



**Avaliação do efeito da temperatura e luz no  
crescimento *in vitro* de *Ulva rigida* C. Agardh  
(Chlorophyta, Chlorophyceae)**

Bruno Ivo Martins Marques Magalhães

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal

Universidade dos Açores  
Departamento de Biologia

---

**Ponta Delgada 2014**

Bruno Ivo Martins Marques Magalhães

**Avaliação do efeito da temperatura e luz no crescimento *in vitro* de *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta, Chlorophyceae)**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, submetida à Universidade dos Açores.

Orientador – Professora Doutora Ana Isabel de Melo Azevedo Neto

Categoria – Professora associada com agregação

Afiliação – Departamento de Biologia, Universidade dos Açores



Universidade dos Açores  
Departamento de Biologia

---

**Ponta Delgada 2014**

**Como citar este trabalho:**

Magalhães BIMM (2014) Avaliação do efeito da temperatura e luz no crescimento *in vitro* de *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta, Chlorophyceae). Dissertação apresentada à Universidade dos Açores para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal. Ponta Delgada.

O nosso planeta devia chamar-se Oceano. Este pequeno orbe que flutua na escuridão infinita do espaço é um reduto de vida no frio sinistro do Universo... Calcula-se que mais de 90 % da biodiversidade do mundo resida nos oceanos...

Auxiliados pelas novas tecnologias, podemos agora ir além dos cerca de dois por cento dos oceanos que as gerações anteriores estudaram. Mas, mesmo com as tecnologias modernas, só daqui a várias gerações se alcançará um conhecimento semelhante ao que temos acerca da terra...

Por muito distanciados que nos sintamos dos oceanos, cada gesto que fazemos na nossa vida quotidiana afeta o ciclo da água do nosso planeta... um maior conhecimento do sistema do oceano e dos seus habitantes pode incitar-nos a trabalhar para que o nosso planeta seja de novo saudável...

Fabien Cousteau (Prefácio, *In: American Museum of Natural History 2007*)

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Ana Neto pela exímia orientação do presente trabalho, desde a aceitação como aluno de mestrado e proposta de tema a desenvolver, até ao determinante incentivo final de apresentação da tese.

Ao Doutor Gustavo Martins pelo interesse, disponibilidade e preciosa orientação no delineamento experimental, pela orientação e ajuda nas sessões tutoriais em tratamento multivariado, pela revisão do texto.

No emparelhamento de tarefas laboratoriais, à colega Maria Inês Pavão pelo seu profissionalismo e partilha dos mesmos objetivos.

Às pessoas que apoiaram na concretização do trabalho prático de laboratório, durante nove meses, com especial agradecimento à Mestre Eunice Nogueira pela condução de recolha de águas neríticas até à autoclavagem, bem como pela organização do material de laboratório, vouchers e programação das câmaras de cultivo.

Ao Dr. Emanuel Xavier pela indicação do meio de cultivo comercial para teste experimental.

Pela colaboração na montagem dos cultivos e pesagens algais, aos alunos de licenciatura Mariana Antunes e Flávio Rodrigues e aos estagiários Eurodisseia Inês Sanchez, Olaia Morán e Mestre Olivier Laroche.

Ao Dr. Nuno Álvaro pela elaboração dos mapas de localização geográfica.

Ao Prof. José Azevedo nas sugestões para a estatística descritiva.

Ao Mestre Afonso Prestes pela ajuda final de estruturar a tese bem como a partilha de conhecimentos durante o mestrado.

Aos restantes Colegas e Professores do MBBV da 2ª edição 2011-12, na exploração do espantoso mundo “verde”.

Decididamente à Mãe linda do meu coração que me acompanha à distância.

Pai, foste determinante. Foi a tua partida que me fez sair em busca do que verdadeiramente gosto, só assim faz sentido.

Minhas irmãs, Ana Paula e Lara, vim para os Açores na certeza de vos trazer no pensamento a cada bom momento. Ao meu cunhado Pedro, meus sobrinhos e afilhados.

À minha Família e Amigos de verdade, tendo a sorte de dizer que todos os dedos que possuo, não chegam para vos contar e de ter a vossa amizade e conselhos. Não é o mar que nos separa, mas sim o que nos une. Neste azul profundo maravilhoso! Ao puto “cisco” que nunca desistiu de sonhar.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABELAS .....	VI
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Breve História e importância das macroalgas a nível mundial .....	1
1.2. Potencialidades e utilizações de macroalgas marinhas .....	3
1.3. Biologia e ecologia de <i>Ulva rigida</i> .....	7
1.4. Ecofisiologia de <i>Ulva rigida</i> .....	10
1.5. Caracterização do Arquipélago dos Açores .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
3. METODOLOGIA .....	14
3.1. Amostragem .....	14
3.2. Trabalho de laboratório .....	15
3.2.1. Preparação do material (acrílico, vidro e metal).....	15
3.2.2. Tratamento da água .....	17
3.2.3. Preparação do meio de cultivo.....	17
3.2.4. Preparação dos vouchers .....	17
3.2.5. Desenho experimental .....	17
3.2.6. Preparação das câmaras .....	19
3.2.7. Preparação das algas e dos contentores de cultivo .....	19
3.2.8. Cultivos experimentais .....	20
3.2.9. Cultivos para avaliação do efeito da temperatura.....	22
3.2.10. Cultivos para avaliação do efeito do fotoperíodo.....	22
3.2.11. Análise de dados.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Avaliação do efeito da temperatura.....	25
4.2. Avaliação do efeito do fotoperíodo .....	29
5. DISCUSSÃO .....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
Anexo I – Preparação de meio de cultura von Stosch (VS) .....	42

Anexo II – Preparação do meio de cultura de Nitratos e Fósforo (N32P2).....	43
Anexo III – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS, 10°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	44
Anexo IV – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS, 15°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	44
Anexo V – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS, 20°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	45
Anexo VI – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 10°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	45
Anexo VII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 15°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	46
Anexo VIII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 20°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	46
Anexo IX – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 10°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	47
Anexo X – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 15°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	47
Anexo XI – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 20°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	48
Anexo XII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 10°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	48
Anexo XIII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 15°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	49
Anexo XIV – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 20°C e 12 h escuro/12 h luz) .....	49
Anexo XV – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 0 h escuro/24 h luz) .....	50
Anexo XVI – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 0 h escuro/24 h luz) .....	50
Anexo XVII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 8 h escuro/16 h luz) .....	51
Anexo XVIII – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 8 h escuro/16 h luz) .....	51

Anexo XIX – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 16 h escuro/8 h luz) .....	52
Anexo XX – Pesos (g) de <i>Ulva rigida</i> na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 16 h escuro/8 h luz) .....	52



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aquicultura na produção mundial, focando-se nos principais grupos de espécies (FAO 2010).....	2
Figura 2. Corte histológico em fronde de <i>U. rigida</i> evidenciando duas fiadas de células (foto de Ignacio Bárbara, algaeBase 2013).....	8
Figura 3. Detalhes de frondes de <i>Ulva rigida</i> : a) espinhos marginais; b) células de superfície com múltiplos pirenoides (fotos de Ignacio Bárbara, algaeBase 2013). 8	
Figura 4. Ciclo de vida do género <i>Ulva</i> (PennState 2002). ....	9
Figura 5. <i>U. rigida</i> em ecossistemas dos Açores: a) subtidal (foto de DOP-UAç 2013); b) intertidal rochoso (foto Bruno Magalhães, 2013).....	10
Figura 6. Localização geográfica do Arquipélago dos Açores (Nuno Álvaro – MAR-CIIMAR/CIRN) .....	12
Figura 7. Normais climatológicas no arquipélago dos Açores (1971-2000): a) temperatura; b) precipitação (IM-AEMET 2011). ....	13
Figura 8. Localização da ETAR-PDL na costa Sul da Ilha de São Miguel, coordenadas UTM (Nuno Álvaro – MAR-CIIMAR/CIRN, com adaptações de fotos da zona em estudo, Bruno Magalhães 2013).....	14
Figura 9. Exemplos de <i>Ulva rigida</i> colhidas nas poças do intertidal da ETAR-PDL, no estado fenológico: frondes desenvolvidas. Maior expressão vegetativa de janeiro a março de 2013, durante os meses de colheita (outubro 2012 a maio 2013, Bruno Magalhães 2013). ....	16
Figura 10. Caixas de Petri quadri-divididas: a e b) aleatoriedade de distribuição em prateleiras de câmara de cultivo; c) etiquetagem e porção algal por compartimento (Bruno Magalhães 2013).....	18
Figura 11. Crescimento médio algal ( $\pm$ SE), mantendo fotoperíodo 12h escuro/12h luz, em diferentes temperaturas. Meios: a) VS; b) VS-10; c) N32P2; d) N32P2-10... 27	
Figura 12. Taxa de mortalidade, mantendo fotoperíodo 12 h escuro/12 h luz, em diferentes temperaturas. Meios: a) VS; b) VS-10; c) N32P2; d) N32P2-10. ....	28
Figura 13. Crescimento médio algal ( $\pm$ SE) e respetiva taxa de mortalidade, mantendo temperatura 15°C, em diferentes fotoperíodos. Refreshamento: a) e c) VS; b) e d) VS-10. ....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias ativas isoladas de <i>U. rigida</i> com bioatividade. ....	6
Tabela 2. ANOVA comparando o efeito da variação da temperatura (10, 15 e 20°C), meio de cultura (VS e N32P2) e refrescamento (sem e com), no crescimento e mortalidade algal aos 40 dias. ....	25
Tabela 3. Teste $\chi^2$ de independência entre a frequência de <i>U. rigida</i> epifitada em diferentes temperaturas e meios de cultivo (df = 4, $\chi^2$ global = 7.75, P > 0.10). .	28
Tabela 4. ANOVA comparando a variação do refrescamento do meio de cultura (VS e VS-10) com os fotoperíodos (0E/24L, 8E/16L e 16E/8L), no crescimento e mortalidade algal aos 40 dias. ....	29
Tabela 5. Teste $\chi^2$ de independência entre a frequência de <i>U. rigida</i> epifitada em diferentes fotoperíodos e meios VS com e sem refrescamento (df = 2, $\chi^2$ global = 1.20, P > 0.55). ....	30

## RESUMO

A utilização de macroalgas marinhas com fins nutricionais e de saúde remonta a épocas muito antigas, havendo registos arqueológicos na América do Sul de há mais de 12000 anos a.c. Na atualidade as potencialidades das macroalgas marinhas são reconhecidas e alvo de interesse generalizado, particularmente nos países ocidentais. Algumas das espécies de maior importância económica mundial, indicadas pela FAO, pertencem às algas verdes (divisão Chlorophyta), de que é exemplo a macroalga *Ulva rigida* C. Agardh. Esta espécie oportunista tem uma distribuição cosmopolita, sendo abundante no litoral açoriano onde tem um papel importante nas comunidades do intertidal rochoso. Apesar da sua importância e distribuição, a fisiologia destes organismos nunca foi objeto de investigação nestes sistemas insulares. O presente projeto pretendeu contribuir para colmatar esta lacuna e teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura e da luz no crescimento de plantas de *Ulva rigida* em cultivo *in vitro*. Coletaram-se indivíduos selvagens que foram submetidos a cultivo controlado em laboratório em diferentes combinações de temperatura (10, 15 e 20°C) e fotoperíodo (24 dia; 16 dia/8 noite; 12 dia/12 noite; 8 dia/16 noite), utilizando os meios de cultivo von Stosch, com e sem refrescamento, e água salgada enriquecida com nutrientes numa combinação de Nitrato 32: Fósforo 2 (N32P2), com e sem refrescamento. Os resultados revelaram que o crescimento algal foi maior às temperaturas de 15 e 20°C e menor a 10°C e significativamente maior quando se usou meio de cultivo von Stosch comparativamente a N32P2. A mortalidade algal em meio von Stosch foi menor também nas duas temperaturas mais elevadas (20 e a 15°C). No meio N32P2 sem refrescamento não se registou nenhum epifitismo, mas quando houve refrescamento e em ambos os casos em meio von Stosch, registaram-se altos níveis de epifitismo. O maior crescimento de *U. rigida* às temperaturas testadas e para o fotoperíodo de 16 horas de luz, pode estar relacionado com uma adaptação às condições encontradas no ecossistema açoriano, pois as temperaturas mínimas médias da superfície nerítica são de 15-16°C. Verificou-se fotoinibição nos cultivos submetidos a luz contínua de 16200 lux durante 24 h. A inibição foi superior nas situações em que se efetuou refrescamento do meio com adição de nutrientes.

## ABSTRACT

The use of marine macroalgae for nutritional and health purposes dates back to ancient times, with archaeological records from South America dating back to 12,000 years BC. At present, the potential of seaweeds are recognized and targeted for widespread interest, particularly in Western countries. Some of the world's most economically important species indicated by FAO belong to the green algae (Chlorophyta), as exemplified by *Ulva rigida* C. Agardh. This opportunistic species has a cosmopolitan distribution, being abundant in the Azorean coasts, where it has an important role in the rocky intertidal communities. Despite its importance and distribution, the physiology of these organisms has never been investigated in these insular systems. This project intended to fulfill this gap and was aimed at evaluating the effect of temperature and light on the in vitro growth of *Ulva rigida*. For this purpose, wild individuals were collected and subjected to controlled in vitro cultures at different combinations of temperature (10, 15 and 20°C) and photoperiod (24 day, 16 day/8 night; 12 day/ 12 night; 8 day/16 night), using as culture media von Stosch, with and without refreshing, and saltwater enriched with nutrients in a combination of nitrate 32: Phosphor 2 (N32P2), with and without refreshing. Results revealed that the algal growth was greater at the temperatures of 15 and 20°C and lower at 10°C, and significantly greater in von Stosch culture medium in comparison with N32P2. The algal mortality was lower in von Stosch medium at the two higher tested temperatures (20 and 15°C). Epiphytism was absent in medium N32P2 without refreshing, but high levels of epiphytism were recorded in N32P2 with refreshing and in von Stosch medium, with and without refreshing. The best growth recorded for the photoperiod of 16 hours light, can reflect an adaptation of *U. rigida* to the local conditions, where average minimum temperatures of surface waters are 15-16°C. There was photoinhibition in the cultures submitted to continuous light of 16200 lux for 24 h. This inhibition was higher when the medium was refreshed with new nutrients.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Breve História e importância das macroalgas a nível mundial

O homem começou por recolher espécies aquáticas para a alimentação, pelo método de apanha manual e direta, aproveitando aberturas naturais da orla costeira, sendo esta técnica utilizada até à atualidade. A apanha de algas é realizada de forma individual na zona intertidal (entre marés), retirando-as de forma brusca do substrato, ao puxão, ou apanhadas arrojadas nas praias ou nos recifes rochosos expostos. No decorrer dos anos, aperfeiçoaram-se utensílios (como ancinhos, camaroeiros, espetos, pequenos enchelevares, tenazes, etc.) e técnicas complementares como mergulho em apneia para recolha no subtidal (Rodrigues 2008). No Chile está documentada a utilização de algas marinhas na dieta e saúde humana, datada de há mais de 12000 anos a.c., constituindo um dos registos mais antigos (Dillehay et al. 2008).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), atribui o uso restrito pelo homem de macroalgas marinhas, durante muitos anos, a países de cultura oriental. Na segunda metade do século XV o aproveitamento das mesmas estendeu-se até aos países da América do Sul. O Chile em 1947 inicia a exploração de pradarias naturais de algas presentes na sua costa. Mais tarde, a Argentina e o Brasil iniciam a atividade de exploração e exportação de bancos naturais com fins à produção de géis (Cervigón et al. 1992). Atualmente as algas são comumente consumidas na Ásia e também ganharam popularidade na Europa. No entanto, os dados sobre a biodisponibilidade dos seus componentes são limitados (Taboada et al. 2010).

A contribuição da aquicultura para a produção de produtos do mar a nível mundial tem aumentado nas últimas décadas (Fig. 1), tornando-se uma atividade económica significativa para muitas nações. Apesar de Portugal ser um dos maiores consumidores de alguns desses produtos na Europa, a aquicultura continua a ser pouco desenvolvida, sendo os Açores um dos poucos lugares onde permanece inexistente (Isidro et al. 2008), apesar de tradicionalmente as algas serem utilizadas quer como alimento, quer com fins comerciais (Neto et al. 2005).

A nível mundial, entre 2008 a 2010, destacaram-se como grandes produtores de algas em aquicultura a China (62.8 para 58.4 %, 11.1 milhões de ton.), a Indonésia (13.7 para 20.6 %, 3.9 milhões de ton.), as Filipinas (10.6 para 9.5 %, 1.8 milhões de

ton.), a República da Coreia (5.9 para 4.7 %, 901700 ton.), a República Popular Democrática da Coreia (2.8 para 2.3 %, 444300 ton.), o Japão (2.9 para 2.3 %, 432800 ton.), a Malásia (1.1 %, 207900 ton.) e a República Unida de Tanzânia (0.7 %, 132000 ton.) (FAO 2010, 2012). O Chile é o produtor de algas mais importante depois da Ásia, produzindo 21700 ton. As algas mais produzidas foram *Laminaria japonica* Areschoug (4.8 milhões ton.), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva, *Eucheuma* spp. (3.8 milhões ton.), *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (1.8 milhões ton.), *Gracilaria* spp. (1.4 milhões ton.) e *Porphyra* spp. (1.4 milhões ton.). A produção realizou-se tanto a grande escala, como em pequena escala, para o consumo pelas comunidades locais (FAO 2010).

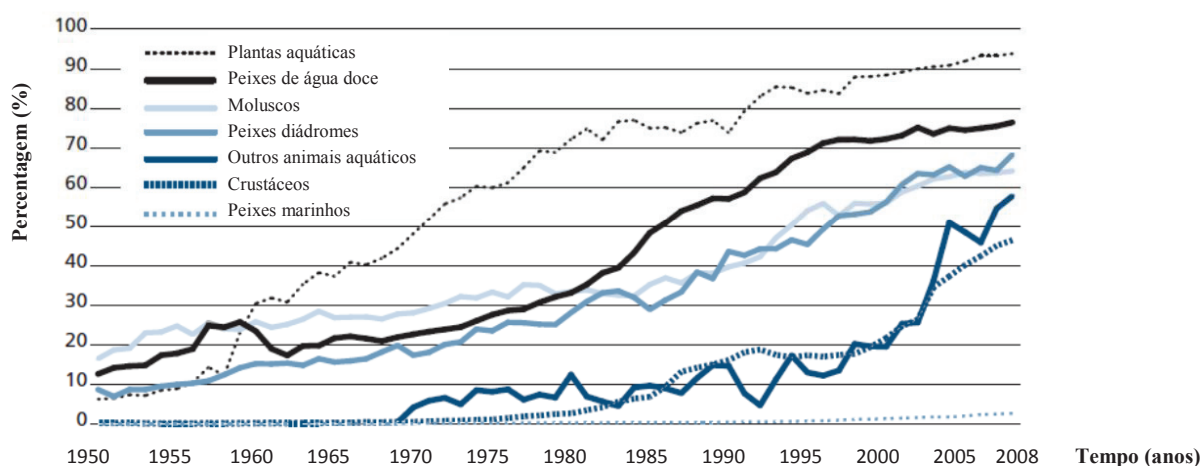


Figura 1. Aquicultura na produção mundial, focando-se nos principais grupos de espécies (FAO 2010).

O aumento em volume da taxa média anual, para produção de algas aquáticas, foi de 9.5 % no decénio de 1990 e de 7.4 % no decénio de 2000. Em contraste, a colheita de recursos algais nos ecossistemas representou apenas 4.5 % da produção de algas em 2010 (FAO 2012).

As regras aplicáveis à produção de algas marinhas, estão descritas para o Espaço Europeu no Artigo 13.º do Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho Europeu de 28 de junho. O documento refere que a colheita de algas marinhas selvagens, ou de partes destas, que cresçam espontaneamente no mar é considerada um método de produção biológica, desde que as zonas de colheita se situem em águas em excelente estado ecológico como definido na Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do

Conselho, de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água. Refere ainda que é necessário salvaguardar que a colheita não afete a estabilidade a longo prazo do habitat natural nem a conservação das espécies na zona de amostragem.

