

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Levi Pompermayer Machado

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS E ANTIFÚNGICAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE MACROALGAS CULTIVADAS *in vitro*

VITÓRIA

2010

LEVI POMPERMAYER MACHADO

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS E ANTIFÚNGICAS DE TRÊS
ESPÉCIES DE MACROALGAS CULTIVADAS *in vitro*

Dissertação de mestrado apresentada por Levi Pompermayer Machado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para aquisição do título de mestre em biologia vegetal.
Orientadora: prof. Dr. Silvia Tamie Matsumoto

VITÓRIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Machado, Levi Pompermayer, 1984-

M149a Avaliações fisiológicas e antifúngicas de três espécies de
macroalgas cultivadas *in vitro* / Levi Pompermayer Machado. –
2010.

40 f. : il.

Orientadora: Silvia Tamie Matsumoto.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Ecofisiologia vegetal. 2. Aclimatação. 3. Biotecnologia. 4.
Fungos fitopatogênicos. 5. Macroalgas. I. Matsumoto, Silvia
Tamie. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais e irmão por serem as melhores e mais inteligentes pessoas que já conheci. É mérito todo deles tudo o alcançado até aqui. Se fosse só por minhas pernas nem metade haveria sido realizado.

A professora Dra. Silvia Tamie Matsumoto pela orientação e por confiar na minha capacidade e no meu trabalho.

Aos professores Dr.Fabrcio Oliveira Reis e Dr. Luiz Fernando Ganassali de Oliverira Jr. pelos ensinamentos e apoio na fase inicial de pesquisas que com o tempo levou a realização dessa pesquisa.

Ao professor Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos pelos conselhos e sempre constantes interesse e disposição para colaborar com a pesquisa desde o seu inicio.

A grande companheira de laboratório e conversas Msc. Wilka Messner da Silva Bispo, sempre foi um prazer e inspiração trabalhar com você.

Ao professor Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol por me receber em seu laboratório num momento crucial da pesquisa e pela colaboração com a análise de carboidratos.

Aos amigos e companheiros da turma do mestrado em biologia vegetal 2009/1 por todo o apoio e diversão proporcionados ao longo da pós - graduação.

Ao grande amigo Stéfano Zorzal pela ajuda em diversos momentos que possibilitou a realização da pesquisa.

A Dra. Valéria de Oliveira Fernandes por todo interesse, boa vontade e conselhos e por empréstimo de equipamentos do Laboratorio de Ecologia e Taxonomia de Algas Continentais (LATEAC) fundamentais para realização dos experimentos alem da empolgação com a qual me ouvia falar dos resultados.

Ao secretário da PRPPG-BV Ricardo Celestino por ter sido sempre solícito e colaborativo.

A Elizabeth (Betinha 1000° é tudo nosso), presença indispensável para tornar o setor de botânica um lugar super agradável.

Aos amigos Gabriel Hector, Elias Iwanaga e João Paulo Izoton por estarem sempre presentes, altas ondas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de pesquisa para realização desta pesquisa.

Ao mar

"Marco Polo descreve a ponte, pedra por pedra.

- Mas qual é a pedra que sustenta a ponte? - Pergunta

Kublai Khan.

*- A ponte não é sustentada por esta ou aquela pedra – responde Marco -,
mas pela curva do arco que estas formam*

Kublai Khan permanece em silêncio, refletindo

Depois acrescenta:

- Por que falar das pedras? Só o arco me interessa.

Polo responde:

- Sem pedras o arco não existe"

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS E ANTIFÚNGICAS DE TRÊS ESPÉCIES DE MACROALGAS CULTIVADAS *in vitro*

O presente estudo buscou caracterizar as alterações em três espécies de Rhodophyta promovidas pelo período de aclimação ao cultivo em laboratório, por meio da análise de parâmetros ecofisiológicos (conteúdo pigmentar, razões clorofila *a*/carotenóides totais – clorofila *a*/ficobiliproteínas totais, concentração de carboidratos não estruturais e razão sacarose/amido) correlacionando com a atividade antifúngica do extrato bruto para algas *in natura* (coletadas diretamente da natureza) e algas após 28 dias de aclimação a condições *in vitro*. Os resultados obtidos indicam que as respostas ao processo de aclimação são diferenciadas para cada espécie de macroalga, principalmente com aumento das razões entre pigmento principal e acessórios e na concentração de açúcares armazenados e metabolizáveis, fatores que se revelaram positivamente correlacionados com o aumento da biotividade obtida para o extrato de macroalgas após a aclimação. Em conclusão verificou-se a importância de se analisar a resposta de cada espécie ao processo de aclimação para aplicação de cultivos e que as técnicas de cultivo de macroalgas em ambientes controlados podem ser utilizadas para a indução na produção de metabólitos de interesse econômico ou bioativos.

Palavras chave: Ecofisiologia de macroalgas, aclimação em laboratório, biotecnologia e bioprocessos, atividade antifúngica, controle de doenças.

Abstract

PHYSIOLOGICAL AND ANTIFUNGAL EVALUATIONS OF THREE SEaweEDS CULTIVATED *in vitro*

This study sought to characterize the changes in three species of Rhodophyta promoted by a acclimation in laboratory culture period, through analysis of ecophysiological parameters (pigment content, ratios of chlorophyll a / carotenoids - chlorophyll a / phycobiliproteins, concentration of nonstructural carbohydrates and ratio sucrose / starch) correlating with the antifungal activity of crude extract for algae collected from nature and algae after 28 days of acclimation to laboratory conditions. The results indicate different responses to the acclimation process is for each species of seaweed, especially with increasing ratios between principal and accessory pigment and the concentration of stored and metabolized sugars, factors which have proved to be positively correlated with increased bioactivity of the extract obtained for macroalgae after adaptation. In conclusion it was noted the importance of analyzing the response of each species acclimated to application of crops and cultivation techniques of macroalgae in controlled environments can be used to induce the production of metabolites of economical interest or bioactive.

Keywords: Ecophysiology of algae, biotechnology, antifungal activity, disease control.

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Composição química da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996) 18
- Tabela 2 – Resultado da análise da concentração de clorofila a, carotenóides e ficobiliproteínas, expresso em miligrama de pigmento por grama de massa fresca da alga e das razões clorofila a / carotenóides totais e clorofila a / ficobiliproteínas totais *in natura* e aclimatadas ao cultivo *in vitro*, valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significantes entre as duas condições *in natura* e *in vitro* (Tukey $P \leq 0,01$)..... 40
- Tabela 3 - Análise do teor de carboidratos, sacarose, glicose e amido expresso em miligrama de carboidrato por grama de massa seca de alga, em algas e a razão entre sacarose/amido, de algas *in natura* e *in vitro*, valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significantes entre as duas condições natureza e aclimatadas (Tukey $P \leq 0,01$). 40
- Tabela 4 - Resultados de bioatividade dos extratos brutos das macroalgas das condições: natureza e aclimatadas ao cultivo em laboratório; letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (Tukey $P \leq 0,01$). Letras maiúsculas identificam a comparação entre a bioatividade entre as condições (*in natura* e *in vitro*), letras minúsculas identificam a comparação entre as espécies na mesma condição e os controles negativo e positivo..... 41

Lista de Figuras

- Figura 1 – Vista geral do cultivo *in vitro* realizado no laboratório de micro propagação figuras A, B, C e D. Detalhes da espécie *Hypnea musciformis* (E) e *Ochtodes secundiramea* (F)..... 38
- Figura 2 - Desenvolvimento da colônia do fungo *C. gloeosporioides* após seis dias de incubação. **A** - *Ochtodes secundiramea*; extrato da alga *in natura* **B** - *Ochtodes secundiramea*; extrato do cultivo *in vitro* **C** – *Palisada flagellifera*; extrato da alga *in natura* **D** - *Palisada flagellifera*; extrato do cultivo *in vitro* **E** - *Hypnea musciformis*; extrato da alga *in natura* **F** - *Hypnea musciformis*; extrato do cultivo *in vitro* **G** - Controle Negativo; **H** - Controle Positivo (Procloroz®)..... 39
- Figura 3 - Gráfico de correlação de Spearman (variando entre -1 e 1) da atividade antifúngica dos extratos das algas nas duas condições (*in natura* e *in vitro*) com os parâmetros sacarose/amido; Clorofila a/Carotenóides totais; Clorofila a/Ficobiliproteínas totais e Glicose..... 41

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1. Macroalgas marinhas: Uma visão geral.....	10
1.2. O filo Rhodophyta.....	11
1.3. Importância de estudos de ecofisiologia e cultivo <i>in vitro</i> de macroalgas.....	13
1.4. Importância de avaliar o período aclimatação.....	14
1.5. Extratos de macroalgas no controle da antracnose do mamoeiro.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. HIPÓTESE.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo geral	15
4.2. Objetivos específicos.....	16
5. METODOLOGIA GERAL.....	16
5.1. Material biológico.....	16
5.2. Cultivo <i>in vitro</i> da Macroalgas.....	17
5.3. Avaliações fisiológicas.....	19
5.3.1. Análise de Pigmentos.....	19
5.3.2. Quantificação de carboidratos não estruturais	19
5.4. Testes de Bioatividade	20
6. REFERÊNCIAS	21
7. Artigo - Caracterização ecofisiológica e de bioatividade - respostas a aclimatação a cultivo <i>in vitro</i> em macroalgas com potencial aplicação na agricultura.....	27
8. ANEXOS.....	38

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Macroalgas marinhas: Uma visão geral

As algas constituem um grupo polifilético de organismos que apresentam um histórico evolutivo muito diverso (LOBBAN; HARRISON, 1994). As macroalgas marinhas pertencem a um grupo heterogêneo e muito diverso de organismos fotossintetizadores e avasculares, com estruturas reprodutivas desprotegidas (cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH; WHITTICK, 1987). Por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, as algas são classificadas como talófitas, pertencente ao reino Plantae e Chromista, sendo as espécies divididas nos três grandes filos Rhodophyta, Chlorophyta e Heterokontophyta. (OLIVEIRA, 2002).

São encontradas em praticamente todos ambientes marinhos, sendo mais abundantes em ambientes costeiros tropicais. A distribuição vertical das algas, em costões rochosos, é limitada pelo gradiente formado pela penetração da luz na coluna d'água de luz em quantidade suficiente para equilibrar a respiração celular e manter os processos metabólicos e investimentos na reprodução. Algumas espécies estão adaptadas para resistir a longos períodos de emersão e se tornam resistentes à dessecação dos períodos de maré baixa, formando zonas distintas de diferente composição ficológica. Outras algas, por sua vez, não suportam exposição ao ar e vivem permanentemente submersas (OLIVEIRA, 2002).

