. O crescimento do disco basal foi maior na irradiância de 150 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ enquanto que o crescimento do eixo ereto foi maior nas irradiâncias de 50 e 100 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A taxa de crescimento de tetrásporófitos adultos foi maior na irradiância de 100 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.
- O acúmulo das ficobiliproteínas foi maior na irradiância de 50 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ indicando uma resposta de aclimatação de *G. domingensis* à baixa irradiância.
- O conteúdo de proteínas solúveis totais em tetrásporófitos adultos foi maior no tratamento com VSES 50% quando cultivados sob a irradiância de 100 $\mu\text{mol de fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Estes resultados indicam que os tetrásporófitos de *G. domingensis* podem armazenar o excesso de nitrogênio preferencialmente sob a forma de proteínas.
- O perfil de carotenóides de tetrásporófitos cultivados em laboratório foi semelhante ao observado nos espécimes coletados na natureza, com a exceção do α e do *cis*- β -caroteno que não foram observados em tetrásporófitos cultivados em laboratório. A concentração destes compostos foi inferior à concentração das ficobiliproteínas, evidenciando o papel dos carotenóides como fotoprotetores do aparato fotossintetizantes.

Os resultados permitem concluir que as concentrações de carotenóides e compostos fenólicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* variam conforme as variações nos parâmetros ambientais, evidenciando a importância destes compostos no

combate ao estresse oxidativo. Por terem acumulado quantidades superiores de carotenóides e compostos fenólicos, sugere-se que os indivíduos haplóides (gametófitos) sejam mais sensíveis ao estresse ambiental do que os indivíduos diplóides (tetrásporófitos), necessitando desenvolver estratégias para sobreviver às condições ambientais desfavoráveis.

Os resultados referentes aos experimentos realizados em laboratório evidenciaram que as plântulas derivadas da germinação de carpósporos e de tetrásporos, bem como os tetrásporófitos adultos de *Gracilaria domingensis* apresentaram ótimos de crescimento e limites de tolerância distintos, sendo estas informações de extrema importância aos trabalhos futuros sobre o cultivo desta espécie. Os resultados indicam que a temperatura é um dos fatores que determinam o limite sul de distribuição de *G. domingensis* no litoral brasileiro, uma vez que os tetrásporos e carpósporos desta espécie não toleraram temperaturas menores do que 15 e 20°C, respectivamente.

Considerando o conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho, espera-se que esses dados possam contribuir ao conhecimento sobre a função dos carotenóides e dos compostos fenólicos nos diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* e que os resultados referentes aos estudos fisiológicos possam ser utilizados em sistemas de cultivo de *G. domingensis*, visando uma maior produtividade.

VII. RESUMO

Gracilaria domingensis (Kütz.) Sonder ex Dickie (Rhodophyta, Gracilariales) é uma alga vermelha que apresenta importância econômica por ser matéria prima para a produção de ágar. Por ser uma espécie passível de ser cultivada, cresce o interesse pelo estudo de compostos do seu metabolismo secundário na busca por moléculas biologicamente ativas. Este trabalho avaliou a variação sazonal do perfil de carotenóides e de compostos fenólicos dos estádios reprodutivos de *G. domingensis*, bem como a atividade antioxidante de seus extratos. Além disso, os efeitos da temperatura, salinidade, irradiância e nutrientes no desenvolvimento de plântulas e tetrasporófitos adultos e os efeitos da irradiância e nutrientes no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, de carotenóides e de proteínas solúveis totais foram também investigados. As coletas foram realizadas sazonalmente na Praia da Lagoinha, Florianópolis, SC, no período de maio/2008 a janeiro/2010. Foi observado o predomínio de tetrasporófitos na população. Quanto à caracterização de carotenóides presentes nos estádios reprodutivos da espécie, foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as xantofilas luteína, zeaxantina e β -criptoxantina e α -caroteno e β -caroteno (*cis* e *trans*). O isômero *trans* do β -caroteno foi o carotenóide majoritário em ambos os estádios reprodutivos, independentemente da época do ano. Com relação ao perfil de compostos fenólicos (determinado por CLAE) foram detectados os seguintes compostos: epicatequina, galocatequina, traços de ácido gálico e um composto ainda não identificado (denominado composto X – Rt 4,4 min). A variação sazonal no conteúdo de carotenóides e de compostos fenólicos foi modulada pelas mudanças nos fatores ambientais que ocorreram durante os dois anos de coletas, sendo que o acúmulo de carotenóides esteve relacionado principalmente à fotoproteção e ao estresse causado pela diminuição da temperatura e o acúmulo de compostos fenólicos esteve relacionado à fotoproteção e à proteção e/ou maturação das estruturas reprodutivas dos estádios reprodutivos. A análise de componentes principais (PCA) evidenciou grupos característicos, agrupando gametófitos femininos coletados no outono e masculinos coletados no inverno, primavera e verão em função das altas concentrações de carotenóides e/ou compostos fenólicos. Estes resultados evidenciaram o efeito fotoprotetor e antioxidante que os carotenóides e compostos fenólicos apresentam e a necessidade que os indivíduos haplóides têm em desenvolver mecanismos para sobreviverem às condições ambientais desfavoráveis e garantir a manutenção da população. Os resultados obtidos em laboratório evidenciaram que as diferentes fases de desenvolvimento avaliadas (plântulas e adultos) apresentaram diferenças fisiológicas com relação aos parâmetros avaliados. Em relação à temperatura, as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos e carpósporos não