Para ser considerada biológica, a cultura de algas marinhas deve ser realizada em zonas costeiras cujas características ambientais e sanitárias sejam pelo menos equivalentes às enunciadas anteriormente. Além disso, devem ser utilizadas práticas sustentáveis em todas as fases da produção, desde a colheita de algas juvenis até à colheita de algas adultas, assegurando a manutenção de uma grande diversidade genética. Convém efetuar regularmente a colheita de algas juvenis na natureza para complementar as populações de cultura interior. Não podem ser utilizados fertilizantes, a não ser em instalações interiores e se tiverem sido autorizados para utilização no modelo de produção biológica.

## **1.2. Potencialidades e utilizações de macroalgas marinhas**

Os organismos autotróficos (algas e bactérias) designados por produtores primários constituem a base da vida nos oceanos, sendo responsáveis pela conversão do dióxido de carbono em matéria orgânica através da fotossíntese e quimiossíntese (Castro & Huber 2000).

Dados recentes da biologia evolutiva das algas, confirmam que estas não estão englobadas num único *taxon*. Constituem, sim, um conjunto diverso quanto à sua organização, origem e características morfológicas, fisiológicas e ecológicas (Judd et al. 2002), podendo ser classificadas pelos respetivos pigmentos fotossintéticos e substâncias de reserva (AMA 2007).

As algas marinhas revelam três cores dominantes, sendo os pigmentos principais os responsáveis por conferir as diferentes tonalidades. Mundialmente estima-se existirem 12000 espécies de algas marinhas Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae, estando registadas 1200 para o Atlântico Norte. Nos Açores são conhecidas 368 espécies, nomeadamente 56 Chlorophyceae, 75 Phaeophyceae e 237 Rhodophyceae (Neto et al. 2005).

Dentro das inúmeras potencialidades de utilizações das macroalgas, destacam-se o seu papel ecológico e valor ambiental, a importância que têm para a investigação

científica em vários domínios, nomeadamente para a compreensão da origem e evolução dos seres vivos (Reviere 2006).

A Diretiva-Quadro da Água (DQA) estabelece as linhas para uma gestão integrada e sustentável das águas naturais, referindo a necessidade de instrumentos analíticos. A avaliação pode ser através de indicadores ambientais, recorrendo aos valores de referência definidos na legislação Portuguesa no Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto e Europeia através da Diretiva 2000/60/EC. De acordo com a DQA e em particular sobre as águas costeiras, as macroalgas são um elemento chave para avaliar o estado de qualidade ecológica, tendo sido estabelecidas as condições ecológicas de referência e estados de qualidade relativos às macroalgas. A eficiência das algas como sensores biológicos está bem comprovada na literatura (Malea & Haritonidis 2000, Nelson et al. 2003, Sjöo & Mörk 2009, Neto et al. 2012), destacando-se o trabalho de Villares & Carballeira (2006) que usaram *U. rigida* como modelo biológico no estudo da eutrofização marinha intertidal. Também Boubonari et al. (2008) investigaram esta espécie e revelaram tratar-se de um bom bioindicador de metais (Zn, Cu, Pb e Cd) em ambientes costeiros de baixa salinidade. Esta informação foi reforçada pela investigação de Rybak et al. (2012) que indicam ainda que populações de *Ulva* sp. em ecossistemas de água doce bioacumulam mais eficientemente metais pesados (Cd, Ni e Pb) e metais alcalino-terrosos (Ca e Mg), em comparação com as espécies de ecossistemas marinhos. De referir ainda o trabalho de Carafaa et al. (2009) que descreve o modelo preditivo de bioacumulação de herbicidas *s*-triazina em *U. rigida*.

As algas marinhas são utilizadas comumente em múltiplas aplicações pelo homem. A principal utilização é como fonte de alimentação e como fonte de géis (McHugh 2003, Gamal 2010), nomeadamente para produzir hidrocolóides, alginatos, agar, agarose e carragenina como agentes espessantes e gelificantes (McLachlan 1985, McHugh 2003, Graham et al. 2009).

A composição das macroalgas marinhas em lípidos e ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), tem interesse na indústria biotecnológica, pois são considerados essenciais na nutrição humana e de diversos animais. Nos países Ocidentais, os ácidos gordos n-3 são utilizados na profilaxia e modulação de algumas doenças humanas, nomeadamente em doenças coronárias e inflamatórias, desordens de origem auto-imune, depressão e doença de Alzheimer (Patarra 2008).



Algumas das espécies de maior importância económica mundial, indicadas pela FAO, pertencem à Divisão das algas verdes (Chlorophyta), pelo seu uso na alimentação quotidiana humana, como é o caso da *Ulva lactuca* Linnaeus (alface do mar) que é consumida em saladas ou fermentada para chá, possuindo certo valor medicinal. As algas verdes podem, ainda, ser utilizadas (i) para a extração de produtos derivados com aplicação em farmacologia (ex. compostos tipificantes, para determinação de grupos sanguíneos) e cosméticos, (ii) como alimento direto para animais (ex. aves alimentadas com preparado com base em *Ulva* e *Enteromorpha*); (iii) em preparados concentrados alimentícios; (iv) em misturas com outros compostos e (v) como fertilizante vegetal (Cervigón et al. 1992).

*Ulva rigida* é uma excelente fonte de nutrientes e pode melhorar uma dieta equilibrada contribuindo para a redução de colesterol LDL, sendo rica em proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais e tem baixo teor em lipídios (Taboada et al. 2010). A composição bioquímica de *Ulva rigida*, colhida numa zona costeira da Índia, foi analisada revelando 76 % de humidade, 6.64 % de proteínas, 22 % de carboidratos, 12 % de lípidos totais, 23 % de fenol, 13 % de clorofila *a*, 7.5 % clorofila *b*, 21 % clorofila total, 4.5 % de carotenóides, 8.9 % de aminoácidos livres. Os principais ácidos gordos em lípidos totais foram 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 (Satpati & Pal 2011).

Algumas algas castanhas (Heterokontophyta, Phaeophyceae), sobretudo os géneros de águas frias conhecidas como “Kelps” (*Macrocystis*, *Nereocystis*, *Lessonia*, etc.), mas também as de águas temperadas tropicais (*Sargassum* e *Turbinaria*) são fontes de ácido algínico, um ficocolóide presente nas paredes celulares das algas castanhas, obtendo-se alginatos (sais de ácido algínico) e polímeros com grande procura nos mercados mundiais (Cervigón et al. 1992).

Nas regiões tropicais, as algas vermelhas (Rhodophyta), são as que têm maior importância económica. Sendo utilizadas para consumo em fresco, como o caso do género *Porphyra*, *Halymenia* e *Gracilaria*. Outros géneros têm grande importância para produção de agar e carragenina, que possui ampla utilização pelas suas características e por existirem vários tipos (carrageninas Kappa, Lambda, Iota, etc.) (Cervigón et al. 1992).

Algas comestíveis são ricas em bioativos antioxidantes, fibras dietéticas solúveis, proteínas, minerais, vitaminas e ácidos gordos polinsaturados. Pesquisas recentes demonstraram o seu potencial para a medicina complementar, as macroalgas

castanhas, verdes e vermelhas têm propriedades terapêuticas para a saúde humana e gestão de doenças, tais como antiobesidade, anticancerígena, antidiabética, anti-hipertensivos, antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatório, imunomodulatórios, tireoide, estimulante antiestrogênico, neuroprotetor, antiviral, antifúngicos, antibacterianos e propriedades de cura do tecido *in vivo*. Compostos ativos incluem polissacarídeos sulfatados e taninos, carotenóides (ex. fucoxantina), minerais, peptídeos e sulfolípidos, com benefícios comprovados contra doenças degenerativas metabólicas. Os seus modos de ação terapêutica e componentes bioativos foram apresentados em diversas publicações científicas (Mohamed et al. 2012). A atividade biológica de extratos ou metabolitos algais é bem conhecida para muitas algas (Santos & Bettencourt 2007, Gamal 2010, Lee et al. 2013), incluindo *Ulva rigida* colhida nos Açores (Silva et al. 2013a, b, Tabela 1).

Tabela 1. Substâncias ativas isoladas de *U. rigida* com bioatividade.

<b>Extrato ou metabolitos</b>	<b>Atividade biológica</b>
Dietil éter e metanol	Antimicrobiano
Diclorometano e etanol	Citotoxicidade
Etanol	Antimutagénico, antioxidante

Nos Açores as duas espécies de algas agarófitas, *Gelidium microdon* Kützing (cabelão) e *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) (musgão), eram coletadas manualmente, por mergulho ou diretamente na zona das marés, secas ao ar, limpas e processadas nas fábricas existentes no arquipélago (numa fase inicial que durou até cerca do decénio de 1990) ou preparadas para exportação e posterior utilização para a produção industrial de agar (Neto et al. 2005). Também nesta região o consumo de macroalgas é generalizado e reconhecido como prática usual em certas ilhas (Patarra 2008). A alga castanha *Fucus spiralis* Linnaeus (“tremoço do mar”) é considerada um petisco - as porções reprodutivas terminais do seu talo são coletadas e consumidas frescas; a alga vermelha *Porphyra* (“erva patinha”) é apanhada e consumida frita ou incorporada em sopas, omeletes ou tortas; as algas vermelhas *Laurencia* e *Osmundia* (“erva malagueta”) são conservadas em vinagre e consumidas ao longo do ano, a acompanhar peixe frito; a alga verde *Ulva rigida* é utilizada na confeção de tortas e/ou sopas (Neto et al. 2005).

Existe longa tradição em todo o mundo na utilização de macroalgas como fertilizantes em terrenos agrícolas, permitindo aumentar as produções, disponibilizando macronutrientes principais (azoto, fósforo e potássio), como secundários (cálcio, magnésio e enxofre), sendo muito rico em micronutrientes aniões e catiões, contribuindo para melhoria da estrutura e da matéria orgânica do solo. A utilização como complemento alimentar em aquicultura é benéfica para a produção de biomassa animal, podendo ser utilizada a espécie *Ulva lactuca* (McHugh 2003).

O aproveitamento do género *Ulva*, como biofiltros de efluentes de águas domésticas, indústria e aquicultura, é referido por vários autores (Shaojun & Tifeng 2008, Yokoyama & Ishihi 2010, Kang et al. 2011, Nielsen et al. 2011, Lawton et al. 2013, Silva et al. 2013a).

A integração de *Ulva* em aquicultura multitrófica serve um propósito binário: a produção de biomassa, simultaneamente com a remoção de nutrientes a partir das águas efluentes da aquicultura, reduzindo assim a carga de nutrientes dissolvidos para o ambiente. Além de seu elevado potencial de crescimento, *Ulva* tem altas taxas de assimilação de nutrientes, especialmente de azoto amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), e cresce bem em águas eutrofizadas, que qualificam a alga para fins de biorremediação, tornando a biomassa menos adequada para a digestão anaeróbica, mas potencialmente interessante como um suplemento alimentar (Nielsen et al. 2011).

### **1.3. Biologia e ecologia de *Ulva rigida***

A alga verde *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta, Ulvophyceae, Ulvales, Ulvaceae, Guiry & Guiry 2013), de nome comum alface-do-mar, tem estrutura foliar designada por fronde ou lâmina. A fixação ao substrato faz-se por um pequeno caule e disco (Neto et al. 2005).

A fronde de *U. rigida* é plana, pálida a verde-escura, geralmente 10 a 15 cm até 30 cm de comprimento podendo atingir 1 m, com margens caneladas e muitas vezes profundamente divididas, podendo evidenciar pequenos orifícios. Frágil e delicada nas partes jovens, é de textura resistente e firme nos organismos maduros (Burrows 1991, Neto et al. 2005, Brodie et al. 2007). Possui duas camadas de células de espessura (Fig. 2, Guiry & Guiry 2013), que têm cloroplastos parietais com (1)2-4 pirenídes (Brodie et

al. 2007) e a sua margem pode possuir denticulos, mais numerosos e óbvios em direção à base onde estreita drasticamente (Fig. 3a, Guiry & Guiry 2013).

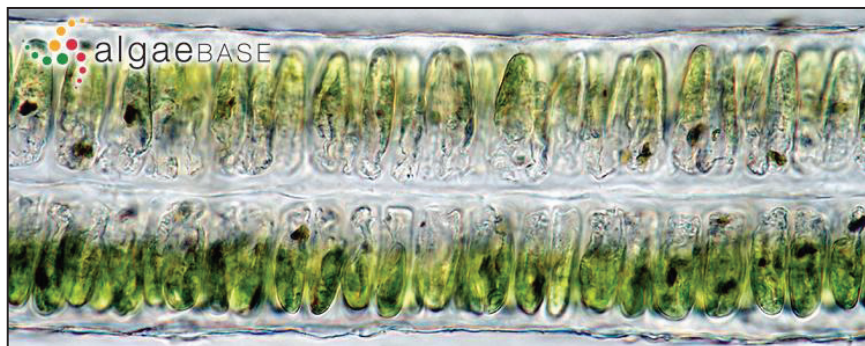


Figura 2. Corte histológico em fronde de *U. rigida* evidenciando duas fiadas de células (foto de Ignacio Bárbara, algaeBase 2013).

Ampliando microscopicamente a zona basal da fronde, verifica-se a presença de algumas células rizoidais de maior dimensão, em relação às vizinhas e às da região do talo médio (Burrows 1991). Na vista de superfície, as células aparecem como irregulares ou em linhas curvas indistintas (Brodie et al. 2007), podendo ter formas poligonais com cantos arredondados (Fig. 3b, Guiry & Guiry 2013).

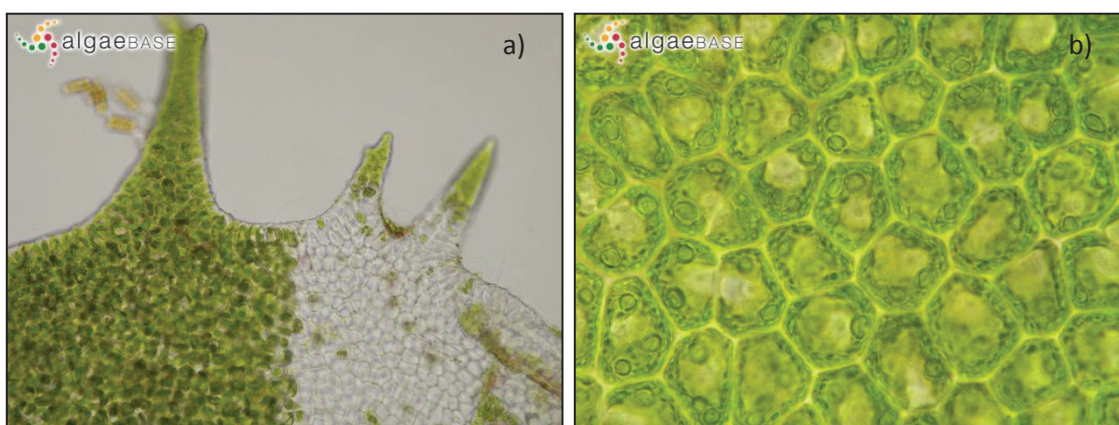


Figura 3. Detalhes de frondes de *Ulva rigida*: a) espinhos marginais; b) células de superfície com múltiplos pirenoides (fotos de Ignacio Bárbara, algaeBase 2013).

*U. rigida* é uma espécie dióica, com reprodução por zoósporos quadriflagelados e por gâmetas biflagelados anisogâmicos (Burrows 1991, Brodie et al. 2007). O ciclo de

vida é haplodiplonte (Fig. 4) com alternância de gametófito isomórfico (haploide) com geração esporófito (diploide), mas ambos os macro e microgâmetas podem desenvolver partenogénese (Burrows 1991).

A reprodução vegetativa é por fragmentação e muito comum em algumas populações (Brodie et al. 2007).

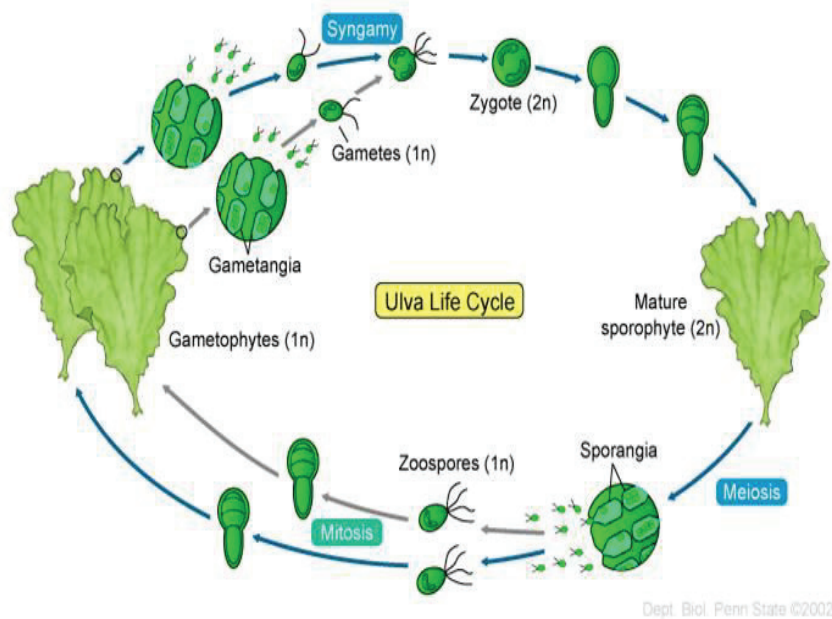


Figura 4. Ciclo de vida do género *Ulva* (PennState 2002).

*U. rigida* é considerada espécie marinha cosmopolita do Ártico ao Antártico, percorrendo as latitudes das costas continentais do Atlântico, Índico e Pacífico, inclusive as ilhas oceânicas (Guiry & Guiry 2013). Esta macroalga é espécie epífita e epilítica (Neto et al. 2005, Brodie et al. 2007), ocorre em baías abrigadas, lagoas e portos, também em costas expostas, ao longo da zona litoral e no sublitoral, estendendo-se a sua distribuição para águas salobras (Burrows 1991). Pode ainda ser encontrada livre em flutuação em baías abrigadas, chegando a formar conspícuas marés verdes em locais eutrofizados (Brodie et al. 2007).

*U. rigida* é frequente em todo o sistema litoral do arquipélago dos Açores na zona de marés e submersa adjacente pouco profunda (Neto 1989, Neto & Baldwin 1990, Neto et al. 1990, Neto 1991 e 1994, Tittley & Neto 1994, Neto 1997, 2000a, b, 2001), nomeadamente estabelece-se em rocha exposta e nas poças (Fig. 5, Wallenstein et al. 2010), ocorrendo geralmente em profundidades menores do que 12 m (Tempera et al.



2013). É um constituinte importante do musgo algal e tem ciclo anual mas pode formar populações perenes de talo verde-claro, achatado e membranoso muito variável na forma e dimensões. É comum ocorrer sob a forma de tufos com cerca de 2 cm de altura, mas pode crescer isoladamente e atingir os 15 cm (Neto et al. 2005) ou mesmo os 30 cm de comprimento em zonas permanentemente submersas (DOP-UAç 2013).

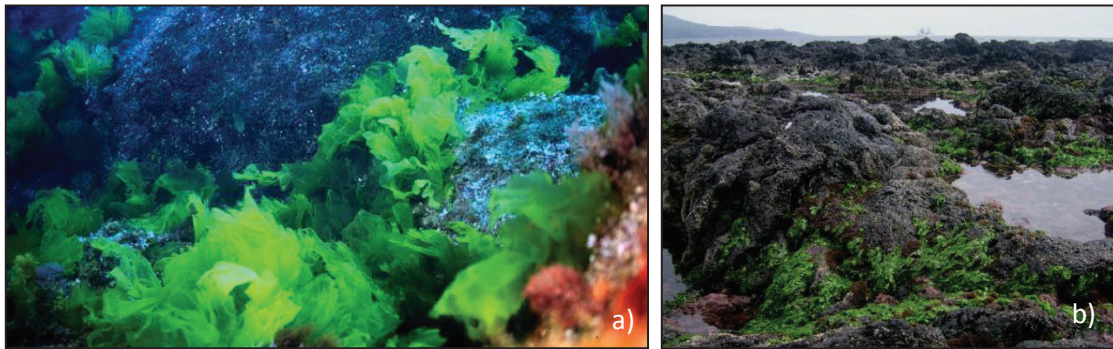


Figura 5. *U. rigida* em ecossistemas dos Açores: a) subtidal (foto de DOP-UAç 2013); b) intertidal rochoso (foto Bruno Magalhães, 2013).

