

Thallis Felipe Boa Ventura

**ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO SEGUIDO DE  
AUMENTO DE IRRADIÂNCIA COMO ESTRATÉGIA DE  
OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DA MACROALGA *Kappaphycus  
alvarezii***

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Aquicultura

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Hayashi

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Simioni

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boa Ventura, Thallis Felipe

Adição de dióxido de carbono seguido de aumento de irradiância como estratégia de otimização do cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* / Thallis Felipe Boa Ventura ; orientadora, Leila Hayashi, coorientador, Carmen Simioni , 2018.  
58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Carbono Inorgânico. 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 4. Carotenoides. 5. Amido das Florídeas. I. Hayashi, Leila . II. Simioni , Carmen . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Adição de dióxido de carbono seguido de aumento de irradiância como estratégia de otimização do cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii***

Por

THALLIS FELIPE BOA VENTURA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

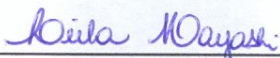
e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

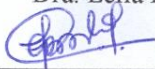
Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



---

Dra. Leila Hayashi - *Orientadora*



---

Dra. Fernanda Ramlov - UFSC



---

Dra. Natália Pirani Ghilardi Lopes - UFABC



Dedico esse trabalho a todos os anjos  
que me ajudaram a traçar esse  
caminho, tanto os que estão perto  
como aqueles que estão longe.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me permitido alcançar esse sonho de estar conquistando esse conhecimento e, por consequência, esse título.

Agradeço a minha família por ter me dado boa educação e me fazer forte o suficiente para enfrentar e vencer todos os obstáculos.

Agradeço aos meus grandes velhos amigos de quase uma vida inteira, aqueles que escolheram estar ao meu lado por aquilo que eu sou, amigos que são mais do que amigos, são irmãos de alma que nem o tempo, nem a distância fizeram diminuir o amor que cresceu entre a gente, amigos que me fazem acreditar que o amor é uma semente forte que cresce nos mais inusitados terrenos, que o amor é a força que une todos os seres desse mundo. Muito obrigado, Suzana, Daniel, Deisy, Mariana, Bárbara, Babi, Pkena! Vocês são maravilhosos!

Agradeço aos novos amigos que me aguentaram durante essa nova fase em Florianópolis, amigos que comemoraram comigo as conquistas e vitórias, amigos que estavam no meu lado mesmo percebendo que eu tenho meus momentos de loucura e devaneio. Obrigado, Gabi, Fred, Fernanda, Matheus, Bruna. Vocês são inesquecíveis!

Obrigado a princesinha do Castelinho Encantado: Aline, que sempre sextou, sabadou e domingou comigo e compartilhou tantos conselhos e experiências!

Obrigado especial ao Kaique que foi meu grande companheiro e apoiador, uma das melhores pessoas que eu conheci em toda a minha vida e cujas aventuras que vivemos juntos nunca serão esquecidas, mas sim celebradas a cada novo dia das nossas vidas! Kaique, você é um homão da porra! (não sei se posso escrever isso, mas é a melhor definição)

Agradeço do fundo do meu coração por ter a oportunidade de ter tido como orientadora uma das pessoas mais formidáveis que já pisou esse planeta: a professora, orientadora, mãe, protetora, japonesa e portadora de uma das risadas mais gostosas, Leila Hayashi, obrigado por acreditar em mim, se cheguei até aqui era porque eu queria te deixar orgulhosa por ter acreditado em mim. Você mudou a minha vida, me deu esperança, me deu um sentido. Existe um lugar especial no meu coração para você. E, sim, vou cuidar de você quando você estiver velhinha demais pra cuidar das algas sozinha!

Muito obrigado a todos os professores que me forneceram o conhecimento necessário para essa conquista, em especial para a co-

orientadora Carmen Simioni, que tanto me ensinou e ajudou! Nunca se esquecem da máxima que diz: “professores plantam sonhos em uma sociedade cansada de sonhar”. Vocês são maravilhosos!

Um obrigado especial para todos os colegas e amigos da Seção de Macroalgas do LCM, sem vocês, nada disso poderia ter sido possível, entre ajuda, discussões e muita risada, nossos sonhos estão sendo construídos naquele laboratório. Obrigado por dividirem essa experiência comigo. Obrigado, Fernando, Marina, Rodrigo, Luíza, Alejandro, Filipe, Clóvis. Seus sonhos são bens valiosos!

Agradeço imensamente ao Alex Alves dos Santos pelas ideias, apoio e por acreditar no futuro da algocultura catarinense; assim como à EPAGRI pelo apoio financeiro que permitiu que projeto fosse realizado.

Finalmente, agradeço a toda a trilha sonora que me acompanhou entre experimentos, análises estatísticas e escrita. Pois, sem música, a vida perde um pouco do seu sentido.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.



“O melhor presente Deus me deu: a vida me ensinou a lutar pelo o que é meu.”

(Charlie Brown Jr.)



## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adição de CO<sub>2</sub> e da irradiância no cultivo de *Kappaphycus alvarezii*. Talos tetrasporófitos foram cultivados durante duas semanas com adição de CO<sub>2</sub> nas seguintes concentrações: 1 L s<sup>-1</sup> (1CO<sub>2</sub>), 2 L s<sup>-1</sup> (2CO<sub>2</sub>) e 3 L s<sup>-1</sup> (3CO<sub>2</sub>), e posteriormente colocados em cultivo em uma alta irradiância (200 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) por mais duas semanas sem injeção de CO<sub>2</sub>. O controle não teve a adição de CO<sub>2</sub> na primeira etapa. Tanto após o experimento com CO<sub>2</sub> e quanto após o cultivo com alta irradiância, foram realizadas análises das taxas de crescimento, quantificação de clorofila *a* e carotenoides, microscopia de luz para observação de grãos de amido e de polissacarídeos ácidos e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a observação das alterações ultraestruturais. Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de crescimento das macroalgas nos diferentes tratamentos e controle nas diferentes etapas. Apenas o tratamento 1CO<sub>2</sub> apresentou diferenças significativas na taxa de crescimento considerando as duas etapas. *K. alvarezii* cultivada com CO<sub>2</sub> apresentaram um grande espessamento da parede celular e aumento na quantidade de grãos de amido, como também maiores quantidades de clorofila *a* e carotenoides quando comparadas ao controle. Após a exposição à alta irradiância, as amostras do controle apresentaram sinais de estresse, como alterações na estrutura dos cloroplastos e diminuição nas suas reservas de amido, assim como tiveram aumento na quantidade de clorofila *a* e carotenoides. No entanto, as amostras cultivadas inicialmente com CO<sub>2</sub> apresentaram aumento na quantidade e no tamanho dos grãos de amido, e na quantidade de organelas relacionadas à geração de energia (mitocôndrias) e construção celular (corpos de Golgi). Tais alterações sugerem uma resposta da célula após a adição de CO<sub>2</sub> com formação de reservas e espessamento na parede celular que possivelmente tornará as plantas mais aptas a lidar com o estresse ambiental durante seu transporte em condições *indoor* para plantio no mar.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Carbono Inorgânico, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Carotenoides, Amido das Florídeas.



## ABSTRACT

This work aimed to verify the influence of CO<sub>2</sub> addition and irradiance in *Kappaphycus alvarezii* cultivation. Tetrasporophytic thalli were cultured in vitro for two weeks with addition of CO<sub>2</sub> according to the following concentrations: 1 L s<sup>-1</sup> (1CO<sub>2</sub>), 2 L s<sup>-1</sup> (2CO<sub>2</sub>) e 3 L s<sup>-1</sup> (3CO<sub>2</sub>), and subsequently cultured under high irradiance (200 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for more two weeks. The control had no CO<sub>2</sub> addition in the first period. After both experiments, with addition of CO<sub>2</sub> and cultivation under high irradiance, the growth rate, chlorophyll *a* and carotenoids quantification were determined, as well as light microscopy for observation of starch granules and acid polysaccharides, and transmission electronic microscopy for observation of ultra-structural alterations. No significant differences were observed in growth rates of different treatments and control among the periods. Only 1CO<sub>2</sub> treatment showed significant differences in growth rates considering the two two periods. *K. alvarezii* cultivated with CO<sub>2</sub> addition showed cell wall thickening and increasing quantity of starch granules, chlorophyll *a* and carotenoids than the control. After exposure to high irradiance, control samples showed stress signs as chloroplasts alterations, decrease in starch granules quantities and an increase in quantity of total chlorophyll *a* and carotenoids. However, samples cultivated with CO<sub>2</sub> showed increase in the quantity and size of the starch granules and an increase in the number of energy generation related organelles (mitochondria) and cell construction (Golgi complex). Such alterations suggest cell response after CO<sub>2</sub> addition as starch reserves formation and cell wall thickening which possibly makes plants more suitable to lead with the environmental stress during its transport from indoor conditions to planting in the sea.

**Keywords:** Aquaculture, Inorganic Carbon, Transmission Electronic Microscopy, Carotenoids, Floridean Starch.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Diagrama de alguns mecanismos de concentração de carbono em células de macroalgas ..... 25

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas in vitro após adição de CO<sub>2</sub> e após exposição a alta irradiância. .... 34

**Figura 2.** Clorofila total em *K. alvarezii* cultivada in vitro após adição de CO<sub>2</sub> e após exposição à alta irradiância. .... 35

**Figura 3.** Carotenóides totais em *K. alvarezii* cultivada in vitro após adição de CO<sub>2</sub> e após exposição à alta irradiância.. .... 36

**Figura 4.** Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Azul de Toluidina (AT-O)..... 37

**Figura 5.** Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). .... 38

**Figura 6.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos controle de *K. alvarezii* após duas semanas de cultivo..... 40

**Figura 7.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii*, do tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de cultivo com adição de CO<sub>2</sub>..... 41

**Figura 8.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii* do controle após duas semanas de exposição à alta irradiância..... 42

**Figura 9.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii* do tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de exposição à alta irradiância..... 43

**Figura 10.** Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas in vitro em diferentes densidades após uma semana de cultivo..... 58

**Figura 11.** Médias das variações de pH no cultivo de *K. alvarezii* in vitro em diferentes densidades durante uma semana. .... 58





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – anidrase carbônica.  
AT-O – coloração azul de toluidina.  
Ci – carbono inorgânico.  
CiD – carbono inorgânico dissolvido.  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono.  
FAO – Food and Agriculture Organization.  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – bicarbonato.  
IMTA – integrated multi trophic aquaculture.  
MET – microscopia eletrônica de transmissão.  
ML – microscopia de luz.  
O<sub>2</sub> – gás oxigênio.  
PAS – coloração Ácido Periódico de Schiff.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
1.1 O CULTIVO DE <i>Kappaphycus alvarezii</i> em SANTA CATARINA, BRASIL	22
1.2 A IMPORTÂNCIA DO CARBONO E DA LUZ NO CULTIVO DE MACROALGAS	23
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivo geral	26
1.3.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 1	27
EFEITOS DA ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E IRRADIÂNCIA NO CULTIVO DA MACROALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i>	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Material Biológico	30
2.2 Adição de diferentes concentrações de dióxido de carbono	30
2.3 Exposição à alta irradiância pós-adição de dióxido de carbono	31
2.4 Análise de clorofila <i>a</i> e carotenoides	31
2.5 Microscopia de luz (ML)	31
2.5.1 Testes histoquímicos	32
2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	32
3 RESULTADOS	33
3.1 Taxas de crescimento específico	33
3.2 Clorofila total	34
3.3 Carotenóides totais	35
3.4 Microscopia de luz	36
3.5 Microscopia eletrônica de transmissão	39
4 DISCUSSÃO	43
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	53
APÊNDICE A – Monitoramento de pH e escolha da biomassa	57



## INTRODUÇÃO

O cultivo de macroalgas representou em 2015 um mercado de 4,8 bilhões de dólares, destacando-se como a atividade dentro da maricultura com maior representatividade em termos de tonagem produzida: 29,4 milhões de toneladas, correspondendo a 27,7% do total da produção aquícola (FAO, 2017).