As algas apresentam elevada importância ecológica por serem produtores primários que sustentam a vida nos mares e oceanos, desempenhando assim um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

No Brasil, os estudos com macroalgas até a segunda metade do século XX se restringiram à listagem de espécies, e como resultado a ficologia nacional se encontra atualmente num estado relativamente privilegiado em relação ao conhecimento de sua flora de macroalgas marinhas. Estão referidas para o litoral brasileiro um total de 643 táxons infragenéricos de macroalgas, sendo

388 Rhodophyta, 88 Heterokontophyta e 167 Chlorophyta e ainda listadas 161 táxons infragenéricos de cianobactérias e 5 espécies de angiospermas marinhas. Isto dá um total geral de 809 táxons infragenéricos de organismos fotossintetizantes bênticos (OLIVEIRA, 2002).

Bioquímica e fisiologicamente as algas são similares em muitos aspectos às plantas, possuindo as mesmas vias metabólicas básicas de síntese de clorofila *a* como principal pigmento fotossintético. Os polissacarídeos e proteínas biossintetizados podem ser comparados com os de outros grupos plantas quanto a sua composição química e processo biossintético (SOUTH; WHITTICK, 1987).

1.2. O filo Rhodophyta

Filo Rhodophyta, composto pelas algas vermelhas, quase que exclusivamente pluricelulares e marinhas (mais comuns em mares quentes). Vivem fixadas em um substrato, possuindo clorofilas *a* e *d*, carotenóides e as ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) como pigmentos acessórios e armazenam amido como material de reserva (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Na Divisão Rhodophyta são reconhecidas quatro classes: Rhodellophyceae, Compsopogonophyceae, Bangiophyceae e Florideophyceae (WYNNE, 2005). Representam o grupo com maior diversidade de espécies entre as macroalgas (USOV, 1992), englobando cerca de 4000 a 6000 espécies (WOELKERLING, 1990), distribuídas em aproximadamente 700 gêneros (KRAFT, 1981).

Estudos fisiológicos têm se focado nas espécies de macroalgas da classe Florideophyceae, com o destaque para as ordens Ceramiales e Gigartinales, que apresentam uma vasta lista de metabólitos halogenados e /ou sulfatados potencialmente bioativos (CARVALHO; ROQUE, 2000) e por apresentarem carboidratos e polissacarídeos (alginatos e carragenas) de interesse comercial (PERFETO, 2004; SCHMIDT, 2009).

Dentre as espécies de Florideophyceae encontradas no litoral capixaba com potencial de bioaproveitamento, destaca-se a macroalga *Hypnea musciformis* (Wulfen). Espécie de ampla distribuição na costa brasileira (ALGAEBASE,

2009; MARTINS, 2007) e de grande interesse econômico, pois é produtora de *k*-carragenana, polissacarídeo com alta poder espessante, possuindo ainda substâncias com potencial farmacêutico, tendo sido determinadas às atividades antiviral (YOKOYA et al., 2007 (b)), antimicrobiana (SELVIN; LIPTON, 2004) e antifúngica (MACHADO et al., 2008). A espécie vem sendo explorada desde a década de 60 e os registros históricos apontam uma sobre-exploração dos bancos naturais (OLIVEIRA et al., 2009).

Essa intensa exploração fez com que *H. musciformis* fosse uma das mais bem estudadas em relação aos efeitos ambientais e o desenvolvimento (BRAVIN; YONESHIGUE-VALENTIN, 2002), formação de calos por micropropagação (BRAVIN et al., 2006) e dos aspectos fisiológicos e produção de ficolóides em diferentes genótipos da alga (YOKOYA et al., 2003; YOKOYA et al., 2007 (a)), não havendo, no entanto, estudo verificando as alterações metabólicas comparando situação de cultivo em laboratório e a alga *in natura*.

Ochtodes secundiramea (Montagne) Howe é uma espécie de distribuição restrita, ocorrendo na região da Bahia, Rio Grande do Norte e com maior intensidade no Espírito Santo (ALGAEBASE, 2009). A espécie possui capacidade de sintetizar inúmeros compostos terpenóicos halogenados (FENICAL; MCCONNELL, 1978; GERWIK, 1984; PAUL et al., 1987 e POLZIN; RORRER, 2003) que, além de possuir ação protetora contra herbivoria (PAUL et al., 1980), apresentam interesse biotecnológico por possuírem atividades biológicas antioxidante e antimicrobiana, (GRESSLER et al., 2009), além de promissora atividade biológica inibitória contra o fungo da antracnose do mamoeiro (MACHADO et al., 2008).

A espécie *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam. faz parte de um gênero pertencente ao complexo *Laurencia*, (NAM, 2007). Essa espécie apresenta a sinonímia *Laurencia flagellifera* J. Agardh. O gênero *Palisada* (Ceraminales), proposto por Nam (2007), possui diversos estudos de caráter molecular e morfológico (GIL-RODRIGUES et al., 2010; CASSANO et al., 2009), porém, não existe registro de estudos sobre o metabolismo e substâncias bioativas para espécie *Palisada flagellifera*.

1.3. Importância de estudos de ecofisiologia e cultivo *in vitro* de macroalgas

Nas últimas décadas, grande importância tem sido atribuída as macroalgas marinhas, devido à aplicação econômica e biotecnológica de metabolitos. Dentre as substâncias citadas destacam-se as constituintes da parede celular das algas: alginatos, agaranas, carragenanas e os produtos diretos do metabolismo da alga: carboidratos não estruturais (PERFETO, 2004; SCHMIDT, 2009) e, além destes, substâncias com ação antioxidante, antibacteriana, antiviral e antifúngica (ABRANTES, 2006; ABREU et al., 2008; MACHADO, 2008 GRESSLER et al., 2009).

A presença das substâncias bioativas estimulou a realização de estudos com ênfase na ecofisiologia das macroalgas e na comparação do desempenho entre as diferentes variedades intraespecíficas de algas em resposta a diversas condições ambientais naturais ou de cultivo (COSTA, 2005; PERFETO, 2004; HAYASHI, 2007; MARTINS, 2007; SCHMIDT, 2009).

Para exploração comercial de algum composto ou da própria macroalga é recomendável a realização de cultivo *in vitro*, já que na natureza ocorrem flutuações sazonais na produção e composição dos metabólitos de algas (SILVA et al., 2008). Tal variação não ocorre nas cultivadas *in vitro* devido ao controle dos fatores ambientais. O cultivo não só evita a exploração excessiva das populações naturais como também facilita a seleção de genótipos e linhagens de importância comercial e permite a obtenção de resultados reproduzíveis e constantes, o que não é possível em populações naturais.

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta fundamental para estudos fisiológicos de organismos de interesse comercial e ecológico devido ao controle das variáveis ambientais (pH, temperatura, intensidade e qualidade luminosa), que interferem nas respostas dos organismos estudados (YOKOYA et al., 2007; a).

Cerca 85 espécies de macroalgas apresentam domínio dos aspectos da cultura de tecidos foi relatado, o objetivo inicial destas técnicas concentra-se principalmente no melhoramento genético e propagação clonal de algas para a maricultura, recentemente estão sendo aplicadas na biotecnologia, por meio de

bioprocessos, visando produção de metabólitos de alto valor e importância para as indústrias farmacêuticas, nutracêuticas e agrárias (Baweja et al., 2009).

1.4. Importância de avaliar o período aclimatação

Segundo Taiz e Zeiger (2009) o processo de aclimatação é o conjunto de respostas ecofisiológicas, que podem envolver expressão gênica, relacionadas com a exposição a condições adversas as da ideal para a espécie.

As interações dos parâmetros abióticos estudados em cultivos laboratoriais estão relacionadas com o local e época de coletas, os quais interferem na fisiologia das macroalgas que afetarão o processo de aclimatação destas ao cultivo em laboratório (Perfeto et al. 2005). Esses fatores podem influenciar as respostas das algas pós-aclimatação, por ocorrência de situações de estresse, podendo interferir nos resultados fisiológicos, tornando-se assim indispensável compreender a dinâmica do processo de aclimatação bem como determinar os padrões adequados para a espécie de interesse.

1.5. Extratos de macroalgas no controle da antracnose do mamoeiro

O Brasil é o maior produtor de mamão do mundo, com uma produção estimada de 1.440.000 t., além de grande produtor, o Brasil destaca-se também como grande exportador, principalmente para a Europa e para os Estados Unidos, país que importa quase a metade de todo o mamão comercializado no mundo (MARTINS; COSTA, 2003).

O Espírito Santo responde por cerca de 74% do volume de mamão embarcado e por 80% do valor exportado, o estado também possui o valor mais elevado de produtividade por hectare, além da supremacia em qualidade de produção, tendo conseguido controlar diversas pragas como mosca da fruta e o mosaico do mamoeiro conquistando, com isso, a confiança de mercados internacionais (MARTINS; COSTA, 2003).

As moléstias de plantas são responsáveis por grandes perdas nas culturas de importância econômica, dentre as quais se destacam as doenças de pós-colheita em frutíferas. A perda pós-colheita de frutas tropicais no Brasil é estimada em 30% dos produtos comercializados (TAVARES; SOUZA, 2005).

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças mais importantes nas plantas cultivadas. O patógeno afeta toda a parte aérea da planta em qualquer fase do desenvolvimento, causando abscisão precoce, podendo causar a morte do hospedeiro. Quando a doença atinge o fruto reduzindo o valor comercial, inutilizando-o para consumo. (SUSSEL, 2005).

Estudos relatam que os metabólitos presentes nos extratos de diversas macroalgas apresentaram atividade biológica no controle do desenvolvimento de diferentes fitopatógenos (RIZVI, 2003; TALAMINI et al. 2005). Machado (2008) verificou o potencial bioativo dos extratos de *O. secundiramea* e *H. musciformis* para o controle *in vitro* do fungo *C. gloeosporioides*, causador da antracnose do mamoeiro.

2. JUSTIFICATIVA

O trabalho buscou caracterizar o processo de aclimação de macroalgas marinhas ao cultivo *in vitro* verificando as alterações concentração de carboidratos não estruturais e nos pigmentos, clorofila *a*, carotenóides totais, aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina além de comparar a atividade biológica o controle do fungo *C. gloeosporioides* para algas de coletadas *in natura* e aclimatadas ao cultivo *in vitro*

3. HIPÓTESE

O processo de aclimação de macroalgas ao cultivo *in vitro* promovem alterações na concentração dos carboidratos não estruturais e nos pigmentos fotossintetizantes, bem como na atividade biológica dos extratos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Verificar comparativamente, entre algas de população natural e algas aclimatadas ao cultivo *in vitro*, o conteúdo pigmentar, a concentração dos carboidratos não estruturais e a atividade antifúngica do extrato bruto contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, determinando os padrões de aclimação para cada espécie.

