UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

HEITOR SPINELLI MONTENEGRO

INTERAÇÕES ENTRE MACROALGAS E O COPÉPODO EPIBENTÔNICO *TISBE BIMINIENSIS*: química ou arquitetura das algas?

Recife
2021

HEITOR SPINELLI MONTENEGRO

INTERAÇÕES ENTRE MACROALGAS E O COPÉPODO EPIBENTÔNICO *TISBE BIMINIENSIS*: química ou arquitetura das algas?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Oceanografia.

Área de concentração: Oceanografia Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Silva do Nascimento.

Recife

2021

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Sandra Maria Neri Santiago, CRB-4 / 1267

M777i Montenegro, Heitor Spinelli.
Interações entre macroalgas e o copépodo epibentônico *Tisbe Biminiensis*: química ou arquitetura das algas? / Heitor Spinelli Montenegro. – 2021.
45 f.: il., fig., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos.
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Silva do Nascimento.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Departamento de Oceanografia, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Oceanografia. 2. Macroalga. 3. Seletividade. 4. Crescimento populacional. 5. Ecotoxicologia. 6. Toxicidade. I. Santos, Lília Pereira de Souza (Orientadora). II. Nascimento, Márcia Silva do (Coorientadora). III. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.) BCTG/2021-216

HEITOR SPINELLI MONTENEGRO

INTERAÇÕES ENTRE MACROALGAS E O COPÉPODO EPIBENTÔNICO *TISBE BIMINIENSIS*: química ou arquitetura das algas?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Oceanografia. Área de concentração: Oceanografia Biológica.

Aprovada em: 25/02/2021.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Juliane Bernardi Vasconcelos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo-Castro (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

A minha família e meus amigos,

Ao meu pai (*in memoriam*),

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família que me ensinou todos os meus valores.

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu pai que sempre me ajudou quando eu precisei e neste momento me olha lá do céu.

À minha irmã que implica comigo, mas sempre me apoia.

À minha avó querida que sempre se preocupa comigo.

À minha tia Sandra que sempre me deu suporte.

A todos os meus amigos que fazem a minha vida mais leve.

Aos meus amigos do "Hadouken" que fizeram da minha graduação um momento incrível e que sem eles sem dúvida no teria tido tanta graça. Mesmo com o fim da graduação eles estão comigo e tenho certeza que sempre estarão.

Aos meus amigos da "Zueira mai finisce" que em Milão fizeram que o ano vivido longe de casa fosse o melhor da minha vida. Foram a minha família na Itália e continuam sendo até hoje.

Ao meu amigo Wander que foi meu companheiro de futebol, de balada, de viagem, de mercado, de academia e até de não fazer nada. Um irmão pra mim. Nem parece que mora em Fortaleza. Sei que posso contar com você sempre.

Aos meus amigos Thaísa, Gabi e Matheus que estão comigo desde o primeiro dia que nos conhecemos em Milão. São como um porto seguro. Sempre que estou com eles eu fico mais feliz.

Aos meus companheiros de laboratório que me deram suporte nas pesquisas e deixaram até os dias chatos legais. Um agradecimento especial para Beta e Jéssica que foram sensacionais comigo.

Às minhas amigas Roberta, Larissa e Bia que nem tenho palavras para descrever o quanto são incríveis. Vocês deram uma cara toda especial para esse mestrado.

A Cris que me orientou na graduação e tenho o prazer de ter como uma amiga até hoje.

À minha orientadora Lília que me aceitou no laboratório e me ajudou nesse difícil percurso.

À minha coorientadora Márcia que foi essencial para mim e para este trabalho.

Ao CNPq por ter concedido a minha bolsa de mestrado.

A Nykon, Souto e ao Laboratório de Bentos que deram suporte ao trabalho.

A toda equipe médica que me acompanha nessa jornada contra o câncer e que faz de tudo para que eu tenha o melhor tratamento e para que eu esteja sempre bem.

A todos que de forma direta e indireta ajudaram na realização deste trabalho.

A Deus que me permitiu chegar até aqui.

RESUMO

As macroalgas são conhecidas por seu papel estrutural no ecossistema e por produzir diversos compostos químicos bioativos. Entre os principais fatores estruturantes da fauna bentônica associada às macroalgas estão a arquitetura e a composição química das algas. Neste trabalho, o copépodo marinho *Tisbe biminiensis* foi utilizado para avaliar a toxicidade dos extratos de macroalgas de diferentes arquiteturas: as Rhodophyta *Palisada perforata* (arquitetura corticada) e *Gelidiella acerosa* (arquitetura corticada), a Ochrophyta *Padina gymnospora* (arquitetura foliosa corticada) e a Chlorophyta *Ulva fasciata* (arquitetura foliosa). O crescimento populacional e a seleção de habitat de copépodos também foram estudados na presença das mesmas macroalgas. Foi realizada uma avaliação fitoquímica para detecção qualitativa de esteróides, quinonas, flavonóides, taninos, sponinas e terponóides. Quinonas estiveram presentes em todos os extratos, enquanto fenóis, alcalóides e cumarinas não foram encontrados em nenhum deles. *G. acerosa* apresentou o maior número (6) de compostos, seguido por *P. gymnospora* (4), *P. perforata* (3) e *U. fasciata* (1). A CE50 para o desenvolvimento de náuplios variou do menor e mais tóxico ao maior e menos tóxico: *G. acerosa* (263 µg. mL-1), *P. gymnospora* (342 µg.mL-1), *U. fasciata* (380 µg.mL-1) e *P. perforata* (411 µg.mL-1). Os resultados toxicológicos tiveram boa relação com o número de compostos químicos observados. Houve preferência dos copépodos para *P. gymnospora* e *P. perforata*. O maior crescimento populacional de *T. biminiensis* em *P. perforata* seguido por *U. fasciata* corrobora os resultados de testes de seletividade e toxicológicos. *G. acerosa* apresentou os piores resultados nos testes de seletividade e crescimento populacional. Concluindo, a relação entre as macroalgas e copépodos foi influenciada tanto pela composição química quanto pela arquitetura das macroalgas.

Palavras-chave: macroalga; seletividade; crescimento populacional; ecotoxicologia; toxicidade.

ABSTRACT

Macroalgae are known for their role as ecosystem engineers and for producing diverse bioactive compounds. Among the main factors structuring the benthic fauna associated to macroalgae are algal architecture and chemical composition. In this work the marine copepod *Tisbe biminiensis* was used to assess the toxicity of the extracts of macroalgae of different architectures: the Rhodophyta *Palisada perforata* (corticated architecture) and *Gelidiella acerosa* (corticated architecture), the Ochrophyta *Padina gymnospora* (corticated foliose architecture) and the Chlorophyta *Ulva fasciata* (foliose architecture). The population growth and habitat preference of copepods were also studied in the presence of the same macroalgae. A phytochemical screening for the qualitative detection of steroids, quinones, flavonoids, tannins, sponins and terponoids was proceeded. Quinones were present in all extracts, while phenols, alkaloids and coumarins were not found in any of them. *G. acerosa* had the highest number (6) of compounds, followed by *P. gymnospora (4), P. perforata* (3) and *U. fasciata* (1). EC50 for the development of nauplii varied from the smallest and more toxic to the greater and less toxic as follow: *G. acerosa* (263 µg. mL^{-1}), *P. gymnospora* (342 µg.mL^{-1}), *U. fasciata* (380 µg.mL^{-1}) and *P. perforata* (411 µg.mL^{-1}). The toxicological results presented a good relationship with number of compounds. There was preference for *P. gymnospora* and *P. perforate.* The greater population growth of *T. biminiensis* in *P. perforata* followed by *U. fasciata*, supports the results of both selectivity and toxicological tests. *G. acerosa* had the worst results in the selectivity and population growth experiments. In conclusion, the relationship between macroalgae and copepod was affected by both macroalgal chemical composition and architecture.

Keywords: seaweed; selectivity; population growth; ecotoxicology; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Macroalgas estudadas. *Palisada perforata* (a), *Gelidiella acerosa* (b), *Padina gymnospora* (c), *Ulva fasciata* (d).	16
Figura 2 –	Localização do ponto de coleta das macroalgas na Praia de Enseada dos Corais, litoral sul do estado de Pernambuco.	19
Figura 3 –	Organograma das etapas de preparação dos extratos de macroalgas. Apenas o extrato polar foi utilizado nos bioensaios.	20
Figura 4 –	Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste 1 (a) e teste 2 (b) com o extrato da macroalga *Gelidiella acerosa* (GL).	28
Figura 5 –	Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste 1 (a) e teste 2 (b) com o extrato da macroalga *Ulva fasciata* (UL).	29
Figura 6 –	Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste com o extrato da macroalga *Padina gymnospora* (PD).	30
Figura 7 –	Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste com o extrato da macroalga *Palisada perforata* (PL).	31
Figura 8 –	Número (média ± desvio padrão) de náuplios associados às macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As linhas tracejadas indicam o número esperado de nauplios em cada arena se não houver preferência de habitat.	32
Figura 9 –	Número (média ± desvio padrão) de copepoditos associados às macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As linhas tracejadas indicam o número esperado de copepoditos em cada arena se não houver preferência de habitat.	34
Figura 10 –	Número (média ± desvio padrão) de náuplios, copepoditos, fêmeas ovígeras e organismos totais de *Tisbe biminiensis* ao final dos testes de crescimento com as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina*	36

gymnospora, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As letras indicam os resultados do teste de Tukey.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos utilizados para identificar a presença ou ausência dos compostos. 21

Tabela 2 – Peso final em gramas dos extratos preparados com diclorometano (DM) e metanol(M) e dos extratos preparados com Etanol (E), rendimento de cada processo de extração (%DM+M e %E) e peso seco das macroalgas *Ulva fasciata*, *Gelidiella ascerosa*, *Palisada perforata* e *Padina gymnospora*. 26

Tabela 3 – Resultados dos screening fitoquímico nas algas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. 27

Tabela 4 – Concentração do efeito não observado (CENO), concentração do efeito observado (CEO) e a concentração efetiva que causa 50% no atraso do desenvolvimento do copépodo (CE50) ($\mu g.mL^{-1}$) obtidos em cada teste para cada um dos extratos de *Ulva fasciata, Gelidiella ascerosa, Palisada perforata* e *Padina gymnospora*. 28