Diversas espécies de macroalgas são cultivadas e exploradas a milhares de anos visando o consumo direto, como as dos gêneros *Saccharina*, *Laminaria*, *Ulva*, *Undaria* e *Pyropia*, ou ainda para a extração de ficocolóides para os mais diversos usos, como as espécies dos gêneros *Kappaphycus*, *Eucheuma* e *Gracilaria*, sendo as duas primeiras carragenófitas e a última, agarófita (PELLIZZARI; REIS, 2011). No entanto, atualmente, o cultivo possui posição de destaque, sendo responsável por cerca de 90% da produção de macroalgas comercializadas no mundo (FAO, 2003).

A produção de ficocolóides é uma atividade fundamental para diversos ramos da indústria, como a farmacêutica, a alimentícia e de cosméticos, principalmente, devido a suas propriedades emulsificantes, estabilizantes e gelificantes, e que acaba por agregar muito valor à biomassa processada (PORSE, RUDOLPH, 2017). Dentre os ficocolóides mais utilizados pela indústria, merece destaque a carragenana, extraída de macroalgas vermelhas, principalmente das espécies *Kappaphycus* e *Eucheuma*, que, juntas, representam mais de 36% de toda produção de macroalgas no mundo (FAO, 2017).

O cultivo de macroalgas carragenófitas não se destaca somente como atividade econômica voltada para o grande mercado internacional, mas, quando incentivado em comunidades litorâneas, tem servido como um importante agente de mudança social e de empoderamento, cuja renda gerada intensifica a economia local e permite melhores condições de vida (REBOURS et al., 2014). Essa mudança tem sido relatada na Tanzânia (MSUYA, 2006), Índia, Indonésia, México, Filipinas, Ilhas Salomão (VALDERRAMA et al., 2013) e no Brasil, no Estado do Ceará (PAULA et al., 2015).

Do ponto de vista ambiental, o cultivo de macroalgas também representa um importante papel, pois devido a sua capacidade de biofiltração e retirada de nutrientes do ambiente, é um importante agente biorremediador. Além disso, são utilizadas largamente em sistemas de aquicultura multitrófica integrada (no inglês, IMTA – *integrated multi-trophic aquaculture*) como um agente amenizador dos impactos causados pelo efluente do cultivo intensivo de espécies heterótrofas

(CHOPIN et al., 2001), além de incrementar o rendimento e estabilidade do sistema por representarem mais um produto com potencial a ser comercializado (BARRINGTON, CHOPIN, ROBINSON, 2009). As macroalgas permitem ainda nesses sistemas uma abordagem ecologicamente sustentável para a cadeia produtiva, fato que pode ser usado em favor do marketing da empresa, resultando em dados positivos para a aquisição de novos clientes ou como um diferencial no mercado (CHOPIN et al., 2012).

O cultivo de macroalgas também pode ter um papel ainda pouco desvendado sobre os efeitos das mudanças climáticas, em especial do aquecimento global, devido a sua grande capacidade fotossintetizante e de apreensão de carbono atmosférico, que usa como fonte para fixação e ganho de biomassa (CHUNG et al., 2010).

## **1.1 O CULTIVO DE *Kappaphycus alvarezii* em SANTA CATARINA, BRASIL**

A introdução da macroalga *K. alvarezii* no Brasil ocorreu em 1995 para o desenvolvimento de cultivos comerciais no Estado de São Paulo. Posteriormente, essa espécie foi levada para o Estado do Rio de Janeiro e Paraíba (PAULA, PEREIRA e OHNO, 2002).

Em 2008, *K. alvarezii* proveniente do Estado de São Paulo foi introduzida no Estado de Santa Catarina em caráter experimental (HAYASHI et al. 2017). Os resultados do cultivo experimental em Florianópolis apontaram taxas de crescimento favoráveis entre a primavera e outono, e um impedimento para a manutenção dos cultivos no mar durante o inverno, devido às baixas temperaturas (HAYASHI et al, 2010b).

Desde então, diversos trabalhos foram realizados sobre a integração dessa espécie com o cultivo de moluscos, uma vez que o Estado de Santa Catarina se destaca como o maior produtor brasileiro de mexilhões e ostras (SANTOS, 2014), como forma de otimizar as estruturas de cultivo já existentes e diversificar a renda dos produtores locais (SANTOS, 2014; HAYASHI et al., 2010b). O potencial de biorremediação dessa espécie também foi explorado com seu cultivo em efluente de carcinicultura em bioflocos (PIRES, 2014; PIRES, 2016) e como esse tipo de cultivo influencia na produção de compostos de interesse comercial dessa espécie (PIRES, 2016; PEDRA et al., 2017), além de aprimoramento do seu cultivo em tanques (FLORES, 2014).

Em 2017, uma licença governamental foi emitida para o cultivo experimental de *K. alvarezii* em quatro pontos do litoral do estado de

Santa Catarina: Ponta do Sambaqui, Governador Celso Ramos, Penha e Ribeirão da Ilha. Fazendas experimentais para o levantamento do potencial do cultivo comercial nesses pontos, assim como produtores locais, serão dependentes em um primeiro momento do fornecimento de biomassa cultivada em tanques em condições *indoor* para o início da produção.

O cultivo *indoor* e em tanques é uma alternativa para a manutenção e crescimento da biomassa durante os meses frios do ano no Sul do Brasil, onde é possível controlar os parâmetros físico-químicos da água até o próximo período de reintrodução no mar, no início da primavera.

## 1.2 A IMPORTÂNCIA DO CARBONO E DA LUZ NO CULTIVO DE MACROALGAS

As macroalgas, assim como todos os vegetais, suprem suas necessidades energéticas através da fotossíntese que pode ser definida como a série de processos nos quais ocorre a síntese de moléculas orgânicas a partir do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera e da água, com energia fornecida pela luz (GEST, 2002). Portanto, é seguro afirmar que esses dois componentes, o CO<sub>2</sub> e a luz, são fatores essenciais para o ganho da biomassa algácea através da fotossíntese.

No caso das macroalgas vermelhas, como *Kappaphycus alvarezii*, espécie alvo do presente trabalho, os principais pigmentos fotossintetizantes são a clorofila *a*, ficobiliproteínas e os carotenoides (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007), sendo que esses pigmentos apresentam-se em diferentes concentrações em virtude da intensidade luminosa na qual a planta está exposta (INDRIATMOKO et al. 2015).

Segundo Guan et al. (2013), *K. alvarezii* é uma espécie fotossinteticamente adaptada a baixas irradiâncias, mas possui mecanismos de regulação e aclimação tanto à excessiva quanto à deficiência em irradiância. Lideman et al. (2012) observou que a atividade fotossintetizante de uma linhagem de *K. alvarezii* cultivada na Indonésia apresentou grande capacidade de aclimação em relação a irradiância do ambiente, diminuindo as concentrações de clorofila *a* e aumentando as quantidades de carotenóides com o aumento da profundidade que em que é cultivada (INDRIATMOKO et al. 2015).

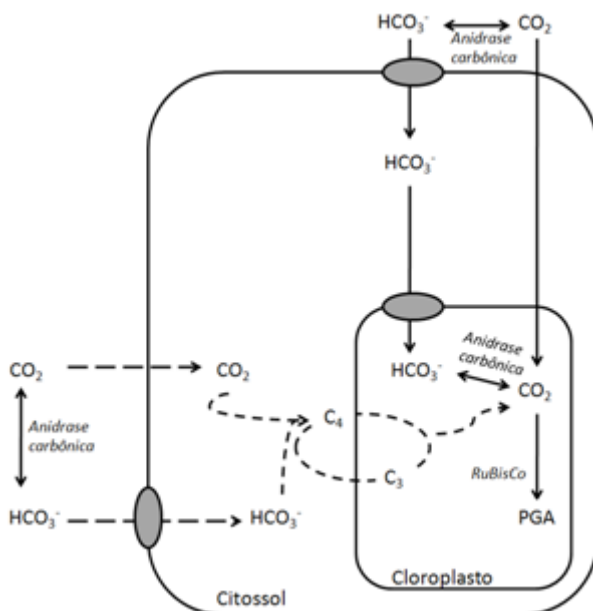
Apesar dessa plasticidade fenotípica, a irradiância na qual a alga é cultivada pode influenciar diretamente, tanto a sua resposta de aclimação, quanto nas suas taxas de crescimento e ganho de biomassa.

Terada et al. (2015) demonstrou que a irradiância, juntamente com a temperatura, é um dos principais fatores estimulantes ou inibidores da atividade fotossintetizante e do crescimento para *K. alvarezii*.

A atividade fotossintetizante dos vegetais exerce ainda um papel fundamental no ciclo do carbono, sendo a principal responsável pela fixação do CO<sub>2</sub> da atmosfera. Esse potencial reside na sua capacidade de transformar o carbono inorgânico (Ci), principalmente proveniente da atmosfera, em compostos orgânicos. Segundo Graham, Graham e Wilcox (2009), os níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera eram muito maiores e os níveis de O<sub>2</sub> eram muito menores há alguns bilhões de anos atrás, sendo que a captura desse carbono e a liberação do oxigênio pelos vegetais, através da fotossíntese, teve papel fundamental para que esses gases atingissem as concentrações atuais.