4.2. Objetivos específicos

- Verificar as mudanças no conteúdo pigmentar das algas, clorofila *a* e pigmentos acessórios, em resposta aclimatação ao cultivo.
- Avaliar as alterações na concentração dos carboidratos produzidos por três espécies de Rhodophyta causadas pela aclimatação ao cultivo em laboratório em relação à mesma espécie de *in natura*.
- Determinar o efeito da aclimatação ao cultivo em laboratório na atividade antifúngica do extrato das macroalgas.
- Correlacionar alterações na atividade antifúngica dos extratos das macroalgas com as mudanças nos parâmetros ecofisiológicos em resposta a aclimatação.

5. METODOLOGIA GERAL

5.1. Material biológico

As macroalgas *H. musciformis*, *O. secundiramea* e *P. flagellifera* foram coletadas na zona entre marés, nos períodos de baixa-mar de marés de sizígia, conforme recomendação Abreu (2005). Material fresco foi coletado no mês de dezembro de 2009 em costões lateríticos da Praia Mole em Carapebus, município de Serra, ES (20°14'34"S 40°12'54"O).

A coleta foi realizada mediante raspagem das rochas com espátulas, retirando dessa forma todo o talo da macroalga. Foram coletados indivíduos plenamente desenvolvidos, buscando sempre ramos vegetativos e que não apresentaram sinais de clorose.

Logo após a coleta, as algas foram separadas em quatro lotes, as do cultivo (lote 1) foram pré-lavadas em campo para remoção de epífitas e organismos fitais macroscópicos e acondicionadas em béqueres contendo água do mar do local de coleta e acondicionadas em uma caixa térmica durante o transporte ao laboratório.

Os talos utilizados na determinação do teor de carboidratos (lote 2) e conteúdo pigmentar (lote 3) das algas da condição *in natura* foram separados

em sacolas plásticas e sacos de papel alumínio respectivamente e depositadas em caixa térmica com gelo para conservação do material durante o transporte

O ultimo lote (4) foi acondicionado em sacos plásticos dentro de caixa térmica, e foi limpo em laboratório para posterior confecção do extrato bruto, utilizando a mistura de diclorometano – metanol (2:1) (MACHADO, 2008).

Adicionalmente foram coletadas amostras das algas, para obtenção da massa seca e para posterior confecção de excicatas depositadas no herbário VIES – UFES, sob os números de tombo de 18.854, 18.856 e 18.857.

5.2. Cultivo *in vitro* da Macroalgas

A água do mar utilizada no processo de aclimatação ao cultivo *in vitro* foi captada na mesma região de coleta das macroalgas e a esterilização realizada no Laboratório de Ecologia e Taxonomia de Algas Continentais (LATEAC) Departamento de Ciências Biológicas, UFES. O processo consistiu na pré-filtragem em algodão e papel filtro para retirada do material particulado em suspensão, seguida de filtragem em Millipore com filtro de celulose de 0,45 µm. Em seguida foi submetida a banho-maria por 60 minutos, após o resfriamento o processo foi repetido (YOKOYA, 1996). Por fim, a água foi exposta à luz ultravioleta (UV) de ação germicida. Durante o experimento, cultivo foi realizado com água do mesmo lote de coleta.

As algas coletadas e pré-lavadas em campo (lote 1) foram limpas para remoção do perifiton com o auxílio de lupa, estilete, pincel e papel filtro. Antes de iniciar o cultivo os talos das algas foram tratadas em solução de água do mar estéril e dióxido de germânio (GeO₂) na concentração de 8 mL.L⁻¹, inibidor específico de microalgas diatomáceas, epífitas contaminantes comuns em culturas *in vitro* de macroalgas e com ciprofloxacino -(CIPRO[®]) 10mg/l utilizado para combater tanto bactérias quanto cianobactérias. Por fim os talos passaram pelo tratamento em uma solução de hipoclorito de sódio em água do mar estéril numa concentração de 1:1000 (v:v) durante um minuto (PERFETO et al. 2005).

Os ramos apicais selecionados foram seccionados em 5 cm de comprimento e 10 e esses fragmentos apicais foram acondicionados em

frascos estéreis de 1000ml (anexo 1) contendo como meio de cultura água do mar estéril enriquecida com solução de von Stosch (tabela 1), no processo aclimatativo utilizou-se a concentração de 2 mL.L⁻¹ de solução para um litro de água do mar estéril.

Procedeu-se troca semanal do meio de cultura, conforme recomendação de Yokoya (1996) e Martins (2007). As três espécies de algas foram cultivadas sob temperatura média de 24 ± 1 °C, fotoperíodo de 14/10h claro-escuro, salinidade 30 - 32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de aproximadamente 30 ± 5 μmol de fótons m⁻² s⁻¹. Foi realizada ainda a aeração com ar úmido com o uso de mini-compressor de ar (120L.h⁻¹), de forma intermitente ao cultivo, conforme recomendação de Bravin e Yoneshigue-Valentin (2002), para melhor distribuição de nutrientes no meio que possibilita maior produção de biomassa no cultivo.

Tabela 1 - Composição química da solução de nutrientes de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996)

Componentes	Concentração por litro
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)

A massa inicial de 5g de cada alga foi cultivada, dividida em 6 frascos (n=6), por um período de 28 dias (MARTINS, 2007), os frascos foram vedados com filme PVC e conservados na sala de Crescimento do laboratório de Micropropagação, Departamento de Ciências Biológicas, UFES.

5.3. Avaliações fisiológicas

As análises fisiológicas (pigmentos: clorofila *a*, carotenóides totais ficobiliproteínas e carboidratos não estruturais: amido, glicose, sacarose e frutose, foram realizadas foram realizadas no tempo zero (algas coletadas diretamente da natureza) e após 28 dias de aclimatação ao cultivo em laboratório.

5.3.1. Análise de Pigmentos

A extração de pigmentos (lote 2) foi realizada conforme o protocolo determinado por Martins (2007) e Ferreira (2008), com modificações. Os talos de algas foram pesados, obtendo-se 6 amostras com 75mg de massa fresca para cada espécie analisada. Posteriormente, a clorofila *a* e os carotenóides totais foram extraído em 2 mL de DMF (N,N- dimetilformamida) durante 24h no escuro a 4°C e o extrato obtido foi analisado em um espectrofotômetro UV - visível (FENTO modelo 600 Plus) nos comprimentos de 664nm para clorofila *a* e 480nm para carotenóides totais (Wellburn 1994). Após a extração da clorofila *a* procedeu-se a maceração dos mesmos talos em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 2ml de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 30 minutos a 12000 *g* e 4°C em uma centrifuga refrigerada (Sigma modelo 2K15). O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina), no comprimentos de onda de 651, 614 e 498 nm e quantificadas com as formulas determinadas conforme Kursar *et al.* (1983).

5.3.2. Quantificação de carboidratos não estruturais

Amostras de 1 grama de massa fresca de seis talos das três espécies foram fervidos em etanol 80% por 5 minutos para inativação enzimática. Após esse processo foi obtido o extrato por meio da maceração e este foi centrifugado a 3.000 *g* por 15 minutos, onde o sobrenadante foi separado, adicionou-se mais 10mL de álcool 80% ao precipitado aquecido em banho-maria por 15 minutos a 80°C e a centrifugação foi repetida, esse extrato alcoólico obtido foi concentrado em rota-evaporador e após a remoção do solvente o extrato resultante foi congelado até a utilização para determinação da glicose frutose e

sacarose, para extração do amido foi realizado a ressuspensão do macerado em 5mL água destilada e conservada em freezer até o momento de análise (MCCREADY et al., 1950).

Para o conteúdo da sacarose foi realizada a fervura da amostra por 5 minutos com solução de hidróxido de potássio (KOH 5,4 N) onde ocorre a degradação dos carboidratos redutores, e a leitura realizada a 620 nm utilizando-se como padrão solução de sacarose de 0 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (RIAZI, et al. 1985).

O conteúdo de frutose na forma livre e combinada presente nos extratos foi estimado pela reação de hidrólise ácida em antrona (0,2%) em banho-maria 37 °C por 45 minutos. Utilizando-se frutose como padrão em solução de 0 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e leitura em espectrofotômetro a 620 nm (JERMYN, 1956).

O conteúdo de glicose na forma livre presente nos extratos foi estimado pelo método enzimático (kit da BioSystem) em incubação à 25 °C por 5 minutos e leitura em 500 nm.

O amido obtido da massa residual e em água destilada foi reagido com 6,5mL de ácido perclórico 52%, por 15 minutos a 5° C, em constante homogeneização. Em seguida, foram acrescentados 15 mL de água centrifugando-se a 3.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e a operação repetida mais uma vez (MCCREADY et al. 1950).

A quantificação do amido foi realizada pela reação da antrona (0,2%) e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro, no $\lambda = 620$ nm utilizando-se solução de glicose de 0 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como padrão. O valor obtido em equivalentes de glicose foi multiplicado pelo fator de correção 0,9, para o ajuste referente à concentração de amido (MCCREADY et al. 1950).

5.4. Testes de Bioatividade

As algas provenientes da população natural (lote 4) e do cultivo *in vitro* foram secas em papel toalha, para a retirada do excesso de água e pesadas e separadas 5g (massa fresca) para o preparo do extrato bruto da alga. O extrato foi obtido pelo processo da extração exaustiva, no qual a alga fica em

contato durante uma semana com a mistura de solvente diclorometano e metanol (2:1), obtendo-se um extrato orgânico de média-alta polaridade, que foi separado da fase aquosa com o auxílio de um funil de separação e concentrado, retirada do solvente em evaporador rotatório a vácuo em temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ (MACHADO, 2008).

O inócuo do fungo *C. gloeosporioides*, causador da antracnose, foi obtido de lavouras de mamão infectadas no município de Linhares, ES, isolado e cedido pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

A colônia matriz foi conservada em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar), em um refrigerador a $5^{\circ}\text{C} \pm 2$, sendo realizadas sucessivas repicagens das colônias, evitando a perda dos conídios por ressecamento do meio de cultura. Para os testes *in vitro* se utilizou-se suspensão de conídios conservados em água destilada pelo método de Castellani (1939).

Os testes de bioatividade *in vitro* foram realizados no laboratório de Mutagênese (GEMUT) do Departamento de Ciências Biológicas, UFES, seguindo metodologia descrita por Machado (2008), no qual o extrato bruto foi diluído no meio BDA para se obter a concentração de 2 ppm. Após a solidificação do meio em placas de Petri de 50 mm de diâmetro foram depositados discos de papel filtro estéril nos quais foram inoculados 3 μl da suspensão de conídios na concentração de $2,5 \times 10^5$, contados em câmara de Neubauer.

A eficiência dos extratos das algas da natureza e do cultivo foi feita por meio de medições periódicas (a cada dois dias) do diâmetro do halo de crescimento do micelial do fungo por meio do uso de um paquímetro digital, determinação do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) conforme Abreu (2005) e comparação com o controle realizado apenas com meio de cultura e conídios do fungo sem a adição do extrato.