*Ulva rigida*, como todas as espécies de *Ulva*, é um colonizador inicial em ecossistemas próximos à costa de crescimento rápido, sendo um importante produtor primário em habitats entre-marés (Burrows 1991).

#### 1.4. Ecofisiologia de *Ulva rigida*

A camada superficial oceânica do ambiente pelágico, epipelágico ou pelágico superior, é normalmente definida como a zona desde a superfície até à profundidade de 200 metros. Onde habitualmente se registam as temperaturas mais elevadas e é a melhor iluminada pela radiação solar, correspondendo à zona fótica. O ambiente costeiro corresponde a uma pequena parte do epipelágico, designadas por águas costeiras ou neríticas, sendo muito produtiva a nível biológico (Castro & Huber 2000).

O crescimento algal é influenciado por diversas condições ambientais (Kakinuma et al. 2006), figurando os *stresses* hialino, luminoso e térmico entre os principais condicionantes ecofisiológicos (Lobban & Harrison 1994, Davison & Pearson 1996). Espécies do género *Ulva* são reconhecidas mundialmente como oportunistas, ao nível da retenção de nutrientes (Clark 2001, Xu et al. 2012). Estes organismos são estenohalinos tolerando grandes variações salinas (Kakinuma et al.

2006), que influenciam a taxa fotossintética e respiratória sucintamente pelo processo da osmorregulação nas algas marinhas (Dawes 1998). São igualmente conhecidos por estenotérmicos, suportando elevadas alterações de temperatura (Häder & Figueroa 1997, Taylor et al. 2001, Allison 2004, Kakinuma et al. 2006, Dong et al. 2012). Adaptam-se muito facilmente ao ambiente, o qual influencia diretamente a taxa metabólica (Dawes 1998), e por sua vez o crescimento, reprodução e distribuição geográfica das algas, refletindo alta capacidade de tolerância aos fatores edáficos (Lobban & Harrison 1994, Dawes 1998).

As algas são conhecidas como organismos indicadores de características ambientais, sendo vasta a investigação experimental sobre os valores ótimos e letais dos fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento destas macroalgas. Por exemplo, estudou-se a resposta de *Ulva (Enteromorpha) intestinalis* a flutuações de salinidade e concluiu-se que está adaptada a regimes reduzidos de sal como aqueles que caracterizam os estuários costeiros (Kamer & Fong 2000). Um outro estudo semelhante foi desenvolvido por Luo & Liu (2011).

Nos Açores o género *Ulva* é abundante (Neto et al. 2005). Estes organismos são importantes na zona intertidal, sendo comumente referidos como indicadores de entradas excessivas de nutrientes no meio marinho. Apesar da sua importância e distribuição, a fisiologia destes organismos nunca foi objeto de investigação nestes sistemas insulares.

### **1.5. Caraterização do Arquipélago dos Açores**

O arquipélago dos Açores faz parte da cordilheira submarina atlântica que se estende desde a Islândia para Sul e Sudoeste (Morton et al. 1998). Tem nove ilhas vulcânicas (Agostinho 1931, White et al. 1979, Lourenço et al. 1998, Nunes 2002, Cruz et al. 2009) e vários ilhéus no Nordeste Atlântico com coordenadas 37°40'N e 25°31'W (Fig. 6), situado na Área 27 – FAO (Ebert & Stehmann 2013). A Corrente do Golfo, que passa relativamente perto, especifica as condições oceanográficas (Morton et al. 1998), variando a temperatura entre 16 a 22°C ao longo do ano e as águas são consideradas oligotróficas (DROTRH/INAG 2001). A salinidade média anual nas águas costeiras é classificada de euhalina entre 30 a 40 ‰, sendo a tipologia das águas enquadradas na eco-região do Atlântico Norte (DROTRH/INAG 2006).

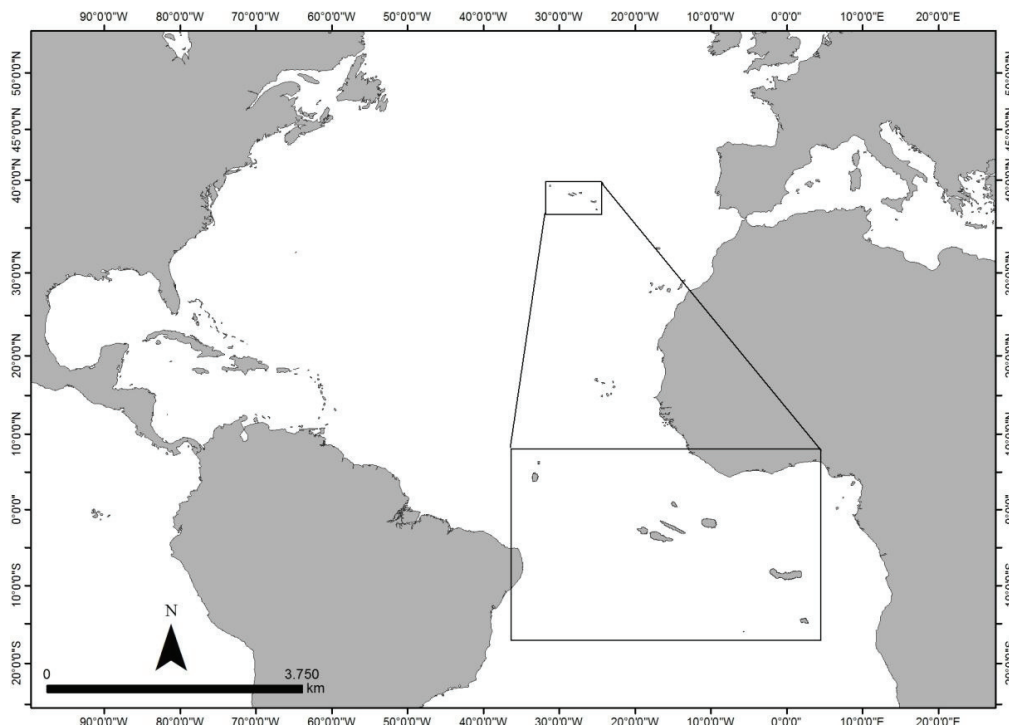


Figura 6. Localização geográfica do Arquipélago dos Açores (Nuno Álvaro – MAR-CIIMAR/CIRN).

A multiplicidade estrutural do ambiente na orla costeira das ilhas dos Açores e ilhéus, bem como das zonas menos profundas correspondentes aos montes submarinos, proporcionam riqueza de nichos ecológicos para as comunidades de organismos marinhos como produtores primários. As macroalgas habitam com relativa abundância o meio marinho, podendo cobrir o substrato rochoso na sua quase totalidade. Distribuem-se verticalmente desde o intertidal, exibindo padrão de zonação das comunidades (supralitoral, mediolitoral e infralitoral), até profundidades com luz suficiente que permitam o seu crescimento, situando-se abaixo dos 100 m (Neto et al. 2005).

Apesar da variação espacial dentro de cada ilha dos Açores, o seu clima é classificado como mesotérmico húmido com características oceânicas, abrangido pela categoria dos climas temperados quentes (grupo C), caracterizados por apresentarem verão e inverno e a temperatura média do mês mais frio ser inferior a 18°C mas superior a -3°C. De Leste para Oeste do Arquipélago, existe transição entre subgrupos Cs e Cf, respetivamente, passando de clima chuvoso temperado com verão seco a húmido em todas as estações (Azevedo et al. 2004). Importa referir que a costa da ilha de São Miguel é temperada com Verão seco e quente (Csa) (IM-AEMET 2011).



De uma forma muito geral o seu clima pode ser caracterizado pela sua amenidade térmica (Fig. 7a), pelos elevados índices de humidade do ar, por taxas de insolação pouco elevadas, por chuva regulares e abundantes e por um regime de ventos rigorosos que rondam o arquipélago acompanhando o evoluir dos padrões de circulação atmosférica à escala da bacia do Atlântico Norte. Os invernos, podendo ser chuvosos, não se manifestam excessivamente rigorosos, ocorrendo precipitação durante todo o ano, mesmo nos meses de estio, embora nestes com muito menor expressão (Fig. 7b). Os verões são amenos e mais ensolarados do que o resto do ano (Azevedo et al. 2004).

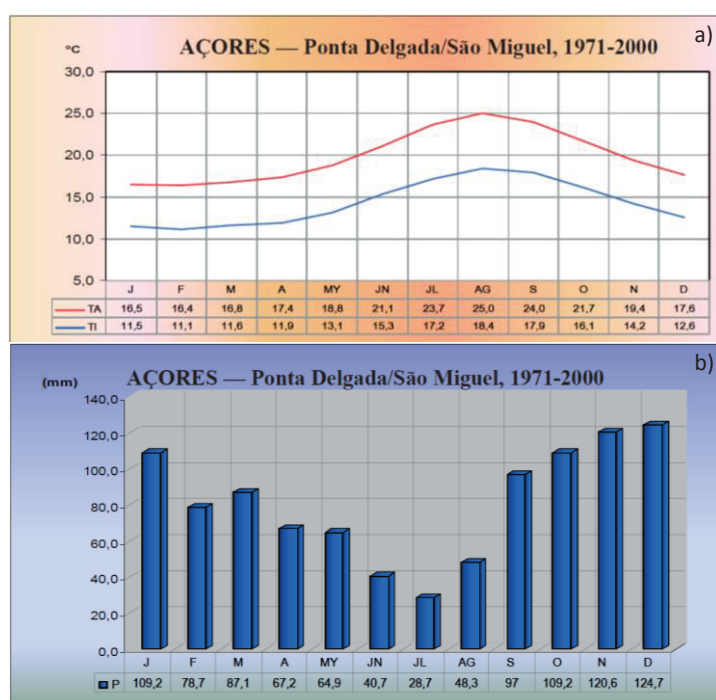


Figura 7. Normais climatológicas no arquipélago dos Açores (1971-2000): a) temperatura; b) precipitação (IM-AEMET 2011).

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo pretendeu avaliar o efeito da temperatura e da luz no crescimento de plantas de *Ulva rigida* em cultivo *in vitro*.

### 3. METODOLOGIA

A avaliação do efeito da temperatura e da luz no crescimento *in vitro* de plantas de *Ulva rigida* nunca tinha sido efetuado nos Açores. Foi necessário efetuar assim um conjunto de experiências preliminares para poder definir e otimizar o desenho experimental a adotar no presente estudo.

Assim, o presente trabalho englobou a realização desses ensaios preliminares e de duas experiências principais de cultivo *in vitro* de *Ulva rigida* recorrendo ao uso de três câmaras de cultura Sanyo MLR-351H com capacidade de 294 L e usando caixas de Petri quadri-divididas como contentores de cultivo.

As atividades desenvolvidas compreenderam trabalho de amostragem no campo e diverso trabalho laboratorial como descrito abaixo.

#### 3.1. Amostragem

Selecionou-se o local de amostragem na zona entre-marés junto à ETAR da Pranchinha em Ponta Delgada (ETAR-PDL, Fig. 8), na Ilha de São Miguel pertencente ao Grupo Oriental no Arquipélago dos Açores, caracterizado por ser uma extensa faixa de escoada lávica contendo abundantes poças litorais.

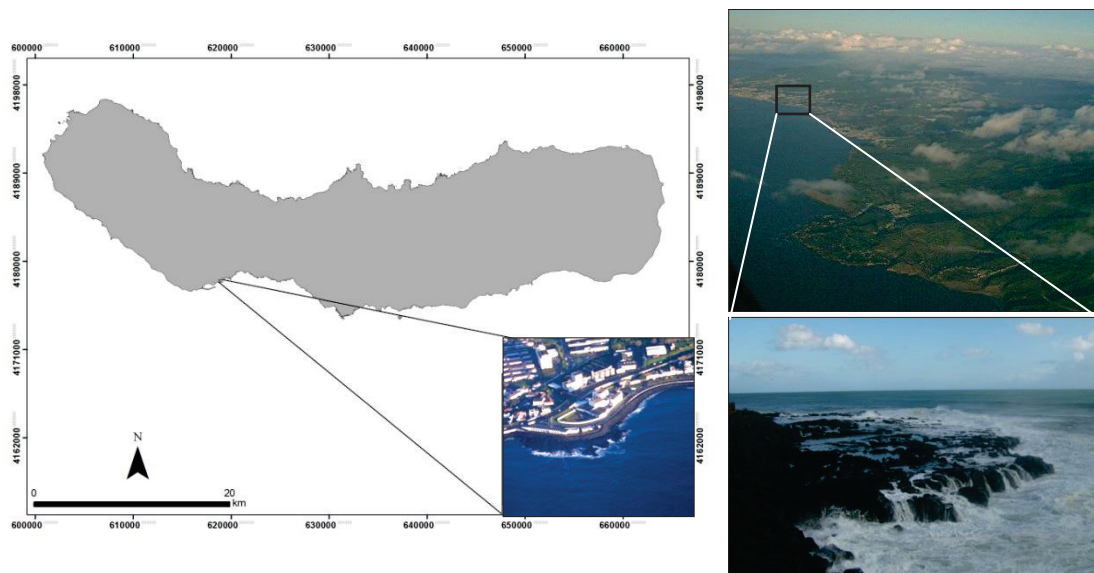


Figura 8. Localização da ETAR-PDL na costa Sul da Ilha de São Miguel, coordenadas UTM (Nuno Álvaro – MAR-CIIMAR/CIRN, com adaptações de fotos da zona em estudo, Bruno Magalhães 2013).

Na seleção do local de amostragem considerou-se: (i) a abundância da espécie em estudo ao longo do ano; (ii) o fácil acesso; e (iii) a proximidade com o local de cultivo, permitindo o transporte rápido.

O posicionamento da escoada lável, exposto à frente costeira e ao rebentamento direto das ondas, sobretudo em épocas de maior ondulação, permite a renovação constante da água do mar na escoada e nas poças do intertidal.

A colheita de águas superficiais neríticas foi realizada em garrações de plástico de 5 L, no decorrer do trabalho experimental mediante as necessidades, garantindo água fresca necessária à preparação e acompanhamento dos cultivos. O transporte para o laboratório foi efetuado de imediato.

Identificou-se visualmente nas poças de maré *Ulva rigida* por reconhecimento prático das algas, mediante o seu aspeto, cor e forma funcional. As plantas completas foram coletadas manualmente durante o período de maré-baixa. Colheram-se aleatoriamente tantos indivíduos quantos os necessários para montar cada experiência, os quais foram colocados em garrafão de plástico de 5 L com água do mar das respetivas poças e transportadas no próprio momento até ao laboratório. As recolhas foram efetuadas no dia da montagem da experiência ou na véspera para garantir organismos frescos.

A confirmação da identificação da espécie em laboratório foi efetuada pela Prof. Ana I. Neto, destacando-se a diversidade de formas dos indivíduos adultos (Fig. 9).

## **3.2. Trabalho de laboratório**

As atividades laboratoriais foram diversificadas e englobaram diversas tarefas nas quais se utilizou sempre bata de proteção e luvas cirúrgicas para minimizar problemas de contaminação.

### **3.2.1. Preparação do material (acrílico, vidro e metal)**

Todo o material e equipamento a usar no laboratório foi devidamente lavado e desinfetado. O material de vidro e metal foi autoclavado recorrendo à autoclave AJC, modelo Uniclave 88 do CIRN. O material com exceção do de vidro foi lavado, deixado a secar, e posteriormente limpo com álcool etílico 96 % para desinfecção, eliminando qualquer tipo de impureza ou porção orgânica não desejada que pudesse comprometer as experiências.

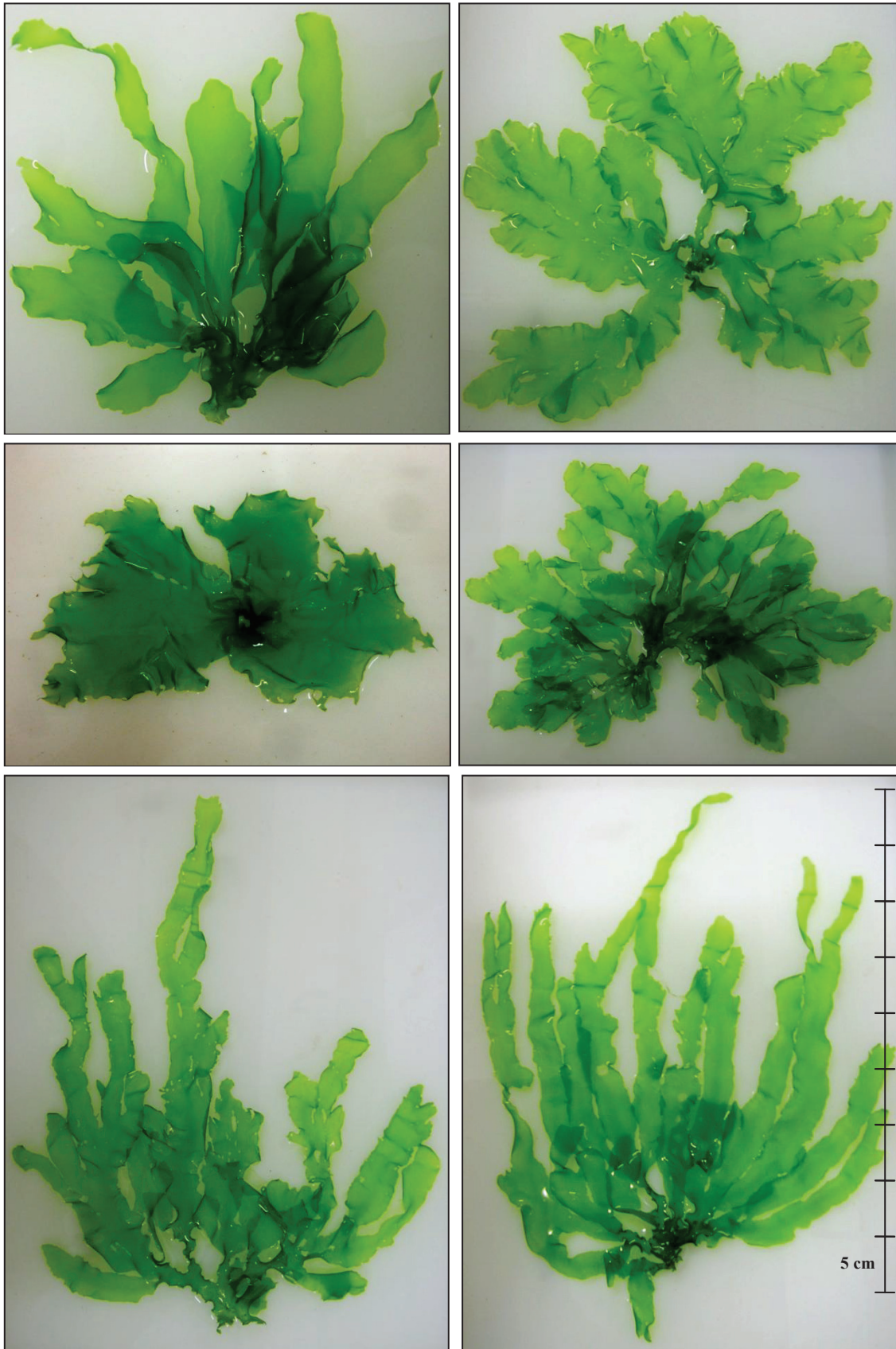


Figura 9. Exemplos de *Ulva rigida* colhidas nas poças do intertidal da ETAR-PDL, no estado fenológico: frondes desenvolvidas. Maior expressão vegetativa de janeiro a março de 2013, durante os meses de colheita (outubro 2012 a maio 2013, Bruno Magalhães 2013).