No caso dos vegetais aquáticos, uma vez que os níveis de CO<sub>2</sub> na água do mar são inferiores aos encontrados na atmosfera, existe a presença de inúmeros processos bioquímicos relacionados com a otimização da captação do Ci, principalmente relacionados ao transporte e a transformação do bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em dióxido de carbono (GRAHAM, GRAHAM, WILCOX, 2009). A enzima anidrase carbônica (AC) participa de um dos principais mecanismos das algas para o transporte e transformação do HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tanto intracelularmente, como na região extracelular periférica. O HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na água pode ser convertido em CO<sub>2</sub> externamente (periplasma) pela AC, ou transportado por proteínas transportadoras de membrana. O CO<sub>2</sub> que se difunde pela célula ou, possivelmente, é importado por transportadores, pode ser aprisionado em forma de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (outro processo que, possivelmente, envolve a AC). Então, o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> precisa ser transformado novamente em CO<sub>2</sub> para ser utilizado pela RuBisCO (Figura 1). A quantidade dessa enzima pode mudar rapidamente de acordo com a disponibilidade de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>2</sub> no ambiente. No entanto, é importante destacar o fato de que o CO<sub>2</sub> é a única forma de Ci que pode ser absorvido diretamente por qualquer organismo fotossintetizante (JI et al., 2016).





**Figura 1.** Diagrama de alguns mecanismos de concentração de carbono em células de macroalgas (Adaptado de GRAHAM, GRAHAM, WILCOX (2009)).

Chung et al. (2010) aponta a importância das macroalgas e seu papel ecológico no atual cenário de aquecimento global e elevação dos índices de  $\text{CO}_2$  na atmosfera, no entanto, existem relativamente poucos relatos da utilização de  $\text{CO}_2$  diretamente no cultivo de espécies de interesse comercial.

A utilização desse gás pode representar custos para a produção, porém, se resultar em um aumento de taxas de crescimento e ganho de biomassa, ou aumento da produtividade de compostos de interesse comercial, essa estratégia pode resultar em otimização da produção em sistemas de cultivo em tanques, principalmente no caso de espécies cujo cultivo diretamente no mar apresenta qualquer tipo de impedimento.

Diversos autores já evidenciaram que a adição de  $\text{CO}_2$  em cultivos de macroalgas resulta em maior ganho de biomassa (COLE et al., 2014; ISRAEL et al., 2015; ZOU, 2005), influenciado pelo aumento da disponibilidade dessa fonte de carbono para a atividade

fotossintetizante. No entanto, o processo fotossintetizantese baseia em outros fatores, como a disponibilidade de irradiação luminosa como forma de energia para que esse processo ocorra.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência da adição de CO<sub>2</sub> e irradiância em cultivos *in vitro* de *Kappaphycus alvarezii*.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Analisar a influência da adição de dióxido de carbono e irradiância sobre a taxa de crescimento;
- Quantificar a clorofila *a* e os carotenoides após os tratamentos;
- Analisar a presença de polissacarídeos ácidos (carragenana) e dos polissacarídeos neutros (grãos de amido) após os tratamentos através de microscopia de luz;
- Analisar as alterações ultraestruturais após os tratamentos através de microscopia eletrônica de transmissão.

O artigo gerado por este trabalho será submetido à Journal of Applied Phycology.

## CAPÍTULO 1

### **EFEITOS DA ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E IRRADIÂNCIA NO CULTIVO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii***

Thallis Felipe Boa Ventura\*; Alex Alves dos Santos; Carmen Simioni;  
Leila Hayashi

Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina  
(UFSC), Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001,  
Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de  
Santa Catarina.

\*Autor correspondente. Tel: +55 48 99692-5597  
Endereço de e-mail: thallis\_omg@hotmail.com

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de macroalgas representou em 2014 a segunda maior produção mundial na aquicultura, chegando a 27,3 milhões de toneladas, gerando 5,6 bilhões de dólares, sendo apenas superado pela produção de peixes de água doce (FAO, 2016). As espécies *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Rhodophyta, Gigartinales) e *Eucheuma denticulatum* (N. L. Burman) Collins & Harvey apresentaram as maiores produções dentre as macroalgas em 2015, alcançando 11 milhões de toneladas (FAO, 2016). Ambas as espécies são a principal fonte para a extração de carragenana, um colóide usado como espessante e estabilizante em diversas atividades industriais. No entanto, o mercado mundial demonstra uma preferência por *K. alvarezii* em comparação a *E. denticulatum* devido ao seu gel mostrar maior força, devido ao predomínio de carragenana *kappa* (HAYASHI et al., 2010).

A introdução de *K. alvarezii* no Brasil foi feita por representar uma alternativa às espécies nativas de carragenófitas que apresentam pouco potencial de cultivo (PAULA, PEREIRA e OHNO, 2002). Em 2008, essa espécie foi introduzida no litoral do Estado de Santa Catarina em escala experimental. O monitoramento de uma unidade de maricultura local demonstrou que as baixas temperaturas durante o inverno são fatores limitantes para o crescimento e sobrevivência dessa espécie, mas taxas de crescimento favoráveis foram observadas entre a primavera e o outono (HAYASHI et al, 2010b). Esses autores destacam a necessidade de manter biomassa algácea *indoor* durante o inverno para ser colocada de volta às fazendas no início da primavera.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para aprimorar qualitativamente e quantitativamente o cultivo de *K. alvarezii* no sul do Brasil com resultados interessantes, relacionados aos efeitos da fertilização e aeração sobre o seu crescimento (FLORES, 2014; PIRES, 2017) e mudanças do seu perfil de compostos bioativos e carragenana (PEDRA et al, 2017; PIRES, 2017). No entanto, manter grande quantidade de biomassa em tanques resulta em elevados custos de manutenção e pode afetar negativamente a sustentabilidade da produção. Não obstante, no início da primavera, uma grande quantidade de biomassa necessita estar disponível para o plantio nas fazendas marinhas.

Sob condições laboratoriais, soluções de nutrientes oferecem taxas de crescimento favoráveis para *K. alvarezii*, como a solução von Stosch a 50% (PAULA, ERBERT, PEREIRA, 2001) e efluente de carcinicultura em bioflocos (PIRES, 2016). No entanto, para cultivos

massivos em tanques ainda se faz necessário encontrar novas estratégias para otimizar espaço, consumo de energia e mão de obra.

Apesar de poucos trabalhos sobre o uso da adição de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em cultivos de macroalgas na aquicultura serem observados, muitos autores estão discutindo o papel das macroalgas na mitigação dos efeitos do aquecimento global e do aumento do CO<sub>2</sub> na atmosfera, assim como seu papel no sequestro de carbono (CHUNG et al, 2010; MURAOKA, 2004). Ji et al. (2016) afirma que o CO<sub>2</sub> é a única forma de carbono que pode ser diretamente assimilada por todos os organismos fotossintetizantes. Nesse sentido, como observado por Israel et al. (2015), algumas macroalgas vermelhas apresentaram um maior potencial de crescimento quando submetidas a adição de CO<sub>2</sub>, fator limitante para a fotossíntese e ganho de biomassa (ZOU, GAO, 2009).

Outro importante fator para a fotossíntese e o crescimento das macroalgas é a energia luminosa, que pode ser um fator limitante quando a intensidade e a qualidade da luz não são as mais adequadas para as necessidades da espécie (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007). De fato, as macroalgas apresentam uma ampla plasticidade fenotípica para melhorar sua capacidade de absorção de luz, especialmente no que se refere aos pigmentos acessórios e no formato do aparato fotossintetizante (GRAHAM, GRAHAM, WILCOX, 2009; WU et al., 2015). Terada et al. (2015) demonstraram que a irradiância, juntamente com a temperatura, é um dos principais fatores estimulantes ou inibidores da atividade fotossintética e do crescimento de *K. alvarezii*. No entanto, até o presente momento, ainda não foram analisados os efeitos desses fatores associados a diferentes concentrações de dióxido de carbono sobre a fisiologia das macroalgas.

No caso do cultivo de *K. alvarezii* no Estado de Santa Catarina, um sistema economicamente viável deve ser desenvolvido de modo a propiciar a formação de um aparato anti-estresse que promova uma melhor resposta após sua transferência para as fazendas marinhas. Apesar dos autores citados anteriormente terem observado ganhos de biomassa em macroalgas expostas à adição de CO<sub>2</sub>, é importante entender as respostas fenotípicas causadas por essa estratégia de cultivo. Por esse motivo, a adição em curto prazo de CO<sub>2</sub>, juntamente com a manipulação de outros fatores como a irradiância pode resultar na formação de uma série de mecanismos anti-estresse que serão importantes para a aclimação das plantas transplantadas para o mar.

O presente trabalho tem como objetivo encontrar uma alternativa para otimizar a saúde e manter a biomassa algácea, observando os efeitos de adição temporária de CO<sub>2</sub> e irradiância em condições in vitro,

a fim de estabelecer parâmetros para o cultivo de *K. alvarezii* em tanques durante os meses frios do litoral sul do Brasil, antes do replantio no mar.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo foi realizado na Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina – LCM/UFSC. Os experimentos *in vitro* foram realizados em uma câmara de ambiente controlado e foram divididos em duas fases: adição de diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> e posterior exposição à alta irradiância;

### 2.1 Material Biológico

Foram utilizados tetrasporófitos da linhagem verde de *K. alvarezii*. Estes eram mantidos em tanques de 30 L, nas seguintes condições: água do mar esterilizada e enriquecida com solução von Stosch 50%, salinidade de 35‰, temperatura de  $24 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas, irradiância de 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aeração constante. Uma semana antes do experimento, os talos foram mantidos apenas em água de mar esterilizada para aclimação.

### 2.2 Adição de diferentes concentrações de dióxido de carbono

Três concentrações de CO<sub>2</sub> foram testadas: 0,1 L min<sup>-1</sup> (1CO<sub>2</sub>), 0,2 L min<sup>-1</sup> (2CO<sub>2</sub>) e 0,3 L min<sup>-1</sup> (3CO<sub>2</sub>), regulados por três fluxômetros de 3,5 bar, através de difusão por pedras porosas. Como controle (C), os talos foram cultivados sob as mesmas condições descritas anteriormente, sem adição de CO<sub>2</sub>. Talos de  $0,5 \pm 0,05$  g foram distribuídos em Erlenmeyers de 500 mL, com água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch 50%, em densidade de 21 g L<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos e o controle foram feitos em cinco repetições. O pH foi monitorado com um pHmetro PHTEK modelo PHS 3B quatro vezes por dia: às 8 h, 11 h, 14 h e 17 h, para verificar como o pH variava durante o dia em resposta à adição de dióxido de carbono na água (Apêndice A). Para evitar a queda do pH e manter a adição constante, tal adição foi feita por apenas duas horas por dia: das 9 h às 11h, por duas semanas.