toleraram temperaturas inferiores a 15 e 20°C, respectivamente. As plântulas derivadas da germinação de carpósporos tiveram taxas de crescimento superior a 30°C enquanto que as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos tiveram taxas de crescimento superior a 20 e 25°C. Para os tetrásporófitos adultos, taxas de crescimento superiores foram observadas a 20 e 25°C. As plântulas derivadas da germinação de carpósporos toleraram salinidades de 25 a 60 ups, tendo seu ótimo de crescimento a 30 ups; as plântulas derivadas da germinação de tetrásporos toleraram salinidades de 25 a 55 ups, apresentando maiores taxas de crescimento a 40 e 45 ups. Os tetrásporófitos adultos toleraram salinidades de 10 a 50 ups (não sobrevivendo na salinidade de 60 ups), e o valor ótimo para o seu crescimento foi em 40 ups. No experimento bifatorial combinando irradiância e concentrações de água do mar enriquecida com a solução de Von Stosch (VSES) verificou-se que as concentrações de VSES não influenciaram o crescimento de plântulas e tetrásporófitos adultos. Entretanto, a irradiância foi determinante no crescimento, sendo que o disco basal das plântulas apresentou maiores taxas de crescimento quando cultivadas sob 150 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O eixo ereto das plântulas e os tetrásporófitos adultos tiveram taxas de crescimento superiores quando cultivados sob a irradiância de 100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As concentrações de ficobiliproteínas e de carotenóides em tetrásporófitos adultos foi influenciada pela irradiância. Baixa irradiância (50 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) estimulou o acúmulo de ficobiliproteínas enquanto que a alta irradiância (100 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) estimulou o acúmulo dos carotenóides. Estes resultados demonstram a importância destes pigmentos na aclimação e fotoproteção dos tetrásporófitos adultos de *G. domingensis* frente às variações na irradiância. Considerando o conjunto de resultados obtidos no presente estudo, espera-se que esses dados possam contribuir ao conhecimento sobre a função dos carotenóides e dos compostos fenólicos nos diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* e que os resultados referentes aos estudos fisiológicos possam ser utilizados em sistemas de cultivo de *G. domingensis*, visando uma maior produtividade.

VIII. ABSTRACT

Gracilaria domingensis (Kütz.) Sonder ex Dickie (Rhodophyta, Gracilariales) is a red alga commercially important as source of raw material for agar production. For being suitable for cultivation, there is a growing interest in the study of its secondary metabolism compounds for searching biologically active molecules. This study has the objectives to assess the seasonal variation of carotenoids and phenolic compounds from different reproductive phases of *G. domingensis*, and to evaluate the antioxidant activity from these extracts. Effects of temperature, salinity, irradiance and nutrients on two developmental stages (sporeling and adult tetrasporophyte) and the effects of irradiance and nutrients on pigments (chlorophyll *a*, phycoerythrin, phycocyanin, and allophycocyanin), carotenoids and protein contents were also investigated in laboratory conditions. Specimens of *G. domingensis* were collected seasonally in Lagoinha Beach, Florianópolis, Santa Catarina State, from May/2008 to January/2010. The population was predominated by tetrasporophytic specimens. Carotenoids from different reproductive phases were identified by HPLC, and xanthophylls (lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin), and α -carotene and β -carotene (*cis* and *trans*) were detected. The major carotenoid was *trans*- β -carotene. The profile of phenolic compounds (determined by HPLC) was characterized by epicatechin, galocatechin, traces of gallic acid and a non-identified compound (named compound X - Rt 4.4 min). The seasonal variation of carotenoids and phenolic content was modulated by changes in environmental conditions, and carotenoid accumulation was related to photoprotection and stress caused by the decrease of temperature. The accumulation of phenolic compounds was also related to photoprotection and protection and/or maturation of reproductive structures of *G. domingensis*. The principal component analysis (PCA) showed characteristic groups: one group composed by female gametophytes collected in autumn and the other composed by male gametophytes collected in winter, spring and summer, which were grouped due to the high concentrations of carotenoids and / or phenolic compounds. These results could be explained by the photoprotective role played by carotenoids and phenolic compounds, and the need of haploid specimens (gametophytes) to develop mechanisms to survive in adverse environmental conditions and to ensure the maintenance of the population. Results of laboratory experiments showed that different stages of development (sporelings and adults) have distinct physiological responses to the parameters evaluated. Carposporelings and tetrasporelings did not tolerate low temperatures, and died at 15-20°C and 15°C, respectively. The optimum temperature for carposporeling development was 30°C; for tetrasporeling was 20 and 25°C. For adult tetrasporophyte, the highest growth rates were recorded at 20 and 25°C. Carposporelings