Tabela 5 – Resultado dos testes de X^2 comparando as médias dos números de náuplios associados as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa* na Arena 1 e 2. 33

Tabela 6 – Resultado dos testes de X^2 comparando as médias dos números de copepoditos associados as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa* na Arena 1e 2. 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CE50	Concentração de efeito a 50%
CENO	Concentração de efeito não observável
CEO	Concentração de efeito observável
CL50	Concentraçao letal a 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM	Diclorometano
M	Metanol
E	Etanol
GL	*Gelidiella acerosa*
PD	*Padina gymnospora*
PL	*Palisada perforata*
UL	*Ulva fasciata*

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**14**
2	**OBJETIVOS**	**18**
2.1	**Objetivo geral**	**18**
2.2	**Objetivos específicos**	**18**
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	**19**
3.1	**Preparação de extrato de algas marinhas**	**19**
3.2	**Screening fitoquímico**	**21**
3.3	**Testes ecotoxicológicos**	**22**
3.4	**Experimentos de preferência de habitat**	**23**
3.5	**Experimentos de crescimento populacional**	**24**
3.6	**Análises estatística**	**24**
4	**RESULTADOS**	**26**
4.1	**Rendimento das extrações**	**26**
4.2	**Screening fitoquímico**	**26**
4.3	**Testes ecotoxicológicos**	**27**
4.3.1	*Gelidiella acerosa*	27
4.3.2	*Ulva fasciata*	28
4.3.3	*Padina gymnospora*	29
4.3.4	*Palisada perforata*	30
4.4	**Preferência de habitat**	**31**
4.4.1	Preferência dos náuplios	31
4.4.2	Preferência dos copepoditos	33
4.5	**Crescimento populacional**	**35**
5	**DISCUSSÃO**	**37**
6	**CONCLUSÃO**	**40**
	REFERÊNCIAS	**41**

1 INTRODUÇÃO

Macroalgas são organismos aquáticos multicelulares que realizam a fotossíntese (CESARIO et al., 2018). As macroalgas marinhas são uma parte importante dos recursos oceânicos e são representadas por mais de 10.000 espécies em todo o mundo (BELGHIT, 2017). Estas se distribuem em áreas costeiras ocupando a zona de médio e sublitoral, assentando em substratos consolidados (HAMED et al., 2018). Elas têm muitos papéis importantes nos ecossistemas marinhos: ser a base das teias tróficas aquáticas, diminuir a hidrodinâmica local, aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido e gerar substratos para animais e plantas (CORTE et al., 2012).

A arquitetura do habitat indica atributos físicos como número, tamanho, forma e disposição dos espaços que são importantes para os organismos viverem em um determinado ambiente (HACKER & STENECK, 1990). A complexidade estrutural das macrófitas é um fator físico importante na estruturação das comunidades bentônicas marinhas (CHEMELLO & MILAZZO, 2002; HAUSER et al., 2006). Pode gerar estímulos comportamentais para alguns invertebrados, bem como predação, proteção e outros fatores (HANSEN et al., 2011). A complexidade da arquitetura das macroalgas influencia a composição taxonômica, abundância, riqueza e diversidade das espécies associadas (GAN et al., 2019; DUARTE et al., 2020). A maior complexidade estrutural da macroalga permite maior proteção aos organismos que a utilizam como habitat (CHEMELLO & MILAZZO, 2002). A forma do talo das macroalgas define o microambiente disponível para colonização e, consequentemente, influencia a abundância da fauna, e macroalgas mais ramificadas tendem a ter uma maior densidade de organismos associados (DUBIASKI-SILVA & MASUNARI, 1995).

A presença de epífitas em macroalgas também é importante para a complexidade dos habitats e influencia positivamente a epifauna (MARTIN-SMITH, 1993). As algas epífitas e sua microflora podem ser uma importante fonte de alimento para diversos animais e aumentar a complexidade dos microhabitats (JOHNSON & SCHEIBLING, 1987). Além da composição da comunidade epifítica presente nas macroalgas e da morfologia das espécies, os componentes químicos das algas serão decisivos para a escolha e associação da epifauna (CUNHA et al., 2013).

As macroalgas são classificadas em verdes (Chlorophyta), marrons (Ochrophyta) e vermelhas (Rhodophyta), com base principalmente na presença ou ausência de pigmentos (WIJESINGHE & JEON, 2012; HAMED et al., 2018). Há uma grande diferença bioquímica

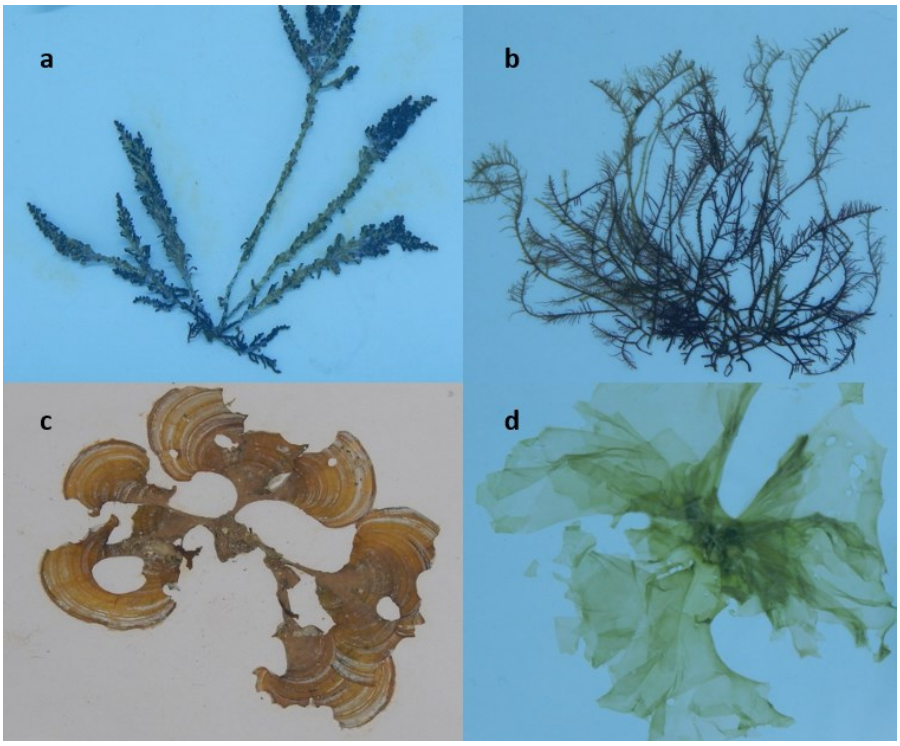
entre algas marrons, verdes e vermelhas em termos de seus metabólitos secundários (BELGHIT et al., 2017) possuindo um amplo espectro de bioatividades (WIJESINGHE & JEON, 2012; YU et al., 2015; TANNA et al., 2018). Já foram descritos mais de 3 mil compostos químicos de macroalgas marinhas. Muitos dos componentes estudados estão relacionados à identificação de lipídios e seus derivados e a metabólitos secundários relacionados à defesa do organismo (BELGHIT et al., 2017). As macroalgas estão frequentemente expostas a diversas ameaças naturais, como patógenos, herbívoros, competição, epífitas e estresse físico. Para enfrentar essas ameaças, eles produzem metabólitos secundários para defesa química (KUMAR et al., 2016). Essa defesa pode ter vários efeitos, desde um gosto ruim até uma toxicidade (LARA-ISSASI et al. 2000).

Nas últimas décadas vem aumentando o interesse pelas algas marinhas como fonte de compostos naturais com bioatividades (SURGET et al., 2017) e o papel das macroalgas na estruturação de comunidades costeiras (CHEMELLO & MILAZZO, 2002; AMSLER et al., 2014). Andrade et al. (2013) identificaram os componentes de extratos de 18 espécies de macroalgas encontradas na costa de Portugal. Surget et al. (2017) descreveram algumas macroalgas verdes como fonte de compostos naturais com atividades mineralogênicas e antioxidantes. Maric et al. (2017) analisaram o efeito do principal metabólito secundário da macroalga *Caulerpa taxifolia* no zebrafish *Danio rerio*. O zebrafish também foi usado por Kang et al. (2014) para identificar o efeito do metabólito secundário da macroalga *Ecklonia cava* na indução do estresse oxidativo. Através de testes de letalidade com *Artemia salina,* Lhullier et al. (2006) investigaram extratos de 19 espécies de macroalgas amostradas no Estado de Santa Catarina (Brasil). No litoral de Pernambuco, Vasconcelos et al. (2018) identificaram 43 espécies de macroalgas em recifes de arenito, e delas algumas tiveram sua atividade microbiana avaliada: *Jania adhaerens*, *Caulerpa racemosa*, *Padina gymnospora*, *Sargassum polyceratium* e *Ulva lactuca* (ALVES et al., 2016).

Neste estudo quatro macroalgas com diferentes arquiteturas foram selecionadas por sua abundância e perenidade na área de estudo: as algas vermelhas (Rhodophyta) *Palisada perforata* (arquitetura corticada) e *Gelidiella acerosa* (arquitetura corticada), a alga marrom (Ochrophyta) *Padina gymnospora* (corticada arquitetura foliosa) e a alga verde (Chlorophyta) *Ulva fasciata* (arquitetura foliosa). *P. perforata* é cosmopolita em áreas tropicais e subtropicais (TASKIN & SUKATAR, 2013; VASCONCELOS et al., 2018). É considerada a espécie mais comum nos Estados de Pernambuco e Paraíba, ocupando a região superior da zona entremarés dos recifes de arenito (FARIAS, 2015). Uma das características da espécie é

o tipo de crescimento em tufos densos com eixos arqueados e destacados e ramificações (SENTIES et al., 2009). O seu talo é parcialmente ereto e fixo no substrato por um apressório discóide e apresenta coloração marrom a esverdeada (FARIAS, 2015) (Fig.1a). *G. acerosa* é amplamente utilizada na produção de ágar (GANESAN, 2011; SUGANTHY et al., 2013; PRASAD et al., 2007) e seus extratos têm atividade antioxidante (SUGANTHY, et al., 2013) (Fig.1 b). *P. gymnospora* é conhecida por produzir metabolismos secundários importantes com função antimicrobiana (BALIANO, 2016; CHANDER et al., 2014; ROSALINE et al., 2007) e antifúngica (ABIRAMI & KOWSALYA, 2012) (Fig.1 c). O gênero *Ulva* possui talo simples e superfícies laminares planas, são algas perenes e possuem baixa capacidade de defesa contra herbívoros (CORTE et al., 2012), mas possuem como característica uma grande quantidade de polissacarídeos na parede celular (LAHAYE & RAY, 1995). Os extratos de *U. fasciata* já apresentaram efeitos antimicrobianos e larvicidas (SELVIN & LIPTIPON, 2004), antibacterianos (SILVA et al., 2013) e antifúngicos (ABIRAMI & KOWSALYA, 2012) (Fig.1.d).