6. REFERÊNCIAS

ABRANTES, JL. 2006. **Estudo da atividade anti - HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas** - Dissertação (Mestrado em

Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2006.

ABREU, GF, TALAMINI, V & STADNIK, MJ. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 34, p. 22-26, 2008.

ABREU, G.F. **Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFSC; Santa Catarina, 2005.

ALGAEBASE. Disponível em: <http://www.algaebase.org> acessado a julho de 2009.

BAWEJA, P.; SAHOO, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ROBAINA, RP. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects. **Phycological Research** 57: 45–58. 2009.

BRAVIN I. C.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; YOKOYA, N.S.; Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do Agar. **Revista Brasil. Bot.**, 29(1), p.175-182, 2006.

BRAVIN I. C.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento *in vitro* de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). **Revista Brasil. Bot.**, 25(4).469-474. 2002.

CARVALHO, L.R.; ROQUE, N.F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**. 23 (6) 757-764. 2000.

CASSANO, V.; DIAZ-LARREA, J.; SENTÍES, A.; OLIVEIRA, M. C.; GIL-RODRIGUEZ, M. C.; FUJII, M.T. . Evidence for the conspecificity of *Palisada papillosa* with *P. perforata* (Ceramiliales, Rhodophyta) from the western and eastern Atlantic Ocean on the basis of morphological and molecular analyses. **Phycologia**, 48 p. 86-100, 2009.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42, 225-226, 1939.

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

EDWARDS, P. **Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions to Marine Science**, University of Texas, Austin 15: 1-228, 1970.

FENICAL, W. MCCONNELL, O.J. Ochtodene and ochtodiol: Novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. **J Org Chem** 43:4238–4241. 1978.

FERREIRA, L.B. **Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor.** Tese (Doutorado – Botânica) Universidade de São Paulo, SP - Brasil. 2008.

GERWICK W.H. 2-chloro-1,6(*S*^{*}),8-tribromo-3-(8)(*Z*)-ochtodene: A metabolite of the tropical red seaweed *Ochtodes secundiramea*. **Phytochem** 23:1323–1324, 1984.

GIL-RODRÍGUEZ, M.C., CASSANO, V., AYLAGAS, E., SENTÍES, A., DÍAZ-LARREA, J., OLIVEIRA, M.C. e FUJII, M.T. *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Canary Islands, Spain: a new record for the eastern Atlantic Ocean based on morphological and molecular evidence. **Botanica marina** 53: 31-40. 2010.

GRESSLER, V.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Ochtodes secundiramea*. In: **II Workshop em novos bioativos de macroalgas**, 2009, Ilhabela, SP.

HAYASHI, L. **Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana.** 100 p. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

JERMYN, M.A. A new method for determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature** 177: 38-39, 1956.

KRAFT, G.T. Rhodophyta: Morphology and classification. In: LOBBAN, C.S.; WYNNE, M. J. (eds.). **The Biology of Seaweeds**. Botanical Monographs 17, Oxford. Blackwell Scientific Publications. 6-51. 1981.

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

LOBBAN, C.S.; HARRISON, P.J. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366p. 1994.

MACHADO, L.P.; BISPO, W.M. da S.; MATSUMOTO, S.T.; SANTOS, R.B.; OLIVEIRA Jr, L.F.G.; REIS, F.O. triagem de macroalgas com potencial antifúngico no controle *in vitro* da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya*). **Revista brasileira de Agrociências**, no prelo.

MACHADO L.P., BISPO, W.M.S., REIS, F.O., SANTOS R.B. 2008. Avaliação do potencial antifúngico de extratos de macroalgas vermelhas bentônicas do litoral capixaba, **in anais XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**,

Vitória – ES. Disponível em http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Fitopatologia/20080813_140403.pdf.

MACHADO L.P. **Avaliação do Potencial Antifúngico de Extratos de Macroalgas no Controle da Antracnose do Mamoeiro.** 43 p. Monografia de graduação de Ciências Biológicas, UFES – ES. 2008.

MARTINS, A. P. **Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta).** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica de São Paulo – SP. 2007.

MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVEIRA, V. e OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. **Analytical Chemistry**. 22: 1156-1158, 1950.

MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.** Vitória Es: Incaper, 497 p. 2003.

NAM, K.W. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Algae. The Korean Journal of Phycology** 22: 53-55. 2007.

OLIVEIRA, E.C., HORTA, P.A., AMANCIO, C.E. SANT' ANNA, C.L. 2009. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação, Disponível em http://www.anp.gov.br/guias_r8/perfuracao_r8/%C3%81reas_Priorit%C3%A1rias/plantas_marinhas.pdf, acessado em junho de 2009

OLIVEIRA, E.C. de . Macroalgas marinhas da costa brasileira – estado do conhecimento, usos e conservação biológica. In: Araújo, E. L. et al., eds. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. Recife: Sociedade Botânica do Brasil & UFRPE. p:122–127, disponível em: <http://www.ib.usp.br/algamare-br/Macroalgas.html> 2002.

PAUL V.J.; HAY M.E.; DUFFY J.E.; FENICAL W.; GUSTAFSON K. Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): Effects of its monoterpenoid components upon diverse coral-reef herbivores. **J Exp Mar Biol Ecol** 114:249–260, 1987.

PAUL V.J.; MCCONNELL O.J.; FENICAL W. Cyclic monoterpenoid feeding deterrents from the red marine alga *Ochtodes crockeri*. **J Org Chem** 45:3401–3407. 1980.

PERFETO, P.N.M.; SCHWARZBOLD, A.; DILLENBURG, L.R. Efeitos da salinidade, temperatura e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux (Gelidiaceae, Rhodophyta). **Biociências**, 12(1), p. 3-10. 2005.

PERFETO, P.N.M. **Efeitos de variáveis abióticas na composição química de *Gelidium crinale* (Gelidiaceae, Rhodophyta) em cultivo unialgal.** Tese (Doutorado em botânica) UFRS – Rio Grande do Sul. 2004.

POLZIN, J.P.; RORRER, L.G. Halogenated Monoterpene Production by Microplantlets of the Marine Red Alga *Ochtodes secundiramea* Within an Airlift Photobioreactor Under Nutrient Medium Perfusion. **Biotechnology and Bioengineering**, 82(4). 2003.

RIAZI, A., MOTSUDA, K. e ARSLON, A. Water – stress induced changes in concentrations of prolines and other solutes in grower regions of young barley leaves. **Journal of Experimental Botany** 172: 1716-1725, 1985.

RIZVI, M. A. **Bioactivity, elementology and econo-medicinal importance of certain seaweeds from Karachi coast.** 330p. Tese (Doutorado em botânica) – University of Karachi, Karachi, Paquistão. 2003.

SCHMIDT, E.C. **Efeitos da radiação ultravioleta-b sobre a morfologia de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex p. Silva (Gigartinales) variantes pigmentares verde e vermelha.** 140 p. Dissertação de mestrado (Biologia Vegetal) UFSC – Florianópolis, 2009.

SELVIN J.; LIPTON, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 12, n.1, p. 1-6. 2004.

SILVA, E.V.; FRANÇA, A.M.; SOUZA, I.A.; BARZA, E.C.; ANJOS, F.B.R. Ocorrência de comportamento defensivo em macroalgas do gênero *Padina*. In: **III Simpósio Brasileiro de Oceanografia.** Oceanografia e mudanças globais. São Paulo : Grafica RCS . p. 145-155. 2008.

SOUTH, GR; WHITTICK, A. Introduction of phycology. Blackwell Scientific Publications. 341p. 1987.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose das curcubitáceas.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

TALAMINI, V.; PAULERT, R.; BORSATO, L.C.; STADNIK, M.J.; SMÂNIA JUNIOR, A. Controle da antracnose do feijoeiro pelo extrato da alga marinha *Ulva fasciata*. **Summa Phytopathologica**, v.31 (suplemento), p.23, 2005.

TAVARES, M.G.; SOUZA P.E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*carica papaya* L.) **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloid**, 6: 9-23. 1992.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, 27 (1) 139-145. 2004.

YOKOYA, N.S. **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. 1996.

YOKOYA, N.S.; PLASTINO, E.M.; ARTEL, R. Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *In*: A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreeland & I.R. Dawson (eds.). Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium. Oxford University Press Inc., New York, pp. 425-433. 2003.

YOKOYA, N.S.; ORLANDO NECCHI JR., O.; ALINE P. MARTINS, A.P.; GONZALEZ, S.F.; PLASTINO, E.M. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). **J Appl Phycol**, 19:197–205; 2007 (a).

YOKOYA, N.S.; YONESHIGUE V,Y. ; BRAVIN, I.C.; ROMANOS, M.T.V.; MENDES, G. Efeitos dos fitorreguladores na micropropagação de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) e atividade antiviral das frondes regeneradas a partir de calos. **In: XII Congresso Latino-americano de Ciências do Mar. Livro de Resumos do XII COLACMAR**, v. 1. p. 557-558 , Florianópolis – SC. 2007 (b).

WELLBURN, A. R.. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WOELKERLING, W. An Introduction. *In*: COLE, K.M.; SHEATH, R.G. **Biology of the red algae**. Cambridge: Cambridge University Press. 1-6. 1990.

WYNNE, M.J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision**. Berlin-Stuttgaart: Nova Hedwigia.152 pp. 2005.

7. Artigo - Caracterização ecofisiológica e de bioatividade - respostas a aclimação a cultivo *in vitro* em macroalgas com potencial aplicação na agricultura

Levi Pompermayer Machado ^{1*}, Silvia Tamie Matsumoto ², Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol ²,
Reginaldo Bezerra dos Santos ³ Luiz Fernando Ganassali Oliveira Junior ⁴

1 Núcleo de pesquisa em ficologia, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Av. Miguel Estefano, 3687, Água Funda 04301-012, Caixa-Postal: 3005- São Paulo, SP - Brasil; 2 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari 514 Goiabeiras 29075-910 - Vitória, ES - Brasil; 3 Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo Av. Fernando Ferrari 514 Goiabeiras 29075-910 - Vitória, ES - Brasil; 4 Departamento de Engenharia Agrônômica. Av. Marechal Rondon, Jardim Roza Elze, 49100-000, São Cristóvão, SE - Brasil

*e- mail: levipmachado@yahoo.com.br Tel: + 55 -27 - 4009 2588

Resumo: O presente estudo buscou caracterizar as alterações em três espécies de Rhodophyta promovidas pelo período de aclimação ao cultivo em laboratório, por meio da análise de parâmetros ecofisiológicos (conteúdo pigmentar, razões clorofila *a*/carotenóides – clorofila *a*/ficobiliproteínas, concentração de carboidratos não estruturais e razão sacarose/amido) correlacionando com a atividade antifúngica do extrato bruto para algas coletadas diretamente da *in natura* e algas após 28 dias de aclimação a condições *in vitro*. Os resultados obtidos indicam que as respostas ao processo de aclimação são diferenciadas para cada espécie de macroalga, principalmente com aumento das razões entre pigmento principal e acessórios e na concentração de açúcares armazenados e metabolizáveis, fatores que se revelaram positivamente correlacionados com o aumento da bioatividade obtida para o extrato de macroalgas após a aclimação. Em conclusão verificou-se a importância de se analisar a resposta de cada espécie ao processo de aclimação para aplicação de cultivos e que as técnicas de cultivo de macroalgas em ambientes controlados podem ser utilizadas para a indução na produção de metabólitos de interesse econômico ou bioativos.