tolerated salinities from 25 to 60 psu, and maximum growth occurred at 30 ups while tetrasporelings tolerated salinities from 25 to 55 psu, and maximum growth occurred at 40 and 45 ups. For adult tetrasporophytes tolerated salinities from 10 to 50 psu (they did not survive at salinity of 60 psu), and the maximum growth occurred at 40 ups. The interaction of irradiance and seawater enriched with von Stosch's solution (VSES) concentrations showed that growth of carposporelings and adult tetrasporophytes was not influenced by VSES concentrations. However, the irradiance was determinant factor on growth, and basal discs and erect fronds of carposporelings and apical segments of tetrasporophyte presented the highest growth when cultured under high irradiances (150 e 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively). The concentrations of phycobiliproteins and carotenoids on tetrasporophytes were influenced by irradiance levels. Low irradiance (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stimulated phycobiliprotein accumulation while high irradiance (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stimulated carotenoid accumulation. These results show the importance of these pigments in the photoprotection and acclimation of tetrasporophytes to face changes in irradiance levels. Considering the set of results obtained in the present study, it is expected that these data could contribute to the knowledge on the role of carotenoids and phenolic compounds in different reproductive phases of *G. domingensis* and results on physiological studies could be applied in mariculture of *G. domingensis* in order to improve the productivity.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde-Álvarez, R.M. & Figueroa, F.L.** 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology* 148: 459–465.
- Accioly, M.C.** 2004. Desenvolvimento da maricultura artesanal de macroalgas no baixo-sul baiano. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 164p.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, H.J.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews* 5: 49-58.
- Aman, R., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U. & Schieber, A.** 2005. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074: 99–105.
- Ambrósio, C.L.B., Camara, F.A. & Faro, Z.P.** 2006. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição* 19: 233-243.
- Amsler, C.D. & Fairhead, V.A.** 2006. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43:1–91.
- Andersson, M., Schubert, H., Pedersén, M. & Snoeijs, P.** 2006. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology* 149: 653–665.
- 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.
- Angelo, P.M. & Jorge, N.** 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 66: 232-240.
- Araújo, P.G.** 2005. Ecologia populacional de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) na área de proteção ambiental da Barra do Rio Mamangape, Paraíba - Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 96 p.
- Araújo, S.A.C. & Deminicis, B.B.** 2009. Fotoinibição da fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências* 7: 463-472.
- Bakhshi, D. & Arakawa, O.** 2006. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. *Journal of Applied Horticulture* 8: 101-104.
- Banerjee, K., Ghosh, R., Homechaudhuri, S. & Mitra, A.** 2009. Biochemical composition of marine macroalgae from Gangetic Delta at the Apex of Bay of Bengal. *African Journal of Basic & Applied Sciences* 1: 96-104.

- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. & David, J.P.** 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29:113-123.
- Bianchi, T.S., Kautsky, L. & Argyrou, M.** 1997. Dominant chlorophylls and carotenoids in macroalgae of the Baltic Sea (Baltic Proper): their use as potential biomarkers. *Sarsia* 82: 55-62.
- Bird, C.J. & McLachlan, J.** 1986. The effect of salinity on distribution of species of *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assessment. *Botanica Marina* 29: 231-238.
- Bouzon, J.L.** 2005. Composição e estrutura espacial da comunidade macrofitobêntica de fundos consolidados das Baías da Ilha de Santa Catarina (SC): subsídios para a avaliação do impacto da urbanização. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 69 p.
- 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.
- Bramley, P.M.** 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany* 53: 2107-2113.
- Brinkhuis, B.H.** 1985. Growth patterns and rates. *In*: M.M Littler & D.S. Littler (eds.). *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press, London, pp. 461-478.
- Brito, L. & Silva, S.** 2004. Fases reprodutivas de *Gracilaria damaecornis* J. Agardh (Gracilariaceae: Rhodophyta). *Boletim do Instituto Oceanográfico da Venezuela* 43: 33-36.
- Brito, L. & Silva, S.** 2005. Fenología y ciclo de vida del alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae) en Sucre, Venezuela. *International Journal of Tropical Biology* 53: 67-73.
- Britton, G., Liaen-Jensen, S. & Pfander H.** 2004. *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser Verlag, Basel, 675p.
- Brown, L.M. & McLachlan, J.** 1982. Atypical carotenoids for the Rhodophyceae in the genus *Gracilaria* (Gigartinales). *Phycologia* 21: 9-16.
- Bulboa, C.** 2006. Bases bio-tecnológicas para o cultivo de *Chondracanthus chamissoi*, uma alga vermelha de importância econômica da costa chilena. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 131 p.
- Buschmann, A., Kuschel, F., Vergara, P. & Schulz, J.** 1992. Intertidal *Gracilaria* farming in southern Chile: differences of the algal provenience. *Aquatic Botany* 42: 327-337.
- Capriles, R.** 2004. Severas mudanças na salinidade dos oceanos. *Revista Eco* 21. <http://www.eco21.com.br/textos/textos.asp?ID=623> (acesso em 18/07/2010).
- Cardozo, K.H.M.** 2007. Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micospirinas (MAAs). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 173p.

- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P. & Pinto, E.** 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60–78.
- Carnicas, E., Jimenez, C. & Niell, F.X.** 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 50: 149-158.
- Carvalho, L.R. & Roque, N.** 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova* 23: 757-764.
- Choi, H.G., Kim, Y.S., Kim, J.H., Lee, S.J., Park, E.J., Ryu, J. & Nam, K.J.** 2006. Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. chorda*, with the potential for mariculture in Korea. *Journal of Applied Phycology* 18: 269–277.
- Connan, S., Deslandes, E. & Gall, E.A.** 2007. Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349: 359–369.
- 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, 100p.
- Costa, V.L. & Plastino, E.M.** 2001. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 491-500.
- Critchley, A.T.** 1993. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. In: M. Ohno & A.T. Critchley (eds.). *Seaweed Cultivation and Marine Ranching*. Japan International Cooperation Agency, Japan, pp. 89-112.
- Cunningham Jr, F.X. & Gantt, E.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: B. Buchanam, W. Gruissem & R. Jones (eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 1367 p.
- Cruz, O.** 1998. A Ilha de Santa Catarina e o continente próximo: um estudo de geomorfologia costeira. Editora da UFSC, Florianópolis, 280p.
- Davison, R.** 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of Phycology* 27: 2-8.
- Dawes, C.J., Orduña-Rojas, J. & Robledo, D.** 1999. Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance *Journal of Applied Phycology* 10: 419–425.
- De Casabianca, M.L., Marinho-Soriano, E. & Laugier, T.** 1997. Growth of *Gracilaria bursa-pastoris* in a mediterranea Lagoon: Thau, France. *Botanica Marina* 40: 29-37.

- Demming-Adams, B.** 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1-24.
- Denault, M., Stieve, E. & Valiela, I.** 2000. Effects of nitrogen load and irradiance on photosynthetic pigment concentrations in *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* in estuaries of Waquoit Bay. *Biological Bulletin* 199: 223–225.
- Deng, H. & Van Berkel, G.J.** 1998. Electrospray mass spectrometry and UV/visible spectrophotometry studies of aluminium (III) – flavonoid complexes. *Journal of Mass Spectrometry* 33: 1080-1087.
- Destombe, C., Godim, J. & Remy, J.M.** 1989. Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). Thirteenth International Seaweed Symposium 204/205: 219 – 223.
- Dkhil, B.B. & Denden, M.** 2010. Salt stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) seeds. *African Journal of Agricultural Research* 5: 1412-1418.
- Duarte-Almeida, J.M., dos Santos, R.J., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M.** 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 446-452.
- Edwards, P.** 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagress in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contribution of Marine Sciences Austin* 15: 1-228.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C. & Wichers, H.J.** 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 648-656.
- Esteban, R., Martínez, B., Fernández-Marin, B., Becerril, J.M. & García-Plazaola, J.I.** 2009. Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongate*. *European Journal of Phycology* 44: 221–230.
- Fazeli, M.R., Tofighi, R., Samadi, N., Jamalifar, H. & Fazeli, H.** 2006. Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & WT) under stress conditions. *Daru* 14: 146-150.
- Fernández, L.E., Valiente, O.G., Mainardi, V., Bello, J.L., Vélez, H. & Rosado, A.** 1989. Isolation and characterization of antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. *Carbohydrate Research* 190: 77-83.
- 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, 200p.
- Ferreira, L.B., Barufi, J.B. & Plastino, E.M.** 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 187-192.