Figura 1 - Macroalgas estudadas. *Palisada perforata* (a), *Gelidiella acerosa* (b), *Padina gymnospora* (c), *Ulva fasciata* (d).



Fonte: Nykon Craveiro (2020).

O copépodo marinho harpactacóide *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco 1973 foi selecionado para este estudo. Ele possui hábitos epibentônicos e é comumente encontrado associado a macroalgas (VOLKMANN-ROCCO, 1973), além de ser criado em laboratório desde 1998 (SOUZA-SANTOS et al., 2006) e utilizado em testes ecotoxicológicos (ARAUJO-CASTRO et al., 2009; LAVORANTE et al., 2013; COSTA, et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; MACIEL et al., 2015; REGIS et al. 2018). Segundo Souza et al. (2012) é importante para a ecotoxicologia marinha que se encontrem organismos apropriados para testes ecotoxicológicos e alguns copépodos bentônicos harpactacóides possuem características interessantes para avaliação de toxicidade de sedimento e de água. *T. biminiensis,* além de possuir tais características, ainda apresenta pequeno tamanho, curto ciclo de vida e alta taxa de fecundidade, contribuindo significativamente para o uso dessa espécie em ensaios ecotoxicológicos (ARAÚJO-CASTRO, 2008). A utilização de náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis* nos testes ecotoxicológicos é feita por trazer ainda mais praticidade, facilidade, diminuição de custo e tempo mantendo bons resultados letais e subletais. Os náuplios são mais sensíveis que os adultos da mesma espécie e possuem dados de sensibilidade semelhantes quando comparados à outras espécies de copépodos (LAVORANTE *et al.*, 2013).

O presente estudo investigou toxicidade dos extratos, a seletividade e o crescimento populacional de *T. biminiensi* em relação a quatro macroalgas de diferentes arquiteturas e composições químicas. O objetivo deste estudo foi identificar o efeito de metabólitos secundários e da arquitetura de macroalgas em um organismo representativo da meiofauna marinha epibentônica.

2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos que serviram como norteadores para o desenvolvimento de todo o trabalho.

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos das macroalgas *Padina gymnospora*, *Palisada perforata*, *Ulva fasciata* e *Gelidiella acerosa* e de seus extratos em copépodos *Tisbe biminiensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração efetiva dos extratos das macroalgas *Padina gymnospora*, *Palisada perforata*, *Ulva fasciata* e *Gelidiella acerosa* que causa 50% efeito (CE50) no desenvolvimento dos náuplios de *Tisbe biminiensis*.
- Determinar a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) dos extratos das macroalgas *P. gymnospora*, *P. perforata*, *U. fasciata* e *G. acerosa* no desenvolvimento dos náuplios de *Tisbe biminiensis*.
- Comparar o crescimento populacional de organismos de *Tisbe biminiensis* associados as macroalgas *P. gymnospora*, *P. perforata*, *U. fasciata* e *G. acerosa.*
- Analisar a preferência de habitat de organismos de *Tisbe biminiensis* em relação as macroalgas *P. gymnospora*, *P. perforata*, *U. fasciata* e *G. acerosa.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As macroalgas *Padina gymnospora*, *Palisada perforata*, *Ulva fasciata* e *Gelidiella acerosa* foram coletadas na Praia da Enseada dos Corais, localizada no município de Cabo de Santo Agostinho (8°19'10,2" S 34°56'53,3" W) (Figura 2). As amostras das macroalgas foram coletadas manualmente na zona intertidal durante a maré baixa e armazenadas em sacos plásticos com água do mar durante o transporte para o laboratório. Uma parte do material coletado foi processada para obtenção dos extratos utilizados em testes ecotoxicológicos com náuplios de *Tisbe biminiensis* e a outra parte foi utilizada nos testes de crescimento populacional e preferência de habitat de copépodos de *T. biminiensis*. Para simplificar o texto, as espécies de macroalgas serão indicadas aqui apenas por seus nomes genéricos.

Figura 2 - Localização do ponto de coleta das macroalgas na Praia de Enseada dos Corais, litoral sul do estado de Pernambuco.

Fonte: Google Earth/Beatriz Santos (2020)

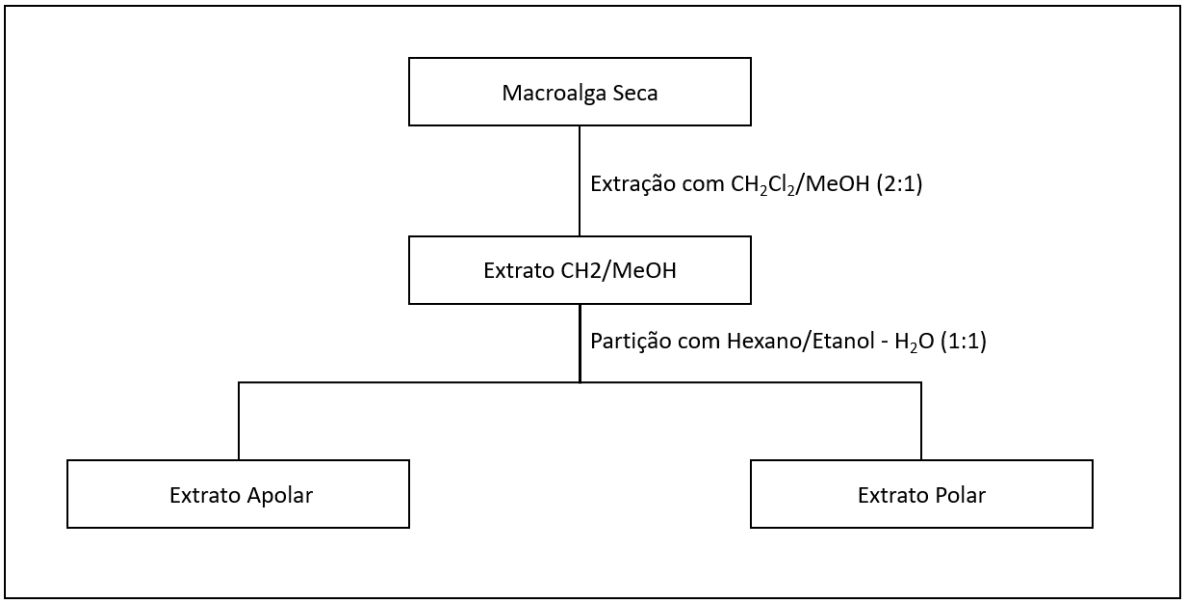
3.1 Preparação de extrato de algas marinhas

As algas coletadas foram lavadas em água corrente até a remoção do sal e, posteriormente, secas à temperatura ambiente por 5 dias. Para a preparação dos extratos, foi

utilizada uma solução de diclorometano e metanol (2: 1) por 72 horas. Após a extração, o solvente foi filtrado e evaporado a vácuo para produzir os extratos orgânicos brutos, que foram então pesados.

Após a extração inicial, as substâncias polares e apolares do extrato foram separadas de uma mistura bifásica de hexano e etanol (1: 1). Neste processo o extrato obtido anteriormente foi adicionado à mistura de hexano e etanol e agitado fortemente manualmente de forma que as substâncias polares se dissolvessem no etanol e as substâncias apolares dissolvidas no hexano. A fase etanólica da mistura foi separada em um funil de separação e evaporada a vácuo para a obtenção dos extratos utilizados nos testes ecotoxicológicos (Figura 3). O extrato com hexano também foi seco à temperatura ambiente para a obtenção de extratos com substâncias apolares e não foi utilizado nos testes. Os extratos brutos foram pesados. Os rendimentos de extração (porcentagem do peso seco do material de partida) foram obtidos para cada macroalga. O rendimento do processo foi calculado de acordo com a porcentagem de extrato produzido em relação ao peso seco das macroalgas.

Figura 3 - Organograma das etapas de preparação dos extratos de macroalgas. Apenas o extrato polar foi utilizado nos bioensaios.



Fonte: O Autor (2021).

3.2 Screening fitoquímico

Foi realizado o screening fitoquímico (SF), testes cromáticos e / ou de precipitação nos extratos brutos de cada macroalga. A detecção qualitativa de esteróides, quinonas, flavonóides, taninos, sponinas e terponóides foi realizada utilizando os métodos propostos por Harborne & Harborne (1998), Gul et al. (2017) e Kumari et al. (2017) descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos utilizados para identificar a presença ou ausência dos compostos.

	Métodos
Alcaloides	Teste de *Hager*. Alguns mL do extrato filtrado + 1-2 mL de reagentes de *Hager*. Um precipitado branco cremoso indica presença.
Flavonoides	Teste de acetato de chumbo. 1mL de extrato vegetal + algumas gotas de solução de acetato de chumbo a 10%. Precipitado amarelo indica presença.
Fenóis	Teste de iodo. 1mL de extrato + algumas gotas de solução de iodo. A coloração transitória vermelha indica presença.
Taninos	Teste de NaOH a 10%. 0,4mL de extrato + 4mL de NaOH 10% + agitação. A formação de emulsão indica presença.
Saponinas	Teste de espuma. 0,5 g de extrato + 2mL de água + agitação vigorosa. Espuma persistente por 10 minutos indica presença.
Terpenóides	2ml de extrato + 2ml de ácido acético anidrido + concentração de H_2SO_4. Solução verde azulada indica presença.
Quinonas	1mL de extrato + alguns mL de hidróxido de potássio alcoólico. Coloração vermelha para azul indica presença.
Cumarinas	Teste de NaOH. Extrato + 10% NaOH + clorofórmio. Coloração amarela indica presença.
Esteróides	Extrato + 2 mL de clorofórmio + H_2SO_4 concentrado. Coloração vermelha indica presença.