Uma vez por semana, os talos foram gentilmente secos com papel toalha e pesados para o cálculo da taxa de crescimento (TC) de acordo com a fórmula proposta por Yong, Yong e Arton (2013):

$$TC = \left[ \left( \frac{B_f}{B_i} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100$$

Onde Bf = biomassa final, Bi = biomassa inicial e t = tempo em dias.

Após o período experimental, amostras foram armazenadas em freezer -20 °C para posterior análise de pigmentos e carotenoides, e amostras foram processadas para Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão.

### **2.3 Exposição à alta irradiância pós-adição de dióxido de carbono**

Após a segunda semana de adição de CO<sub>2</sub>, os talos foram expostos a uma irradiância de 200 μmols fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por duas semanas. Todas as outras condições de cultivo descritas anteriormente foram mantidas, exceto pela não adição de CO<sub>2</sub>. Uma vez por semana os talos foram gentilmente secos com papel toalha e pesados para o cálculo das taxas de crescimento de acordo com a fórmula descrita por YONG, YONG e ARTON (2013).

Após o período experimental, amostras foram armazenadas em freezer -20 °C para posterior análise de pigmentos e carotenoides. Essas amostras também foram processadas para Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão.

### **2.4 Análise de clorofila *a* e carotenoides**

Para a extração da clorofila, amostras de 1 ± 0,0001 g (n=6) de cada tratamento e controle foram utilizadas. A clorofila *a* e os carotenoides totais foram extraídos em 3 mL de DMSO a 40°C, durante 30 minutos e quantificados por espectrofotômetro de acordo com Wellburn (1994):

$$\text{Chl } a = 12,19 \times A_{665} - 3,45 \times A_{649}$$

$$\text{Carot Total} = (1000 \times A_{480} - 2,14 \text{ Chla}) / 220$$

### **2.5 Microscopia de luz (ML)**

Para as análises histoquímicas, amostras de cada tratamento e controle foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão

fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante 12 h, em temperatura de 4 °C. Após esse período, o material foi lavado três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M e desidratado em soluções crescentes de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100% (Bouzon, 2006). A pré-infiltração e a infiltração das amostras foram feitas em historesina glicolmetacrilato e os blocos foram montados em historesina glicolmetacrilato adicionando um endurecedor. As secções foram realizadas com espessura de 4 µm em micrótomo modelo Leica RM 2125 com navalha de tungstênio e foram dispostas em lâminas para a aplicação de técnicas de histoquímicas.

### **2.5.1 Testes histoquímicos**

Para a análise das amostras dos tratamentos e controle, foram aplicados os seguintes testes histoquímicos:

- a) Azul de toluidina (AT-O) (Gordon & McCandless, 1973): foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas com as secções foram coradas por cerca de 60 segundos, lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.
- b) Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Gahan, 1984): foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As lâminas com as secções foram imersas em solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 15 minutos, e o reativo de Schiff foi aplicado durante 30 minutos no escuro. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em água corrente durante 15 minutos, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá.

O material corado pelas diferentes técnicas foi analisado e fotografado com um microscópio de epifluorescência (Olympus BX 41) equipado com imagem QCapture Pro Software 5.1 (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

### **2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e tamponadas com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4°C por 12 h. A pré-fixação foi seguida por três lavagens de 30 minutos cada, no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (1:1), durante



4 h a temperatura ambiente (Pueschel, 1979; Bouzon, 2006). Após esse período, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, sendo mantido por 30 minutos em cada lavagem. A desidratação foi realizada em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo o material mantido por 30 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então filtrado com resina Spurr em duas séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e polimerizados em estufa a 70 °C por 24 horas. Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrotomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 2% por 10 min. e citrato de chumbo 2% por 10 min. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

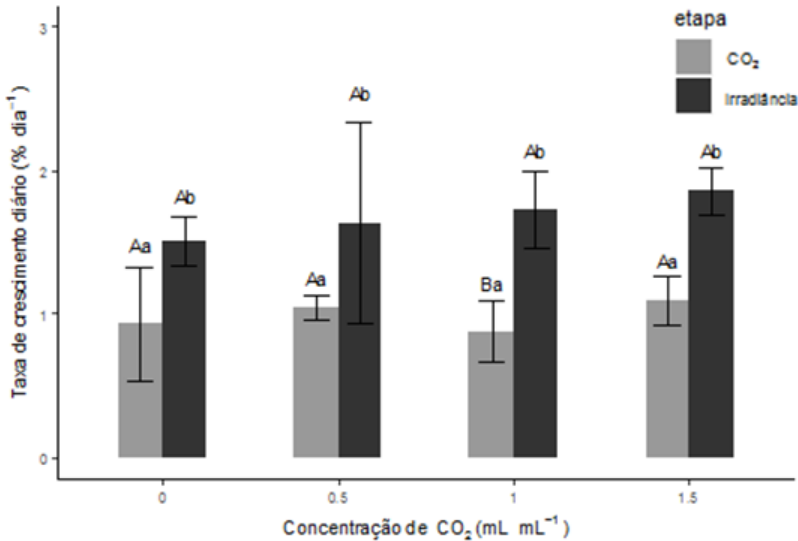
## **2.7 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 7®. As taxas de crescimento foram submetidas a ANOVA bifatorial utilizando como fatores a etapa de adição de CO<sub>2</sub> e a etapa de irradiância, para tal, os dados foram previamente transformados para números reais inteiros através da função  $y = \sqrt{x}$ . As concentrações de clorofila e carotenóides foram submetidas a ANOVA One-Way. Todas as análises foram seguidas de teste de Tukey Least Significant Difference (LSD) com significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Taxas de crescimento específico**

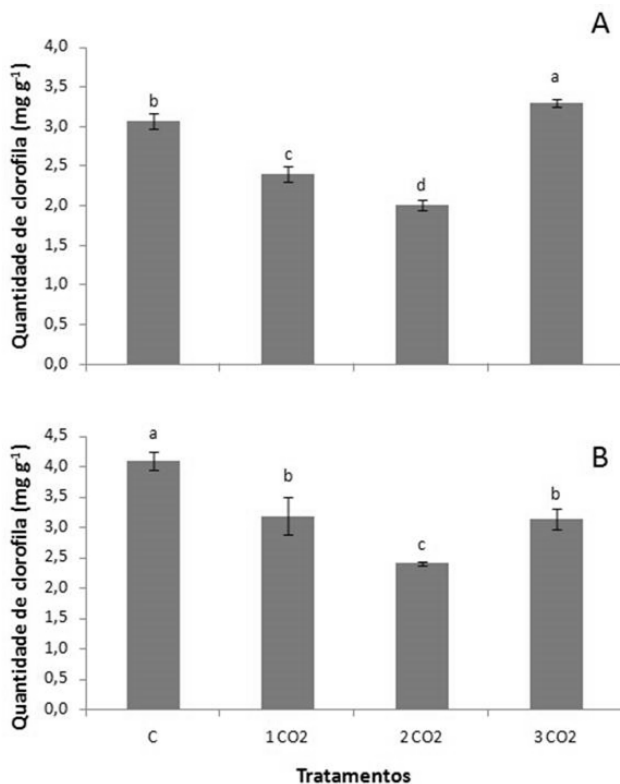
As taxas de crescimento de *K. alvarezii* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e controle, em nenhuma das duas etapas analisadas após adição de CO<sub>2</sub> e após exposição à alta irradiância (Figura 1). Apenas o tratamento 1CO<sub>2</sub> apresentou diferenças significativas considerando as diferentes etapas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas in vitro após adição de CO<sub>2</sub> e após exposição a alta irradiância. Valores apresentados em médias de cada tratamento. Letras minúsculas representam as diferenças entre as concentrações de CO<sub>2</sub> e controle, e as letras maiúsculas representam as diferenças entre as etapas. A barra vertical representa o desvio padrão.

### 3.2 Clorofila total

No período pós-adição de CO<sub>2</sub>, o tratamento 3CO<sub>2</sub> apresentou um total de clorofila significativamente maior quando comparado com os outros tratamentos e controle (Figura 2a). No entanto, após o período de exposição à alta irradiância, o controle passou a apresentar um total de clorofila significativamente maior ao encontrado em todos os tratamentos (Figura 2b).

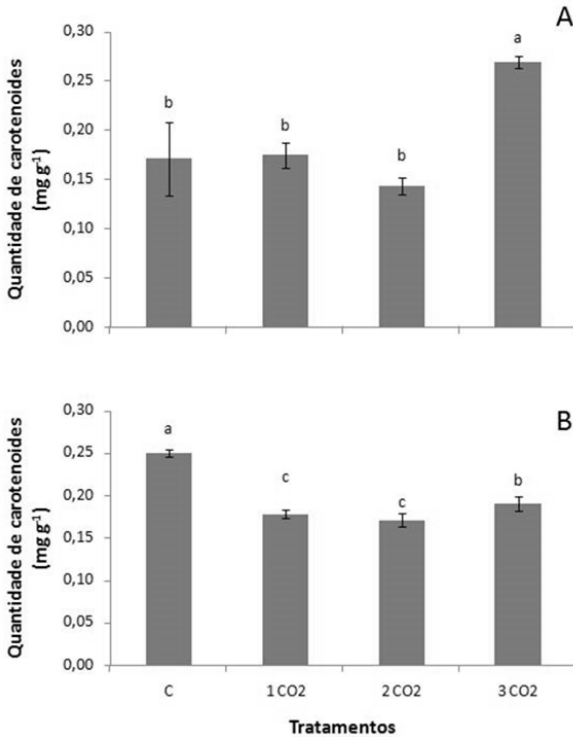


**Figura 2.** Clorofila total em *K. alvarezii* cultivada in vitro após adição de CO<sub>2</sub> (A) e após exposição à alta irradiância (B). Valores apresentados em médias de cada tratamento. As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre tratamentos ( $p < 0,05$ ). A barra vertical representa o desvio padrão.

### 3.3 Carotenóides totais

No período pós-adição de CO<sub>2</sub>, o tratamento 3CO<sub>2</sub> apresentou um total de carotenóides significativamente maior quando comparado com os outros tratamentos e controle (Figura 3a). No entanto, após o período de exposição à alta irradiância, o controle passou a apresentar um total de carotenóides significativamente maior ao encontrado em todos os tratamentos (Figura 3b). Para os tratamentos 1CO<sub>2</sub> e 2CO<sub>2</sub>, a quantidade

de carotenóides variou pouco entre os períodos antes e depois da exposição à alta irradiância.