- Frank, H., Das, S.K., Bautista, S., Bruce, D., Vasil'ev, S., Crimi, M., Croce, R. & Bassi, R.** 2001. Photochemical behaviour of xanthophylls in the recombinant photosystem II antenna complex, CP26. *Phytochemistry* 40: 1220-1225.
- Ganesan, P., Kumar, C.S. & Bhaskar, N.** 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99: 2717–2723.
- Garcia-Plazaola, J.I., Hernández, A., Olano, J.M. & Becerril, J.M.** 2003. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Functional Plant Biology* 30: 319–24.
- Garza-Sánchez, F., Zertuche-González, J.A. & Chapman, D.J.** 2000. Effect of temperature and irradiance on the release, attachment and survival of spores of *Gracilaria pacifica* Abbott (Rhodophyta). *Botanica Marina* 43: 205-212.
- Giusti, M. & Wrolstad, R.E.** 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *In*: R.E. Wrolstad (ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-13.
- Givernaud, T., Gourji, A.E., Mouradi-Givernaud, A., Lemoine, Y. & Chiadmi, N.** 1999. Seasonal variations of growth and agar composition of *Gracilaria multipartita* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiologia* 398/399: 172 – 199.
- Godillo, F.J., 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* 57:2661-2671.
- Gomes, F.S.** 2007. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição* 20: 537-548.
- Gómez-Pinchetti, J.L., Ramazanov, Z., Fontes, A. & García-Reina, G.** 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to β -carotene content. *Journal of Applied Phycology* 4: 11-15.
- Grasshoff, K.A., Ehrhardt, M. & Kremling, K.** 1983. *Methods of seawater analysis*. 2.ed. Verlag Chemie, 419 p.
- Guaratini, T.** 2008. Antioxidantes de macroalgas marinhas: caracterização química e atividade *in vitro*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 141p.
- Guimarães, M.** 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 89 p.
- Guimarães, M. & Plastino, E.M.** 1999. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). *Acta Microscopica* 8: 795-796.
- Guimarães, M., Plastino, E.M. & Oliveira, E.C.** 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* 42: 481-486.

- Guimarães, M., Plastino, E.M. & Destombe, C.** 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169.
- Gurgel, C.F.D. & Fredericq, S.** 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on rbcL sequence analysis. *Journal of Phycology* 40:138–59.
- Hanisak, M.D.** 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of culture seaweeds. *Hydrobiologia* 204/205: 79–87.
- Hansen, J.E. & Doyle, W.T.** 1976. Ecology and natural history of *Iridaea cordata* (Rhodophyta, Gigartinales): population structure. *Journal of Phycology* 12: 273-278.
- Harnborne, J.B.** 1999. Classes and functions of secondary products. *In*: N.J. Walton & D.E Brown (Eds.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. Imperial College Press, London, pp. 1-25.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. & Bobilya, D.J.** 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572–584.
- Hendrey, G.A.F., Houghton, J.D. & Brown, S.B.** 1987. The degradation of chlorophyll – A biological enigma. *New Phytologist* 107: 255-302.
- Horn-Filho, N.O.** 2002. Estágios de desenvolvimento costeiro no litoral da Ilhas de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. *Revista Discente Expressões Geográficas* 2: 70-83.
- Horn-Filho, N.O., Leal, P.C. & Oliveira, J.S.** 2000. Ilha de Santa Catarina, SC – Brasil: 88 km de praia arenosa. *Anais do Simpósio Brasileiro sobre Praias Arenosas: morfodinâmica, ecologia, usos, riscos e gestão*. Editora da UNIVALI, Itajaí, p164-165.
- Horta, P.A., Amancio, E., Coimbra, C.S. & Oliveira, E.C.** 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Huang, H. & Wang, B.** 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao Coastline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4993-4997.
- Hulshof, P.J.M., Kosmeijer-Schuil, T., West, C.E. & Hollman, P.C.H.** 2007. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 655-661.

- Jahns, P., Latowski, D. & Strzalka, K.** 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 3-14.
- 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. *Biochemistry Physiology Pflanzen* 167: 191-194.
- Jones, A.B., Dennison, W.C. & Stewart, G.R.** 1996. Macroalgal responses to nitrogen source and availability: amino acid metabolic profiling as a bioindicator using *Gracilaria edulis* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 52: 757-766.
- Kain, J.M. & Destombe, C.** 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 269-281.
- Kakita, H. & Kamishima, H.** 2006. Effects of environmental factors and metal ions on growth of the red alga *Gracilaria chorda* Holmes (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 18: 469-474.
- Kim, Y.K., Guo, Q. & Packer, L.** 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172: 149-156.
- King, A. & Young, G.** 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99: 213-218.
- Kirst, G.O.** 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:21-53.
- Kosovel, V. & Talarico, L.** 1979. Seasonal variation of photosynthetic pigments in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss (Florideophyceae, Gigartinales). *Bolletino Della Società Adriatica di Scienze* LXIII: 5-15.
- 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.
- Kuskoski, E.M., Fett, R., Asuero, A.G. & Troncoso, A.M.** 2005. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). *Vitae* 12: 45-52.
- Lapointe, B.E.** 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 17: 90-95.
- Lee, K., Park, S.R. & Kim, Y.K.** 2007. Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: a review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350: 144-175.
- Lesser, M.P.** 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68:253-78.
- Leung, I. & Phil, M.** 2008. Macular pigment: new clinical methods of detection and the role of carotenoids in age-related macular degeneration. *Optometry* 79: 266-272.