Fonte: Harborne & Harborne (1998), Gul et al. (2017) e Kumari et al. (2017)

3.3 Testes ecotoxicológicos

A metodologia do teste ecotoxicológico com náuplios de *T.biminiensis* foi desenvolvida por Lavorante et al. (2013). Os copépodos foram cultivados em água do mar filtrada com salinidade 35, temperatura de 28 ° C e fotoperíodo natural e alimentados com diatomáceas *Chaetoceros muelleri* cultivadas em meio f/2 de Guillard e ração. No dia anterior ao experimento, os copépodos adultos foram separados das caixas de cultivo (4L) por uma peneira de 250 µm de malha. Estes foram então introduzidos em um sistema de separação de prole, onde copépodos adultos ficavam retidos em uma peneira de 120 µm e os náuplios ao eclodirem procuravam o alimento que estava sedimentado no fundo do sistema. Antes do início do teste, os adultos foram separados e os náuplios concentrados em peneira de 64 µm. Para estimar o número de náuplios transferidos para o teste, três alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e contadas em estereomicroscópio. Aproximadamente duzentos náuplios foram usados em cada amostra de teste sendo transferidos com uma pipeta automática.

Inicialmente, a maior concentração testada foi preparada pesando os extratos polares em balança analítica e dissolvendo em água do mar filtrada com salinidade 35. Foi necessário utilizar o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,6% e sonicador por um mínimo de 5 minutos para dissolver o extrato e formar uma solução homogênea. A partir da primeira solução de extrato foram feitas diluições seriadas com balões volumétricos. Foram utilizadas as concentrações de 700, 420, 252, 151 e 90,6 $\mu g.mL^{-1}$. Em um dos testes realizados com a macroalga *Gelidiella* foram utilizadas as concentrações de 685, 342,5, 171,25 e 85,625 $\mu g.mL^{-1}$. A microalga *Chaetoceros muelleri* foi adicionada como alimento para os náuplios na concentração de $2,5x10^5$ células / mL em cada concentração do extrato, tentando alterar suas concentrações o mínimo possível. Dois grupos de controle foram usados, um com 0,6% de DMSO e o outro sem o solvente. Paralelamente, foi realizado teste de referência com sulfato de zinco pentahidratado.

Os bioensaios foram realizados em incubadora com temperatura controlada (28 ° C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). O *endpoint* do teste foi o desenvolvimento de náuplios de *T. biminiensis* após 72 horas. O desenvolvimento foi baseado na passagem do estágio naupliar para o de copepodito, estimado a partir da relação entre os copepoditos corados (rosa de bengala) no final do teste e o número de animais no início do teste. Os testes foram realizados em recipientes de vidro com 25 mL da solução teste e cada concentração de extrato teve 4 réplicas. Menos de 1mL do concentrado de náuplios foi adicionado aos recipientes.

Para estimar o número inicial de náuplios usados no teste, pelo menos 5 alíquotas dos concentrados de náuplios foram coletadas, fixadas, coradas e contadas. No início e no final de cada teste, o pH e o oxigênio dissolvido foram medidos em uma das amostras de cada tratamento. Para finalizar o teste, as amostras foram fixadas em formol a 4% e coradas com corante rosa de bengala. Foi mantida uma espera mínima de 72h para a contagem dos indivíduos, os náuplios ou copepoditos corados em vermelho foram considerados vivos ao final do experimento, enquanto os descoloridos foram considerados já mortos.

3.4 Experimentos de preferência de habitat

Os experimentos de preferência de habitat foram realizados em 2 arenas (32 cm de largura, 47 cm de comprimento e 14,5 cm de altura - 20 L). Em cada arena, 18 recipientes de vidro com capacidade de 60 mL foram dispostos aleatoriamente, 4 réplicas de cada uma das macroalgas testadas e 2 potes vazios (controles). Em cada recipiente foram adicionados 0,7 g de macroalgas frescas. Cada arena foi preenchida com 10L de água do mar filtrada (salinidade 35), o suficiente para que os potes de vidros ficassem submersos e permitisse a escolha de habitat dos copépodos durante o teste.

Para iniciar o teste, uma das caixas de cultivo de *T. biminiensis* (4 L) foi passada por uma peneira de 64µm para reter todos os organismos presentes. Esses organismos foram colocados em um béquer com 500mL de água do mar filtrada com salinidade 35. Com a ajuda de um bastão de vidro, o conteúdo do copo foi agitado aleatoriamente e metade do conteúdo foi colocado em cada uma das arenas. O experimento teve duração de 24 horas e foi mantido à temperatura de 28°C no escuro, para evitar o efeito da luz no comportamento dos animais. Após 24 horas, os postes de vidro foram fechados com cuidado para que os copépodos no interior não escapassem. Todo o conteúdo dos recipientes foi fixado em formaldeído 4% e corado com rosa bengala. Após 72 horas, o material foi contado em estereomicroscópio e os organismos classificados como náuplios e copepoditos (fases juvenis e adultas consideradas juntas).

3.5 Experimentos de crescimento populacional

Pequenas culturas de *T. biminiensis* foram realizadas para avaliar o crescimento populacional na presença das quatro espécies de macroalgas. Todas as culturas começaram com 10 fêmeas e foram realizadas em recipientes de 1,8 L (20 cm de largura, 26 cm de comprimento e 5 cm de altura). Três réplicas foram usadas para cada macroalga e 10g delas foram adicionados a cada recipiente em 800 mL de água do mar filtrada com salinidade 35. As culturas foram realizadas a 28 ° C e fotoperíodo e iluminação natural. Os copépodos alimentaram-se com 100 mg de ração para larva de peixes produzidas pela INVE Aquaculture (https://www.inveaquaculture.com/) e 80 mL de suspensão da microalga *Chaetoceros muelleri*. Os recipientes eram mantidos tampados e com aeração e a cada dia eram verificadas a salinidade e a temperatura da água dos recipientes e, quando necessário, esses parâmetros eram corrigidos. A cada 7 dias a água do mar era trocada com o uso de uma peneira de 64 μm. Após 30 dias, o teste foi encerrado e todos os organismos foram fixados com formaldeído a 4% e corados com rosa de bengala. Devido ao grande número de organismos, foi necessário fazer subamostras. Cada amostra foi colocada em um béquer, preenchido até 500ml e homogeneizado. Cinco subamostras de 10ml foram removidas e os organismos contados em estereomicroscópio. O número médio de organismos obtidos foi usado para estimar o número total de animais no recipiente. Os copépodos foram classificados em náuplios, copepoditos (jovens e adultos) e fêmeas ovígeras.

3.6 Análise estatística

A concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos (EC50) foi através regressões após a transformação PROBIT. A concentração do efeito observado (CEO) e a concentração do efeito não observado (CENO) foram obtidas usando ANOVA unifatorial seguida pelo teste de Dunnett (para comparações entre tratamentos e controle). O teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn foram realizados quando os parâmetros normalidade e homocedacidade não foram atingidos.

Nos experimentos de preferência, o teste do Qui-quadrado foi usado para comparações entre macroalgas, considerando todas as espécies juntas e aos pares, e para náuplios e copepoditos separadamente. O número esperado de animais foi estimado dividindo o número

total de animais que entraram nos recipientes com algas pelo número de recipientes com algas, ou seja, considerando um distribuição homogênea de animais entra as algas.

Para os experimentos de crescimento populacional, ANOVA unifatorial e teste posterior de Tukey foram usados. A normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade de variâncias (teste de Levene) foram sempre testadas e, quando os parâmetros não foram alcançados, o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn foram realizados. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos durante a realização dos experimentos, a começar com o rendimento obtido durante a extração realizada com as macroalgas e as famílias de compostos químicos encontradas em seus extratos. Também serão apresentados os resultados dos testes ecotoxicológicos realizados com os náuplios de *Tisbe biminiensis*, os resultados do teste de preferência de habitat, assim como os resultados obtidos com o teste de crescimento populacional.

4.1 Rendimento das extrações

Os pesos dos extratos polares e apolares e os rendimentos da extração com diclorometano e metanol e com etanol em relação ao peso seco das macroalgas estudadas estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Peso final em gramas dos extratos preparados com diclorometano (DM) e metanol(M) e dos extratos preparados com Etanol (E), rendimento de cada processo de extração (%DM+M e %E) e peso seco das macroalgas *Ulva fasciata*, *Gelidiella ascerosa*, *Palisada perforata* e *Padina gymnospora*.

	Peso Seco	**DM+ M**	**E**	**%DM + M**	**%E**
Ulva fasciata	140,5	1,2326	1,0505	0,8773	0,7477
Gelidiella acerosa	90,6	5,4955	1,079	6,0657	1,191
Palisada perforata	262,8	5,9903	4,9896	2,2794	1,8986
Padina gymnospora	157,4	4,3416	4,2152	2,4752	0,6928

Fonte: O Autor (2021).

4.2 Screening fitoquímico

Foram encontrados esteróides, quinonas, flavonóides, taninos, sponinas e terponóides. Quinonas estiveram presentes em todos os extratos, enquanto fenóis, alcalóides e cumarinas não foram encontrados em nenhum deles. *Gelidiella* apresentou o maior número (6) de compostos, seguida por *Padina* (4), *Palisada* (3) e *Ulva* (1) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados dos screening fitoquímico nas algas *Ulva fasciata, Padina gymnospora, Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa.*

	Ulva fasciata	*Padina gymnospora*	*Palisada perforata*	*Gelidiella acerosa*
Cumarinas	-	-	-	-
Esteróides	-	+	+	+
Quinonas	+	+	+	+
Fenóis	-	-	-	-
Flavanoides	-	-	-	+
Taninos	-	-	-	+
Saponinas	-	+	-	+
Terpenoides	-	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-

(-) ausência; (+) presença.

Fonte: O Autor (2021).