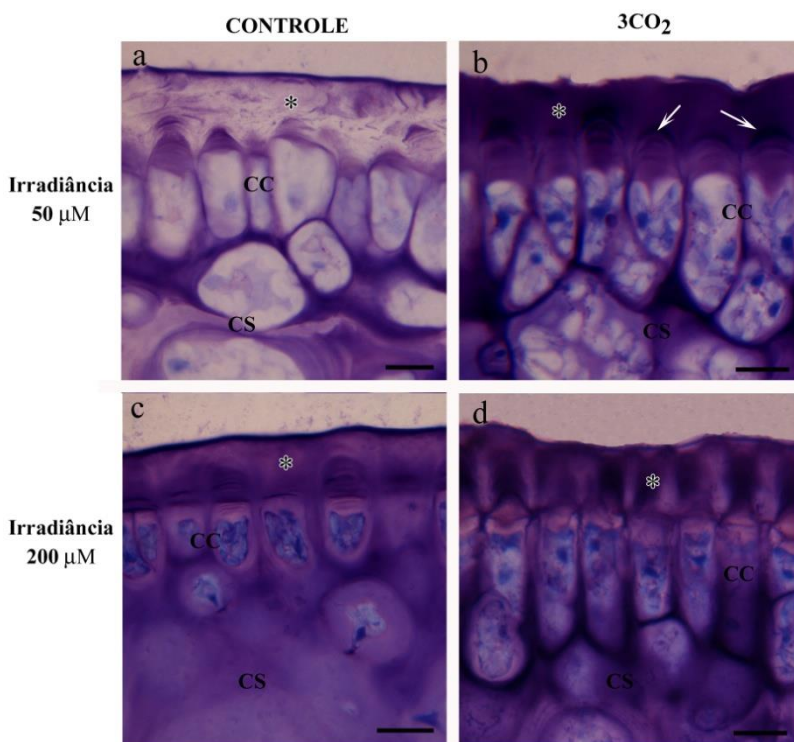
**Figura 3.** Carotenóides totais em *K. alvarezii* cultivada in vitro após adição de CO<sub>2</sub> (A) e após exposição à alta irradiância (B). As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre tratamentos ( $p < 0,05$ ). Valores apresentados em médias de cada tratamento. A barra vertical representa o desvio padrão.

### 3.4 Microscopia de luz

Após duas semanas de cultivo, amostras do controle apresentaram fraca reação metacromática à coloração Azul de Toluidina (AT-O) (Figura 4a). Já o tratamento 3CO<sub>2</sub>, revelou espessamento das células corticais em formato de domos e forte reação metacromática ao AT-O, tanto na região mais externa, como nos espaços intercelulares

entre as células corticais e subcorticais, indicando a presença de carragenana nestas regiões (Figura 4b).

Quando expostos à irradiância de  $200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por duas semanas, tanto o controle (Figura 4c) como o tratamento  $3\text{CO}_2$  (Figura 4d) apresentaram um aumento no espessamento da parede celular das células corticais, na região voltada para o exterior (Figura 4c), sendo que o tratamento  $3\text{CO}_2$  apresentou células corticais mais alongadas e com forte reação metacromática ao AT-O.

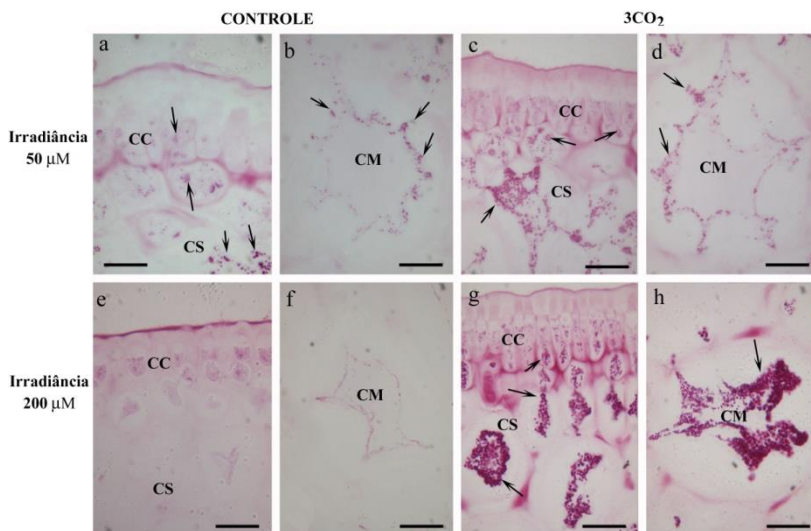


**Figura 4.** Microscopia de luz de seções transversais de *K. alvarezii* coradas com Azul de Toluidina (AT-O). a) Amostra controle com fraca reação metacromática ao AT-O na parede celular das células corticais na região voltada para o exterior, indicando a presença de carragenana; b) Tratamento  $3\text{CO}_2$  após duas semanas de adição de dióxido de carbono com espessamento em forma de domos (setas) e forte reação metacromática ao AT-O na parede celular das células corticais; c) Amostra controle após duas semanas de exposição à alta

irradiância com forte reação metacromática ao AT-O nas células corticais; d) Tratamento  $3\text{CO}_2$  após duas semanas de exposição à alta irradiância com espessamento em forma de domos e forte reação metacromática ao AT-O. Células corticais (CC), células subcorticais (CS). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Amostras do controle cultivadas por duas semanas apresentaram fraca reação à coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS), revelando pequenas quantidades de grãos de amido das florídeas nas células corticais, subcorticais e nas periferias das células medulares (Figuras 5a e 5b). Já o tratamento  $3\text{CO}_2$  apresentou uma grande quantidade de grãos de amido e celulose PAS positivos nas células corticais, subcorticais e medulares (Figura 5c e 5d).

Após duas semanas de cultivo em alta irradiância, foi observada reação na parede celular (presença de celulose) no controle, no entanto, ausência de grãos de amido das florídeas (Figura 5e e 5f). Já no tratamento  $3\text{CO}_2$ , a alta irradiância resultou num aumento da reação ao PAS sendo visualizada grande quantidade de celulose e grãos de amido PAS positivos em todos os tipos celulares (Figura 5g e 5h).



**Figura 5.** Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). a e b) Amostras controle com fraca reação ao PAS na parede celular (celulose), grãos de amido das florídeas PAS positivos em pequena quantidade nas células

corticais, subcorticais (a, setas) e nas medulares na sua periferia (b, setas); c e d) Tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de adição de CO<sub>2</sub> com aumento de grãos de amido e celulose PAS positivos nas células corticais, subcorticais (c, setas) e medulares (d, setas); e e f) Amostra controle após duas semanas de exposição à alta irradiância com presença de células com celulose PAS positiva na parede celular mas sem presença de grãos de amido das florídeas; g e h) Tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de exposição à alta irradiância com presença de células com forte reação positiva ao PAS na parede celular e grande quantidade de grãos de amido PAS positivos. Células corticais (CC), células subcorticais (CS), células medulares (CM). Escala: 25 µm.

### 3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

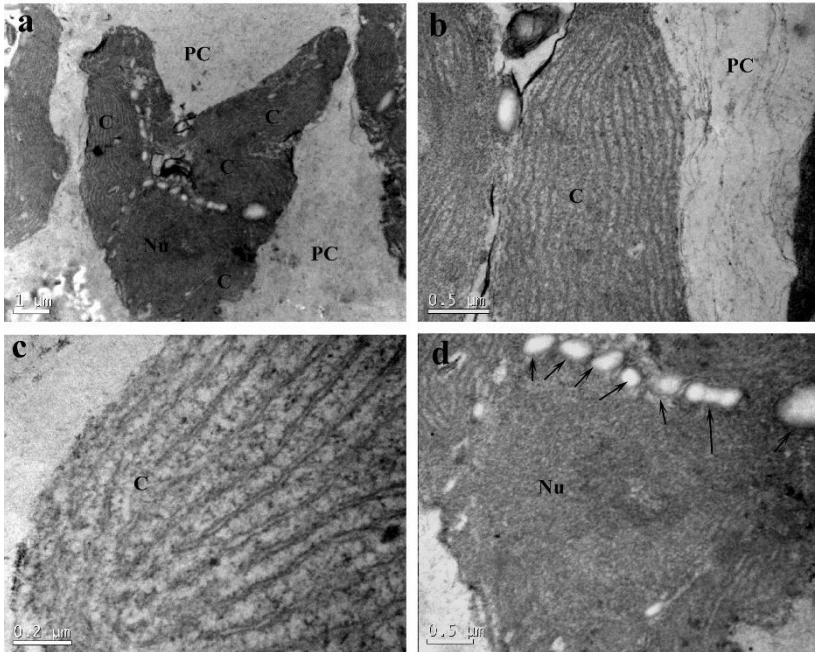
As amostras controle cultivadas por duas semanas não apresentaram alterações visíveis das características consideradas como típicas da espécie: células corticais em formato de cálice, com cloroplastos periféricos contendo tilacóides com organização típica de algas vermelhas, presença de grãos de amido periféricos ao núcleo e microfibrilas de celulose na parede celular (Figura 6).

O tratamento 3CO<sub>2</sub>, após duas semanas de cultivo com adição de CO<sub>2</sub>, apresentou grãos de amido das florídeas dispersos pelas células corticais e parede celular com microfibrilas com pontuações densas (Figura 7a,b). Os cloroplastos foram visualizados com tilacóides íntegros, mas com regiões homogêneas centrais sem a presença de tilacóides (Figura 7c,d). Nestas células foram visualizadas também diversas mitocôndrias, corpos de Golgi e retículo endoplasmático rugoso disperso, e grãos de amido de maior tamanho quando comparado ao controle, próximos ao núcleo (Figura 7d-f).

Depois de submetidas à alta irradiância, amostras do controle mostraram severas mudanças na sua estrutura (Figura 8). A parede celular dessas células apresentou microfibrilas de celulose mais delgada (Figura 8b) e em seu citoplasma foram visualizados cloroplastos com inúmeros plastoglóbulos eletrondensos (Figura 8b) e tilacóides degradados (Figura 8c), diminuição da quantidade de grão de amido e presença de membranas concêntricas (Figura 8d).