- Lewis, W.M.** 1985. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploidy. *American Naturalist* 125: 692-701.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J.** 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 366 p.
- Lucena, L.A.F., Dias, T.L.P., Miranda, G.E.C. & Horta, P.A.** 2010. Macroalgas de manguezais hipersalinos: um estudo piloto. *In: Menezes, M. (org.). XIII Congresso Brasileiro de Ficologia*, Paraty, Rio de Janeiro.
- Luhan, M.A.R.J.** 1996. Biomass and reproductive states of *Gracilaria heretoclada* Zhang et Xia collected from Jaro, Central Philippines. *Botanica Marina* 39: 207 – 211.
- Lünning, K.** 1990. *Seaweeds: their environment biogeography and physiology*. John Wiley & Sons, New York, 527p.
- Machlin, L.J.** 1995. Critical assessment of epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 35: 41–50.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. & Lima, J.L.F.C.** 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 61: 1–19.
- Marco, G.J.** 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 45: 594- 598.
- Marquardt, J. & Hanelt, D.** 2004. Carotenoid composition of *Delesseria lancifolia* and other marine red algae from polar and temperate habitats. *European Journal of Phycology* 39 :285–92.
- 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, São Paulo, 131p.
- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F. & Araújo, M.E.M.** 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 103:778-86.
- Mathews-Roth, M.M.** 1997. Historical review: carotenoids and photoprotection. *Photochemistry and Photobiology* 65: 148-151.
- McHugh, D.J.** 2003. *A guide to the seaweed industry*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 105 p.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S. & Leitão, S.G.** 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15: 127-130.
- Miller, H.E.** 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 48: 91.

- Miranda, G.E.C.** 2000. Avaliação do impacto da exploração (simulada) da alga agarófita *Gracilaria caudata* J. Agardh no litoral da Paraíba. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 107p.
- Molyneux, P.** 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211-219.
- Mshigeni, K.E.** 1976. Studies on the reproduction of selected species of *Hypnea* (Rhodophyta, Gigartinales) from Hawaii. *Botanica Marina* 19: 341-346.
- Murano, E.** 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7: 245-254.
- Novoa, A.V., Motidome, M., Mancini-Filho, J., Linares, A.F., Tanae, M.M., Torres, L.M.B. & Lapa, A.J.** 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37: 373-382.
- Nur, I., Okon, Y. & Henis, Y.** 1982. Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, poly-P-hydroxybutyrate, succinate oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasilense* Cd grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology* 128: 2937-2943.
- Nygård, C.A. & Dring, M.J.** 2008. Influence of salinity, temperature, dissolved inorganic carbon and nutrient concentration on the photosynthesis and growth of *Fucus vesiculosus* from the Baltic and Irish Seas. *European Journal of Phycology* 43: 263-262.
- Okuda, T. & Neushul, M.** 1981. Sedimentation studies of red algal spores. *Journal of Phycology* 17: 113-118.
- Oliveira, E.C.** 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. *Panorama da Aqüicultura* 7: 42-45.
- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M.** 1994. Gracilariaceae. *In*: I. Akatsuka (ed.) *Biology economic algae*. SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 185-226.
- Orduña-Rojas, J. & Robledo, D.** 1999. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 42: 315-319.
- Orfanidis, S. & Breeman, A.** 1999. Geographic variation in thermal traits in *Digenea simplex* and *Champia parvula* (Rhodophyta) in relation to present and glacial temperatures regimes. *Journal of Phycology* 35: 919-930.
- Orfanidis, S., Venekamp, L. & Breeman, A.** 1999. Ecophysiological adaptations of two Mediterranean red algae in relation to distribution. *European Journal of Phycology* 34: 469-476.
- Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A., Bustus-Barrera, M. & Arroyo-Ortega, E.** 2001. Recruitment in situ and fertility of nuclear phases of *Gelidium robustum* (Rhodophyta). *Ciencias Marinas* 27: 35-46.