Palavras chave: Ecofisiologia de macroalgas, biotecnologia, atividade antifúngica.

Abstract: This study sought to characterize the changes in three species of Rhodophyta promoted by a acclimation in laboratory culture period, through analysis of ecophysiological parameters (pigment content, ratios of chlorophyll *a* / carotenoids - chlorophyll *a* / phycobiliproteins, concentration of nonstructural carbohydrates and ratio sucrose / starch) correlating with the antifungal activity of crude extract for algae collected from nature and algae after 28 days of acclimation to laboratory conditions. The results indicate different responses to the acclimation process is for each species of seaweed, especially with increasing ratios between principal and accessory pigment and the concentration of stored and metabolized sugars, factors which have proved to be positively correlated with increased bioactivity of the extract obtained for macroalgae after adaptation. In conclusion it was noted the importance of analyzing the response of each species acclimated to application of crops and cultivation techniques of macroalgae in controlled environments can be used to induce the production of metabolites of economical interest or bioactive.

Keywords: Ecophysiology of algae, biotechnology, antifungal activity.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos e aplicações das macroalgas marinhas inicialmente focaram em especial as espécies do gênero *Porphyra*, focaram a obtenção de produtos para uso na alimentação humana, como por exemplo, o nori (SOUTH; WHITTICK, 1987). A partir da década de 1970, as macroalgas marinhas tiveram importância econômica, devido ao potencial de aplicação biotecnológico dos compostos de parede: alginatos, agaranas, carragenanas, e produtos diretos do metabolismo de carboidratos não estruturais (PERFETO et al. 2005; SCHMIDT, 2009).

Mais recentemente há um crescente interesse nos organismos marinhos, devido à presença de substâncias biologicamente ativas e pigmentos com a função de proteção a herbivoria e das constantes mudanças nas condições abióticas sofridas pelas algas (PAUL et al., 1987), que apresentam ainda ação antioxidante, antiviral, antibacteriana, antihelmíntica, antifúngica e citotóxica com aplicações nas áreas farmacêuticas, nutracêuticas e agrárias, que geraram diversos trabalhos de triagem de espécies com potencial a serem explorados (ABRANTES et al., 2010; ABREU et al., 2008; MACHADO, 2008; LHULLIER et al., 2006; RAYMUNDO et al., 2004; SELVIN; LIPTON, 2004; MAGALLANES, 2003; RIZVI, 2003; LIMA - FILHO et al., 2002; KIM et al., 2002; PINTO et al., 2000; BALLESTEROS et al., 1992).

Em paralelo o desenvolvimento de bicompostíveis de terceira geração a partir de macroalgas marinhas constitui outra aplicação econômica que tem movimentado diversas pesquisas buscando avaliar a potencialidade das diferentes espécies de macroalgas e os carboidratos metabolizados por está visando obter bioetanol (GOH; LEE, 2009).

Para a realização de estudos avançados de ecofisiologia de macroalgas se faz necessário a aplicação de cultivo de em laboratório pela possibilidade de se isolar os fatores ambientais, determinando a influência no metabolismo das algas (BAWEJA et al., 2009), além de possibilitar a indução a produção de metabólitos de interesse (RORRER & CHENEY, 2004; PERFETO et al., 2004). Adicionalmente, o emprego dessa técnica pode ser aplicado como ferramenta de conservação das espécies exploradas (DAY et al., 1999).

Neste contexto o presente estudo buscou colaborar caracterizando e correlacionar as alterações, promovidas pela aclimação ao cultivo *in vitro*, no conteúdo pigmentar, teor de carboidratos não estruturais e atividade biológica do extrato para controle de fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) causador da antracnose do mamoeiro, das macroalgas *Hypnea musciformis* (Wulfen) – (Gigartinales), *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe – (Gigartinales) e *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W - (Ceraminales).

2. METODOLOGIA

2.1. Material Biológico

Realizou-se uma coleta das macroalgas em costões lateríticos da praia Mole em Carapebus município de Serra, E.S. (20°14'34"S 40°12'54"O). Buscando caracterizar os efeitos do processo de aclimação ao cultivo em laboratório foram realizadas análises do conteúdo pigmentar (clorofila *a*, carotenóides totais e ficobiliproteínas –

aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina), dos carboidratos não estruturais (glicose, sacarose, amido e frutose) e teste de atividade antifúngica *in vitro* em algas coletadas diretamente da natureza e em algas após 4 semanas de aclimação ao cultivo *in vitro*.

Para tanto as algas coletadas em campo e pré - limpas foram separadas em dois lotes; 1º lote: algas para aclimatar ao cultivo em laboratório, conservadas em béqueres contendo água do mar depositadas em caixa térmica; 2º lote: algas para análise dos parâmetros ecofisiológicos e bioatividade, depositadas em envelopes de papel alumínio e conservadas em caixa térmica com gelo.

2.2. Aclimação ao Cultivo em Laboratório

Primeiramente foi realizado o processo de esterilização da água do mar para o cultivo, o processo consistiu na filtragem em membrana de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (Millipore HA) e submetida a banho-maria por 60 minutos após o resfriamento o processo foi repetido; posteriormente foi exposta à luz ultravioleta (UV) de ação germicida. O cultivo foi realizado com água do mesmo lote de coleta (YOKOYA et al. 2007; PERFETO et al. 2005).

Em laboratório, as algas coletadas e pré-lavadas em campo (lote 1) foram submetidas a limpeza manual. Antes de iniciar a aclimação ao cultivo, os talos das algas foram tratados por um dia em dióxido de germânio (GeO_2) na concentração de 4 mL.L^{-1} e com o antibiótico ciprofloxacino (*CIPRO*[®]) 10 mg.L^{-1} em água do mar estéril (BAWEJA et al. 2008), para combater diatomáceas e bactérias, por fim, os talos das algas ainda passaram pelo tratamento em uma solução de hipoclorito de sódio em água do mar estéril numa concentração de 1:1000 (v:v) durante um minuto (PERFETO et al. 2005).

Para a aclimação ao cultivo *in vitro*, após o processo de limpeza, os talos das algas foram cultivados em frascos erlenmeyers de 1 litro por um período de 28 dias em água do mar estéril (item 2.1), enriquecida com solução de von Stoch, modificada por Yokoya (1996), na concentração de 2 mL.L^{-1} , sendo realizadas trocas semanais do meio de cultura, Yokoya et al.(2007), foram realizadas 6 repetições para cada espécie de alga.

A sala de cultivo foi preparada com temperatura de $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (400-700 nm), proveniente de lâmpadas fluorescentes (luz do dia de 20W), com fotoperíodo de 14:12 (luz:escuro) e aeração, (BRAVIN & YONESHIGUE-VALENTIN 2002) intermitente 3:1 (desligado:ligado).

2.3. Análise de Parâmetros Ecofisiológicos

A extração dos pigmentos seguiu o protocolo estabelecido por Yokoya et al. (2007) com maceração em nitrogênio líquido de 75mg de alga suspendendo o material em tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 com posterior centrifugação a centrifugada por 30 minutos a $12000 g$ e 4°C em uma centrifuga refrigerada Fanem (modelo 2K15) para análise das ficobiliproteínas. Ressuspendendo o material em DMF (N,N-dimetilformamida) mantendo durante 24h no escuro a 5°C para extração de clorofila *a* e carotenóides totais.

A quantificação foi realizada em um espectrofotômetro UV- Visível FENTO (modelo 600 Plus) por meio dos comprimentos de onda e fórmulas determinados por Wellburn (1994) para clorofila *a* e carotenóides totais e Kursar *et al.* (1983) para as ficobiliproteínas.

A extração dos carboidratos não estruturais seguiu o estabelecido por McCready *et al.* (1950) com fervura e maceração das algas em etanol 80% com posterior centrifugação e separação do sobrenadante hidro- alcoólico e remoção do solvente por evaporação em baixa temperatura e congelamento até o momento de análise, o resíduo da centrifugação foi ressuspensionado em água destilada e ácido perclórico 52% e congelado para análise de amido.

A análise dos carboidratos foi realizado por meio de hidrólise ácida em antrona (0,2%) comparação com curva padrão de cada carboidrato analisado conforme os métodos sacarose (RIAZI, *et al.* 1985); amido (DUBOIS *et al.*, 1956) e a quantificação realizada em espectrofotômetro UV- Visível FENTO (modelo 600 Plus) no comprimento de onda de 620 nm. O conteúdo de glicose na forma livre presente nos extratos foi estimado pelo método enzimático (kit da BioSystem) em incubação à 25 °C por 5 minutos e leitura em 500 nm.

2.4. Análise de atividade antifúngica

Os inóculos do fungo foram obtidos de lavouras de mamão naturalmente infectadas, localizadas no município de Linhares, e foram cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) conservados e meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar).

Para a realização do teste de bioatividade foi obtido o extrato bruto das macroalgas a partir da extração exaustiva com os solventes diclorometano e metanol 2:1, os solventes foram removidos por evaporação a baixa temperatura (MACHADO, 2008).

O resíduo obtido foi diluído no meio BDA na concentração de 3 ppm, no qual o foi inoculado a suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* na concentração de 10^5 conídios mL⁻¹, a atividade antifúngica foi avaliada pela medida do diâmetro crescimento micelial do fungo no meio BDA calculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (Equação 1), expresso em cm.d⁻¹, e comparação dos extratos das algas com controle negativo contendo apenas meio de cultura e o fungo e controle positivo contendo Procloraz® (fungicida comercial) (ABREU *et al.* 2008).

$$IVCM = (D - Da) \cdot N^{-1}$$

Equação 1 – IVCM, Onde, D: Diâmetro médio atual; Da: Diâmetro médio anterior; N: número de dias após a inoculação.

2.5. Análise dos dados

Os resultados do experimento conduzido de forma inteiramente casualizada (diferença entre os valores obtidos nas algas coletadas na natureza e após aclimação ao cultivo em laboratório) dos parâmetros de teor de carboidratos não estruturais e conteúdo pigmentar e de bioatividade foram submetidos a análise de variância (ANOVA) unifatorial e a identificação de diferenças estatisticamente significativas realizada pelo teste de Tukey.