4.3 Testes ecotoxicológicos

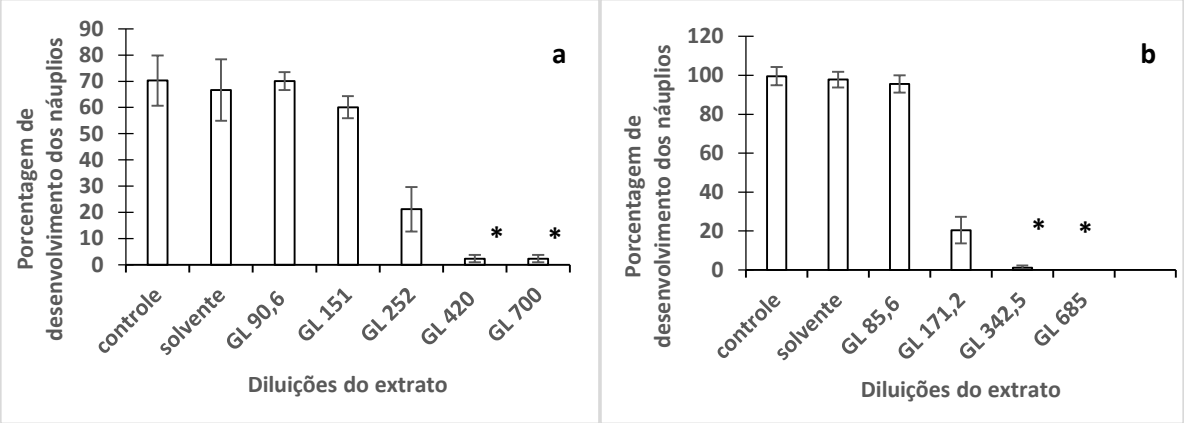
Resultados obtidos após a realização dos ensaios ecotoxicológicos com os náuplios de *Tisbe biminiensis* expostos aos extratos das macroalgas *Gelidiella acerosa*, *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora* e *Palisada perforata*.

4.3.1 *Gelidiella acerosa*

Analisando o desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* após a exposição ao extrato de *Gelidiella* no teste 1, uma redução significativa (Kruskal-Wallis H = 27,163; P = <0,001 e Dunn p <0,05) foi observada no desenvolvimento de náuplios entre o grupo controle e o concentrações de 420 e 700 $\mu g.mL^{-1}$. O desenvolvimento nos grupos controle com solvente e concentrações de 90,6, 151 e 252 $\mu g.mL^{-1}$ não foi significativamente diferente do grupo controle (Figura 4a). No teste 2, diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas (Kruskal-Wallis H: 20,36; p: <0,001). Comparando o grupo controle com outros tratamentos, apenas as duas maiores concentrações de 342,5 e 685 $\mu g.mL^{-1}$ (Dunn p: <0,05)

reduziram significativamente o crescimento dos náuplios (Figura 4b). O CENO, o CEO e a CE50 para ambos os teste são mostrados na Tabela 4. A CE50 no teste 1 foi 297 ± 52 $\mu g.mL^{-1}$ e 230 ± 110 $\mu g.mL^{-1}$ no teste 2. A CE50 média para o teste 1 e 2 foi 263 $\mu g.mL^{-1}$ com um desvio padrão de 48.

Figura 4 - Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste 1 (a) e teste 2 (b) com o extrato da macroalga *Gelidiella acerosa* (GL).



Fonte: O Autor (2021).

Tabela 4 - Concentração do efeito não observado (CENO), concentração do efeito observado (CEO) e a concentração efetiva que causa 50% no atraso do desenvolvimento do copépodo (CE50) ($\mu g.mL^{-1}$) obtidos em cada teste para cada um dos extratos de *Ulva fasciata, Gelidiella ascerosa, Palisada perforata* e *Padina gymnospora.*

	Ulva **Teste 1**	***Ulva*** **Teste 2**	***Gelidiella*** **Teste 1**	***Gelidiella*** **Teste 2**	***Padina***	***Palisada***
CENO	252	252	252	171	252	252
CEO	420	420	420	342	420	420
CE50	380 ± 54	419 ± 51	297 ± 51	230 ± 110	342 ± 82	411 ± 63

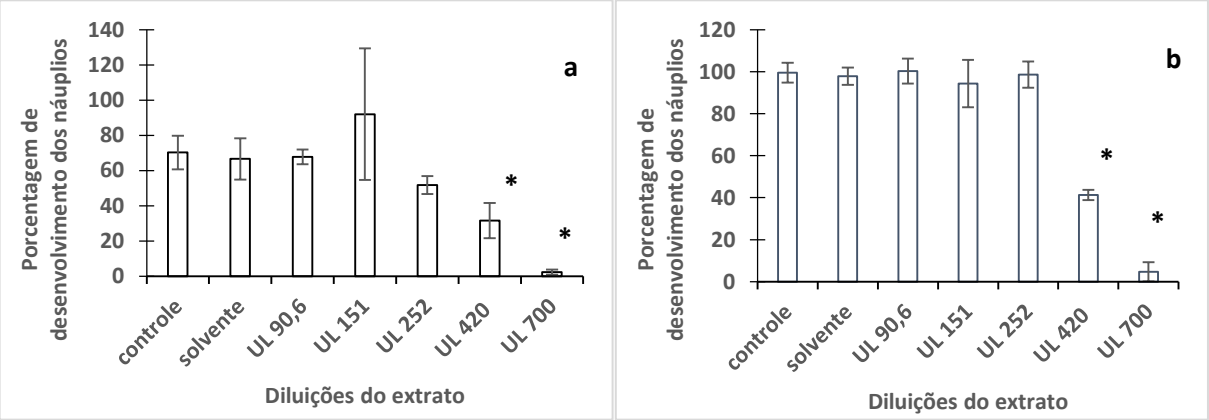
Fonte: O Autor (2021).

4.3.2 *Ulva fasciata*

O desenvolvimento de náuplios no teste 1 para o extrato de *Ulva* (Figura 5a) variou significativamente entre os tratamentos (Kruskal-Wallis H: 23,44, p: <0,001). Diferença

significativa foi observada entre o grupo controle e as concentrações de 420 e 700 µg.mL^{-1} (Dunn p: <0,05). Não houve diferenças significativas entre o grupo controle e outros tratamentos. No teste 2, diferenças significativas foram observadas entre o grupo controle e as duas maiores concentrações (420 e 720 µg.mL^{-1} - ANOVA F: 134,94, p <0,01 e p de Dunnett: <0,05). Não houve diferenças significativas entre o grupo controle e outros tratamentos. O CENO, o CEO e a CE50 do extrato de *Ulva* para ambos os testes estão na Tabela 4. A CE50 no teste 1 foi de 342 ± 82 µg.mL^{-1} e 419 ± 51 µg.mL^{-1} no teste 2. A CE50 média obtido entre os dois testes foi de 380 µg.mL^{-1} com desvio padrão de 54.

Figura 5 - Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste 1 (a) e teste 2 (b) com o extrato da macroalga *Ulva fasciata* (UL).

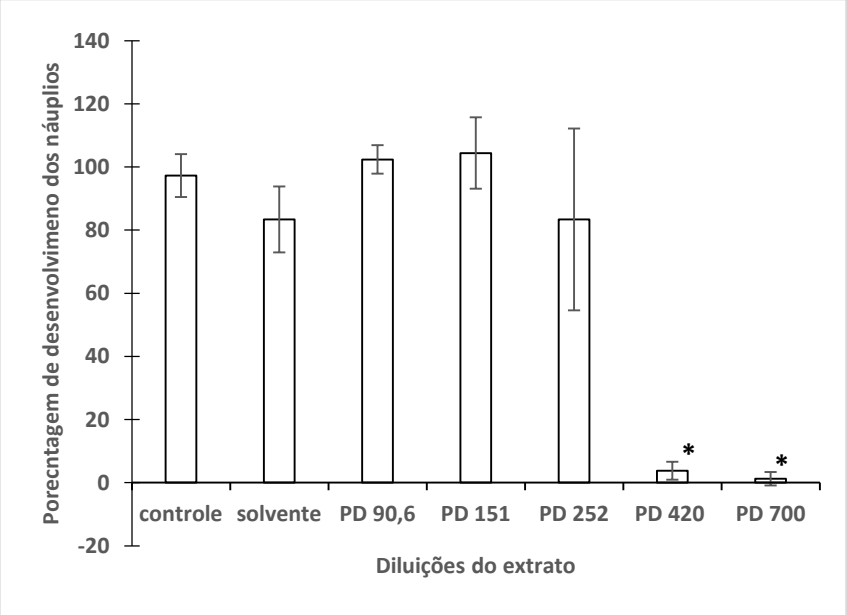


Fonte: O Autor (2021).

4.3.3 *Padina Gymnospora*

No teste 3 realizado com o extrato de *Padina*, houve diferença significativa (Kruskal-Wallis H = 22,923; P = <0,001 e Dunn p <0,05) no desenvolvimento dos náuplios entre o grupo controle e nas concentrações de 420 e 700 µg.mL^{-1}. O grupo testado com o solvente e com as concentrações de 90,6, 151 e 252 µg.mL^{-1} de extrato não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 6). O CENO, o CEO e a CE50 da *Padina* para este teste são apresentados na Tabela 4. A CE50 do teste realizado com *Padina* foi de 342 ± 82 µg.mL-1.

Figura 6 - Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste com o extrato da macroalga *Padina gymnospora* (PD).

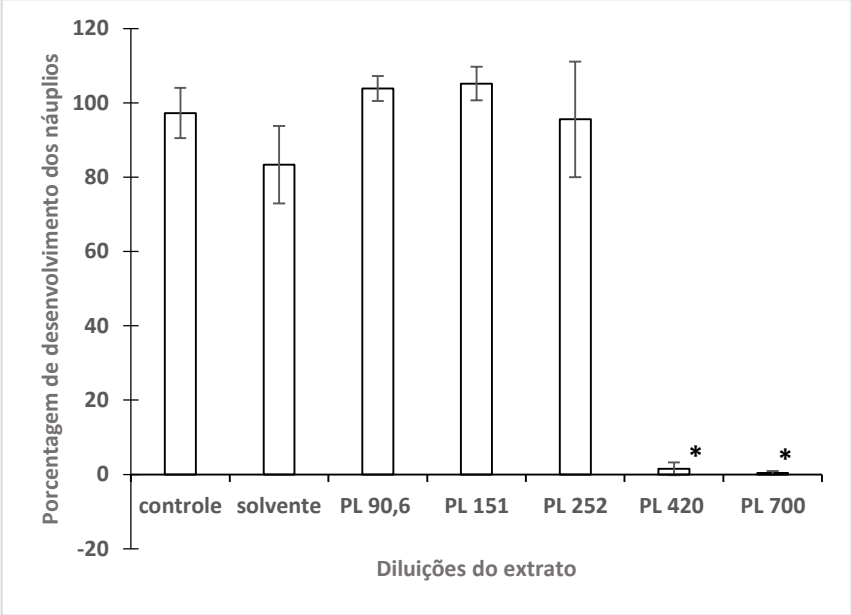


Fonte: O Autor (2021).