### **3.2.2. Tratamento da água**

No laboratório, no mesmo dia da recolha da água do mar, procedeu-se à sua filtração da água em sistema de filtração SpeedFlow (Crami Milano), com auxílio de bomba de sucção D-74321 Bietigheim-Bissingen (Dürr Technik, potência de 230 v, 1.55 A), utilizando microfibras de vidro Whatman com diâmetro 25 nm (cat. n.º 1825-025) para cada um dos três copos do sistema de filtração. A quantidade de água filtrada variou mediante as necessidades de cultivo e sua manutenção.

Seguidamente a água do mar foi autoclavada (20 minutos, 120°C e pressão 1.5 bar; autoclave AJC, modelo Uniclave 88 do CIRN) e armazenada em garrafas de vidro graduadas com capacidade de 2000 ml e após arrefecimento foram colocadas no frigorífico. Teve-se o cuidado de confirmar a ausência de precipitados no frasco.

### **3.2.3. Preparação do meio de cultivo**

Como meio de cultivo utilizou-se Meio von Stosch (VS) (Andersen 2005) e água salgada enriquecida em nutrientes numa combinação Nitrato 32: Fósforo 2 (N32P2; Pavão, Maria Inês, comunicação pessoal). Os procedimentos de preparação para cada meio estão desenvolvidos nos Anexos I e II deste relatório.

### **3.2.4. Preparação dos vouchers**

No laboratório, as macroalgas foram depositadas em tabuleiros com água do mar e foram limpas para remover epífitos, pequenos invertebrados e materiais diversos, selecionando-se dois dos melhores exemplares, um para prensar e ficar a integrar as coleções do Herbário Ruy Telles Palhinha (AZB) do Departamento de Biologia, outro do qual foi retirada uma porção que foi armazenada em sílica gel para eventual posterior estudo genético.

### **3.2.5. Desenho experimental**

Definiu-se um desenho experimental que garantisse um número suficiente de replicados para posterior tratamento e análise estatística.



Para cada experiência foi definido utilizar 6 caixas de Petri quadri-divididas, cada uma contendo três replicados (porções de alga).

Os dois meios de cultivo a testar von Stosch e água salgada enriquecida em nutrientes numa combinação de Nitrato 32: Fósforo 2, foram testados sem (VS; N32P2) e com refrescamento a cada 10 dias (VS-10; N32P2-10). Na primeira situação o meio era simplesmente colocado no início e abastecido quando em escassez sem se remover o antigo. Na segunda situação (com refrescamento), o meio existente ainda nos cultivos era removido na totalidade e substituído por novo meio a cada 10 dias de cultivo.

Em todas as experiências as caixas de Petri foram colocadas aleatoriamente nas prateleiras das câmaras previamente programadas (Fig. 10a e b).

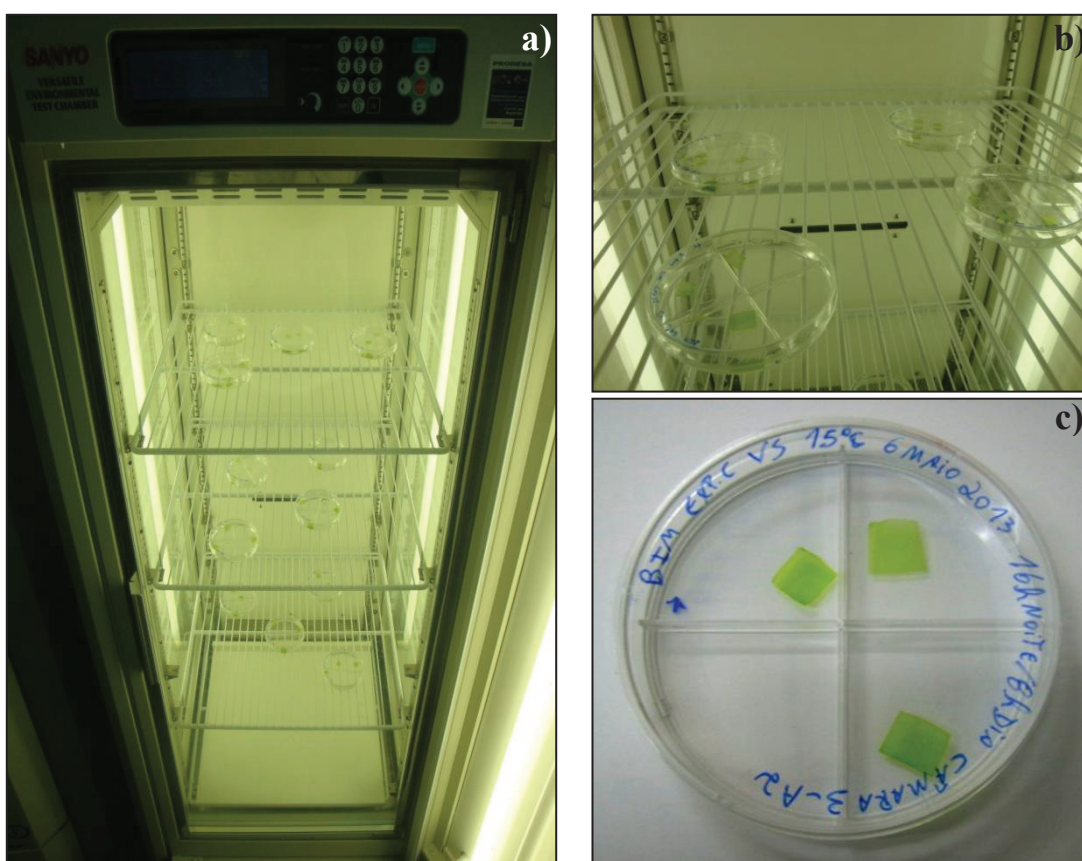


Figura 10. Caixas de Petri quadri-divididas: a e b) aleatoriedade de distribuição em prateleiras de câmara de cultivo; c) etiquetagem e porção algal por compartimento (Bruno Magalhães 2013).

A monitorização dos cultivos, foi realizada quando as câmaras estavam em período de iluminação, possibilitando a sua abertura e retirada para laboratório de modo a cumprir o procedimento de registo de pesagens, estado de sanidade vegetal e presença

de epífitos, bem como refrescamento do meio se aplicável em dia de pesagem. As caixas, ao serem novamente colocadas nas respetivas câmaras, foram rodadas e trocadas de prateleiras aleatoriamente.

### **3.2.6. Preparação das câmaras**

As câmaras de cultivo disponíveis no Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores são equipamentos de crescimento controlado de plantas com possibilidade de programação de intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura.

Como se pretendia fixar a intensidade luminosa num valor próximo ao do ambiente natural efetuaram-se medições de intensidade luminosa junto ao local de colheita (16h, 09.11.2013), através de um Fluxímetro (Center 337 Lightmeter). De seguida prepararam-se as câmaras para esse valor de luz recorrendo às lâmpadas da câmara FL40SSW/37.

### **3.2.7. Preparação das algas e dos contentores de cultivo**

O procedimento de preparação dos cultivos foi muito cuidadoso para evitar contaminações. Limpou-se a superfície de trabalho e demais utensílios com álcool etílico a 96 %.

As caixas de Petri quadri-divididas foram devidamente identificadas. Para isto, no bordo de cada caixa anotou-se as iniciais do nome do autor, as iniciais da experiência, a indicação do meio de cultivo, a temperatura da câmara, a data de início do cultivo, o fotoperíodo, o n.º da câmara e o n.º da caixa. Por trás da caixa de Petri foi desenhada uma seta, indicando o sentido horário de colocação de cada porção algal em cada compartimento (Fig. 10c).

Colocou-se o meio de cultivo na caixa sem preencher na totalidade os quatro compartimentos.

Prepararam-se as algas para cultivo. Estas foram colocadas num copo graduado com a água do mar filtrada e autoclavada, durante 10 minutos. Após este período, cortaram-se pequenas porções de 1 cm<sup>2</sup> de alga, na zona intermédia das frondes de modo a obter as necessárias para estabelecer os cultivos, seguindo um molde em papel plastificado e usando tesouras de papel. Assim preparadas, foram colocadas as porções

de algas, previamente pesadas recorrendo a uma balança de relojoeiro Kern ALJ 220-5DNM, em três das quatro células de cada caixa de Petri, uma em cada célula. A quarta célula da caixa, apesar de não ter alga, possuía meio de cultivo de modo a minimizar a evaporação. Para cada porção de alga registou-se o peso, estado de saúde e presença de epífitos, em folhas de registo, as quais foram posteriormente transpostas para ficheiros Excel para posterior tratamento dos dados. Antes da pesagem, para remover o excesso de água cada porção de alga foi passada por gaze esterilizada 6 vezes de cada lado. Este procedimento foi idêntico em todas as experiências efetuadas e cada vez que se realizavam pesagens.

### **3.2.8. Cultivos experimentais**

No início do trabalho experimental efetuou-se o teste aos meios de cultivo, fixando os fatores temperatura e luz. Testou-se o meio von Stosch e em projeto paralelo, a decorrer em simultâneo, testaram-se várias combinações de água salgada enriquecida com os macronutrientes azoto e fósforo. Desenvolveram-se várias experiências que culminaram na decisão dos meios a utilizar. Este trabalho foi seguido de outros testes preliminares para avaliação do efeito da temperatura e do fotoperíodo, de modo a definir valores de base a utilizar no desenvolvimento experimental.

Assim, a fase experimental englobou seis testes preliminares, conforme explicado de seguida. Optou-se por apresentar alguns resultados preliminares neste ponto, nas situações em que serviram de base ao delineamento experimental do trabalho posteriormente desenvolvido.

No teste preliminar I, que decorreu durante 13 dias (27 de outubro a 9 de novembro de 2012), fixou-se o fotoperíodo em 24 h luz, a intensidade luminosa em 37800 lux e utilizaram-se vários meios de cultivo sem refrescamento, nomeadamente VS, Comercial (macronutrientes: 20 % azoto e 5 % fósforo; micronutrientes: 4 % potássio, 4.5 % magnésio, 6 % enxofre, 0.08 % boro, 0.016 % cobre, 0.16 % ferro, 0.08 % manganês, 0.0016 % molibdénio e 0.05 % zinco) e água não enriquecida com 10 salinidades diferentes (38, 34, 30, 26, 22, 18, 14, 10, 6 e 0 ‰). Fez-se variar a temperatura em dois valores: 18 e 20°C, preparando cada câmara com uma destas condições. Registou-se a pesagem inicial e colocaram-se os cultivos nas câmaras, respeitando o desenho experimental explicado no ponto 3.2.5. No final do 7º dia de cultivo, deu-se a experiência por concluída, devido à elevada mortalidade registada. No



geral o cultivo encontrava-se todo ameaçado. As algas resistiram a condições estuarinas mas não dulçaquícolas, houve muitas mortes e algumas porções algais danificadas indicando fotoinibição. Os resistentes foram os cultivos de VS nos quais alguns tinham epífitos. Decidiu-se avançar para o teste preliminar II mantendo o desenho mas anulando salinidades inexistentes para os Açores, eliminou-se o meio Comercial e foi colocada a luz nos valores aproximados à realidade da ilha de São Miguel, como explicado no ponto 3.2.6.

No teste preliminar II, que decorreu durante 28 dias (10 de novembro a 8 de dezembro de 2012), fixou-se o fotoperíodo em 24 h luz, a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizaram-se vários meios de cultivo sem refrescamento, nomeadamente VS e três meios salinos (38, 34 e 26 ‰). Para VS houve renovação de meio e caixa ao 14º dia, continuando. Fez-se variar a temperatura em dois valores: 18 e 20°C, preparando cada câmara com uma destas condições. Registou-se a pesagem inicial e colocaram-se os cultivos nas câmaras, utilizaram-se 3 caixas por cada combinação de meio e 3 replicados por cada caixa. Efetuaram-se registos do estado de saúde inicial, e depois regularmente. Efetuaram-se pesagens nos 11º, 14º e 28º dias.

No teste preliminar III, complementar ao teste II, que decorreu durante 14 dias (24 de novembro a 8 de dezembro de 2012) tal como a primeira fase da segunda experiência em VS, fixou-se o fotoperíodo em 24 h luz, a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizaram-se vários meios de cultivo sem refrescamento, nomeadamente VS e quatro meios salinos (40, 36, 32 e 28 ‰). Fez-se variar a temperatura em dois valores: 18 e 20°C, preparando cada câmara com uma destas condições. Registou-se a pesagem inicial e final da experiência ao 14º dia e estado de saúde inicial e seguidamente de 2 em 2 dias até ao final 14º dia. Utilizaram-se 3 caixas por cada combinação de meio e 3 replicados por cada caixa. A mortalidade foi generalizada em meios sem aporte de nutrientes independentemente da salinidade. Sobreviveram os cultivos em VS que continuaram nas condições do seguinte teste.

No teste preliminar IV, que decorreu durante 21 dias (9 de dezembro a 30 de dezembro de 2012), fixou-se o fotoperíodo em 12 h escuro/12 h luz, a intensidade luminosa em 16200 lux, a temperatura em 20°C e utilizou-se o meio de cultivo VS sem refrescamento, preparando a câmara com estas condições e respeitando o desenho experimental explicado no ponto 3.2.5. Registou-se a pesagem inicial e no 21º dia, correspondente ao final da experiência, o estado de sanidade vegetal inicial no 3º dia, e seguidamente de 2 em 2 dias até ao final da experiência.

No teste preliminar V, complementar ao teste IV, que decorreu durante 21 dias (11 de janeiro a 1 de fevereiro de 2013), fixou-se o fotoperíodo em 12 h escuro/12 h luz, a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizou-se o meio de cultivo VS sem refrescamento. Fez-se variar a temperatura em dois valores: 18 e 22°C, preparando cada câmara com uma destas condições e respeitando o desenho experimental explicado no ponto 3.2.5. Registou-se a pesagem inicial, no 14º e 21º dia (final da experiência), o estado de saúde inicial e seguidamente de 2 em 2 dias até ao final da experiência. A sobrevivência foi generalizada nos meios testados, registando-se menor crescimento algal a 22°C.

No teste preliminar VI, que decorreu durante 40 dias (15 de março a 24 de abril de 2013), fixou-se o fotoperíodo em 12 h escuro/12 h luz, a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizaram-se os meios de cultivo VS e N32P2, ambos sem refrescamento. Fez-se variar a temperatura em três valores: 14, 16 e 17°C, preparando cada câmara com uma destas condições. Registou-se a pesagem inicial e seguidamente a cada 5 dias até ao final. Não houve diferenças significativas no crescimento para as três temperaturas testadas.

### **3.2.9. Cultivos para avaliação do efeito da temperatura**

Nesta experiência de avaliação do efeito da temperatura, que decorreu durante 40 dias (2 de fevereiro a 14 de março de 2013), fixou-se o fotoperíodo em 12 h escuro/12 h luz (FOTOP 12E/12L), a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizou-se como meio de cultivo VS com e sem refrescamento (VS-10 e VS) e uma combinação de N32P2 com e sem refrescamento (N32P2-10 e N32P2). Fez-se variar a temperatura em três valores: 10, 15 e 20°C, preparando cada câmara com uma destas condições.

### **3.2.10. Cultivos para avaliação do efeito do fotoperíodo**

Nesta experiência de avaliação do efeito do fotoperíodo, que decorreu em 40 dias (6 de maio a 15 de junho de 2013), fixou-se a temperatura em 15°C, a intensidade luminosa em 16200 lux e utilizou-se como meio de cultivo VS com e sem refrescamento (VS-10 e VS). Fez-se variar o fotoperíodo em três valores: 0 h escuro/24 h luz (FOTOP 0E/24L), 8 h escuro/16 h luz (FOTOP 8E/16L) e 16 h escuro/8 h luz (FOTOP 16E/8L), preparando cada câmara com uma destas condições.

### 3.2.11. Análise de dados

Os ficheiros em Microsoft Excel foram organizados para cada uma das experiências em metadados e tabela de dados brutos, tendo-se realizado a estatística descritiva no programa informático referido, nomeadamente média, desvio padrão e erro padrão, com respetiva representação gráfica.

Os dados de crescimento e mortalidade foram tratados pela análise de variância (ANOVA), através do software GMav-5 (Underwood et al. 2002). As hipóteses foram testadas através de procedimentos multivariados, avaliando se existe efeito de interação entre diferentes fatores no crescimento e mortalidade *in vitro* de *Ulva rigida* decorridos 40 dias.

Para a avaliação do efeito da temperatura foram usados quatro fatores: temperatura (três níveis, ortogonal e fixo), meio de cultivo (dois níveis, ortogonal e fixo), refrescamento (dois níveis, ortogonal e fixo), caixa (seis níveis aninhados em cento e vinte e três e aleatório) e três replicados.

Para a avaliação do efeito do fotoperíodo foram usados três fatores: refrescamento do meio de cultivo (dois níveis, ortogonal e fixo), fotoperíodo (três níveis, ortogonal e fixo), caixa (seis níveis aninhados em doze e aleatório) e três replicados.

Antes da análise, os dados foram verificados para a heterogeneidade de variância por meio do teste de Cochran's e as transformações não foram necessárias. Exceto na primeira situação (efeito da variação dos diferentes fatores no crescimento algal) em que a heterocedasticidade persistiu após transformação. Neste, a análise foi realizada em dados não transformados, sendo a análise de variância relativamente robusta pois a replicação foi alta (Underwood 1997).

As comparações posteriores, em termos significativos, foram analisadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

Para o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de independência, os dados de epifitismo foram organizados em Excel, para os diferentes meios de cultivo e para as respetivas temperaturas e fotoperíodos testados: nenhum (0), pouco (1) e muito (2) epifitados. Os cálculos foram executados para os valores observados (StatTrek 2014;  $O_{r,c}$  foi a contagem de frequência observada a nível de porções amostradas de *U. rigida* pouco e muito epifitadas na variável meio de cultura e nível idêntico de epífitos na variável

temperatura/fotoperíodo; r e c referem-se a linhas e a colunas respetivamente) e expectados de epífitos ( $E_{r,c} = (n_r * n_c)/n$ ; onde  $E_{r,c}$  foi a contagem de frequência esperada de epífitos,  $n_r$  foi o número total de observações da amostra a nível de epífitos na variável meio de cultura,  $n_c$  foi o número total de observações da amostra a nível de epífitos na variável temperatura/fotoperíodo, e n foi o tamanho total da amostra). Seguiu-se cálculo da contribuição  $\chi^2$  ( $\chi^2 = \sum [ (O_{r,c} - E_{r,c})^2 / E_{r,c} ]$ ).

Determinou-se os graus de liberdade ( $df = (r - 1) * (c - 1)$ ); r foi o número de níveis de variável categórica temperatura/fotoperíodo, e c foi o número de níveis para a variável categórica meio de cultura com e sem refrescamento), o teste  $\chi^2$  global (somatório de  $\chi^2$ ) e a probabilidade (P, distribuição de  $\chi^2$  usando os df calculados).

## 4. RESULTADOS

Em Anexo (III a XX) estão apresentados os resultados das pesagens de todas as porções de *Ulva rigida* para cada momento ao longo de 40 dias (de 5 em 5 dias), nos diferentes testes.

### 4.1. Avaliação do efeito da temperatura

A análise de variância relativa à avaliação do efeito da temperatura revelou uma interação significativa entre os fatores temperatura (10, 15 e 20°C), meio (VS e N32P2) e refrescamento, no crescimento algal no final dos 40 dias de cultivo ( $P < 0.05$ , Tabela 2).

Tabela 2. ANOVA comparando o efeito da variação da temperatura (10, 15 e 20°C), meio de cultura (VS e N32P2) e refrescamento (sem e com), no crescimento e mortalidade algal aos 40 dias.