Em paralelo foram determinadas as relações clorofila *a* / carotenóides totais; clorofila *a* / ficobiliproteínas totais, sacarose / amido e teor parâmetros utilizados para caracterização ecofisiológica de vegetais.

Esses parâmetros foram correlacionados com a atividade antifúngica do extrato da macroalga *in natura* e cultivadas *in vitro* ao cultivo em laboratório por meio do índice de correlação de Spearman ($p \leq 0,05$) buscando caracterizar como as respostas ecofisiológicas influenciam a bioatividade das espécies.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da análise do conteúdo pigmentar e das relações entre o pigmento principal (clorofila *a*) e pigmentos acessórios (carotenóides totais e ficobiliproteínas totais) estão compilados na tabela 1 (Anexo), com a verificação de existência de diferenças significativas entre as algas da natureza e aclimatadas em laboratório.

Para os resultados da análise pigmentar não foi diagnosticado alterações significativas nas concentrações para os pigmentos clorofila *a* e carotenóides totais entre as algas nas condições *in natura* e *in vitro*.

Segundo Dawes (1992) e Hendry & Price (1993) as alterações nas concentrações desses pigmentos relacionam-se diretamente com resposta as condições severas de estresse ambiental, indicando que o processo de aclimação ao cultivo *in vitro*, durante quatro semanas, não gerou elevado estresse para as macroalgas.

A espécie *O. secundiramea* apresentou redução significativa para o parâmetro clorofila *a*/carotenóides em resposta ao processo de aclimação ao cultivo em laboratório. Lambers et al. (1998) afirmam que o parâmetro clorofila *a*/carotenóides funciona como um forte índice de estresse em vegetais, esta relação é afetada por fatores ambiental, sendo diretamente proporcional à intensidade luminosidade e inversamente proporcional à disponibilidade de nitrogênio.

Em paralelo foram detectadas alterações significativas para a espécie *P. flagellifera* nos teores dos compostos fotoprotetores aloficocianinas e ficoeritrina e na razão clorofila *a*/ficobiliproteínas totais. Essa alteração se relaciona fazem parte do processo de aclimação de curto prazo (TALARICO e MARAZANA, 2000). Esses pigmentos são a principal reserva de nitrogênio em macroalgas e a sua redução dos pigmentos significa a utilização do nitrogênio em outras vias metabólicas (DAWES, 1992).

A tabela 2 (anexo) apresenta os resultados dos teores dos carboidratos sacarose, glicose e amido e a relação sacarose/amido e a verificação da existência e diferença significativas para as concentrações das algas na natureza e aclimatadas ao cultivo em laboratório.

A espécie *P. flagellifera* apresentou uma aumento significativo no teor de sacarose acompanhando de decréscimo na concentração de amido. Esses carboidratos fornecem informações a cerca do padrão ecofisiológico da espécie, a redução do amido estar associado ao aumento das taxas metabólicas (SCOTT, 2008), enquanto os aumentos de sacarose, que além de ser o principal açúcar metabolizado, pode estar relacionado à resposta de defesa (FERNANDES et al., 2005).

Em contra partida a espécie *O. secundiramea* apresentou um aumento nos teores de glicose e frutose em respostas ao processo de aclimação, acompanhado da redução da concentração de amido. O comportamento dessa espécie no processo aclimação está relacionado com a interação sinérgica de parâmetros ambientais e o histórico de vida da espécie, apresenta um paralelo com o diagnosticado por Perfeto et al. (2005).

O aumento significativo nos teores de determinados carboidratos nas espécies *O. secundiramea* e *P. flagellifera* após o processo de aclimação ao cultivo em laboratório indicam potencialidades da biotecnologia para exploração de bioetanol de terceira geração (GOH; LEE, 2009; BAWEJA et al. 2009).

A razão sacarose/amido fornece a avaliação do processo metabólico da vegetal frente a condições ambientais (MENENDEZ et al., 2002; LAMBERS, et al. 1998), neste estudo observou-se diferentes padrões de respostas ao processo de aclimação, sendo diagnosticado redução para *O. secundiramea*, aumento para *P. flagellifera* e ausência de alterações para *H. musciformis*.

A espécie *H. musciformis* não apresentou nenhuma alteração significativa nas concentrações de carboidratos e pigmentos em respostas a aclimação indicando elevado potencial adaptativo, o resultado corrobora com os obtidos por Luong-Van & Renaud (2006), analisando a composição química em respostas a variações sazonais de 30 espécies de macroalgas australianas, verificaram que *Hypnea* foi o único gênero que não apresentou alterações significativas para o teor de carboidratos.

Essa capacidade fisiológica de aclimação permite a *H. musciformis* apresentar uma ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro, ocorrendo desde o litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Maranhão (Algamaris, 2010), podendo ser encontrada em regiões do infralitoral e mesolitoral, estando sujeita a variações ambientais e apresentando ampla tolerância à temperatura (18 a 30°C) e salinidade (20 a 50 ups) (YOKOYA; OLIVEIRA, 1992).

A tabela 3 (anexo) apresenta os resultados de atividade antifúngica no controle do fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* dos extratos brutos das espécies de macroalgas

Os resultados obtidos pela avaliação da atividade antifúngica corroboram os de Machado (2008) que obteve inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* de aproximadamente 90% para *O. secundiramea* e próximo a 50% para *H. musciformis*.

Na análise comparativa entre as espécies de macroalgas constatou-se maior potencial para *O. secundiramea* que não apresentou diferença significativa com o controle positivo (antifúngico comercial Procloraz®), em contra partida a espécie *P. flagellifera* na condição da natureza apresentou o menor potencial de inibição.

O processo de aclimação ao cultivo em laboratório potencializou a atividade biológica do extrato das espécies *O. secundiramea* e *P. flagellifera*, com as algas aclimatadas apresentando maior de inibição do crescimento micelial sendo estatisticamente diferente da bioatividade da alga da natureza.

O processo de aclimação ao cultivo em laboratório não promoveu alterações nas concentrações dos carboidratos, pigmentos bem como não influenciou a bioatividade do extrato da espécie *H. musciformis*, não sendo constatadas diferenças significativas entre o extrato de algas da natureza e aclimatadas.

Buscando identificar quais dos parâmetros analisados, concentração de glicose, relações sacarose/amido, clorofila *a*/carotenóides totais, clorofila *a*/ficobiliproteínas totais, realizou-se a análises do índice de Spearman correlacionando os dados ecofisiológicos das espécies em cada condição, natureza e aclimatadas, com a bioatividade da alga na mesma condição. Os resultados obtidos estão plotados no gráfico 1 (anexo).

Para as espécies *P. flagellifera* e *O. secundiramea* foi detectado o aumento da bioatividade em função do processo de aclimação ao cultivo em laboratório, após a análise de correlação entre a bioatividade e os parâmetros ecofisiológicos para as condições de algas natureza e aclimatadas verificou-se a existência de relações significativas entre a ecofisiologia e a bioatividade.

Para *O. secundiramea* o aumento da bioatividade está positivamente correlacionada com o decréscimo do parâmetro clorofila *a*/carotenóides e aumento da concentração de glicose, ambos significativos, no processo de aclimação ao cultivo em laboratório.

O aumento da bioatividade do extrato da espécie *O. secundiramea* em função do aumento da concentração de glicose está ligado com a disponibilidade do carboidratos para vias metabólicas secundarias, como a do piruvato – acetilcoenzima A (Acetil-CoA), responsável pela síntese de isoprenóides e ácidos graxos com atividade biológica (CARDOZO et al. 2007).

A análise comparativa da correção de Spearman ente as condições natureza e aclimatada foi possível verificar que o aumento da bioatividade do extrato de *P. flagellifera* na condição aclimatada está positivamente relacionado ao aumento da razão clorofila *a*/ficobiliproteínas totais promovido principalmente pelo decréscimo da concentração da aloficocianina e ficoeritrina.

A correlação positiva entre a o aumento da razão clorofila *a*/ficobiliproteínas totais com o maior potencial antifúngico para o extrato da espécie *P. flagellifera* aclimatada ao cultivo em laboratório possivelmente está associada com a disponibilização do nitrogênio para outras rotas metabólicas envolvendo a produção de aminoácidos (DAWES,1992).

A espécie *H. musciformis* não apresentou variação significativa em nenhum parâmetro ecofisiológico avaliado não sendo também detectada alteração significativas na bioatividade da espécie, possivelmente a resposta desta espécie ao processo de aclimação ao cultivo em laboratório envolve alterações no rendimento fotossintético como o diagnosticado por Yokoya et al. (2007).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que cada espécie de macroalga marinha apresentou diferentes respostas de aclimação ao cultivo *in vitro*, e isso deve ser levado em conta na seleção de espécies e formas de implantação, manejo e condução e experimentos em laboratório.

Para as espécies *O. secundiramea* e *P. flagellifera* é possível a realização de cultivos laboratoriais em maior escala, biorreatores, para obtenção de metabólitos bioativos de interesse econômico ou obtenção de carboidratos com potencial aplicação na exploração de bioetanol de terceira geração.

A espécie *H. musciformis* apresentou elevado potencial aclimatativo em resposta ao cultivo *in vitro*, é sabido que esta espécie apresenta o mesmo potencial com relação à mudança de parâmetros ambientais em campo. As ausências de alterações significativas obtidas nesse estudo indicam a possibilidade de cultivo dessa espécie maior escala para obtenção de biomassa e ficocolóides, similar ao que já é realizado em cultivos realizados em campo.

5. REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. L. ; BARBOSA, J.P. ; CAVALCANTI, D ; PEREIRA, R.C., ; FONTES, C F ; TEIXEIRA, V.L ; SOUZA, T.M.L ; FRUGULHETTI, I.C.P.P . The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian Brown Algae *Dictyota pffaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Medica** (Internet), v. 76, p. 339-344, 2010.

ABREU, G.F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 22-26, 2008.

ALGAMARIS – Disponível em - <http://www.ib.usp.br/algaemaris/algaemarisbrasilis.html>, Acessado em agosto de 2010.

BALLESTEROS E.; MARTIN D.; URIZ, M.J. Biological activity of extracts from some mediterranean macrophytes. **Botanica Marina** v. 35, p. 481 - 485, 1992.

BAWEJA, P.; SAHOO, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ROBAINA, P.R. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects. **Phycological Research**; n.57 p: 45–58. 2009.

BRAVIN I. C.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; YOKOYA, N.S.; Formação de calos e regeneração de segmentos apicais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): obtenção de culturas axênicas e efeitos da concentração do Agar. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.175-182, 2006.