4.3.4 *Palisada perforata*

Analisando o desenvolvimento de náuplios após a exposição ao extrato de *Palisada*, uma diferença significativa foi observada entre os tratamentos (Kruskal-Wallis H = 23,635; P = 0,001). Comparando o grupo controle aos demais tratamentos, observou-se diferença apenas com as duas maiores concentrações do extrato, 420 e 700 µg.mL^{-1} (Dunn p <0,05) (Figura 7). O CENO,o CEO e a CE50 para este teste foram calculados (Tabela 4). O valor da CE50 da *Palisada* foi 411 ± 63 µg.mL^{-1}.

Figura 7 - Porcentagem (média e desvio padrão) de desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* no teste com o extrato da macroalga *Palisada perforata* (PL).



Fonte: O Autor (2021).

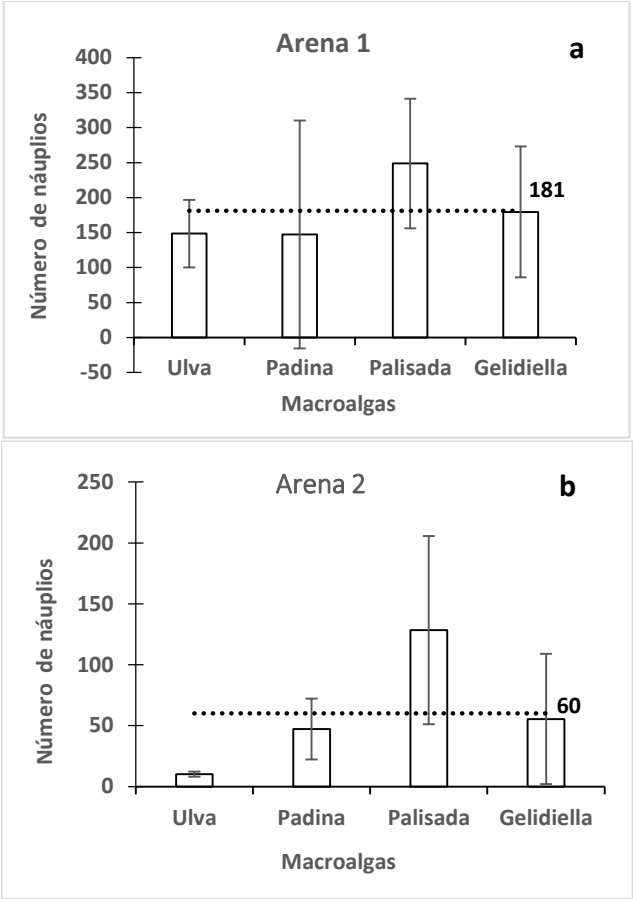
4.4 Preferência de habitat

Resultados do teste de preferência de habitat realizado com *Tisbe biminiensis* na presença das macroalgas *Gelidiella acerosa*, *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora* e *Palisada perforata*.

4.4.1 Preferência dos náuplios

Na arena 1, o número médio de náuplios associados a cada uma das macroalgas não foi o mesmo que o esperado (181) ($X^2 = 37,5$, d.f. = 3, $p < 0,0001$) (Fig. 7a). O mesmo ocorreu na arena 2 ($X^2 = 122$, d.f. = 3, $p < 0,0001$), com média esperada de 60,3 (fig. 7b). O número de náuplios em recipientes sem macroalgas foi 2,5 ± 2,3, um número muito menor do que aqueles com macroalgas.

Figura 8 - Número (média ± desvio padrão) de náuplios associados às macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As linhas tracejadas indicam o número esperado de náuplios em cada arena se não houver preferência de habitat.



Fonte: O Autor (2021).

Comparando a distribuição dos náuplios entre cada par de macroalgas da arena 1, observou-se que não houve diferenças significativas entre os seguintes pares: *Padina* e *Ulva*, *Ulva* e *Gelidiella* e *Padina* e *Gelidiella* (Tabela 5). Na arena 2, também não houve diferença significativa entre o par de macroalga *Padina* e *Gelidiella* (Tabela 5). Nas arenas 1 e 2 houve diferença significativa no número de náuplios entre a *Palisada* e *Padina*, *Ulva* e *Gelidiella* (Tabela 5). Pode-se observar uma tendência dos náuplios a preferirem a *Palisada* (Figura 8).

Tabela 5 - Resultado dos testes de X^2 comparando as médias dos números de náuplios associados as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa* na Arena 1 e 2.

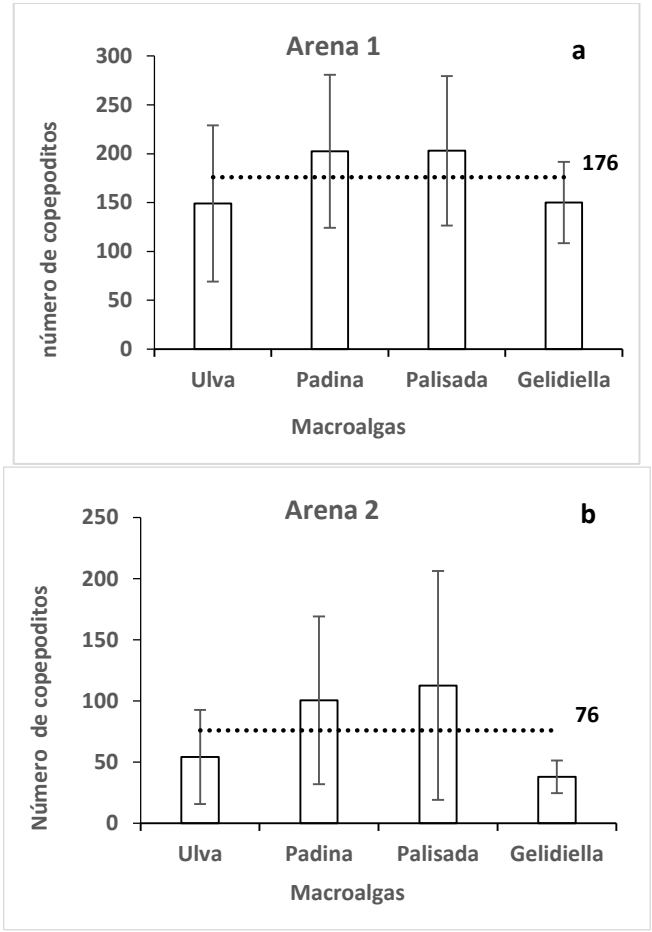
Combinação algas	Graus de liberdade	X^2 (com correção)	Probabilidade
Arena 1			
Ulva x Padina	1	0	0,9884
Ulva x Palisada	1	24,797	<0,0001*
Ulva x Gelidiella	1	2,744	0,0976
Padina x Palisada	1	25,506	<0,0001*
Padina x Gelidiella	1	2,989	0,0838
Palisada x Gelidiella	1	10,877	0,001*
Arena 2			
Ulva x Padina	1	22,539	< 0,0001*
Ulva x Palisada	1	99,082	< 0,0001*
Ulva x Gelidiella	1	29,78	< 0,0001*
Padina x Palisada	1	36,643	< 0,0001*
Padina x Gelidiella	1	0,512	0,512
Palisada x Gelidiella	1	28,174	< 0,0001*

Fonte: O Autor (2021).

4.4.2 Preferência dos copepoditos

O número médio de copepoditos em *Ulva*, *Padina*, *Palisada* e *Gelidiella* na arena 1 e 2 são mostrados na Figura 9. Nos recipientes sem macroalgas, o número de copepoditos (32 ± 17) foi muito menor do que naqueles com macroalgas. A média de copepodito nas quatro macroalgas na arena 1 não foi a mesma esperada (X2 = 16,1, d.f. = 3, p = 0,0011), a média esperada foi de 176 copepoditos. Na arena 2, o número médio de copepoditos associados a cada uma das macroalgas não foi o mesmo esperado (76,4) (X2 = 50,6, d.f. = 3, p <0,0001).

Figura 9 - Número (média ± desvio padrão) de copepoditos associados às macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As linhas tracejadas indicam o número esperado de copepoditos em cada arena se não houver preferência de habitat.



Fonte: O Autor (2021).

Em relação ao número de copepoditos associados às macroalgas estudadas, observou-se que não houve diferença significativa nas duas arenas entre os pares de *Ulva* e *Gelidiella*, *Padina* e *Palisada* (Tabela 6). Em todos os outros pares de macroalgas, diferenças significativas foram observadas em relação aos copepoditos (Tabela 6). Os copepoditos associados às macroalgas das espécies *Padina* e *Palisada* apresentaram um número superior ao esperado, ocorrendo o contrário com *Ulva* e *Gelidiella* (Figura 9). Assim, há indicação de preferência pelos copépodes de *Tisbe biminiensis* às macroalgas *Padina* e *Palisada.*

Tabela 6 - Resultado dos testes de X^2 comparando as médias dos números de copepoditos associados as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa* na Arena 1e 2.