- Pakker, H. & Breeman, A.** 1996. Temperature responses of tropical to warm temperate seaweeds. II. Evidence for ecotypic differentiation in ampho-Atlantic Tropical-Mediterranean species. *European Journal of Phycology* 31: 133-141.
- Pereira, D.C.** 2009. Variação no conteúdo protéico e pigmentar em variantes cromáticas de *Gracilaria domingensis* nas populações naturais de Rio do Fogo-RN, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade do rio Grande do Norte, Natal, 91p.
- Pereira, D., Cardozo, K.H.M., Colepicolo, P. & Marinho-Soriano, E.** 2007. Efeito dos parâmetros ambientais sobre o conteúdo de pigmentos da macroalga *Gracilaria domingensis* cultivada em viveiros de camarão. In: S. Rosso (ed.). VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambú, PP. 1-2.
- Pereira, M.D., Schettini, C.A.F. & Omachi, C.Y.** 2009. Caracterizações de feições oceanográficas na plataforma de Santa Catarina através de imagens orbitais. *Revista Brasileira de Geofísica* 27: 81-93.
- Plastino, E.M.** 1985. As espécies de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia Dura, Ubatuba, SP. – aspectos biológicos e fenologia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 124p.
- Plastino, E.M., Guimarães, M., Matioli, S.R. & Oliveira, E.C.** 1999. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Genetics and Molecular Biology* 22: 105-108.
- Plastino, E.M.; Ursi, S. & Fujii, M.T.** 2004. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 52: 45-52.
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E. & Stiger-Pouvreau, V.** 2006. Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquatic Botany* 85: 337–344.
- Pinheiro-Joventino, F. & Bezerra, C.L.F.** 1980. Estudos de fenologia e regeneração de *Gracilaria domingensis* Sonder (Rhodophyta – Gracilariaceae) no Estado do Ceará. *Arquivos de Ciências do Mar* 20: 33 – 41.
- PMF – Prefeitura Municipal de Florianópolis.** 2010. <http://www.pmf.sc.gov.br> (acesso em 15/07/2010).
- Poblete, A. & Inostraza, I.** 1987. Management of a *Gracilaria* natural bed in Lenga, Chile: a case study. In: M.A. Ragen & C.J. Bird (eds.). Twelfth International Seaweed Symposium, Netherlands, pp. 307 – 311.
- Polifrone, M., De Massi, F. & Gargiulo, G.M.** 2006. Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). *Aquaculture* 261: 1003-1013.
- Pozzi, A.C.S.** 2007. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá”. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 86p.

- Raikar, S.V., Iima, M. & Fujita, Y.** 2001. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth of *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta) from Japan, Malaysia and India. *Indian Journal of Marine Science* 30: 98-104.
- Ramlov, F.** 2007. Efeitos dos fitorreguladores e da irradiância no crescimento e na morfogênese de morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 113p.
- Ramlov, F., Plastino, E.M. & Yokoya, N.S.** 2009. Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica* 32: 607-615.
- Randhir, R; Preethi, S; Kalidas, S.** 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry* 37: 1247-1256.
- Ranga Rao, A., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. & Ravishankar, G.A.** 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology* 98: 560–564.
- Rmiki, N.E., Brunet, C., Cabioch, J. & Lemoine, Y.** 1996. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiologia* 326/327: 407–13.
- Roginsky, V. & Lissi, E.A.** 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254.
- Rodriguez-Amaya, D., Kimura, M., Godoy, H.T. & Amaya-Farfan, J.** 2008 Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 445– 463.
- Römer, S., Lubeck, J, Kauder, F., Steiger, S., Adomat,C. & Sandmann,G.** 2002. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metabolic Engineering* 4: 263–272 (2002).
- Romo, H., Alveal, K. & Dellarossa, V.** 1979. Biología de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss en Chile Central. *Actas Symposium Algas Marinas Chilenas* 1: 155 – 163.
- Rossi, J.A. & Kasum, C.M.** 2002. **Dietary flavonoids:** bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutricion* 22:19–34.
- Salles, J.P., Scherner, F., Yoshimura, C.Y., Fanganiell, M., Bouzon, Z.L. & Horta, P.A.** 2010. Cultivation of Native Seaweed *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta) in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 633-640.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. & Saura-Calixto, F.** 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-276.

- Sandmann, G.** 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 4–12.
- Santelices, B. & Ugarte, R.** 1990. Ecological differences among Chilean population of commercial *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 2: 17-26.
- Santos, R.I.** 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petronick (eds.). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*, 5ed. Editora da UFSC & Editora da UFRS, Florianópolis, pp. 403-434.
- Schmidt, E.C., Santos, R., Maraschin, M., Horta, P.A. & Bouzon, Z.L.** 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* (in press) doi: 10.1016/j.micron.2010.07.010.
- Schubert, N. & García-Mendoza, E.** 2008. Photoinhibition in red algal species with different carotenoids profiles. *Journal of Phycology* 44: 1437–1446.
- Schubert, N., García-Mendoza, E. & Pacheco-Ruiz, I.** 2006. Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology* 42: 1208–1216.
- Scott, C.E. & Eldridge, A.L.** 2005. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 551-559.
- Shahidi, F. & Naczk, M.** 2006. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press, London, 566 p.
- Silva, F.A.V., Borges, M.F.M. & Ferreira, M.A.** 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* 2: 94-103.
- Simon, C., Ar Gall, E., Levavasseur, G. & Deslandes, E.** 1999. Effects of short-term variations of salinity and temperature on the photosynthetic response of the red alga *Grateloupia doryphora* from Brittany (France). *Botanica Marina* 42: 437-440.
- Smit, A.J.** 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262.
- Soriano, E.M.** 2007. Seaweed biofilters: an environmentally friendly solution. *World Aquaculture* 38: 31-33.
- Sousa, A.I., Martins, I., Lillebo, A.I., Flindt, M.R. & Pardal, M.A.** 2007. Influence of salinity, nutrients and light on the germination and growth of *Enteromorpha* sp. Spores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341: 142–150.
- Sousa, M.B., Pires, K.M.S., Alencar, D.B., Sampaio, A.H. & Saker-Sampaio, S.** 2008. α , β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas in natura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 953-958.
- Souza, M.C.R., Marques, C.T., Dore, C.M.G., Silva, F.R.F., Rocha, H.A.O. & Leite, E.L.** 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19:153–160.