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, Pio ; PINTO, E. . Metabolites from algae with economical impact.. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CLIPPEL, J. K. ; CUZZUOL, G. R. F. Aspectos ecofisiológicos de *Sinningia aghensis* Chautems em condições de campo. **Hoehnea**, n.36, p. 73-81. 2009.

DAWES, C.J. Irradiance acclimation of the cultured Philippine seaweeds, *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. **Botanica Marina**, n. 35, p:189-195, 1992.

DAY, J.G.; BENSON, E.E.; FLECK R.A. In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n. 2 v.35, 1999.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. e SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, n. 28, p: 350-356, 1956.

FERNANDES, P.M.B.; SANTOS, M.P.; VENTURA, J.A. indução de resposta a estresse em mamoeiro após tratamento com levedura e óxido nítrico. Papaya Brasil, 2005. Disponível em : http://www.fundagres.org.br/downloads/pi-mamao/2005_biotecnologia_04.pdf

GOH, C.S.; LEE, K.T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 842-848, 2010.

HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H., Stress indicators: chlorophylls and carotenoids .In:Hendry, G.A.F., Grime,J.P. (Eds.), **Methods in Comparative Plant Ecology**. Chapman & Hall, London, pp. 148–152, 1993.

JERMYN, M.A. A new method for determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature** 177: 38-39, 1956.

KIM, J.; AHN, M.; YOON, K.; KIM, C.Y.; MIN, S.; KIM, Y.; KIM, H-J.; KIM, J-H.; SHIN, C.; LEE, C.; KIM, T.G.; KIM, S-H.; HUH, H. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. **Journal of Applied Phycology**, n. 5, p: 325-329, 2002.

KURSAR, T.A., VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R.S. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. **Plant Physiology**, n.73, p: 353-360. 1983.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. Springer Verlag: New York, 1998.

LHULLIER, C.; HORTA, P.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p: 158-161, 2006.

LIMA-FILHO, J.M.; CARVALHO, A.F.F.U.; FREITAS, S.M.; MELO, V.M.M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian coast; **Brazilian Journal of Microbiology**, n.33 p:311-313, 2002.

LUONG-VAN, J.T.; RENAUD, S.M. Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, n.18, p: 381–387, 2006.

MACHADO L.P. **Avaliação do Potencial Antifúngico de Extratos de Macroalgas no Controle da Antracnose do Mamoeiro**. 43 p. Monografia de Conclusão de Curso - Ciências Biológicas, UFES – ES. 2008.

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Revista peruana de biología**. n.10, v. 2, p: 125- 132, 2003.

MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVEIRA, V. e OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. **Analytical Chemistry**, n.22, p: 1156-1158, 1950.

MENÉNDEZ, M.; HERRERA, J. e COMÍN, F.A. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O.F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon. **Scientia Marina**, n.66, v. 4, p: 355-364, 2002.

PAUL V.J.; HAY M.E.; DUFFY J.E.; FENICAL W.; GUSTAFSON K. Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): Effects of its monoterpenoid components upon diverse coral-reef herbivores. **Journal Experimental Marine Biology Ecology** n.114, p:249–260, 1987.

PERFETO, P.N.M.; SCHWARZBOLD, A.; DILLENBURG, L.R. Efeitos da salinidade, temperatura e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux (Gelidiaceae, Rhodophyta). **Biociências**, n.12, v.1, p: 3-10. 2005.

PINTO, E; CATALANI, L. H.; LOPES, N. P.; Di MASCIO, P.; COLEPICOLO, P. Peridinin as the Major Biological Carotenoid Quencher of Singlet Oxygen in Marine Algae *Gonyaulax polyedra*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 268, n. 2, p: 496-500, 2000.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. n. 4, v. 40, p: 495 – 504. 2004.

RIAZI, A., MOTSUDA, K. e ARSLON, A. Water – stress induced changes in concentrations of prolines and other solutes in grower regions of young barley leaves. **Journal of Experimental Botany**, n. 172, p: 1716-1725, 1985.

RIZVI, M. A. **Bioactivity, elementology and econo-medicinal importance of certain seaweeds from Karachi coast**. 330p. Tese (Doutorado em botânica) – University of Karachi, Karachi, Paquistão. 2003.

SCHMIDT, E.C. **Efeitos da radiação ultravioleta-b sobre a morfisiologia de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex p. Silva (Gigartinales) variantes pigmentares verde e vermelha**. 140 p. Dissertação de mestrado (Biologia Vegetal), UFSC – Florianópolis, 2009.

SELVIN J.; LIPTON, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 12, n.1, p: 1-6. 2004.

SOUTH, GR; WHITTICK, A. **Introduction of Phycology**. Blackwell Scientific Publications. 341p. 1987.

TALARICO, L.; MARAZANA, G. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n.56, p: 1– 11, 2000.

KURSAR, T.A., VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R.S. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutation ns. **Plant Physiology**, n. 73, p: 353-360, 1983.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p: 307-313, 1994.

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

YOKOYA, N.S.. **Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodófitas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis***. 202p.Tese (Doutorado em Botânica), Universidade de São Paulo, SP, 1996.

YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. **Journal of Applied Phycology**, n.4, p: 339- 345, 1992.

8. ANEXOS

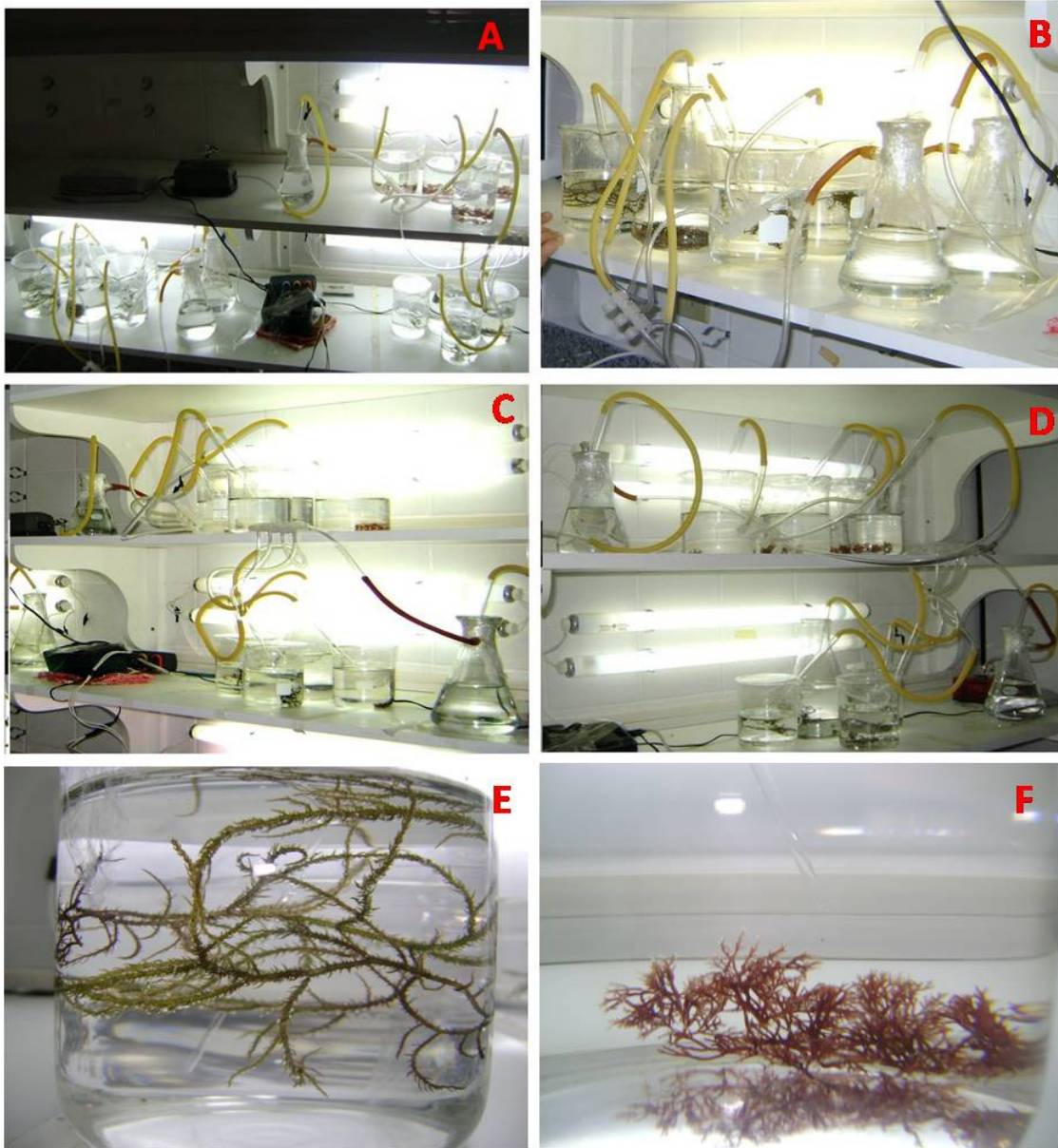


Figura 1 – Vista geral do cultivo in vitro realizado no laboratório de micro propagação figuras A, B, C e D. Detalhes da espécies *Hypnea musciformis* (E) e *Ochtodes secundiramea* (F).