Fonte	df	Crescimento			Mortalidade		
		MS	F	P	MS	F	P
Temperatura = T	2	19.1784	53.63	0.0000	1.1852	6.46	0.0029
Meio = M	1	1.6086	4.50	0.0381	4.7407	25.86	0.0000
Refrescamento = Rf	1	3.6244	10.14	0.0023	3.1296	17.07	0.0001
Caixa (T x M x Rf)	60	0.3576	0.78	0.1391	0.1833	1.89	0.0012
T x M	2	2.1222	5.93	0.0044	0.9630	5.25	0.0079
T x Rf	2	0.0069	0.02	0.9808	1.8519	10.10	0.0002
M x Rf	1	2.7835	7.78	0.0071	0.4630	2.53	0.1173
T x M x Rf	2	4.4871	12.55	0.0000	0.0741	0.40	0.6694
Residual	144	0.4578			0.0972		
Transformação		não possível			nenhum		
Teste Cochran's		C = 0.1402 (P < 0.01)			C = 0.0476 ns		
SNK		T10: VS > VS-10 T10: N32P2 < N32P2-10 T15: VS = VS-10 T15: N32P2 = N32P2-10 T20: VS = VS-10 T20: N32P2 > N32P2-10  VS: T10 < T15 = T20 VS-10: T10 < T15 = T20 N32P2: T10 < T15 = T20 N32P2-10: T10 = T20 < T15			Interação T x Rf: VS e N32P2: T10 > T15 = T20 VS-10 e N32P2-10: T15 < T10 < T20  T10: VS e N32P2 = VS-10 e N32P2-10 T15: VS e N32P2 = VS-10 e N32P2-10 T20: VS e N32P2 < VS-10 e N32P2-10  Interação T x M: VS: T10 > T15 = T20 N32P2: T10 = T15 = T20  T10: VS > N32P2 T10: VS-10 < N32P2-10 T15: VS > N32P2 T15: VS-10 = N32P2-10 T20: VS = N32P2 T20: VS-10 > N32P2-10		

ns: não significante

Nesta experiência verificou-se que o refrescamento do meio de cultivo teve efeitos diferentes no crescimento algal em função da temperatura e do meio de cultivo. Assim, e como se pode constatar da análise SNK (Tabela 2), a 10°C houve um efeito

negativo e significativo do refrescamento em meio VS (média  $\pm$  SE: sem refrescamento  $0.034 \text{ g} \pm 0.007$ ; com refrescamento  $0.011 \text{ g} \pm 0.005$ ) (Tabela 2, Fig. 11a, b). O contrário ocorreu no meio N32P2, no qual, para a mesma temperatura, se registou um efeito positivo e significativo do refrescamento (com refrescamento:  $0.030 \text{ g} \pm 0.004$ ; sem refrescamento:  $0.023 \text{ g} \pm 0.003$ ). A  $20^\circ\text{C}$ , o crescimento foi significativamente superior no meio N32P2 sem refrescamento ( $0.055 \text{ g} \pm 0,004$ ) do que com refrescamento ( $0.032 \text{ g} \pm 0,004$ ). Para as restantes combinações de efeitos temperaturas e meios não houve efeito significativo do refrescamento no crescimento algal. Estes resultados revelam uma tendência não consistente do efeito do fator refrescamento no crescimento algal.

Relativamente ao efeito da temperatura verificou-se que, com exceção do meio N32P2 com refrescamento, o crescimento algal foi sempre significativamente menor quando as algas foram cultivadas a  $10^\circ\text{C}$  comparativamente com o crescimento registado a  $15$  e  $20^\circ\text{C}$  (Tabela 2, Fig. 11), realçando um efeito positivo da temperatura no crescimento algal.

Quando comparando os diferentes meios (VS vs. N32P2) verificou-se que o crescimento algal aos 40 dias foi significativamente maior em meio VS em 3 (de 6 possíveis) situações, igual em 2 situações e inferior em 1 situação, comparativamente ao crescimento observado em meio N32P2. Verificou-se ainda que o crescimento algal foi tendencialmente favorecido em meio VS sem refrescamento às duas temperaturas mais baixas ( $10$  e  $15^\circ\text{C}$ ), não havendo diferenças significativas a  $20^\circ\text{C}$ . Nos casos em que houve refrescamento (VS-10), os resultados foram altamente variáveis dependendo da temperatura (Tabela 2, Fig. 11).

A análise ANOVA à mortalidade algal aos 40 dias, revelou uma interação significativa entre os fatores temperatura e refrescamento e entre os fatores temperatura e meio (Tabela 2).

A análise SNK indicou que, para a interação temperatura e refrescamento, a mortalidade de *Ulva rigida* foi significativamente superior a  $10^\circ\text{C}$  do que a  $15$  e  $20^\circ\text{C}$ , no caso em que não houve refrescamento do meio (Tabela 2, Fig. 12). Nas situações em que houve refrescamento do meio a mortalidade algal foi significativamente superior a  $20^\circ\text{C}$ , seguindo-se os  $10$  e os  $15^\circ\text{C}$ , não se tendo registado diferenças significativas entre as duas temperaturas inferiores.

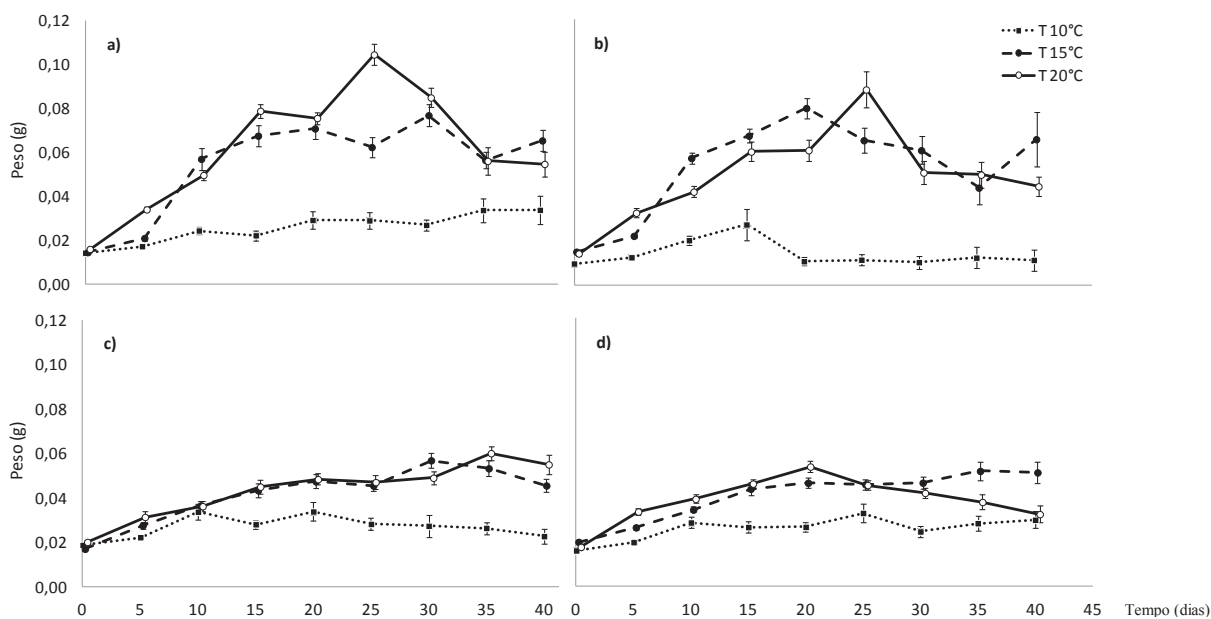


Figura 11. Crescimento médio algal ( $\pm$  SE), mantendo fotoperíodo 12h escuro/12h luz, em diferentes temperaturas. Meios: a) VS; b) VS-10; c) N32P2; d) N32P2-10.

De uma forma geral não se registou mortalidade nos primeiros 20 dias. Após este período, verificou-se alguma mortalidade que variou entre os fatores testados. Relativamente à interação entre os fatores temperatura e meio verificou-se que em meio VS foi registada baixa mortalidade algal aos 40 dias, sobretudo a 20°C (5.6 %) e a 15°C (16.7 %), mas a 10°C atingiu 50 % (Fig. 12a), sendo significativamente superior às restantes. As maiores percentagens de mortes algais registadas foram de 72.2 %, no meio VS com refrescamento a 20°C aos 35 e 40 dias e a 10°C aos 40 dias. O início da mortalidade ocorreu a 10°C aos 25 dias e nas restantes temperaturas 20 e 15°C aos 30 e 35 dias, respetivamente. Mas salienta-se o facto de a mortalidade ter disparado a 20°C de 5.6 % aos 30 dias para 72.2 % aos 35 dias, o que não sucedeu a 10°C tendo sido a mortalidade gradualmente crescente (Fig. 12b).

Continuando na interação da temperatura com o meio, a análise SNK indicou que nas temperaturas 10 e 15°C (com e sem refrescamento) a mortalidade foi significativamente superior no meio VS do que em N32P2. A mortalidade algal no meio N32P2 durante os 40 dias estudados foi de 0 % às temperaturas 15 e 20°C. A 10°C os níveis de mortalidade foram relativamente baixos e atingiram o máximo de 16.7 % aos 30 dias (Fig. 12c). A mortalidade foi superior aos 20°C em N32P2 com refrescamento do que nas restantes temperaturas, tendo atingido valores de, respetivamente, 38.9 e 55.6 % nos 35 e 40 dias de cultivo (Fig. 12d).

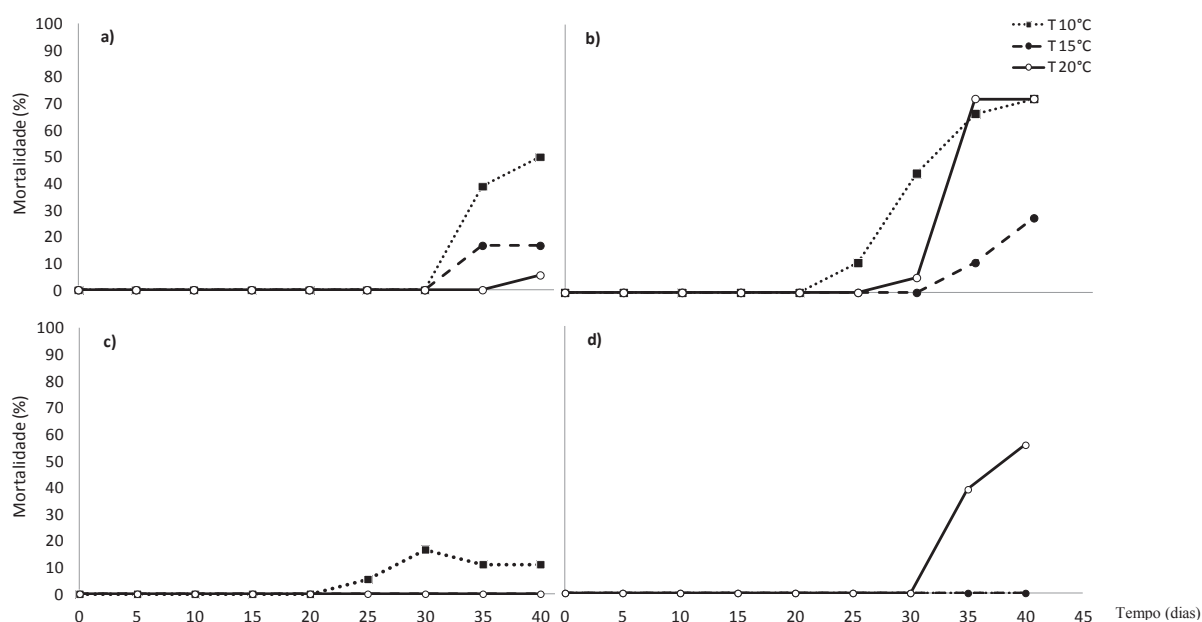


Figura 12. Taxa de mortalidade, mantendo fotoperíodo 12 h escuro/12 h luz, em diferentes temperaturas. Meios: a) VS; b) VS-10; c) N32P2; d) N32P2-10.

Tabela 3. Teste  $\chi^2$  de independência entre a frequência de *U. rigida* epifitada em diferentes temperaturas e meios de cultivo ( $df = 4$ ,  $\chi^2$  global = 7.75,  $P > 0.10$ ).

	VS	VS-10	N32P2-10
<b>T 10°C</b>			
Observado	18	18	6
Expectado	18.4	18.4	5.1
Contribuição $\chi^2$	0.01	0.01	0.15
<b>T 15°C</b>			
Observado	18	18	9
Expectado	19.8	19.8	5.5
Contribuição $\chi^2$	0.16	0.16	2.25
<b>T 20°C</b>			
Observado	18	18	0
Expectado	15.8	15.8	4.4
Contribuição $\chi^2$	0.31	0.31	4.39

No que diz respeito ao número de algas epifitadas verificou-se que em meio N32P2 sem refrescamento não se registou quaisquer casos de epifitismo. Em contraste, quando houve refrescamento em meio N32P2 e em ambos os casos em meio VS registaram-se altos níveis de epifitismo (Tabela 3). Para estes últimos, não houve qualquer diferença na proporção de algas epifitadas a qualquer uma das temperaturas registadas ( $\chi^2$  global = 7.75,  $P > 0.10$ , Tabela 3).



## 4.2. Avaliação do efeito do fotoperíodo

A ANOVA referente à avaliação do efeito do fotoperíodo, revelou a existência de uma interação significativa do efeito dos fatores refrescamento (VS e VS-10) e fotoperíodo (0E/24L, 8E/16L e 16E/8L) no crescimento algal decorridos 40 dias (Tabela 4). A análise SNK revelou que, no caso em que o fotoperíodo foi de 8E/16L, o crescimento algal foi significativamente superior com refrescamento (VS-10,  $0.041 \text{ g} \pm 0.004$ ) do que sem refrescamento (VS,  $0.041 \text{ g} \pm 0.005$ ). No entanto, não se verificaram diferenças no crescimento algal entre meios com e sem refrescamento nos casos dos fotoperíodos 0E/24L e 16E/8L (Tabela 4, Fig. 13a, b). Por outro lado, no caso do meio sem refrescamento não houve diferenças significativas no crescimento algal entre os vários fotoperíodos. Já no caso em que houve refrescamento o crescimento algal variou significativamente entre fotoperíodos sendo maior em 8E/16L em relação a 16E/8L e 0E/24L.

Tabela 4. ANOVA comparando a variação do refrescamento do meio de cultura (VS e VS-10) com os fotoperíodos (0E/24L, 8E/16L e 16E/8L), no crescimento e mortalidade algal aos 40 dias.

Fonte	df	Crescimento			Mortalidade		
		MS	F	P	MS	F	P
Refrescamento = Rf	1	0.0547	0.18	0.6778	0.7500	2.21	0.1473
Fotoperíodo = Fotop	2	3.9625	12.76	0.0001	1.6204	4.78	0.0158
Caixa (Rf x Fotop)	30	0.3105	1.65	0.0432	0.3389	3.33	0.0000
Rf x Fotop	2	1.3024	4.19	0.0248	1.0833	3.20	0.0551
Residual	72	0.1881			0.1019		
Transformação		nenhum			nenhum		
Teste Cochran's		C = 0.1394 ns			C = 0.0909 ns		
SNK		0E/24L: VS = VS-10 8E/16L: VS < VS-10 16E/8L: VS = VS-10			Fotop: 0E/24L = 8E/16L 8E/16L = 16E/8L 0E/24L > 16E/8L		
		VS: 0E/24L = 8E/16L = 16E/8L VS-10: 8E/16L > 16E/8L > 0E/24L					

No que diz respeito à mortalidade algal aos 40 dias verificou-se que apenas houve um efeito significativo do fotoperíodo, registrando-se uma maior mortalidade em 0E/24L do que a 16E/8L (Tabela 4).

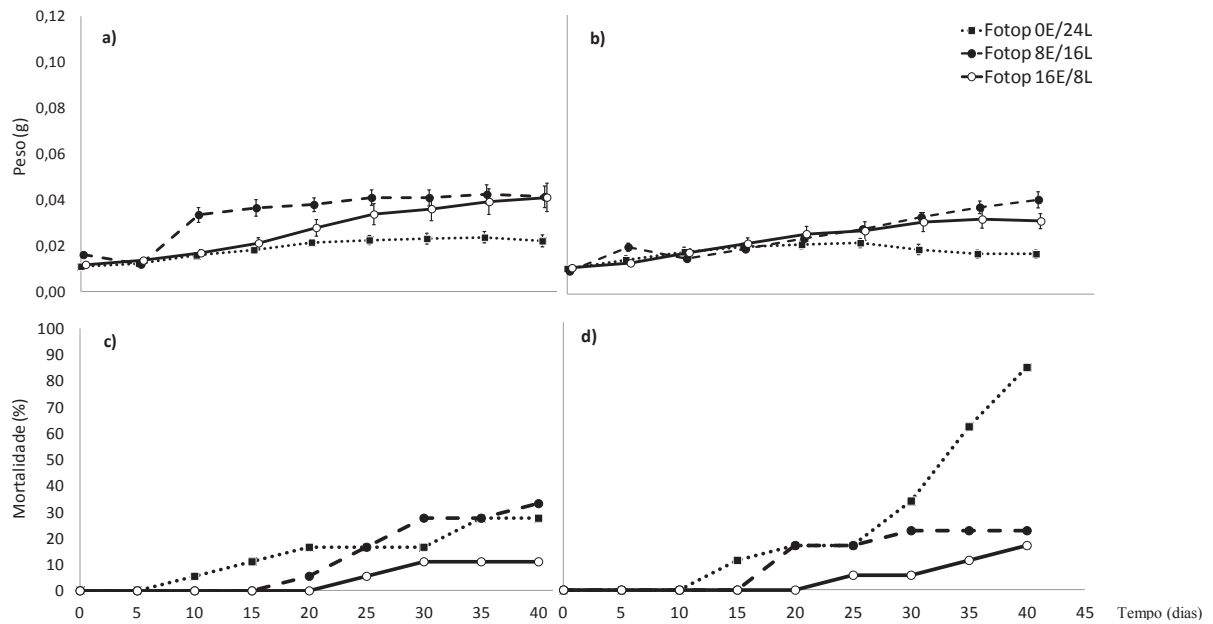


Figura 13. Crescimento médio algal ( $\pm$  SE) e respectiva taxa de mortalidade, mantendo temperatura 15°C, em diferentes fotoperíodos. Refrescamento: a) e c) VS; b) e d) VS-10.

Em relação à quantidade de algas epifitadas verificou-se que a proporção de epífitos em meios VS com e sem refrescamento e para cada um dos diferentes fotoperíodos foi idêntica ( $\chi^2$  global = 1.20,  $P > 0.55$ , Tabela 5).

Tabela 5. Teste  $\chi^2$  de independência entre a frequência de *U. rigida* epifitada em diferentes fotoperíodos e meios VS com e sem refrescamento (df = 2,  $\chi^2$  global = 1.20,  $P > 0.55$ ).

	VS	VS-10
<b>Fotop 0E/24L</b>		
Observado	18	18
Expectado	16.8	19.3
Contribuição $\chi^2$	0.09	0.08
<b>Fotop 8E/16L</b>		
Observado	11	18
Expectado	13.5	15.5
Contribuição $\chi^2$	0.46	0.40
<b>Fotop 16E/8L</b>		
Observado	18	18
Expectado	16.8	19.3
Contribuição $\chi^2$	0.09	0.08

## 5. DISCUSSÃO

No global, os resultados vão de encontro ao esperado na medida em que é do conhecimento geral que o crescimento algal é influenciado pela temperatura, luz e disponibilidade de nutrientes no meio (Lobban & Harrison 1994, Davison & Pearson 1996). O baixo crescimento de *Ulva rigida* em cultivo *in vitro* a 10°C registado neste estudo parece, contudo, contrariar a elevada capacidade estenotérmica reportada na literatura para organismos deste género (Häder & Figueroa 1997, Taylor et al. 2001, Allison 2004, Kakinuma et al. 2006, Dong et al. 2012). Por outro lado, este reduzido crescimento à temperatura mais baixa testada e o pico de crescimento registado nas temperaturas mais elevadas pode estar relacionado com uma adaptação às condições encontradas no ambiente natural onde a alga ocorre nos Açores e onde foi coletada. Esta pode ser também a explicação para o maior crescimento observado para o fotoperíodo de 16 horas de luz. De facto, nos Açores a temperatura da água do mar nunca desce aos 10°C e os períodos de maior crescimento algal correspondem às épocas do ano em que há menores períodos de escuro, nomeadamente na primavera e início do verão (Neto 1997). Informação meteorológica para os anos de 1993-95 na ilha de São Miguel, fonte do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, registou valores médios mensais da temperatura da água do mar de 15-16°C mínimos em fevereiro-março e de 22-23°C máximos em agosto-setembro (Neto 2000a), variando a temperatura nerítica superficial da coluna de água entre 16 a 22°C ao longo do ano (DROTRH/INAG 2001). Valores de temperatura média da água do mar registados no grupo oriental do Arquipélago dos Açores (Instituto Português do Mar e Atmosfera 2014), desde o início do estabelecimento dos cultivos (teste preliminar I) em outubro de 2012 com valor máximo de 22°C, descendo gradualmente até valores mínimos de 15.5-16°C em março-abril de 2013 e atingindo os 18-20°C em junho de 2013.