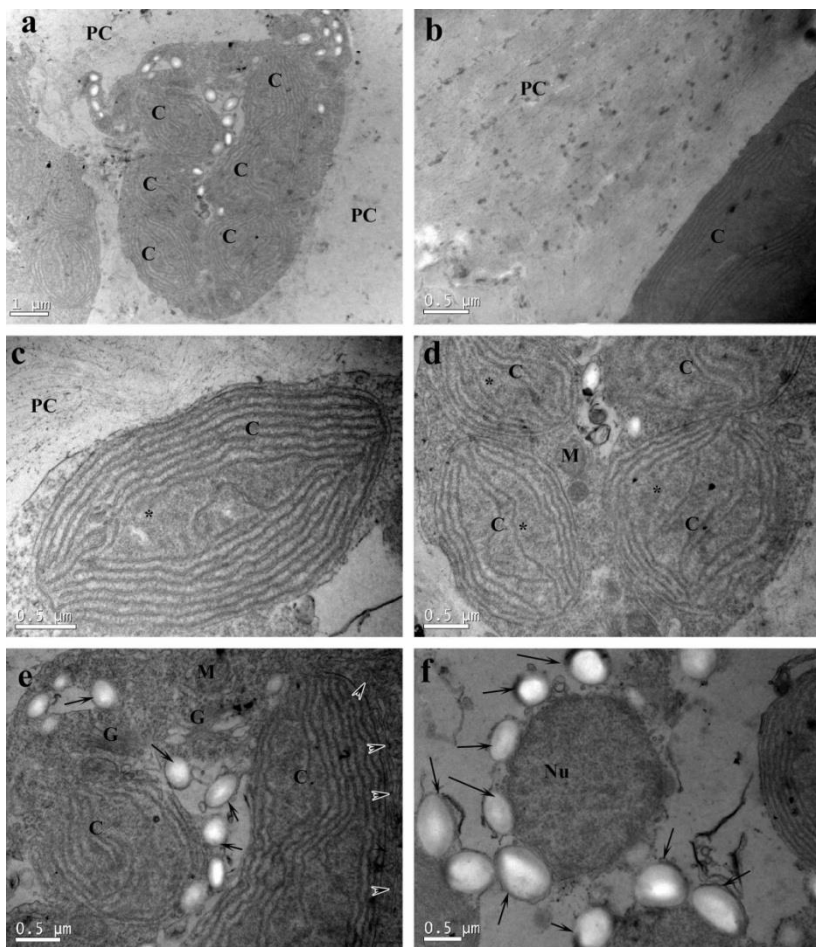
Amostras do tratamento 3CO<sub>2</sub>, após duas semanas de exposição à alta irradiância, apresentaram espessamento da parede celular com pontuações densas nas microfibrilas de celulose e presença de muitos grãos de amido no citoplasma (Figura 9a-c). Os cloroplastos apresentaram grande quantidade de plastoglóbulos e alguns com

alterações nos tilacóides. Estas células foram visualizadas com diversas mitocôndrias próximas aos cloroplastos (Figura 9d).



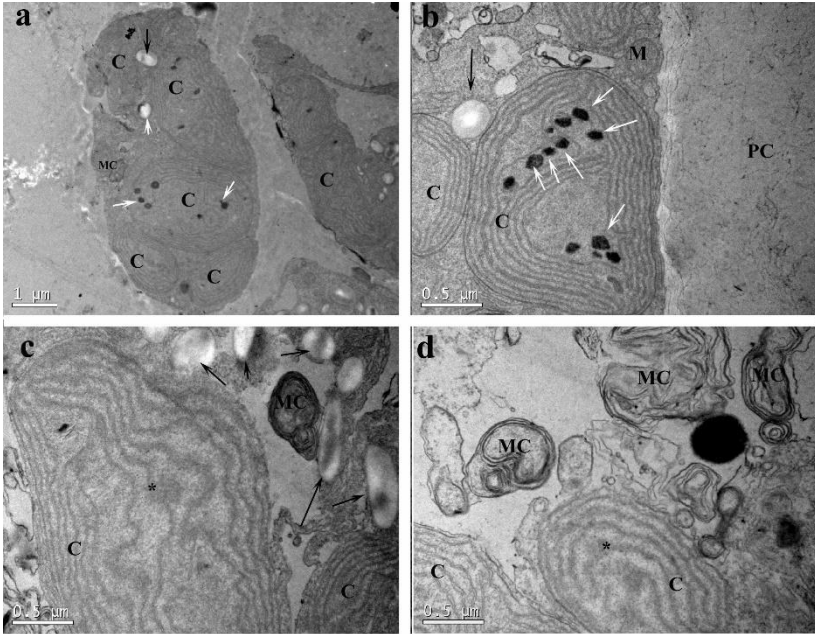
**Figura 6.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos controle de *K. alvarezii* após duas semanas de cultivo. a) Visão geral da célula cortical com formato de taça típico da espécie, com citoplasma denso apresentando cloroplastos periféricos. b) Detalhe as microfibrilas frouxas de celulose na parede celular e cloroplasto com organização típica das algas vermelhas e tilacóides paralelos. c) Detalhe da integridade dos tilacóides. d) Acúmulo de pequenos grãos de amido das florídeas (setas) no redor do núcleo. Parede celular (PC), Cloroplastos (C), Núcleo (N).



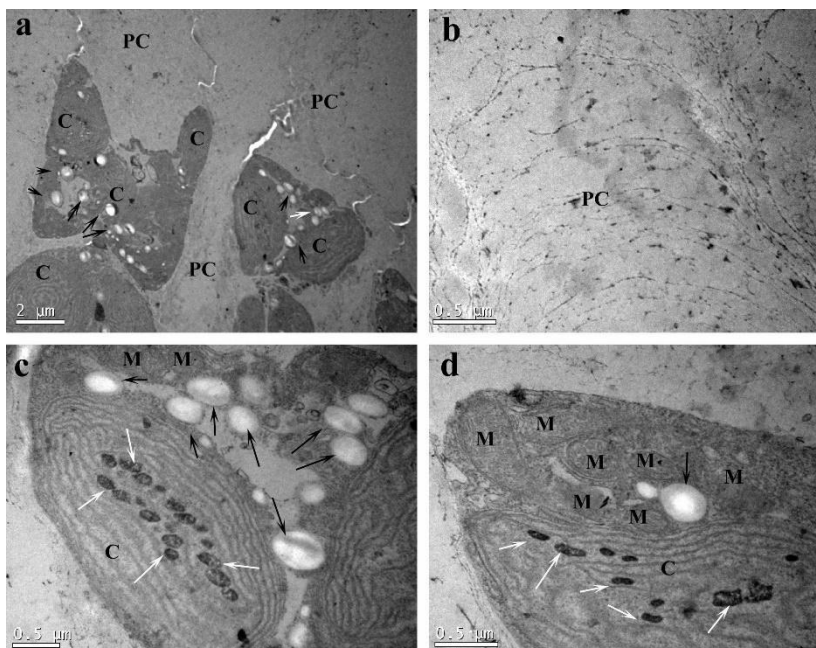


**Figura 7.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii*, do tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de cultivo com adição de CO<sub>2</sub>. a) Visão geral de uma célula cortical em formato de taça apresentando citoplasma denso com cloroplastos periféricos e grãos de amido das florídeas dispersos; b) Detalhe da parede celular com microfibrilas de celulose com pontuações densas; c e d) Cloroplastos com presença de tilacóides íntegros, mas com presença de uma região central homogênea (\*) sem presença de tilacóides; e) Presença de diversos corpos de Golgi, mitocôndrias, grãos de amido das florídeas (setas) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta); f) Detalhe dos

grãos de amido (setas) ao redor do núcleo. Parede celular (PC), Cloroplastos (C), Núcleo (N), Corpos de Golgi (G), Mitocôndria (M).



**Figura 8.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii* do controle após duas semanas de exposição à alta irradiância. a) Visão geral de uma célula cortical com pouca quantidade de grãos de amido das florídeas (setas pretas); b) Detalhe da parede celular com microfibrilas de celulose delgadas e detalhe de cloroplasto com presença de plastoglôbulos eletrondensos (setas brancas); c) Detalhe de um cloroplasto com tilacóides degradados (\*); d) Presença de diversas membranas concêntricas no interior da célula. Parede celular (PC), Cloroplastos (C), Membranas concêntricas (MC).



**Figura 9.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de talos de *K. alvarezii* do tratamento 3CO<sub>2</sub> após duas semanas de exposição à alta irradiância. a) Visão geral das células corticais em forma de taça com presença de uma espessa parede celular e diversos grãos de amido em seu citoplasma. b) Detalhe da parede celular com microfibrilas de celulose com pontuações densas; c - f) Detalhe dos cloroplastos com alterações nos tilacóides e presença de diversos plastoglóbulos (setas brancas), presença de diversas mitocôndrias e grãos de amido (setas pretas). Parede celular (PC), Cloroplastos (C), Núcleo (N), Mitocôndria (M).

#### 4 DISCUSSÃO

A adição de CO<sub>2</sub> nos cultivos de *Kappaphycus alvarezii* gerou respostas de aclimação inicial, como um aumento da quantidade de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e carotenóides), aumento do espessamento da parede celular, maior produção de componentes de reserva e alterações na organização celular. Essas respostas influenciaram na sua posterior aclimação ao cultivo em alta irradiância favorecendo o contínuo acúmulo de componentes de reserva, formação

de parede celular e a presença de organelas envolvidas na produção de energia. Já o controle, submetido à alta irradiância, apresentou diminuição dos componentes de reserva e alterações na integridade dos cloroplastos.

Um grande espessamento da parede celular pôde ser observado no tratamento  $3\text{CO}_2$ , provavelmente como consequência a dois estímulos: uma resposta ao estresse causada pela diminuição do pH e uma maior ativação das vias de utilização do excesso de Ci disponível no meio. A produção de carragenana com consequente espessamento da parede celular já foi observado como modo de mitigar o estresse ambiental por salinidade, luz e movimentação da água (HAYASHI et al., 2010c; ISKANDAR, SYAM, TRIJUNO, 2013; WAKIBIA et al., 2006).

Andría et al (2010), relatou um aumento de polissacarídeos na parede celular (ágar) em *Gracilaria* sp. cultivada com altos níveis de carbono inorgânico dissolvido (CiD), o que pode ser um padrão semelhante ao observado para *K. alvarezii* no presente trabalho, com o espessamento da parede pela produção de carragenana. No entanto, esses autores observaram uma diminuição na quantidade total de pigmentos daquela espécie, fato que não foi observado no presente trabalho, corroborando diversos autores que observaram respostas heterogêneas nos pigmentos das macroalgas quando submetidas a alterações nas concentrações de CiD (KORBEE et al., 2015; YILDIS, DERE, 2015).

As maiores concentrações de clorofila *a* e de carotenoides foram obtidas no tratamento  $3\text{CO}_2$ . Sugere-se que a clorofila *a* e os carotenoides inicialmente aumentaram com o  $\text{CO}_2$  favorecendo a atividade fotossintetizante. Segundo Tee et al. (2015), um aumento na quantidade de clorofila pode levar a um aumento do fluxo de transporte de elétrons aumentando assim a fixação do  $\text{CO}_2$  pela RuBisCO, justificando o aumento da concentração desses pigmentos ao elevar-se os níveis de  $\text{CO}_2$ . Porém, provavelmente devido ao estresse inicial, uma maior produção de carotenoides foi observada, sugerindo que o tratamento induziu a produção de antioxidantes para a ativação da defesa da célula.