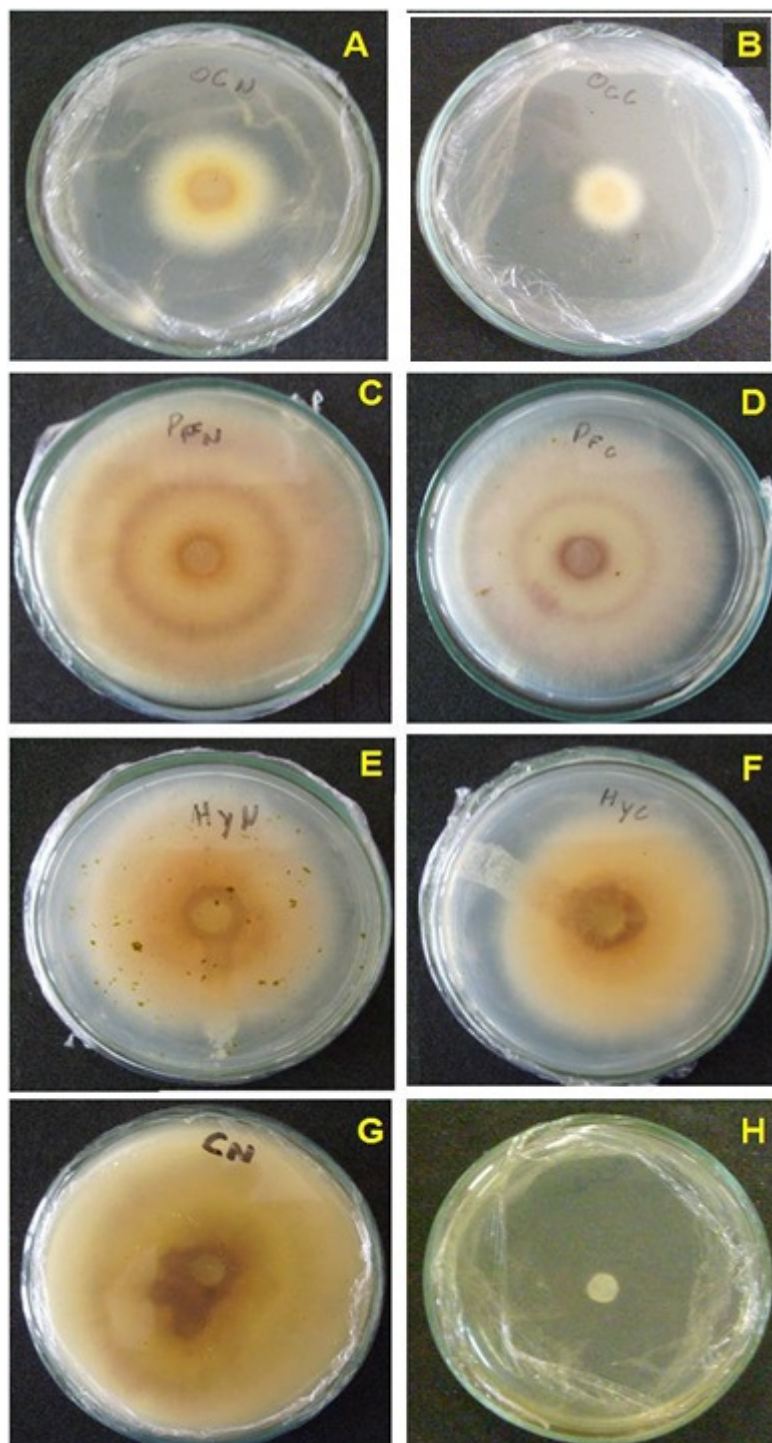


Figura 2 - Desenvolvimento da colônia do fungo *C. gloeosporioides* após seis dias de incubação. **A** - *Ochtodes secundiranea*; extrato da alga *in natura* **B** - *Ochtodes secundiranea*; extrato do cultivo *in vitro* **C** - *Palisada flagellifera*; extrato da alga *in natura* **D** - *Palisada flagellifera*; extrato do cultivo *in vitro* **E** - *Hypnea musciformis*; extrato da alga *in natura* **F** - *Hypnea musciformis*; extrato do cultivo *in vitro* **G** - Controle Negativo; **H** - Controle Positivo (Procloroz®).

Tabela 2 – Resultado da análise da concentração de clorofila a, carotenóides e ficobiliproteínas, expresso em miligrama de pigmento por grama de massa fresca da alga e das razão clorofila a / carotenóides totais e clorofila a / ficobiliproteínas totais *in natura* e aclimatadas ao cultivo *in vitro*, valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significantes entre as duas condições *in natura* e *in vitro* (Tukey $P \leq 0,01$).

Pigmentos (mg.g ⁻¹)	Condição	Espécies de Macroalgas		
		<i>H. musciformis</i>	<i>P. flagellifera</i>	<i>O. secundiramea</i>
Clorofila a	<i>in natura</i>	246,68 A	148,67 A	299,92 A
	<i>in vitro</i>	187,68 A	134,93 A	218,59 A
Carotenóides totais	<i>in natura</i>	79,29 A	37,02 A	58,17 A
	<i>in vitro</i>	61,48 A	46,28 A	56,7 A
Clorofila a/ carotenóides totais	<i>in natura</i>	3,11 A	4,01 A	5,15 A
	<i>in vitro</i>	3,05 A	2,91 A	3,85 B
Aloficocianina	<i>in natura</i>	1,57 A	1,62 A	0,56 A
	<i>in vitro</i>	0,30 A	0,61 B	0,45 A
Ficocianina	<i>in natura</i>	0,37 A	0,72 A	0,16 A
	<i>in vitro</i>	0,08 A	0,09 B	0,07 A
Ficoeritrina	<i>in natura</i>	0,84 A	1,30 A	0,50 A
	<i>in vitro</i>	0,14 A	0,39 B	0,26 A
Clorofila a/ ficobiliproteínas totais	<i>in natura</i>	88,73 A	40,82 A	245,84 A
	<i>in vitro</i>	360,92 A	124,02 B	279,88 B

Tabela 3 - Análise do teor de carboidratos, sacarose, glicose e amido expresso em miligrama de carboidrato por grama de massa seca de alga, em algas e a razão entre sacarose/amido, de algas *in natura* e *in vitro*, valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significantes entre as duas condições natureza e aclimatadas (Tukey $P \leq 0,01$).

Carboidratos (mg.g ⁻¹)	Condição	Espécies de Macroalgas		
		<i>H. musciformis</i>	<i>P. flagellifera</i>	<i>O. secundiramea</i>
Frutose	<i>in natura</i>	0,04 A	0,32 A	0,01 A
	<i>in vitro</i>	0,05 A	0,17 A	0,02 B
Sacarose	<i>in natura</i>	1,11 A	1,71 A	1,05 A
	<i>in vitro</i>	1,10 A	2,06 B	0,94 A
Glicose	<i>in natura</i>	4,09 A	2,52 A	0,77 A
	<i>in vitro</i>	2,88 A	1,95 A	3,91 B
Amido	<i>in natura</i>	5,56 A	13,27 A	2,71 A
	<i>in vitro</i>	4,57 A	10,01 B	4,23 B
Sacarose/amido	<i>in natura</i>	0,22 A	0,13 A	0,39 A
	<i>in vitro</i>	0,24 A	0,21 B	0,22 B

Tabela 4 - Resultados de bioatividade dos extratos brutos das macroalgas das condições: natureza e aclimatadas ao cultivo em laboratório; letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (Tukey $P \leq 0,01$). Letras maiúsculas identificam a comparação entre a bioatividade entre as condições (*in natura* e *in vitro*), letras minúsculas identificam a comparação entre as espécies na mesma condição e os controles negativo e positivo.

		<i>H. musciformis</i>	<i>P. flagellifera</i>	<i>O. secundiramea</i>	Controle negativo	Controle positivo
IVCM ($\text{cm} \cdot \text{dia}^{-1}$)	<i>in natura</i>	4,70 Aa	6,31 Ab	1,31 Ac	8,47 d	0,00 c
	<i>in vitro</i>	4,62 Aa	4,96 Ba	0,92 Bb	8,47 c	0,00 b
% de Inibição	<i>in natura</i>	44,48 Aa	25,58 Ab	84,52 Ac	0,00 d	100 c
	<i>in vitro</i>	45,48 Aa	41,47 Ba	89,19 Bb	0,00 c	100 b

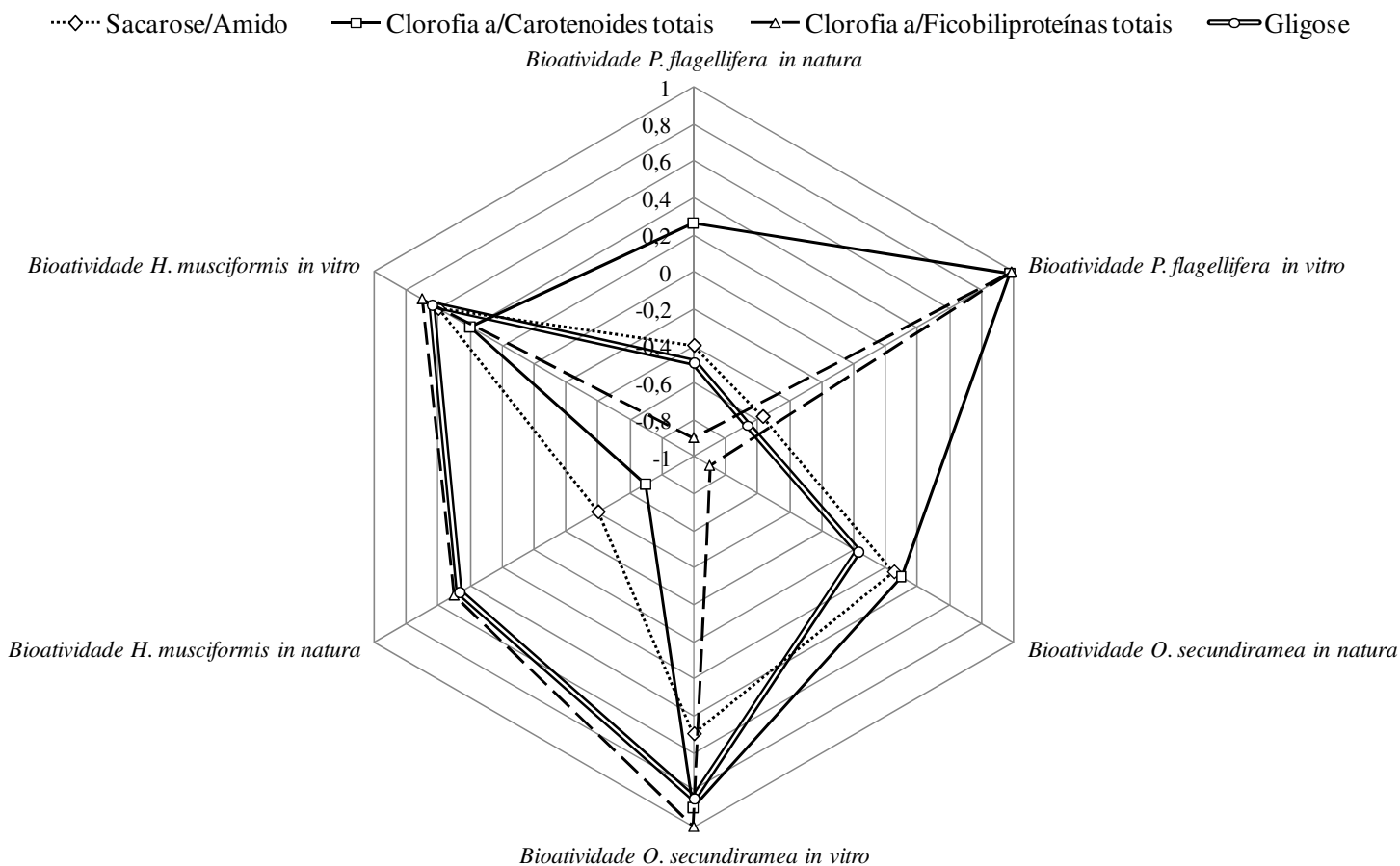


Figura 3 - Gráfico de correlação de Spearman (variando entre -1 e 1) da atividade antifúngica dos extratos das algas nas duas condições (*in natura* e *in vitro*) com os parâmetros sacarose/amido; Clorofila *a*/Carotenóides totais; Clorofila *a*/Ficobiliproteínas totais e Glicose.