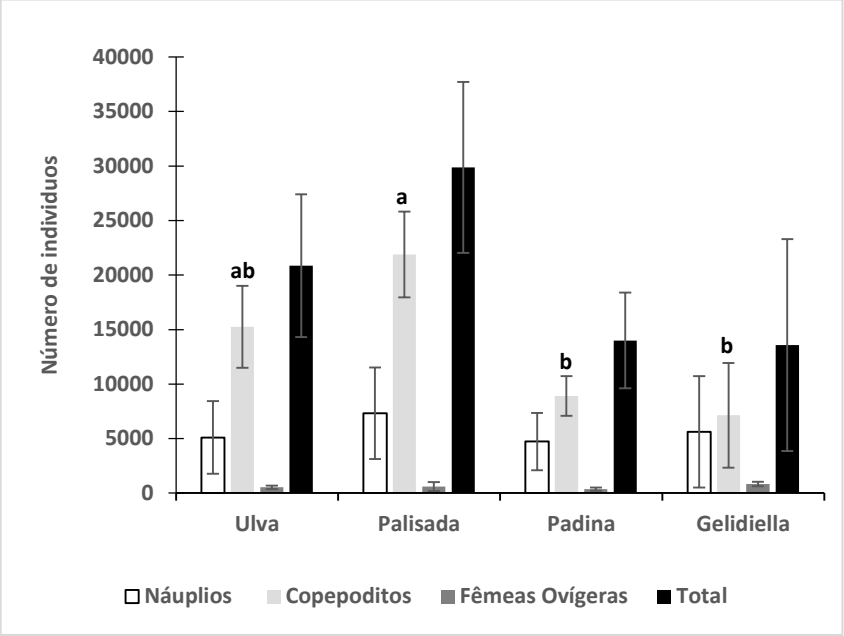
Combinação algas	Graus de liberdade	X^2 (com correção)	Probabilidade
Arena 1			
Ulva x Padina	1	7,841	0,0051*
Ulva x Palisada	1	7,98	0,0047*
Ulva x Gelidiella	1	0	1
Padina x Palisada	1	0,001	0,9802
Padina x Gelidiella	1	7,524	0,0061
Palisada x Gelidiella	1	7,66	0,0056*
Arena 2			
Ulva x Padina	1	13,231	0,0003*
Ulva x Palisada	1	19,798	< 0,0001*
Ulva x Gelidiella	1	2,521	0,1123
Padina x Palisada	1	0,593	0,4411
Padina x Gelidiella	1	27,309	< 0,0001*
Palisada x Gelidiella	1	36,08	< 0,0001*

Fonte: O Autor (2021).

4.5 Crescimento populacional

Os dados obtidos com o teste de crescimento populacional de *T. biminiensis* em culturas contendo as macroalgas podem ser vistos na Figura 10. Não houve diferença significativa entre o número total de organismos nos diferentes tratamentos (ANOVA, F = 3,2 p = 0,08). A comparação entre a média do número de náuplios nos diferentes tratamentos não mostrou diferença significativa (ANOVA, F = 0,5 p = 0,08). O mesmo ocorreu com a média das fêmeas ovígeras (ANOVA, F = 1,8 p = 0,216). No entanto, o número de copepoditos diferiu entre os diferentes tratamentos (ANOVA, F = 9,6, p = 0,005), com o número de copepoditos em *Palisada* igual ao de *Ulva*, mas maior que em *Padina* e *Gelidiella*.

Figura 10 - Número (média ± desvio padrão) de náuplios, copepoditos, fêmeas ovígeras e organismos totais de *Tisbe biminiensis* ao final dos testes de crescimento com as macroalgas *Ulva fasciata*, *Padina gymnospora*, *Palisada perforata* e *Gelidiella acerosa*. As letras indicam os resultados do teste de Tukey.



Fonte: O Autor (2021).

5 DISCUSSÃO

O screening fitoquímico dos extratos de macroalgas revelou que eles são muito diferentes em termos de compostos bioativos, *Gelidiella acerosa* é a mais rica em compostos seguida por *Padina gymnospora*, *Palisada perforata*, enquanto *Ulva fasciata* apresenta o menor número de compostos. No extrato de *G. acerosa*, apenas cumarinas, fenóis e alcalóides estavam ausentes. S.M. et al. (2018) estudando extratos de *G. acerosa* em vários solventes (etanol, metanol, acetato de etila, diclorometano, hexano e água) encontraram uma grande variedade de classes de compostos. Resultados divergentes em relação ao nosso estudo foram observados para cumarinas (presença no extrato hexânico) e terpenóides (ausência nos extratos hexano e diclorometano).

Shanmuganathan & Devi (2016) mostraram que extratos de *P. gymnospora* preparados com vários solventes (éter de petróleo, benzeno, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e água) não possuem taninos e alcalóides, porém, ao contrário de nossos resultados, eles contêm flavonóides e ausência de terpenóides. Abirami & Kowsalya (2012) realizaram o screening fitoquímico do extrato metanólico de *P. gymonspora* coletada na Índia e resultados encontraram resultados semelhantes aos nossos para alcalóides, esteróides, saponinas, terpenóides e quinonas. No entanto, os resultados para flavonóides, taninos e fenóis foram diferentes.

Abirami & Kowsalya (2012) estudaram o extrato metanólico de *U. fasciata* e detectaram flavonóides, taninos, fenóis, esteróides, saponinas, terpenóides, resultado diferente do presente estudo. As quinonas também mostraram resultados divergentes entre os dois estudos. Enquanto nosso estudo observou a presença de quinonas, o trabalho de Abirami & Kowsalya (2012) mostra a ausência. A única substância que apresentou o mesmo resultado em ambos os estudos foram os alcalóides, estando ausentes em ambos.

A CE50 para o desenvolvimento de náuplios de *Tisbe biminiensis* variou do menor ao maior como segue: *G. acerosa*, *P. gymnospora*, *U. fasciata* e *P. perforata*. Assim, *G. acerosa* apresentou o extrato mais tóxico e *P. perforata* o menos tóxico. Esta escala de toxicidade tem uma boa relação com o número de substâncias descritas acima. *G. acerosa* obteve mais famílias de compostos de metabólitos secundários do que as outras algas, seguida por *P. gymnospora*. Apesar das diferenças químicas observadas entre os extratos, todas as macroalgas estudadas apresentaram CENO e CEO semelhantes. Apenas o CEO da *G. acer*osa

foi inferior, indicando que esses parâmetros foram menos sensíveis às diferenças entre as macroalgas.

Um estudo de Lhullier et al. (2006) também avaliou a toxicidade de extratos de macroalgas encontrados na costa brasileira. Em seu estudo, a CL50 (concentração letal para 50% dos indivíduos) do extrato alcoólico de 19 macroalgas coletadas no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, foi determinado para *Artemia salina*. Os valores encontrados variaram de menos de 50 a 229 $\mu g.mL^{-1}$. Os valores de CL50 dos extratos de *U. fasciata* foram de 76 e 63 $\mu g.mL^{-1}$ e dos extratos de *P. gymnospora* foram <50 $\mu g.mL^{-1}$. Comparando os valores de CL50 obtidos por Lhullier et al. (2006) e os valores de CE50 do presente estudo, podemos perceber que os resultados para os náuplios de *T. biminiensis* foram todos maiores do que os de *A. salina*, indicando menor toxicidade para o copépodo dos extratos testados neste estudo. Embora em ambos os estudos os extratos de *Padina* tenham sido mais tóxicos do que os de *Ulva*. Selvin e Lipton (2004) estudaram o extrato de diclorometano-metanol de *Ulva fasciata* e demonstraram um amplo espectro de atividade antibacteriana e a CL50 de 1,8 mg / mL para teste de citotoxicidade com *A. salina*. Esse valor foi superior aos encontrados por Lhullier et al. (2006) e ao deste manuscrito.

Enquanto *Ulva* e *Padina* têm talos frondosos, *Gelidiella* e *Palisada* têm talos ramificados, e essas diferenças poderiam gerar uma maior complexidade estrutural que normalmente se reflete em uma maior abundância da fauna (CHEMELLO & MILAZZO, 2002; DUBIASKI-SILVA & MASUNARI, 1995; HACKER & STENECK, 1990). O índice de complexidade de habitat que leva em consideração a dimensão fractal e o peso das algas mostra que a *Gelidiella* tem uma maior complexidade de habitat, sendo seguida por *Palisada*, *Padina* e *Ulva* (MONTENEGRO et al., 2021, submetido à publicação). Esperava-se que as macroalgas *Gelidiella* e *Palisada* tivessem a preferência dos copépodos, devido a suas arquiteturas mais complexas que lhes proporcionariam maior proteção tanto de predadores quanto da hidrodinâmica. Testes realizados por Hacker e Steneck (1990) com Amphipoda mostraram preferência por algas com arquitetura ramificada, indicando que os componentes espaciais e estruturais são importantes para a densidade e tamanho dos organismos presentes nas macroalgas. Hansen et al. (2011) indicaram que os macroinvertebrados preferem macrófitas de maior complexidade estrutural e, consequentemente, apresentam maior abundância. No entanto, os resultados dos testes de seletividade mostraram uma preferência por náuplios de *T. biminiensis* apenas pelas macroalgas da espécie *Palisada*. Para copepoditos, o teste de preferência mostrou que náuplios preferem *Padina* e *Palisada*. Diante desses resultados, pode-se sugerir que a arquitetura não é o único fator que determina a

relação entre fauna e macroalgas. Nossos resultados químicos e toxicológicos indicam que *Gelidiella*, apesar da arquitetura favorável, pode apresentar compostos químicos com efeito inibitório para copépodos. Já a produção de alguns compostos químicos pelas macroalgas pode interferir na epifauna diretamente ou por meio da alteração do microfilme microbiano (JOHNSON & SCHEIBLING, 1987).

O maior crescimento populacional de *T. biminiensis* indicado por um maior número de copepoditos na macroalga *Palisada* seguida por *Ulva*, corrobora os resultados tanto dos testes de seletividade quanto dos testes toxicológicos. Essas duas espécies de macroalgas foram as que apresentaram menor toxicidade para náuplios de *T. biminiensis*. A produção de substâncias químicas bioativas pode ter sido um dos fatores que contribuíram para o menor crescimento populacional da macroalga *Gelidiella* e *Padina*.

6 CONCLUSÕES

Embora os componentes estruturais das macroalgas sejam importantes para determinar a densidade populacional e seletividade da epifauna, os componentes químicos podem acabar se destacando, como mostram os dados obtidos no presente estudo. A relação entre o copépodo epibentônico *Tisbe biminiensis* e as 4 macroalgas estudadas teve ligação tanto com a ausência de compostas secundários tóxicos para eles como com a arquitetura das macroalgas. O extrato de *Gelidiella acerosa* foi o que obteve o maior número de compostos químicos e o que apresentou o menor valor de EC50 nos testes de toxicidade, refletindo negativamente nos testes de seletividade e crescimento populacional. A *Ulva fasciata* mesmo com baixa toxicidade para os copépodos não foi tão atrativa, provavelmente por possuir uma arquitetura mais simples.

REFERÊNCIAS

ABIRAMI, R. G.; KOWSALYA, S. Phytochemical screening, microbial load and antimicrobial activity of underexploited seaweeds. **International Research Journal of Microbiology**. v. 3, n. 10, p. 328-332, 2012.

ALVES, R. C. C.; MERCES, P. F. F.; SOUZA, I. R. A.; SILVA, A. P. S.; LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S. SILVA, M. V.; SILVA, A. G. da. Antimicrobial activity of seaweed of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 10, p. 312-318, 2016.