Já após a exposição à irradiância, os níveis de clorofila e carotenoides permaneceram os mesmos nos tratamentos, enquanto as amostras controle tiveram os níveis dessas moléculas aumentados, sugerindo uma aclimatação e proteção ao aparato fotossintetizante, uma vez que os carotenoides também possuem a função de estabilizar a clorofila sob excesso de luz (INDRIATMOKO et al., 2015).

Em relação às reservas de amido das florídeas, a quantidade reduzida observada no controle após a exposição à irradiância está possivelmente relacionada com um esforço metabólico da planta para aclimatar-se ao estresse luminoso, assim como a produção de clorofila e carotenoides resultando em uma maior capacidade de absorção da luz abundante. Além disso, como não foi realizada a adição de CO<sub>2</sub>, as reservas observadas antes da exposição à irradiância foram praticamente exauridas para a manutenção dessas vias.

No tratamento com CO<sub>2</sub>, as reservas de amido das florídeas já se mostravam superiores àquelas do controle previamente a exposição à irradiância e apresentaram um aumento considerável após este período. Segundo Raven, Evert e Eichhorn (2007), os grãos de amido são produtos de armazenamento temporário e se acumulam somente quando a alga ou planta está fotossintetizando ativamente. Um aumento na quantidade de grãos de amido das florídeas também pode resultar em um posterior aumento de carragenana, já que a produção desta pode ser impulsionada com a degradação das reservas de amido (FOURNET et al., 1999). É importante destacar que a produção de polissacarídeos de resposta ao estresse, como os de parede celular, é regulada pela enzima epimerase que também é responsável pela produção do amido (USULDIN et al., 2017).

No tratamento 3CO<sub>2</sub> foram observadas alterações nos cloroplastos, que inicialmente apresentaram um alargamento central entre os tilacóides, sendo ocupado por um material de aparência homogênea, possivelmente depósitos de enzimas como a RuBisCO que podem ter potencializado a atividade fotossintetizante, e o acúmulo de material de reserva, fato que explica o posterior aumento na quantidade e tamanho dos grãos de amido observado após a exposição a alta irradiância. O aumento na quantidade de RuBisCO pode estar relacionado com o aumento do Ci disponível, uma vez que sua disponibilidade é um dos principais fatores reguladores da atividade fotossintetizante (GAO e McKinley, 1994). Dessa forma, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> diminuiu o efeito inibitório do O<sub>2</sub> sobre a fotossíntese (PARRY, 2003), uma vez que as reações de carboxilação e oxigenação são catalizadas no mesmo sítio ativo da RuBisCO e o CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> são substratos competitivos (GRAHAM, GRAHAM, WILCOX, 2009).

Após cultivo em alta irradiância, os cloroplastos foram as organelas mais afetadas, tendo alterações nos tilacóides e acúmulo de plastoglôbulos em seu interior, tanto no controle como no tratamento com CO<sub>2</sub>. Segundo Bréhélin et al. (2007), durante a senescência ou

estresse, os tilacóides dos cloroplastos são degradados e substituídos por plastoglobulinas.

No tratamento 3CO<sub>2</sub> também pôde ser observado um aumento na quantidade de organelas relacionadas com a produção de energia intracelular, como as mitocôndrias e na construção celular, como as estruturas de Golgi. A presença de mitocôndrias, especialmente no entorno dos cloroplastos e próximo à membrana celular, indica uma grande atividade celular para a produção de compostos de reserva, uma vez que essas vias são altamente dependentes de grande disponibilidade de energia. O aumento na quantidade de estruturas de Golgi pode estar diretamente relacionado à manutenção da espessura da parede, sendo essas organelas também envolvidas na produção de materiais para sua composição (TSEKOS, OROLOGAS, DIMOPOULOU, 2007).

Por outro lado, células do controle, após a exposição à alta irradiância, além das alterações nos cloroplastos, apresentaram muitas membranas concêntricas no interior das células indicando estresse e possível dano celular.

Apesar de não serem observadas diferenças significativas nas taxas de crescimento entre o controle e os tratamentos, evidenciou-se uma grande mobilização na atividade celular para a produção de substâncias de reserva e constituição celular nos tratamentos, possibilitando, assim, uma melhor resposta ao posterior estresse luminoso.

Os resultados observados no presente trabalho são importantes para definir uma estratégia de fortalecimento da atividade celular e aclimação de *K. alvarezii* em ambiente *indoor*, que podem contribuir para um melhor desempenho dessa espécie quando transportada para o cultivo no mar, resultando em uma resposta mais efetiva ao estresse ambiental ao qual estará sujeita.

## 5 CONCLUSÃO

A adição de CO<sub>2</sub> no cultivo *in vitro* de *K. alvarezii* resultou em um conjunto de alterações celulares como o espessamento da parede celular, grande formação de reservas de grãos de amido e aparecimento de organelas relacionadas a uma intensa atividade celular. Esses resultados sugerem que *K. alvarezii* cultivada com a adição de CO<sub>2</sub> pode estar mais apta a responder mais efetivamente ao estresse quando transportada para o cultivo no mar, possivelmente resultando em melhores índices de produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ANDRIA, Jesus; VERGARA, Juan; PEREZ-LLORENS, J. Lucas. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. **European Journal of Phycology**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.497-504, dez. 1999. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09541449910001718851>.
- AUSTIN, J. R. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. **The Plant Cell Online**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.1693-1703, 9 jun. 2006. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.039859>.
- BIDWELL, R.g.s.; MCLACHLAN, J.. Carbon nutrition of seaweeds: Photosynthesis, photorespiration and respiration. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.15-46, mar. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90040-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(85)90040-1).
- BOUZON, Zenilda Laurita. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.229-238, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042006000200004>.
- CHUNG, Ik Kyo et al. Using marine macroalgae for carbon sequestration: a critical appraisal. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.877-886, 19 out. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9604-9>.
- DAWES, C. J.. Irradiance Acclimation of the Cultured Philippine Seaweeds, *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.189-195, 1992. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1992.35.3.189>.
- DOTY, Maxwell S. *Eucheuma alvarezii* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. In: **Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species**. (Abbott, I.A.

& Norris, J.N. Eds), pp. 37-45. La Jolla: California Sea Grant College Program [Report T-CSGCP-011], 1985.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. 2016. Rome. Italy.

FLORES, Ana Luiza Gampert. **Viabilidade do cultivo em tanques de macroalgas *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, gigartinales) para manutenção de matrizes**. 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Florianópolis, 2014.

FOURNET, Isabelle et al. Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalisto* culture conditions. **European Journal of Phycology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.125-130, maio 1999. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09670269910001736182>.

GAHAN, P.B. Plant Histochemistry and cytochemistry. **An Introduction Academic Press**, Florida, U.S.A.300, 1984.

GAO, Kunshan; MCKINLEY, Kelton R.. Use of macroalgae for marine biomass production and CO<sub>2</sub> remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.45-60, fev. 1994. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02185904>.

GORDON, E.M. and MCCANDLESS, E.L. Ultrastructure and Histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. **Proceedings of Nova Scotia Institute Science**, 27, 111-133, 1973.

GRAHAM, Linda E.; WILCOX, Lee W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice Hall, c2009.

HAYASHI, Leila et al. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.505-511, 30 mar. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9163-x>.

HAYASHI, Leila et al. A Review of *Kappaphycus* Farming: Prospects and Constraints. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and**



**Astrobiology**, [s.l.], p.251-283, 2010. Springer Netherlands. [http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-8569-6\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-8569-6_15).

HAYASHI, Leila et al. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.439-447, 25 set. 2010c. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9595-6>.

INDRIATMOKO et al. Composition of photosynthetic pigments in a red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in different depths. **Procedia Chemistry**, [s.l.], v. 14, p.193-201, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.028>.

ISKANDAR, Akmal; SYAM, Rajuddin; TRIJUNO, Dody Dh. Content of Carrageenan, Chlorophyll *a* and Carotenoid of *Kappaphycus alvarezii* Cultivated in Different Seawater Depth Laikang Village, District of Mangarabombang, Takalar Regency. **Journal of Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-9, 14 nov. 2013. Macrothink Institute, Inc.. <http://dx.doi.org/10.5296/jab.v2i1.4559>.

ISRAEL, Alvaro et al. Utilization of flue gas from a power plant for tank cultivation of the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 249, n. 1-4, p.311-316, set. 2005.

JI, Yan et al. Ecophysiological responses of marine macroalgae to climate change factors. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.2953-2967, 4 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0840-5>.

KORBEE, N et al. A novel in situ system to evaluate the effect of high CO<sub>2</sub> on photosynthesis and biochemistry of seaweeds. **Aquatic Biology**, [s.l.], v. 22, p.245-259, 20 nov. 2014. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/ab00594>.

MURAOKA, Daisuke. Seaweed resources as a source of carbon fixation. **Bull. Fish. Res. Agen. Supplement**, Japão, v. 1, n. 1, p.59-63, jan. 2004.

NUNES, Beatris Gomes. **Monitoramento do ambiente do cultivo experimental da alga *Kappaphycus alvarezii* na praia de Sambaqui,**

**Florianópolis/SC.** 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PARRY, M. A. J.. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 54, n. 386, p.1321-1333, 14 mar. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg141>.

PAULA, Edison Jose de; PEREIRA, Ricardo Toledo Lima; OHNO, Masao. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.1-9, mar. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00248.x>.

PAULA, Edison Jose de; ERBERT, Cintia; PEREIRA, Ricardo Toledo Lima. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in vitro. **Phycological Research**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.155-161, 20 set. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.2001.00235.x>.

PEDRA, Anna Gabrielle La Macchia et al. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, [s.l.], v. 479, p.297-303, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.005>.

PIRES, Clóvis Murilo. **Análise do potencial de fertilização da macroalga *Kappaphycus alvarezii* com efluentes oriundos da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema de bioflocos.** 2014. 25 p. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

PIRES, Clóvis Murilo. **Aproveitamento do efluente da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* em sistema biofloco pela macroalga *Kappaphycus alvarezii*.** 2017. 54 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

PUESCHEL, Curt M.. Ultrastructure of Tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.409-424, dez. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1979.tb00713.x>.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray Franklin; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REIS, Renata Perpetuo; LOUREIRO, Rafael Rodrigues; MESQUITA, Frederico Sampaio. Does salinity affect growth and carrageenan yield of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales/Rhodophyta)? **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.1231-1234, 18 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02699.x>.