O maior crescimento observado para o fotoperíodo de 8E/16L e para as temperaturas de 15 e 20°C vai de encontro ao trabalho de Casabianca & Posada (1998) com *Ulva rigida* da costa francesa do Mar Mediterrâneo que registaram um máximo de crescimento para temperaturas de água entre 15 e 18°C e uma luz de 200-280 mEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Os mesmos autores referem que as espécies de algas do género *Ulva* que habitam zonas temperadas são caracterizadas por crescimento vegetativo ótimo entre 10 a 18°C, mas que a temperaturas inferiores a 10°C o crescimento é retardado e, quando maior do que 25°C é inibido. No entanto, *Ulva lactuca* resiste a temperaturas elevadas

(comparativamente com *Grateloupia turuturu*, *Laminaria japonica*, *Palmaria palmata* e *Undaria pinnatifida*), suportando 30°C durante 4 horas sem aparente declínio no rendimento ótimo da fluorescência clorofilina (Shaojun & Tifeng 2008).

Outros estudos comparativos, do efeito combinado da temperatura do meio (5, 10, 15 e 20°C) e luz (40 e 60 mEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), revelaram que 10°C e 40 mEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> foram as condições mais adequadas para o crescimento vegetativo de *Ulva fenestrata*, coletada na zona de sublitoral de Amursky Bay no mar do Japão, em condições de laboratório em meio de cultivo Provasoli. No entanto, a redução de temperatura abaixo de 5°C inibiu o crescimento e o seu aumento para valor superior a 10°C facilitou a gametogênese frequente e regular (Kalita & Tytlianov 2003).

A influência da temperatura e do fotoperíodo sobre o crescimento e reprodução foi avaliada em *Porphyra dioica* coletada na costa norte de Portugal continental, e submetida a cultivo em meio von Stosch, tendo as taxas de crescimento sido significativamente afetadas por aqueles dois parâmetros. Nestas experiências a maior taxa de crescimento foi registada a 15°C (Pereira et al. 2004 e 2006). Os talos masculinos libertaram gâmetas a temperaturas entre 10 e 20°C e a fotoperíodos de 10, 12 e 16 h de luz. A ocorrência de talos femininos não fertilizados foi observada entre 10 e 20°C, sob todos fotoperíodos testados (Pereira et al. 2006).

Sabe-se que em *Ulva* a temperatura e luz influenciam significativamente a assimilação de nutrientes para os tecidos, através da estimulação da atividade fotossintética, com o conseqüente crescimento algal (Solidoro et al. 1997, Campbell 2001, Pérez-Mayorga et al. 2011). No presente estudo observou-se que o crescimento algal foi significativamente maior quando se usou meio de cultivo von Stosch comparativamente ao meio de água salgada enriquecida com nutrientes numa combinação de apenas Nitrato 32: Fósforo 2 (N32P2). Pensamos que isto está relacionado com a maior disponibilidade de micronutrientes para as algas no meio von Stosch, para além dos macronutrientes Nitrato e Fósforo.

A análise da composição de aminoácidos em *Ulva rigida* revelou ser rica em proteína e com qualidade considerada boa (Taboada 2010), no entanto diferiu em baixa percentagem de proteínas analisada por Satpati & Pal (2011). Supostamente estas diferenças de concentrações de azoto nos tecidos algais, devem-se à disponibilidade do mesmo nos meios de cultivo. Nielsen et al. (2011) referem que os efluentes de aquicultura são ricos em azoto amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e, portanto, muito adequado como fonte de nutrientes para as espécies de *Ulva*. Com teores mais elevados de nutrientes

dissolvidos em água, as concentrações nos tecidos algais de azoto, fósforo, aminoácidos e proteínas aumentam em *Ulva lactuca*. Também *Ulva pertusa* apresentou elevada eficiência de biofiltração de  $\text{NH}_4^+$  (> 80 %), em sistema integrado de piscicultura-algas. Nos tecidos vegetais os teores de azoto e fósforo aumentaram rapidamente, removendo eficientemente dos efluentes da aquacultura  $\text{NH}_4^+$ , seguidamente de nitratos mais nitritos ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) e ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Kang et al. 2011).

A mortalidade algal registada foi maior em meio von Stosch do que em N32P2, mas menor também nas duas temperaturas mais elevadas testadas (20 e 15°C). Não se registaram quaisquer casos de epifitismo em meio N32P2 sem refrescamento, ocorrendo simultaneamente neste meio a menor percentagem de mortalidade algal. No entanto, quando houve refrescamento em meio N32P2, houve epifitismo e a mortalidade aos 20°C aumentou. Estes resultados da epifitismo *versus* mortalidade poderão estar relacionados com a disponibilidade de nutrientes no meio e com a reposição de nutrientes aquando do refrescamento.

Na avaliação do efeito do fotoperíodo a 15°C, verificou-se a existência de uma interação significativa do efeito dos fatores refrescamento em meio von Stosch e fotoperíodo 0E/24L na saúde algal de *Ulva rigida*, decorridos 40 dias, atingindo-se uma mortalidade de 83.3 %. Isto sugere ter ocorrido fotoinibição já que os cultivos estavam submetidos a luz contínua de 16200 lux durante 24 h. Estes resultados vão de encontro ao observado por Figueroa et al. (2009) que referiram que há algum efeito inibitório do stress luminoso de curto prazo em *Ulva lactuca* quando há enriquecimento do meio de cultivo em azoto. A adaptação de *Ulva lactuca* ao excesso de luz acompanhada por uma eficiente conversão da irradiância em energia fotoquímica ou térmica impedindo assim os danos no fotossistema II (PS II), foi igualmente referida por Shaojun & Tifeng (2008). No entanto, o refrescamento do meio com adição de macro e micronutrientes deve ter tido efeito sinérgico com a temperatura ótima de crescimento de 15°C para *Ulva rigida*, estimulando a exposição do aparelho fotossintético aos efeitos diretos do excesso de luz, acabando por ocorrer fotoinibição.

Sendo *U. rigida* uma espécie relativamente fácil de cultivar e atendendo a todas as suas aplicações potenciais referidas na introdução deste estudo e aos resultados obtidos neste trabalho, pensamos ser importante investigar o cultivo desta alga a nível industrial, no sentido de avaliar eventual futura produção a maior escala na Região.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho J (1931) The volcanoes of the Azores Islands. Bulletin volcanologique 8(1):123-138
- Allison G (2004) The influence of species diversity and stress intensity on community resistance and resilience. Ecological Monographs 74:117-134
- AMA (2007) Espécies marinhas dos Açores e de interesse comercial / Marine species of the Azores with commercial value - Edição Bilingue. Coleção “Pesca Artesanal dos Açores”. Associação Marítima Açoriana, Rabo de Peixe, 240 p
- American Museum of Natural History (2007) Grande enciclopédia dos oceanos. Dorling Kindersley, Londres, 512 p
- Andersen RA (2005) Algal culturing techniques. Phycological Society of America, Elsevier, p 518
- Azevedo E, Rodrigues M, Fernandes J (2004) O clima dos Açores (subsídios). Extrato do Atlas básico dos Açores CLIMAAT (Interreg III B - Mac 2.3/A3), Ponta Delgada, 48 p
- Boubonari T, Malea P, Kevrekidis T (2008) The green seaweed *Ulva rigida* as a bioindicator of metals (Zn, Cu, Pb and Cd) in a low-salinity coastal environment. Botanica Marina 51(6):472-484
- Brodie J, Maggs CA, John DM (2007) The green seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society, London, p 100
- Burrows EM (1991) Seaweeds of the british isles: volume 2, chorophyta. British museum (natural history), The Dorset Press, Dorchester, London, p 98-99
- Campbell S (2001) Ammonium requirements of fast-growing ephemeral macroalgae in a nutrient-enriched marine embayment (Port Phillip Bay, Australia). Marine Ecology Progress Series 209:99-107
- Carafaa R, Marinova D, Dueria S, Wollgasta J, Giordanic G, Viarolic P, Zaldívar JM (2009) A bioaccumulation model for herbicides in *Ulva rigida* and *Tapes philippinarum* in Sacca di Goro lagoon (Northern Adriatic). Chemosphere 74(8):1044-1052
- Casabianca MLD, Posada F (1998) Effect of environmental parameters on the growth of *Ulva rigida* (Thau Lagoon, France). Botanica Marina 41(2):157-165

- Castro P, Huber ME (2000) Marine Biology. Third edition, McGraw-Hill, Boston, 444 p
- Cervigón F, Cipriani R, Fischer W, Garibaldi L, Hendrickx M, Lemus A, Márquez R, Poutiers J, Robaiana G, Rodriguez B (1992) Guia de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de sur América. FAO, Roma, 513 p
- Clark R (2001) Marine pollution. Fifth edition, University of Oxford, New York, 237 p
- Cruz J, Coutinho R, Antunes P, Freire P (2009) Hydrogeology of the Azores volcanic archipelago (Portugal). Geophysical Research Abstracts 11:11726
- Davison I, Pearson G (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. Journal of Phycology 32(2):197-211
- Dawes C (1998) Marine Botany. Second edition, University of South Florida, 480 p
- Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República n.º 176/98 – I Série A, Ministério Ambiente, Lisboa
- Dillehay TD, Ramírez C, Pino M, Collins MB, Rossen J, Pino-Navarro JD (2008) Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. Science 320(5877):784-786
- Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L327:1-72
- Dong M, Zhang X, Zhuang Z, Zou J, Ye N, Xu D, Mou S, Liang C, Wang W (2012) Characterization of the LhcSR gene under light and temperature stress in the green alga *Ulva linza*. Plant Molecular Biology Reporter 30:10-16
- DOP-UAç (2013) Azorean marine species database. Departamento de Oceanografia e Pescas, Centro do IMAR da Universidade dos Açores, Horta. <http://www.horta.uac.pt/intradop/>; consultada a 07 janeiro 2013
- DROTRH/INAG (2001) Plano regional da água da Região Autónoma dos Açores, relatório técnico. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar e Instituto da Água, Ponta Delgada, 414 p
- DROTRH/INAG (2006) Relatório síntese da caracterização da região hidrográfica do Arquipélago dos Açores, implementação do Quadro da Água. Secretaria Regional do Ambiente e do Mar e Instituto da Água, 91 p

- Ebert D, Stehmann M (2013) Sharks, batoids, and chimaeras of the North Atlantic. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, Rome, 7:523 p
- FAO (2010) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma, 219 p
- FAO (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura, Roma, 231 p
- Figuerola FL, Israel A, Neori A, Martínez B, Malta E, Jr PA, Inken S, Marquardt R, Korbee N (2009) Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress. *Aquatic Biology* 7:173-183
- Gamal A (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18:1-25
- Graham L, Graham J, Wilcox L (2009) *Algae*. Second edition, Editor Wilbur B, Benjamin Cummings, 616 p
- Guiry M, Guiry G (2013) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultada a 04 dezembro 2013
- Häder D, Figuerola F (1997) Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochemistry and Photobiology* 66(1):1-14
- IM-AEMET (2011) Atlas climático dos Arquipélagos das Canárias, da Madeira e dos Açores. Temperatura do ar e precipitação (1971-2000). Instituto de Meteorologia de Portugal e Agência Estatal de Meteorologia de Espanha, 78 p
- Instituto Português do Mar e Atmosfera (2014) Boletins climatológicos. Governo de Portugal, Ministério da Agricultura e do Mar. <http://www.ipma.pt/pt/>; consulta a 16 junho 2014
- Isidro E, Pham C, Silva E, Guedes R, Girolamo M (2008) Some aspects of the Azores relevant to aquaculture and objectives of the workshop. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 7:1-2
- Judd W, Campbell C, Kellogg E, Stevens P, Donoghue M (2002) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Second edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 576 p



- Kakinuma M, Coury D, Kuno Y, Itoh S, Kozawa Y, Inagaki E, Yoshiura Y, Amano H (2006) Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Marine Biology* 149:97-106
- Kalita TL, Tytlianov EA (2003) Effect of temperature and illumination on growth and reproduction of the green alga *Ulva fenestrata*. *Russian Journal of Marine Biology* 29(5):316-322
- Kamer K, Fong P (2000) A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254:53-69
- Kang YH, Park SR, Chung IK (2011) Biofiltration efficiency and biochemical composition of three seaweed species cultivated in a fish-seaweed integrated culture. *Algae* 26(1):97-108
- Lawton RJ, Mata L, Nys R, Paul NA (2013) Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: selecting target species and strains. *PLoS ONE* 8(10):e77344
- Lee JC, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, Chang HW (2013) Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International* 13:55
- Lobban C, Harrison P (1994) Temperature and salinity, *in*: Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, 210-240 p
- Lourenço N, Miranda JM, Luis JF, Ribeiro A, Victor LAM, Madeira J, Needham HD (1998) Morpho-tectonic analysis of the Azores volcanic plateau from a new bathymetric compilation of the area. *Marine Geophysical Researches* 20:141-156
- Luo M, Liu F (2011) Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 409:223-228
- Malea P, Haritonidis S (2000) Use of the green alga *Ulva rigida* C. Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. *Journal of Applied Phycology* 12:169-176
- McHugh D (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 441:105 p

- McLachlan J (1985) Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. *Plant and Soil* 89:137-157
- Mohamed S, Hashim S, Rahman H (2012) Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology* 23(2):83-96
- Morton B, Britton J, Martins A (1998) *Ecologia costeira dos Açores*. Sociedade Afonso Chaves, Ega, Ponta Delgada, 249 p
- Nelson TA, Nelson AV, Tjoelker M (2003) Seasonal and spatial patterns of “green tides” (ulvoid algal blooms) and related water quality parameters in the coastal waters of Washington state, USA. *Botanica Marina* 46:263-275
- Neto AI (1989) *Algas marinhas do litoral da ilha Graciosa*. Universidade dos Açores, Departamento de Biologia, Ponta Delgada. Relatório:61-65
- Neto AI (1991) *Macroalgas marinhas do litoral da ilha do Pico*. Universidade dos Açores, Departamento de Biologia, Ponta Delgada. Relatório:19-25
- Neto AI (1994) Checklist of the benthic marine macro algae of the Azores. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 12A:15-34
- Neto AI (1997) *Studies on algal communities of São Miguel, Azores*. Tese de Doutoramento em Biologia, especialidade de Biologia Marinha. Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 309 p
- Neto AI (2000a) Ecology and dynamics of two intertidal algal communities on the littoral of the island of São Miguel (Azores). *Hydrobiologia* 432:135-147
- Neto AI (2000b) Observations on the biology and ecology of selected macroalgae from the littoral of São Miguel (Azores). *Botanica Marina* 43:483-498
- Neto AI (2001) Macroalgal species diversity and biomass of subtidal communities of São Miguel (Azores). *Helgoland Marine Research* 55:101-111
- Neto AI, Baldwin HP (1990) *Algas marinhas do litoral das ilhas do Corvo e Flores*. Universidade dos Açores, Departamento de Biologia, Ponta Delgada. Relatório:103-111
- Neto AI, Fralick RA, Baldwin HP, Hehre E (1990) *Algas marinhas do litoral de Santa Maria*. Universidade dos Açores, Departamento de Biologia, Ponta Delgada. Relatório:33-42

- Neto AI, Tittley I, Raposeiro PM (2005) Flora marinha do litoral dos Açores / Rocky shore marine flora of the Azores – Edição Bilingue, Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Nova Gráfica, 156 p
- Neto JM, Gaspar R, Pereira L, Marques JC (2012) Marine Macroalgae Assessment Tool (MarMAT) for intertidal rocky shores. Quality assessment under the scope of the european water framework directive. *Ecological Indicators* 19:39-47
- Nielsen MM, Bruhn A, Rasmussen MB, Olesen B, Larsen MM, Møller HB (2011) Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *Journal Applied Phycology*: DOI 10.1007/s10811-011-9767-z
- Nunes J (2002) Novos conceitos em vulcanologia: erupções, produtos e paisagens vulcânicas. Associação Portuguesa de Geólogos, *Geonovas* 16:5-22
- Patarra R F (2008) Pesquisa de ácidos gordos em macroalgas marinhas do litoral dos Açores. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, especialidade em Biologia Marinha, Porto, 64 p
- PennState (2002) Protists II - Kingdoms Stramenopila, Rhodophyta and Chlorophyta, Dept. Biol. Penn State. <https://wikispaces.psu.edu/display/110Master/Protists+II+-+Kingdoms+Stramenopila,+Rhodophyta,+and+Chlorophyta>; consultada a 28 setembro 2012
- Pereira R, Pinto IS, Yarish C (2004) Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Phycologia* 43(6):756-767
- Pereira R, Yarish C, Pinto IS (2006) The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Aquaculture* 252:66-78
- Pérez-Mayorga DM, Ladah LB, Zertuche-González JA, Leichter JJ, Filonov AE, Lavín MF (2011) Nitrogen uptake and growth by the opportunistic macroalga *Ulva lactuca* (Linnaeus) during the internal tide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 406:108-115
- Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho Europeu de 28 de Junho de 2007. *Jornal Oficial da União Europeia*, L189:1-23
- Reviere B (2006) Biologia e filogenia das algas. Artemed, Porto Alegre, 280 p

- Rodrigues L (2008) Artes de pesca dos Açores, tecnologia de pesca e marinharia. Associação marítima Açoriana, Europam Lda., p 58-59 e 63
- Rybak A, Messyasz B, Łęska, B (2012) Freshwater *Ulva* (Chlorophyta) as a bioaccumulator of selected heavy metals (Cd, Ni and Pb) and alkaline earth metals (Ca and Mg). *Chemosphere* 89:1066-1076
- Santos R, Bettencourt R (2007) A importância dos produtos de biotecnologia no mar dos Açores. Jornadas de Economia do Mar “Energia e Investigação Científica na Economia do Mar”, Ponta Delgada
- Satpati GG, Pal R (2011) Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida* - a nutritional approach. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2(4):10-13
- Shaojun P, Tifeng S (2008) Temperature and light tolerance of representative brown, green and red algae in tumble culture revealed by chlorophyll fluorescence measurements. *Acta Oceanologica Sinica* 27(4):137-146
- Silva M, Vieira L, Almeida A, Kijjoo A (2013a) The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications. *Oceanography* 1:101
- Silva M, Vieira L, Almeida AP, Silva AMS, Seca AML, Barreto MC, Neto AI, Pedro M, Pinto E, Kijjoo A (2013b) Chemical study and biological activity evaluation of two Azorean macroalgae: *Ulva rigida* and *Gelidium microdon*. *Oceanography* 1:102
- Sjöö GL, Mörk E (2009) Tissue nutrient content in *Ulva* spp. (Chlorophyceae) as bioindicator for nutrient loading along the coast of East Africa. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal* 2:11-17
- Solidoro C, Pecelik G, Pastres R, Franco D, Dejak C (1997) Modelling macroalgae (*Ulva rigida*) in the Venice lagoon: model structure identification and first parameters estimation. *Ecological Modelling* 94:191-206
- StatTrek (2014) Chi-Square test for independence. Stat Trek, teach yourself statistics. <http://stattrek.com/>; consulta a 18 março 2014
- Taboada C, Millan R, Miguez I (2010) Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:445-449

- Taylor R, Fletcher R, Raven J (2001) Preliminary studies on the growth of selected “green tide” algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate. *Botanica Marina* 44:327-336
- Tempera F, Atchoi E, Amorim P, Gomes-Pereira J, Gonçalves J (2013) Atlantic area marine habitats, adding new Macaronesian habitat types from the Azores to the EUNIS habitat classification. MeshAtlantic, IMAR/DOP-UAç, Horta, Technical Report 4: p 50
- Tittley I, Neto AI (1994) “Expedition Azores 1989”: benthic marine algae (seaweeds) recorded from Faial and Pico. *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 12A:1-13
- Underwood AJ (1997) *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press, Cambridge
- Underwood AJ, Chapman MG, Richards SA (2002) GMAV-5 for Windows, an analysis of variance programme. Centre for Research on Ecological Impacts of Coastal Cities, Marine Ecology Laboratories, University of Sydney, Australia
- Villares R, Carballeira A (2006) Trophic categorization in the Rías Baixas (NW Spain): nutrients in water and in macroalgae. *Scientia Marina* 70(1):89-97
- Wallenstein F, Peres S, Xavier E, Neto A (2010) Phytobenthic communities of intertidal rock pools in the eastern islands of Azores and their relation to position on shore and pool morphology. *Arquipelago. Life and Marine Sciences* 27:9-20
- White WM, Tapia MDM, Schilling JG (1979) The petrology and geochemistry of the Azores islands. *Contributions to Mineralogy and Petrology* 69(3):201-213
- Xu D, Gao Z, Zhang X, Fan X, Wang Y, Li D, Wang W, Zhuang Z, Ye N (2012) Allelopathic interactions between the opportunistic species *Ulva prolifera* and the native macroalga *Gracilaria lichvoides*. *PLoS ONE* 7(4):e33648(1-7)
- Yokoyama H, Ishihi Y (2010) Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm - potential role in integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 22:74-83

## **Anexo I – Preparação de meio de cultura von Stosch (VS)**

1- Após filtragem, mede-se com a ajuda de uma proveta graduada 970 ml de água do mar acrescentando 30 ml de água destilada, perfazendo 1000 ml, diminuindo-se a salinidade de água do mar.