- Stahl, W. & Sies, H.** 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740 : 101– 107.
- Steen, H.** 2004. Effects of reduced salinity on reproduction and germling development in *Sargassum muticum* (Phaeophyceae, Fucales). *European Journal of Phycology* 39: 293 – 299.
- Sultana, B., Anwar, F. & Przybylski, R.** 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry* 104: 1106-14.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J-O., Dommès, J.** 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113: 1226–1233.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 1991. Surface protection and secondary defence compounds. *In*: L. Taiz & E. Zeiger (eds.). *Plant Physiology*. Benjamin Cumming, Califórnia, pp. 320-345.
- Takagi, S., Kishi, F., Nakajima, K., Kimura, Y. & Nakano, M.** 1990. A seasonal variation of carotenoid composition in green leaves and effect of environmental factors on it. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University* 75: 1-7.
- Talarico, L. & Maranzana, G.** 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56 1–11.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen Ba, G. & Mathé, G.** 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56 : 200-7.
- Uenojo, M., Maróstica Junior, M.R. & Pastore, G.M.** 2007. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova* 30: 616-622.
- Ursi, S.** 2005. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmento, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 121p.
- Ursi, S. & Plastino, E.M.** 2001. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 587-594
- Ursi, S., Pedersén, M., Plastino, E. & Snoeijs, P.** 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997–1007.
- Vermerris, W. & Nicholson, R.** 2008. Phenolic compound biochemistry. Springer Science, London, 267p.
- Vershinin, A. O. & Kamnev, A. N.** 1996. Xanthophyll cycle in marine macroalgae. *Botanica Marina* 39: 421–425.

- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. *In*: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism, 1ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 1-29.
- Wang, B., Zhang, W., Duan, X. & Li, X.** 2009. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry* 113: 1101-1105.
- Wilson, A.J. & Critchley, A.T.** 1997. Studies on *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Farnham and Irvine and *Gracilaria aculeata* (Hering) Papenfuss from southern Africa. I. The influence of temperature, irradiance, salinity and nitrogen-nutrition on growth. *South African Journal of Botany* 63: 465-473.
- Woodall, A.A., Lee, S.W.M., Weesie, R.J., Jackson, M.J. & Britton, G.** 1997. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336:33-42.
- Xia, J., Li, Y. & Zou, D.** 2004. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. *Aquatic Botany* 80: 129-137.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M. & Newmark, H.L.** 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* 21: 381-406.
- Yan, X., Nagata, T. & Fan, X.** 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 253-262.
- Ye, N., Wang, H. & Wang, G.** 2006. Formation and early development of tetraspores of *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales, Gracilariaceae) under laboratory conditions. *Aquaculture* 254: 219-226.
- Yoshie, Y., Wang, W., Petillo, D. & Suzuki, T.** 2000. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science* 66: 998-1000.
- Yoshimura, C.Y.** 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163p.
- 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.
- Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C.** 1992a. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. *Journal of Applied Phycology* 4: 339-345.
- Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C.** 1992b. Efectos de la salinidad en la tasa de crecimiento, morfología y contenido de agua de algunas algas rojas brasileñas de importância económica. *Ciencias Marinas* 18: 49-64.

- Yokoya, N. S. & Oliveira, E. C.** 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *Japanese Journal of Phycology (Sôru)* 41: 283-293.
- Zacarias, A.A., Moresco, H.H., Horst, H., Brighente, I.M.C., Marques, M.C.A. & Pizzollati, M.G.** 2007. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999.
- Zemke-White, W.L. & Ohno, M.** 1999. World seaweed utilization: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* 11: 369-376.
- Zhang, W., Duan, X., Huang, H., Zhang, Y. & Wang, B.** 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphycladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology* 19: 97-108.
- Zou, D. & Gao, K.** 2009. Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. *Phycologia* 48: 510–517.
- Zubia, M., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y.** 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19: 449–458.