RINCONES, Raúl E.; YU, Shukun; PEDERSÉN, Marianne. Effect of dark treatment on the starch degradation and the agar quality of cultivated *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta, Gracilariales) from Venezuela. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 260-261, n. 1, p.633-640, jun. 1993. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00049082>.

SIMIONI, Carmen. **Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e, desenvolvimento de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio**. 2014. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

TEE, Mian Zi et al. Growth rate analysis and protein identification of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) under pH induced stress culture. **Aquaculture Reports**, [s.l.], v. 2, p.112-116, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.09.001>.

TERADA, Ryuta et al. The effect of irradiance and temperature on the photosynthesis and growth of a cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae) from Vietnam, based on in situ and in vitro measurements. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.457-467, 15 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0557-x>.

TSEKOS I, OROLOGAS N, DIMOPOULOU A. Effects of brefeldin A on the structure and function of the Golgi apparatus in the marine red alga *Erythrocladia subintegra* Rosenvinge. **Journal of Biological Research**. 7: 29 – 39, 2007.

USULDIN, Siti Rokhiyah Ahmad et al. Molecular investigation of carrageenan production in *Kappaphycus alvarezii* in different culture conditions: a proteomic approach. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.1989-2001, 17 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1119-1>.

WAKIBIA, Joseph G. et al. Seasonal changes in carrageenan yield and gel properties in three commercial eucheumoids grown in southern Kenya. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.208-215, 1 jan. 2006. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/bot.2006.026>.

WELLBURN, Alan 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**, [s.l.], v. 144, n. 3, p.307-313, set. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0176-1617(11)81192-2).

WU, Huanyang et al. Growth, pigment composition, chlorophyll fluorescence and antioxidant defenses in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta) under light stress. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 100, p.27-32, set. 2015.

YILDIZ, Gamze; DERE, Şükran. The effects of elevated-CO<sub>2</sub> on physiological performance of *Bryopsis plumosa*. **Acta Oceanologica Sinica**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.125-129, abr. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13131-015-0652-5>.

YONG, Y.S.; YONG, W.T.L.; ANTON A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of Applied Phycology** 25, 1831-1834, 2013.

ZOU, Dinghui; GAO, Kunshan. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. **Phycologia**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.510-517, 30 nov. 2009. International Phycological Society. <http://dx.doi.org/10.2216/08-99.1>

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BARRINGTON, K., CHOPIN, T. and ROBINSON, S. 2009. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In D. Soto (ed.). **Integrated Mariculture: a global review**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529. Rome, FAO. pp. 7–46.

CHOPIN, Thierry et al. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.975-986, dez. 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x>.

CHOPIN, Thierry et al. Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.209-220, dez. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01074.x>.

CHUNG, Ik Kyo et al. Using marine macroalgae for carbon sequestration: a critical appraisal. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.877-886, 19 out. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9604-9>.

COLE, Andrew J. et al. Using CO<sub>2</sub> to enhance carbon capture and biomass applications of freshwater macroalgae. **Gcb Bioenergy**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.637-645, 1 out. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/gcbb.12097>.

FAO. 2003. **A Guide to the seaweed industry**. Food and Organization of the United Nations. 2003. Rome, Italy.

FAO. 2017. **FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2015**. 2015. Rome, Italy.

FLORES, Ana Luiza Gampert. **Viabilidade do cultivo em tanques de macroalgas *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, gigartinales) para manutenção de matrizes**. 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Florianópolis, 2014.

GEST, Howard. History of the word photosynthesis and evolution of its definition. **Photosynthesis Research**, [s.l.], v. 73, n. 1/3, p.7-10, 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1020419417954>.

GUAN, Xiangyu et al. Photosystem II photochemistry and phycobiliprotein of the red algae *Kappaphycus alvarezii* and their implications for light adaptation. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/256549>.

HAYASHI, Leila et al. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.337-343, 22 jun. 2010b. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9543-5>.

HAYASHI, Leila et al. The Cultivation of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in Tropical and Sub-Tropical Waters. **Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities**, [s.l.], p.55-90, 2017. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-63498-2\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-63498-2_4).

INDRIATMOKO et al. Composition of photosynthetic pigments in a red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in different depths. **Procedia Chemistry**, [s.l.], v. 14, p.193-201, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.028>.

ISRAEL, Alvaro et al. Utilization of flue gas from a power plant for tank cultivation of the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 249, n. 1-4, p.311-316, set. 2015.

Ji, Yan et al. Ecophysiological responses of marine macroalgae to climate change factors. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.2953-2967, 4 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0840-5>.

LIDEMAN et al. Effect of temperature and light on the photosynthesis as measured by chlorophyll fluorescence of cultured *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus* sp. (Sumba strain) from Indonesia. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.399-406,

4 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9874-5>.

MSUYA, Flower E.. The impact of seaweed farming on the social and economic structure of seaweed farming communities in Zanzibar, Tanzania. **World Seaweed Resources: an Authoritative Reference System**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p.1-27, 01 jan. 2006.

PAULA, Edison Jose de; PEREIRA, Ricardo Toledo Lima; OHNO, Masao. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.1-9, mar. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00248.x>.

PAULA, Eugênia Vale de et al. A Inovação Social e o Desenvolvimento Sustentável na Algicultura: O Caso do Projeto Mulheres de Corpo e Alga. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.379-400, 3 ago. 2015. Centro Universitario de Maringa. <http://dx.doi.org/10.17765/2176-9168.2015v8n2p139-160>.

PEDRA, Anna Gabrielle La Macchia et al. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, [s.l.], v. 479, p.297-303, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.005>.

PELLIZZARI, Franciane; REIS, Renata Perpetuo. Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern Brazilian Coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.305-312, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000057>.

PIRES, Clóvis Murilo. **Análise do potencial de fertilização da macroalga *Kappaphycus alvarezii* com efluentes oriundos da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema de bioflocos**. 2014. 25 p. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

PIRES, Clóvis Murilo. **Aproveitamento do efluente da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* em sistema bioflocos pela macroalga *Kappaphycus alvarezii***. 2017. 54 p. Dissertação (Mestrado) -

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

PORSE, Hans; RUDOLPH, Brian. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.2187-2200, 24 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1144-0>.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray Franklin; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REBOURS, Céline et al. Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.1939-1951, 3 maio 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0304-8>.

SANTOS, Alex Alves dos. **Potencial de cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no litoral de Santa Catarina**. 2014. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

TERADA, Ryuta et al. The effect of irradiance and temperature on the photosynthesis and growth of a cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae) from Vietnam, based on in situ and in vitro measurements. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.457-467, 15 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0557-x>.

VALDERRAMA, Diego et al, eds. 2013. **Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming**. Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 580. Rome, FAO. 204 pp.

ZOU, Dinghui. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). **Aquaculture**, [s.l.], v. 250, n. 3-4, p.726-735, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.014>.



## APÊNDICE A – Monitoramento de pH e escolha da biomassa

Para definir a densidade a ser utilizada no presente trabalho em função das variações positivas do pH promovida pela atividade fotossintética, foi elaborado um pré-teste descrito a seguir.

Três densidades foram testadas: 7 g L<sup>-1</sup>(D7), 14 g L<sup>-1</sup> (D14) and 21 g L<sup>-1</sup>(D21). Talos de 0,5 ± 0,05 g de *Kappaphycus alvarezii* foram distribuídos em 12 erlenmeyers de 500 mL com água do mar esterilizada e enriquecidos com solução von Stosch 50%, resultando em quatro réplicas de cada tratamento. O pH foi monitorado utilizando um pHmetro PHTEK modelo PHS 3B, quatro vezes por dia: 8 h, 11 h, 14 h e 17 h, para registrar como o pH se comporta durante o dia nas diferentes densidades de cultivo.

Depois de uma semana de cultivo, os talos foram gentilmente secos com papel toalha, pesados e a taxa de crescimento específica (TC) foi calculado de acordo com a fórmula (YONG, YONG e ARTON, 2013):

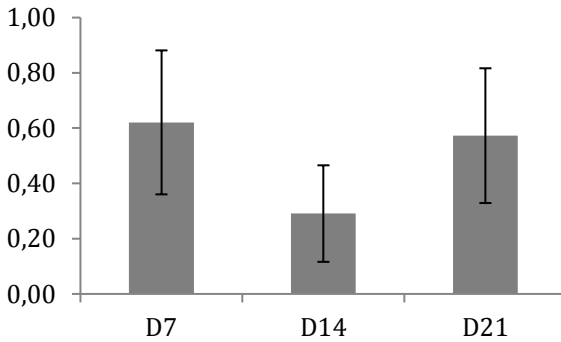
$$TC = \left[ \left( B^f / B^i \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100$$

Onde, Bf = biomassa final, Bi = biomassa inicial, t = tempo (em dias).

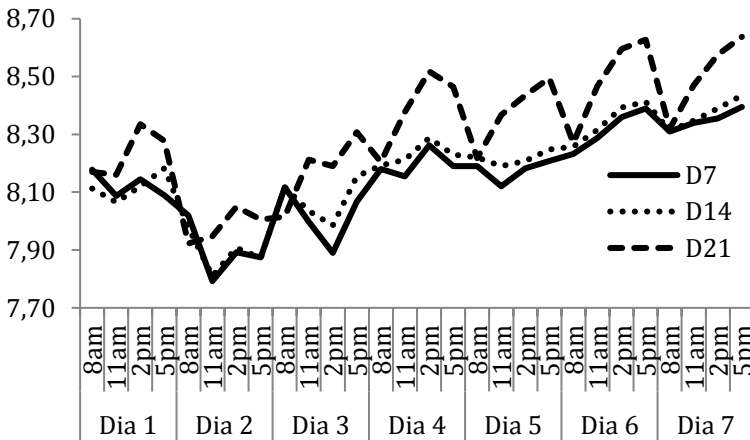
As taxas de crescimento dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas (Tukey, p<0,05) (Figura 10).

O pH se comportou com um aumento contínuo ao longo do dia e indicou baixa nos períodos da noite, o que sugere a influência da atividade fotossintética sobre esse parâmetro. Durante todo o período experimental, o pH apresentou aumento progressivo (Figura 11).

As médias finais do pH registrada no tratamento D21 (8,64 ± 0,06) foram significativamente superiores às registradas nos outros tratamentos, portanto, essa foi a densidade escolhida para os outros experimentos.



**Figura 10.** Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas in vitro em diferentes densidades após uma semana de cultivo. Dados representam as médias de cada tratamento. Barras verticais representam os desvios padrão.



**Figura 11.** Médias das variações de pH no cultivo de *K. alvarezii* in vitro em diferentes densidades durante uma semana.