2- Aos 1000 ml adiciona-se 1.44 ml de HCl mais 0.12 g  $\text{NaHCO}_3$ , utilizando agitador magnético, para equilibrar o pH.

3- Retiram-se 970 ml e colocado em garrafa de vidro graduada de 2000 ml, para autoclavar (período de esterilização 20 min a 120°C e 1.5 bar).

4- Armazena-se 24 h em frigorífico, para evitar precipitações, sem nunca abrir a garrafa.

5- Após o período de espera, adiciona-se 5 ml de cada nutriente (cinco) por ordem seguidamente indicada, através de pipeta graduada para cada nutriente, agitando todas as garrafas de vidro da solução-mãe antes de usar:

5.1-  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}^*$ , 5.375 g a);

5.2-  $\text{NaNO}_3$ , 21.26 g a);

5.3-  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.14 g b) (0.07 g/250 ml, garrafa de vidro envolvida em folha de alumínio, para evitar que a solução precipite com a luz);

5.4-  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.98 g a);

5.5- NaEDTA, 1.86 g b), 0.93g/250 ml.

6- Em 475 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada dissolve-se cada vitamina em frasco de vidro. Filtração 0.2  $\mu\text{m}$  autoclavado. Adicionou-se 5 ml de vitaminas (três) de cada solução-mãe:

6.1- Tiamina (vitamina  $\text{B}_1$ ), 0.1 g;

6.2- Biotina (vitamina H), 0.5 ml;

6.3- Cianocobalamina (vitamina  $\text{B}_{12}$ ), 0.5 ml.

No final armazena-se as vitaminas no congelador.

\* $\text{Na}_2\beta$ -glicerofosfato (substituir por  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}_7$ )

a) para 500 ml (proporção 5 ml nutrientes/1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

b) para 250 ml (necessário reduzir para metade)

## **Anexo II – Preparação do meio de cultura de Nitratos e Fósforo (N32P2)**

Para a determinação das concentrações de Nitratos (N) usa-se como valor inicial 0.3 ppm de  $\text{NO}_3$ , correspondente ao valor ambiente. O qual foi determinado por análise bioquímica pelo INOVA – Instituto Inovação e Tecnologia dos Açores, à água nerítica da costa Sul de São Miguel a recolher para preparação dos meios. A partir deste valor inicial de  $\text{NO}_3$ , definiram-se os restantes valores com crescimento exponencial: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 ppm.

Quanto à concentração de Fósforo (P), o valor ambiente foi de 0.37 ppm  $\text{P}_2\text{O}_5$  determinado pelo INOVA e define-se 2 ppm como valor acima do registado em condições naturais.

Todas as concentrações de N são preparadas a partir do mesmo composto,  $\text{NaNO}_3$ . Calcula-se a % de  $\text{NO}_3$  presente no composto e de Na, tendo por base o valor da Massa Molar do composto. Obtidas 73 e 27 % respetivamente, procede-se ao cálculo da quantidade de composto necessária: para a quantidade de  $\text{NO}_3$  pretendido, qual a quantidade de Na necessária (e.g.  $2\text{NO}_3$  corresponde a 73 %, x Na corresponderá a 27 %), o valor obtido será o valor de Na necessário. Seguidamente, soma-se ao valor 2 ppm de  $\text{NO}_3$ , o respetivo valor de Na obtido. Esse somatório será o valor do composto necessário para a concentração de N que se pretende.

Exemplifica-se: 32 ppm  $\text{NO}_3^-$  corresponde a 73% de  $\text{NaNO}_3$ , x ppm Na corresponde a 27 % de  $\text{NaNO}_3$ , então,  $x = (32 \cdot 0.27) / 0.73 = 11.83$  ppm (mg/L) de Na. O somatório de  $32 + 11.83$  mg/L = 43.83 mg/L = 0.0438 g/L

As concentrações de Fósforo são obtidas, à semelhança, que as de Nitratos pelo mesmo cálculo, utiliza-se o composto  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Através do valor da Massa Molar, a equivalência de 2 ppm corresponde a 22.6 % do composto. Da análise realizada pelo INOVA, para determinar os valores ambientes, tem-se como marcador  $\text{P}_2\text{O}_5$  ajustando-se para  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  disponível em laboratório. Como o composto de referência do INOVA tem 2 moléculas de P e apenas necessitamos de 1 molécula de P, então para a concentração de 2 ppm de P é necessário 0.008 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Para perfazer o meio N32P2, adiciona-se em simultâneo 0.0438 de  $\text{NaNO}_3$  e 0.008 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**Anexo III – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS, 10°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,008	0,010	0,012	0,006	0,044	0,044	0,038	0,038	0,038
1	2	0,012	0,014	0,017	0,008	0,078	0,041	0,030	0,030	0,030
1	3	0,019	0,022	0,024	0,024	0,026	0,025	0,029	0,028	0,031
2	1	0,008	0,012	0,020	0,019	0,024	0,012	0,042	0,008	0,009
2	2	0,011	0,015	0,024	0,027	0,017	0,040	0,029	0,065	0,059
2	3	0,012	0,014	0,024	0,021	0,034	0,014	0,042	0,009	0,002
3	1	0,015	0,022	0,040	0,039	0,041	0,032	0,014	0,014	0,014
3	2	0,016	0,021	0,036	0,032	0,044	0,046	0,009	0,049	0,049
3	3	0,015	0,019	0,027	0,035	0,036	0,041	0,033	0,068	0,061
4	1	0,026	0,027	0,034	0,032	0,039	0,049	0,029	0,082	0,116
4	2	0,015	0,015	0,022	0,024	0,025	0,039	0,027	0,021	0,016
4	3	0,019	0,023	0,038	0,036	0,041	0,058	0,029	0,067	0,065
5	1	0,011	0,016	0,026	0,026	0,022	0,022	0,016	0,016	0,016
5	2	0,012	0,015	0,019	0,015	0,011	0,011	0,018	0,018	0,009
5	3	0,016	0,017	0,019	0,015	0,013	0,010	0,012	0,008	0,008
6	1	0,013	0,014	0,016	0,010	0,009	0,009	0,033	0,033	0,033
6	2	0,014	0,017	0,021	0,015	0,011	0,016	0,019	0,019	0,019
6	3	0,013	0,017	0,021	0,016	0,013	0,013	0,035	0,035	0,035
Peso Médio (g)		0,014	0,017	0,024	0,022	0,029	0,029	0,027	0,034	0,034
SE		0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,004	0,002	0,005	0,007

**Anexo IV – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS, 15°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,012	0,018	0,064	0,057	0,060	0,054	0,072	0,046	0,050
1	2	0,016	0,025	0,083	0,105	0,083	0,064	0,075	0,043	0,049
1	3	0,010	0,016	0,050	0,058	0,055	0,049	0,071	0,045	0,044
2	1	0,013	0,019	0,040	0,090	0,075	0,057	0,084	0,053	0,055
2	2	0,009	0,016	0,048	0,065	0,061	0,049	0,069	0,037	0,038
2	3	0,018	0,022	0,045	0,047	0,062	0,063	0,091	0,071	0,077
3	1	0,015	0,021	0,051	0,064	0,071	0,068	0,078	0,060	0,068
3	2	0,019	0,026	0,067	0,098	0,099	0,087	0,103	0,077	0,082
3	3	0,017	0,023	0,068	0,080	0,091	0,080	0,090	0,068	0,079
4	1	0,022	0,029	0,099	0,076	0,084	0,073	0,083	0,075	0,080
4	2	0,015	0,022	0,042	0,061	0,062	0,062	0,068	0,063	0,085
4	3	0,011	0,014	0,025	0,033	0,042	0,043	0,066	0,050	0,060
5	1	0,011	0,017	0,044	0,058	0,065	0,036	0,039	0,039	0,039
5	2	0,012	0,018	0,048	0,058	0,069	0,072	0,093	0,093	0,093
5	3	0,013	0,019	0,047	0,045	0,043	0,030	0,037	0,037	0,037
6	1	0,016	0,025	0,101	0,089	0,110	0,088	0,107	0,071	0,077
6	2	0,016	0,019	0,033	0,038	0,044	0,047	0,052	0,045	0,056
6	3	0,018	0,029	0,072	0,092	0,100	0,101	0,108	0,045	0,110
Peso Médio (g)		0,015	0,021	0,057	0,068	0,071	0,062	0,077	0,056	0,065
SE		0,001	0,001	0,005	0,005	0,005	0,004	0,005	0,004	0,005



**Anexo V – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS, 20°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,018	0,030	0,040	0,061	0,060	0,093	0,069	0,063	0,061
1	2	0,018	0,035	0,065	0,086	0,077	0,106	0,086	0,062	0,060
1	3	0,018	0,034	0,051	0,083	0,074	0,109	0,097	0,092	0,092
2	1	0,013	0,032	0,047	0,094	0,088	0,143	0,094	0,054	0,042
2	2	0,018	0,036	0,053	0,094	0,077	0,112	0,063	0,046	0,045
2	3	0,018	0,036	0,056	0,084	0,074	0,091	0,063	0,025	0,027
3	1	0,020	0,037	0,050	0,076	0,070	0,096	0,087	0,066	0,069
3	2	0,015	0,039	0,061	0,089	0,090	0,131	0,104	0,084	0,078
3	3	0,018	0,037	0,046	0,069	0,079	0,115	0,091	0,074	0,072
4	1	0,013	0,029	0,039	0,066	0,070	0,118	0,096	0,066	0,067
4	2	0,014	0,029	0,039	0,064	0,057	0,080	0,058	0,017	0,013
4	3	0,015	0,033	0,048	0,072	0,069	0,086	0,086	0,005	0,033
5	1	0,015	0,030	0,042	0,084	0,082	0,126	0,114	0,097	0,088
5	2	0,015	0,044	0,074	0,104	0,099	0,126	0,106	0,086	0,072
5	3	0,014	0,033	0,044	0,061	0,059	0,066	0,052	0,018	0,018
6	1	0,015	0,036	0,048	0,091	0,083	0,118	0,104	0,065	0,026
6	2	0,015	0,037	0,055	0,082	0,087	0,090	0,070	0,058	0,059
6	3	0,016	0,025	0,035	0,064	0,066	0,078	0,089	0,060	0,063
Peso Médio (g)		0,016	0,034	0,050	0,079	0,076	0,105	0,085	0,058	0,055
SE		0,000	0,001	0,002	0,003	0,003	0,005	0,004	0,006	0,006

**Anexo VI – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 10°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,011	0,012	0,014	0,012	0,010	0,010	0,006	0,006	0,008
1	2	0,012	0,015	0,020	0,012	0,008	0,007	0,007	0,007	0,007
1	3	0,012	0,013	0,018	0,012	0,012	0,010	0,006	0,006	0,006
2	1	0,010	0,015	0,017	0,009	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
2	2	0,009	0,012	0,030	0,018	0,016	0,013	0,008	0,006	0,001
2	3	0,014	0,018	0,049	0,035	0,037	0,042	0,050	0,088	0,090
3	1	0,015	0,017	0,024	0,017	0,014	0,012	0,006	0,005	0,002
3	2	0,010	0,011	0,013	0,011	0,011	0,009	0,008	0,007	0,009
3	3	0,010	0,013	0,022	0,015	0,008	0,007	0,006	0,006	0,006
4	1	0,008	0,011	0,016	0,011	0,008	0,009	0,007	0,007	0,007
4	2	0,006	0,010	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,005	0,005
4	3	0,006	0,008	0,011	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
5	1	0,006	0,010	0,020	0,011	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002
5	2	0,009	0,014	0,029	0,027	0,025	0,029	0,026	0,029	0,012
5	3	0,008	0,011	0,015	0,091	0,004	0,030	0,030	0,030	0,030
6	1	0,012	0,013	0,020	0,014	0,012	0,007	0,007	0,007	0,007
6	2	0,009	0,011	0,021	0,084	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002
6	3	0,010	0,012	0,014	0,099	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Peso Médio (g)		0,010	0,013	0,020	0,027	0,011	0,011	0,010	0,012	0,011
SE		0,001	0,001	0,002	0,007	0,002	0,003	0,003	0,005	0,005

**Anexo VII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 15°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,014	0,018	0,054	0,049	0,056	0,048	0,052	0,053	0,054
1	2	0,015	0,020	0,058	0,085	0,086	0,063	0,069	0,053	0,052
1	3	0,008	0,014	0,040	0,066	0,065	0,046	0,043	0,013	0,013
2	1	0,011	0,023	0,049	0,068	0,066	0,007	0,070	0,064	0,082
2	2	0,020	0,020	0,067	0,084	0,047	0,047	0,051	0,035	0,019
2	3	0,015	0,022	0,055	0,088	0,091	0,084	0,076	0,075	0,092
3	1	0,014	0,020	0,076	0,079	0,080	0,062	0,015	0,015	0,015
3	2	0,009	0,023	0,066	0,067	0,088	0,083	0,087	0,068	0,078
3	3	0,016	0,025	0,059	0,064	0,099	0,084	0,094	0,105	0,198
4	1	0,018	0,021	0,059	0,058	0,077	0,043	0,022	0,010	0,008
4	2	0,011	0,029	0,045	0,049	0,066	0,073	0,074	0,075	0,088
4	3	0,014	0,027	0,059	0,073	0,098	0,087	0,088	0,090	0,106
5	1	0,023	0,031	0,066	0,070	0,094	0,094	0,099	0,011	0,140
5	2	0,014	0,023	0,077	0,079	0,109	0,088	0,022	0,017	0,022
5	3	0,018	0,024	0,053	0,074	0,112	0,100	0,090	0,008	0,118
6	1	0,026	0,023	0,062	0,066	0,073	0,058	0,049	0,005	0,005
6	2	0,015	0,022	0,054	0,058	0,085	0,074	0,066	0,066	0,066
6	3	0,011	0,017	0,035	0,039	0,048	0,039	0,030	0,030	0,030
Peso Médio (g)		0,015	0,022	0,057	0,068	0,080	0,065	0,061	0,044	0,066
SE		0,001	0,001	0,003	0,003	0,005	0,006	0,006	0,008	0,012

**Anexo VIII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (VS-10, 20°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,016	0,038	0,049	0,073	0,090	0,138	0,075	0,075	0,075
1	2	0,010	0,030	0,041	0,056	0,071	0,090	0,040	0,040	0,040
1	3	0,015	0,048	0,060	0,081	0,067	0,097	0,039	0,039	0,039
2	1	0,015	0,023	0,027	0,037	0,042	0,063	0,039	0,039	0,039
2	2	0,016	0,024	0,031	0,050	0,063	0,083	0,067	0,053	0,047
2	3	0,024	0,039	0,049	0,072	0,081	0,113	0,093	0,116	0,082
3	1	0,018	0,040	0,055	0,096	0,087	0,156	0,057	0,044	0,029
3	2	0,011	0,040	0,040	0,058	0,034	0,052	0,013	0,013	0,013
3	3	0,018	0,038	0,051	0,074	0,085	0,136	0,064	0,056	0,040
4	1	0,012	0,032	0,036	0,049	0,038	0,046	0,046	0,046	0,046
4	2	0,018	0,033	0,045	0,056	0,056	0,062	0,033	0,033	0,033
4	3	0,015	0,025	0,039	0,057	0,064	0,086	0,041	0,041	0,041
5	1	0,016	0,042	0,058	0,084	0,088	0,122	0,082	0,078	0,054
5	2	0,008	0,020	0,026	0,021	0,017	0,022	0,012	0,012	0,012
5	3	0,011	0,023	0,034	0,047	0,050	0,081	0,059	0,059	0,059
6	1	0,012	0,031	0,044	0,060	0,057	0,082	0,031	0,031	0,031
6	2	0,007	0,019	0,026	0,040	0,044	0,072	0,057	0,057	0,057
6	3	0,015	0,043	0,049	0,075	0,063	0,090	0,067	0,067	0,067
Peso Médio (g)		0,014	0,033	0,042	0,060	0,061	0,088	0,051	0,050	0,045
SE		0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,008	0,005	0,006	0,005

**Anexo IX – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 10°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,021	0,026	0,038	0,034	0,036	0,037	0,037	0,034	0,036
1	2	0,018	0,021	0,030	0,025	0,027	0,029	0,004	0,031	0,035
1	3	0,019	0,024	0,031	0,029	0,033	0,032	0,029	0,023	0,026
2	1	0,026	0,039	0,067	0,051	0,053	0,058	0,011	0,031	0,021
2	2	0,017	0,021	0,032	0,027	0,028	0,025	0,048	0,023	0,019
2	3	0,019	0,024	0,035	0,032	0,035	0,037	0,010	0,045	0,047
3	1	0,015	0,019	0,030	0,028	0,028	0,021	0,020	0,012	0,010
3	2	0,010	0,012	0,027	0,014	0,096	0,007	0,048	0,048	0,007
3	3	0,025	0,025	0,031	0,028	0,030	0,030	0,051	0,032	0,035
4	1	0,023	0,026	0,033	0,031	0,033	0,030	0,067	0,026	0,020
4	2	0,021	0,027	0,078	0,033	0,045	0,040	0,035	0,017	0,015
4	3	0,015	0,018	0,027	0,024	0,026	0,031	0,067	0,028	0,016
5	1	0,016	0,020	0,029	0,024	0,020	0,016	0,006	0,016	0,007
5	2	0,016	0,019	0,022	0,021	0,019	0,017	0,014	0,021	0,023
5	3	0,014	0,015	0,018	0,018	0,018	0,017	0,009	0,012	0,006
6	1	0,020	0,019	0,030	0,033	0,030	0,029	0,015	0,033	0,036
6	2	0,022	0,025	0,023	0,023	0,023	0,022	0,005	0,005	0,005
6	3	0,021	0,023	0,029	0,029	0,029	0,031	0,016	0,038	0,046
Peso Médio (g)		0,019	0,022	0,034	0,028	0,034	0,028	0,027	0,026	0,023
SE		0,001	0,001	0,004	0,002	0,004	0,003	0,005	0,003	0,003

**Anexo X – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 15°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,016	0,026	0,052	0,044	0,041	0,054	0,061	0,050	0,055
1	2	0,018	0,026	0,042	0,040	0,038	0,040	0,052	0,051	0,050
1	3	0,018	0,027	0,038	0,055	0,054	0,049	0,056	0,056	0,061
2	1	0,016	0,034	0,042	0,032	0,033	0,065	0,048	0,058	0,046
2	2	0,018	0,019	0,021	0,051	0,043	0,040	0,081	0,066	0,046
2	3	0,013	0,029	0,036	0,040	0,032	0,055	0,037	0,031	0,027
3	1	0,015	0,021	0,028	0,058	0,057	0,061	0,072	0,080	0,052
3	2	0,018	0,032	0,036	0,054	0,059	0,041	0,055	0,055	0,048
3	3	0,020	0,036	0,038	0,051	0,047	0,031	0,057	0,075	0,032
4	1	0,027	0,029	0,037	0,060	0,072	0,052	0,075	0,077	0,035
4	2	0,017	0,037	0,033	0,005	0,055	0,044	0,051	0,043	0,053
4	3	0,018	0,029	0,049	0,047	0,053	0,030	0,054	0,047	0,050
5	1	0,014	0,028	0,022	0,049	0,075	0,037	0,047	0,044	0,076
5	2	0,009	0,031	0,033	0,023	0,025	0,038	0,028	0,027	0,045
5	3	0,020	0,015	0,027	0,043	0,042	0,056	0,055	0,050	0,046
6	1	0,016	0,027	0,045	0,031	0,036	0,040	0,055	0,035	0,034
6	2	0,020	0,024	0,043	0,056	0,049	0,035	0,070	0,057	0,025
6	3	0,017	0,029	0,036	0,041	0,045	0,050	0,071	0,058	0,040
Peso Médio (g)		0,017	0,028	0,037	0,043	0,047	0,046	0,057	0,053	0,046
SE		0,001	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003	0,004	0,003

**Anexo XI – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2, 20°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,026	0,033	0,031	0,036	0,035	0,034	0,034	0,047	0,036
1	2	0,024	0,048	0,051	0,060	0,063	0,059	0,057	0,066	0,071
1	3	0,020	0,026	0,027	0,032	0,038	0,042	0,044	0,065	0,056
2	1	0,017	0,025	0,026	0,036	0,050	0,043	0,045	0,066	0,048
2	2	0,019	0,036	0,044	0,077	0,055	0,057	0,060	0,096	0,071
2	3	0,025	0,049	0,059	0,071	0,073	0,087	0,088	0,076	0,087
3	1	0,016	0,024	0,033	0,044	0,043	0,048	0,046	0,058	0,048
3	2	0,022	0,042	0,045	0,051	0,055	0,053	0,052	0,068	0,054
3	3	0,018	0,024	0,027	0,036	0,037	0,039	0,038	0,044	0,042
4	1	0,019	0,036	0,038	0,043	0,054	0,049	0,052	0,056	0,051
4	2	0,023	0,004	0,034	0,042	0,044	0,041	0,046	0,053	0,050
4	3	0,020	0,029	0,036	0,045	0,046	0,044	0,052	0,057	0,107
5	1	0,017	0,024	0,022	0,027	0,034	0,032	0,037	0,048	0,038
5	2	0,017	0,033	0,036	0,043	0,049	0,049	0,045	0,052	0,044
5	3	0,016	0,020	0,023	0,027	0,033	0,027	0,031	0,044	0,032
6	1	0,023	0,035	0,039	0,044	0,055	0,049	0,053	0,068	0,053
6	2	0,020	0,037	0,041	0,048	0,051	0,048	0,053	0,055	0,054
6	3	0,020	0,039	0,041	0,049	0,054	0,047	0,052	0,065	0,050
Peso Médio (g)		0,020	0,031	0,036	0,045	0,048	0,047	0,049	0,060	0,055
SE		0,001	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004

**Anexo XII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 10°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,013	0,017	0,022	0,020	0,018	0,016	0,018	0,021	0,028
1	2	0,011	0,012	0,014	0,014	0,015	0,018	0,015	0,017	0,023
1	3	0,013	0,016	0,019	0,018	0,015	0,016	0,007	0,008	0,011
2	1	0,014	0,015	0,018	0,016	0,016	0,011	0,010	0,006	0,010
2	2	0,020	0,024	0,031	0,029	0,032	0,035	0,026	0,027	0,032
2	3	0,015	0,016	0,018	0,015	0,013	0,011	0,010	0,007	0,006
3	1	0,011	0,015	0,039	0,021	0,025	0,033	0,029	0,036	0,042
3	2	0,016	0,021	0,031	0,028	0,032	0,033	0,033	0,041	0,050
3	3	0,011	0,013	0,019	0,018	0,018	0,019	0,015	0,017	0,018
4	1	0,017	0,019	0,025	0,025	0,027	0,032	0,025	0,032	0,037
4	2	0,017	0,020	0,036	0,034	0,034	0,041	0,024	0,024	0,018
4	3	0,016	0,019	0,027	0,028	0,030	0,033	0,024	0,026	0,028
5	1	0,015	0,018	0,023	0,023	0,024	0,040	0,029	0,034	0,033
5	2	0,020	0,025	0,052	0,034	0,037	0,077	0,041	0,048	0,045
5	3	0,023	0,030	0,041	0,046	0,039	0,046	0,025	0,028	0,018
6	1	0,018	0,021	0,024	0,024	0,025	0,030	0,029	0,032	0,031
6	2	0,021	0,031	0,047	0,056	0,047	0,062	0,052	0,065	0,070
6	3	0,018	0,022	0,027	0,027	0,029	0,036	0,030	0,038	0,034
Peso Médio (g)		0,016	0,020	0,028	0,026	0,027	0,033	0,024	0,028	0,030
SE		0,001	0,001	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	0,004	0,004

**Anexo XIII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 15°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,022	0,030	0,028	0,075	0,060	0,054	0,040	0,036	0,038
1	2	0,019	0,034	0,032	0,050	0,055	0,040	0,059	0,065	0,068
1	3	0,016	0,026	0,032	0,052	0,051	0,049	0,036	0,034	0,043
2	1	0,021	0,028	0,031	0,052	0,058	0,065	0,067	0,081	0,091
2	2	0,027	0,028	0,030	0,040	0,037	0,040	0,043	0,054	0,054
2	3	0,026	0,026	0,032	0,046	0,051	0,055	0,050	0,062	0,067
3	1	0,018	0,028	0,040	0,062	0,059	0,061	0,062	0,072	0,078
3	2	0,023	0,029	0,038	0,038	0,037	0,041	0,045	0,048	0,056
3	3	0,017	0,026	0,024	0,027	0,028	0,031	0,033	0,045	0,046
4	1	0,019	0,019	0,035	0,040	0,045	0,052	0,057	0,060	0,043
4	2	0,018	0,025	0,044	0,042	0,040	0,044	0,043	0,049	0,041
4	3	0,013	0,025	0,039	0,036	0,036	0,030	0,025	0,027	0,012
5	1	0,017	0,024	0,042	0,031	0,036	0,037	0,039	0,066	0,030
5	2	0,020	0,024	0,034	0,038	0,046	0,038	0,045	0,011	0,076
5	3	0,020	0,024	0,031	0,049	0,057	0,056	0,067	0,057	0,051
6	1	0,019	0,031	0,034	0,035	0,043	0,040	0,033	0,047	0,028
6	2	0,018	0,027	0,041	0,032	0,034	0,035	0,038	0,047	0,045
6	3	0,024	0,019	0,030	0,041	0,059	0,050	0,051	0,068	0,051
Peso Médio (g)		0,020	0,026	0,034	0,044	0,046	0,046	0,046	0,052	0,051
SE		0,001	0,001	0,001	0,003	0,002	0,002	0,003	0,004	0,005

**Anexo XIV – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito da temperatura (N32P2-10, 20°C e 12 h escuro/12 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,021	0,037	0,046	0,054	0,066	0,049	0,048	0,048	0,048
1	2	0,013	0,023	0,035	0,033	0,035	0,038	0,037	0,037	0,037
1	3	0,019	0,031	0,039	0,050	0,055	0,048	0,052	0,052	0,052
2	1	0,020	0,034	0,032	0,044	0,048	0,051	0,056	0,061	0,063
2	2	0,019	0,034	0,040	0,053	0,059	0,053	0,047	0,042	0,023
2	3	0,019	0,031	0,049	0,050	0,058	0,052	0,045	0,045	0,045
3	1	0,016	0,032	0,041	0,044	0,048	0,043	0,035	0,026	0,022
3	2	0,012	0,030	0,033	0,039	0,039	0,030	0,024	0,024	0,024
3	3	0,020	0,028	0,032	0,038	0,050	0,045	0,047	0,039	0,018
4	1	0,023	0,032	0,034	0,040	0,050	0,046	0,050	0,045	0,041
4	2	0,014	0,032	0,032	0,039	0,043	0,041	0,043	0,037	0,037
4	3	0,020	0,048	0,062	0,067	0,073	0,063	0,045	0,045	0,045
5	1	0,015	0,035	0,033	0,038	0,043	0,045	0,038	0,036	0,011
5	2	0,018	0,036	0,037	0,045	0,052	0,042	0,043	0,043	0,043
5	3	0,015	0,032	0,037	0,047	0,067	0,030	0,020	0,009	0,009
6	1	0,019	0,045	0,051	0,060	0,072	0,065	0,060	0,049	0,027
6	2	0,016	0,027	0,033	0,044	0,054	0,036	0,032	0,029	0,026
6	3	0,016	0,034	0,037	0,044	0,051	0,040	0,030	0,009	0,009
Peso Médio (g)		0,018	0,033	0,039	0,046	0,054	0,045	0,042	0,038	0,032
SE		0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,003	0,004

**Anexo XV – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 0 h escuro/24 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,014	0,012	0,015	0,018	0,024	0,028	0,029	0,028	0,028
1	2	0,010	0,010	0,018	0,021	0,024	0,029	0,034	0,037	0,038
1	3	0,010	0,015	0,014	0,017	0,024	0,027	0,030	0,021	0,019
2	1	0,008	0,008	0,014	0,018	0,022	0,015	0,016	0,017	0,020
2	2	0,011	0,010	0,012	0,013	0,015	0,024	0,029	0,029	0,029
2	3	0,011	0,015	0,021	0,026	0,034	0,036	0,044	0,046	0,046
3	1	0,011	0,011	0,017	0,019	0,017	0,019	0,018	0,017	0,016
3	2	0,011	0,010	0,018	0,021	0,027	0,031	0,036	0,034	0,010
3	3	0,009	0,009	0,013	0,016	0,019	0,024	0,015	0,017	0,016
4	1	0,013	0,014	0,018	0,023	0,024	0,032	0,027	0,029	0,028
4	2	0,009	0,009	0,010	0,012	0,014	0,017	0,014	0,016	0,010
4	3	0,008	0,009	0,016	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
5	1	0,017	0,017	0,020	0,021	0,027	0,031	0,032	0,035	0,038
5	2	0,009	0,009	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
5	3	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
6	1	0,011	0,010	0,014	0,017	0,023	0,024	0,021	0,028	0,029
6	2	0,010	0,010	0,014	0,016	0,022	0,007	0,009	0,009	0,009
6	3	0,012	0,021	0,014	0,014	0,018	0,008	0,007	0,007	0,007
Peso Médio (g)		0,011	0,012	0,016	0,018	0,021	0,022	0,023	0,024	0,022
SE		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003

**Anexo XVI – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 0 h escuro/24 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,010	0,009	0,016	0,018	0,024	0,031	0,023	0,020	0,020
1	2	0,009	0,009	0,013	0,013	0,019	0,024	0,025	0,025	0,025
1	3	0,009	0,010	0,012	0,013	0,018	0,022	0,022	0,022	0,022
2	1	0,012	0,011	0,014	0,017	0,019	0,016	0,007	0,007	0,007
2	2	0,008	0,014	0,012	0,015	0,019	0,016	0,011	0,012	0,012
2	3	0,010	0,011	0,013	0,017	0,019	0,025	0,026	0,018	0,018
3	1	0,008	0,009	0,012	0,017	0,014	0,012	0,012	0,012	0,012
3	2	0,009	0,011	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
3	3	0,011	0,011	0,014	0,020	0,015	0,016	0,007	0,007	0,007
4	1	0,009	0,010	0,013	0,016	0,020	0,021	0,022	0,022	0,022
4	2	0,011	0,011	0,014	0,018	0,016	0,013	0,011	0,011	0,011
4	3	0,014	0,023	0,026	0,029	0,025	0,024	0,013	0,019	0,020
5	1	0,012	0,022	0,028	0,019	0,014	0,011	0,011	0,011	0,011
5	2	0,016	0,032	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
5	3	0,008	0,011	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037
6	1	0,017	0,031	0,038	0,034	0,036	0,037	0,019	0,018	0,017
6	2	0,013	0,016	0,022	0,029	0,033	0,031	0,039	0,017	0,017
6	3	0,009	0,012	0,015	0,022	0,026	0,031	0,030	0,023	0,022
Peso Médio (g)		0,011	0,015	0,018	0,020	0,021	0,022	0,019	0,017	0,017
SE		0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

**Anexo XVII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 8 h escuro/16 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,012	0,014	0,019	0,025	0,033	0,041	0,046	0,060	0,064
1	2	0,018	0,011	0,052	0,054	0,059	0,063	0,068	0,078	0,085
1	3	0,010	0,014	0,014	0,023	0,032	0,049	0,042	0,055	0,062
2	1	0,021	0,012	0,031	0,038	0,037	0,035	0,035	0,035	0,035
2	2	0,016	0,011	0,027	0,026	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
2	3	0,014	0,011	0,024	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026
3	1	0,015	0,010	0,038	0,036	0,039	0,036	0,032	0,036	0,039
3	2	0,019	0,013	0,037	0,043	0,035	0,035	0,035	0,038	0,038
3	3	0,018	0,010	0,019	0,032	0,039	0,049	0,045	0,052	0,055
4	1	0,016	0,012	0,039	0,038	0,037	0,026	0,020	0,022	0,014
4	2	0,018	0,010	0,040	0,040	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
4	3	0,009	0,011	0,011	0,019	0,019	0,022	0,038	0,023	0,022
5	1	0,018	0,019	0,057	0,067	0,047	0,046	0,039	0,023	0,016
5	2	0,019	0,013	0,057	0,072	0,072	0,071	0,069	0,064	0,063
5	3	0,012	0,010	0,019	0,027	0,033	0,046	0,043	0,057	0,032
6	1	0,016	0,012	0,039	0,015	0,031	0,030	0,030	0,030	0,030
6	2	0,021	0,009	0,035	0,041	0,050	0,062	0,070	0,067	0,068
6	3	0,015	0,010	0,042	0,032	0,033	0,039	0,039	0,035	0,035
Peso Médio (g)		0,016	0,012	0,033	0,036	0,038	0,041	0,041	0,042	0,041
SE		0,001	0,001	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,005

**Anexo XVIII – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 8 h escuro/16 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,011	0,012	0,021	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027	0,027
1	2	0,010	0,035	0,015	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
1	3	0,010	0,011	0,015	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
2	1	0,011	0,023	0,012	0,014	0,019	0,027	0,035	0,037	0,043
2	2	0,008	0,023	0,013	0,017	0,023	0,031	0,043	0,044	0,052
2	3	0,009	0,018	0,016	0,015	0,019	0,026	0,036	0,036	0,026
3	1	0,009	0,021	0,012	0,020	0,025	0,034	0,038	0,045	0,052
3	2	0,011	0,028	0,016	0,017	0,021	0,023	0,026	0,021	0,022
3	3	0,009	0,016	0,012	0,016	0,021	0,028	0,033	0,043	0,050
4	1	0,010	0,020	0,015	0,019	0,027	0,033	0,042	0,051	0,050
4	2	0,008	0,019	0,013	0,017	0,020	0,017	0,017	0,017	0,017
4	3	0,008	0,007	0,015	0,020	0,028	0,032	0,027	0,032	0,034
5	1	0,011	0,028	0,017	0,025	0,025	0,029	0,040	0,050	0,060
5	2	0,010	0,024	0,015	0,021	0,025	0,031	0,038	0,048	0,051
5	3	0,009	0,011	0,015	0,019	0,024	0,031	0,035	0,051	0,051
6	1	0,011	0,022	0,020	0,025	0,028	0,036	0,043	0,040	0,051
6	2	0,009	0,018	0,015	0,020	0,028	0,033	0,042	0,049	0,056
6	3	0,010	0,025	0,016	0,020	0,031	0,027	0,035	0,042	0,048
Peso Médio (g)		0,010	0,020	0,015	0,019	0,024	0,028	0,033	0,037	0,041
SE		0,000	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003	0,004

**Anexo XIX – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS, 15°C e 16 h escuro/8 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,017	0,020	0,028	0,038	0,052	0,060	0,065	0,074	0,079
1	2	0,018	0,020	0,023	0,037	0,055	0,071	0,077	0,084	0,085
1	3	0,009	0,009	0,012	0,014	0,017	0,020	0,022	0,023	0,026
2	1	0,011	0,018	0,024	0,023	0,032	0,038	0,047	0,046	0,041
2	2	0,010	0,011	0,013	0,015	0,016	0,018	0,020	0,023	0,022
2	3	0,011	0,012	0,015	0,016	0,026	0,024	0,028	0,031	0,033
3	1	0,012	0,013	0,016	0,020	0,025	0,028	0,033	0,034	0,037
3	2	0,013	0,020	0,027	0,038	0,058	0,070	0,064	0,070	0,072
3	3	0,008	0,009	0,010	0,013	0,017	0,022	0,023	0,021	0,024
4	1	0,007	0,008	0,011	0,015	0,019	0,024	0,025	0,030	0,033
4	2	0,009	0,009	0,010	0,010	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011
4	3	0,008	0,009	0,010	0,013	0,013	0,019	0,019	0,019	0,019
5	1	0,013	0,019	0,023	0,033	0,049	0,066	0,077	0,088	0,103
5	2	0,016	0,014	0,016	0,019	0,023	0,028	0,031	0,034	0,037
5	3	0,013	0,014	0,017	0,020	0,024	0,030	0,032	0,035	0,039
6	1	0,014	0,017	0,021	0,026	0,031	0,040	0,042	0,043	0,037
6	2	0,009	0,009	0,011	0,013	0,015	0,015	0,012	0,014	0,015
6	3	0,011	0,011	0,012	0,014	0,017	0,021	0,021	0,024	0,025
Peso Médio (g)		0,012	0,014	0,017	0,021	0,028	0,034	0,036	0,039	0,041
SE		0,001	0,001	0,001	0,002	0,004	0,005	0,005	0,006	0,006

**Anexo XX – Pesos (g) de *Ulva rigida* na avaliação do efeito do fotoperíodo (VS-10, 15°C e 16 h escuro/8 h luz)**

Caixa	Replicado	Tempo (dias)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
1	1	0,010	0,017	0,030	0,042	0,055	0,062	0,071	0,065	0,070
1	2	0,008	0,009	0,012	0,010	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
1	3	0,014	0,019	0,028	0,036	0,042	0,041	0,041	0,042	0,047
2	1	0,011	0,016	0,024	0,026	0,022	0,022	0,026	0,026	0,026
2	2	0,010	0,011	0,013	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,015
2	3	0,014	0,018	0,024	0,027	0,033	0,038	0,043	0,049	0,046
3	1	0,009	0,011	0,013	0,015	0,017	0,013	0,015	0,019	0,018
3	2	0,010	0,010	0,013	0,015	0,017	0,020	0,023	0,025	0,026
3	3	0,018	0,021	0,032	0,047	0,061	0,073	0,076	0,070	0,045
4	1	0,010	0,010	0,016	0,019	0,022	0,026	0,031	0,034	0,021
4	2	0,009	0,010	0,012	0,016	0,021	0,018	0,020	0,022	0,036
4	3	0,012	0,012	0,014	0,017	0,021	0,024	0,028	0,037	0,037
5	1	0,013	0,013	0,015	0,017	0,021	0,025	0,030	0,028	0,030
5	2	0,010	0,012	0,014	0,016	0,020	0,022	0,028	0,032	0,036
5	3	0,011	0,011	0,012	0,014	0,017	0,018	0,022	0,027	0,030
6	1	0,008	0,008	0,010	0,012	0,018	0,010	0,016	0,018	0,019
6	2	0,010	0,014	0,017	0,019	0,023	0,024	0,027	0,032	0,025
6	3	0,014	0,019	0,023	0,027	0,029	0,028	0,031	0,025	0,025
Peso Médio (g)		0,011	0,013	0,018	0,022	0,026	0,027	0,031	0,032	0,031
SE		0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,004	0,004	0,004	0,003