AMSLER, C. D.; MCCLINTOCK, J. B.; BACKER, B. J. Chemical mediation of mutualistic interactions between macroalgae and mesograzers structure unique coastal communities along the western Antarctic Peninsula. **Journal of Phycology**, n.1, v. 50, p. 1-10, 2014.

ANDRADE, P. B.; BARBOSA, M.; MATOS, R. P.; LOPES, G.; VINHOLES, J.; MOUGA, T.; VALENTAO, P. Valuable compounds in macroalgae extracts. **Food Chemistry**, n. 138, p. 1819-1828, 2013.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V. Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos. Recife, 104 p., 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; TORREIRO, A. G. A. G.; GARCIA, K. S..Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. **Brazilian Journal of Oceanography.** v. 57, n. 1, p. 33-41, 2009.

BALIANO, A. P.; PIMENTEL, E. F.; BUZIN, A. R. VIEIRA, T. Z. ROMAO, W.; TOSE, L. V.; LENZ, D. ANDRADE, T. U.; FRONZA, M., KONDRATYUK, T. P. ENDRINGER, D. C. Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 26, p. 714-719, 2016.

BELGHIT, I; RASINGER, J. D.; HEESCH, S.; BIANCAROSA, I.; LILAND, N.; TORSTENSEN, B.; WAAGBØ, R.; LOCK, E. BRUCKNER, C. G. In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. **Algae Research**, n. 26 p. 240-249, 2017

CESARIO, M. T.; FONSECA, M. M. R.; MARQUES, M. M.; ALMEIDA, M. C. M. D. Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. **Biotechnology Advances**, n. 36, p. 798-817, 2018.

CHANDER, M. P.; VEERARAGAVAM, S. VIJAYACHARI, P. Antimicrobial and Hemolytic activity of seaweed *Padina gymonspora* from South Andaman, Andaman and Nicobar Islands of India. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v.3, n. 6, p. 364-369, 2014.

CHEMELLO, R.; MILAZZO, M. Effect of algal architecture on associated fauna: some evidence from phytal molluscs. **Marine Biology**. n. 140, p. 981-990, 2002.

CORTE, G. N.; NASCIMENTO, M. C.; PAVANI, L; LEITE, F. P. P. Crustáceos associados à macroalga *Ulva* spp. Em praias com diferentes características ambientais. **Bioikos**, v. 26, n. 2, p. 101-111, 2012.

COSTA, B. V. M.; YOGUI, G. T.; SOUZA-SANTOS, T. P. Acute toxicity of tributyltin on the marine copepod *Tisbe biminiensis*. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 62, n.1, p. 65-69, 2014.

CUNHA, T. J.; GUTH, A. Z.; BROMBERG, S.; SUMIDA, P. Y. G. Macrofauna associated with the brown algae *Dictyota* spp. (Phaeophyceae, Dictyotaceae) in the Sebastião Gomes Reef and Abrolhos Archipelago, Bahia, Brazil. **Continental Shelf Research**, n. 70, p. 140-149, 2013.

DUARTE, R. C. S.; BARROS, G.; MILESI, S. V.; DIAS, T. L. P. Influence of macroalgal morphology on the functional structure of molluscan community from hypersaline estuary. **Hydrobiologia**, v. 847, n. 4, p. 1107-1119, 2020.

DUBIASKI-SILVA, J.; MASUNARI, S. Ecologia populacional dos amphipoda (crustácea) dos fitais de Caiobá, Matinhos, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. n. 12, v. 2, p. 373-396, 1995.

FARIAS, J. N. Taxonomia, perfil químico e potencial biológico no complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral da Paraíba e Pernambuco, Brasil. São Paulo, 123 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Botanica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

GAN, S. X.; TAY, Y. C.; HUANG, D. Effects of macroalgal morphology on marine epifaunal diversity. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 99, n.8, p. 1697-1707, 2019.

GANESAN, M.; THIRUPPATHI, S. ESWARAN, K.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Development of an improved method of cultivation to obtain high biomass of ter red alga *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta) in the open sea. **Biomass and Bioenergy**, n. 35, p. 2729-2736, 2011.

GUL, R., JAN, S. U.; FARIFULLA, S.; SHERANI, S.; JAHAN, N. Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. **The Scientific World Journal**, 2017.

HACKER, S. D.; STENECK, R. S. Habitat Architecture and the Abundance and Body-Size-Dependent Habitat Selection of a Phytal Amphipod. **Ecology**. v. 71, n. 6, p. 2269-2285, 1990.
HAMED, S. M.; EL-RHMAN, A. A. A.; ABDEL-RAOUF N.; IBRAHEEM, I. B. M. Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for susteinable agriculture technology. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, n. 7, p. 104-110, 2018.

HANSEN, J. P.; WIKSTRÖM, S. A.; AXEMAR, H.; KAUTSKY, L. Distribution differences and active habitat choices of invertebrates between macrophytes of different morphological complexity. **Aquatic Ecology**. n. 45, p. 11-22, 2011.

HARBONE, A. J. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. **Springer Science & Business media**. 1998.

HAUSER, A.; ATTRILL, M. J.; COTTON, P. A. Effects of habitat complexity on the diversity and abundance of macrofauna colonising artificial kelp holdfasts. **Marine Ecology Progress Series**, v. 325, p. 93–100, 2006.

JOHNSON, S. C.; SCHEIBLING, R. E. Structure and dynamics of epifaunal assemblages on intertidal macroalgae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* in Nova Scotia, Canada. **Marine Ecology – Progress Series**. V. 37, p. 209-227, 1987.

KANG, M. KIM, K., WIJESINGHE, YANG, X., AHN, G., JEON, Y. Protective effect of polyphenol extracted from *Ecklonia cava* against ethanol induced oxidative damage in vitro and in zebrafish model. **Journal of Functional Foods**, n. 6, p.339-347, 2014

KUMAR, M.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; PERNICE, M.; JIANG, Z.; RALPH, P. Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. **Algal Research**, n. 16 p.76-92, 2016.

KUMARI, P.; KUMARI, C.; SINGH, P. S. Phytochemical screening of selected medicinal plants for secondary metabolites**. International Journal of Life-Sciences Scientific Research**. v. 3, n. 4, p. 1151-1157, 2017.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from marine green alga *Ulva "rígida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extrations and chemical composition. **Carbohydrate Research**, n. 274, p. 251-261, 1995.

LARA-ISSASSI, G.; ALVAREZ-HERNANDEZ, S.; COLLADO-VIDES, L. Ichtyotoxic activity of extracts from Mexican marine macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, n. 12, p. 45-52, 2000.

LAVORANTE, B. R. B. O.; OLIVEIRA, D. D.; COSTA, B. V. M.; SOUZA-SANTOS, L. P. A new protocol for ecotoxicological assesssment of seawater using naplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda:Harpacticoida). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 95, p. 52-59, 2013.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral de catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina.* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

MACIEL, D. C.; COSTA, B. V. M.; SANTOS, L. P. S.; SOUZA, J. R. B.; ZANARDI-LAMARDO, E. Avaliação da toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino do Rio Capibaribe (Pernambuco, Brasil) utilizando o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* Volkmann Rocco (1973). **Tropical Oceanography**. v. 43, n.1, p. 26-37, 2015.

MARIC, P.; AHEL, M.; SENTA, I.; TERZIC, S.; MIKAC, I.; ZULJEVIC, A.; SMITAL, T. Effect-directed analysis reveals inhibitions of zebrafish uptake tranporter Oatp1d1 by caulerpenyne, a major secondary metabolite from the invasive marine alga *Caulerpa taxifolia.* **Chemosphere**, n. 174, p. 643-654, 2017.

MARTIN-SMITH, K. M. Abundance of mobile epifauna: the role of habitat complexity and predation by fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. n. 174, p. 243-260, 1993.

OLIVEIRA, D. D.; SOUZA-SANTOS, L. P.; SILVA, H. K. P. MACEDO, S. J. Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 104, p.373-378, 2014.

PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K.; GANESAN, M.; RAMAVAT, B.K.; JHA, B.; GHOSH, P. K. Agars of *Gelidiella acerosa* of west and southeast coast of India. **Bioresource Technology**, n. 98, p. 1907-1915, 2007.

REGIS, C. G.; SOUZA-SANTOS, L. P.; YOGUI, G. T.; MORAES, A. S.; SCHETTINI, C. A. F. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p 45-55, 2018.

ROSALINE, X. C.; SAKTHIVELKUMAR, S.; CHITRA, S.; JANARTHANAN, S. Antibacterial activity of the seaweeds *Chaetomorpha linum* and *Padina gymnospora* on human bacterial pathogens. **Journal of Environment & Biotechnology**. v. 6, n.1, p. 43-52, 2017.

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

SENTIES, A.; DIAZ-LARREA, J.; CASSANO, V.; GIL-RODRIGUEZ, C. FUJII, M. *Palisada perforata* (Rhodomelaceae, Ceramiales) em el Caribe mexicano. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, n. 80, p. 7-12, 2009.

SHANMUGANATHAN, B.; DEVI, K. P. Evaluation of nutriotional profile and antioxidant and anticholineterase activities of *Padina gymnospora* (Phaeophyceae). **European Journal of Phycology**. v.57, n. 4, 2016.

SILVA, G. C.; ALBUQUERQUE-COSTA, R.; OLIVEIRA-PEIXOTO, J. R.; PESSOA-NASCIMENTOS, F. E.; DE MACEDO- CARNEIRO, P. B.; SILVA DOS FERNADES-VIERIAS, R. H. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. **Latin American Journal of Aquatic Research**. v. 41, n. 1, p. 183-188, 2013.

S. M., F. M. B.; CHITRA, K.; JOSEPH, B.; SUNDARARAJAN, R.; S. H. *Gelidiella acerosa* inhibits lung cancer proliferation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.18, n.104, 2018.

SOUZA, E. C. P. M. et al. Acute sensitivity to *Nitokra* sp benthic copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** v. 7, n. 1, p. 75-81, 2012.

SOUZA-SANTOS, L.P.; PASTOR, J.M.O.; FERREIRA, N.G.; COSTA, W.M.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SANTOS, P.J.P. Developing the harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*

culture: testing for salinity tolerance, ration levels, presence of sediment and density dependent analyses. Aquaculture Research, v. 37, p. 1516-1523, 2006.

SUGANTHY, N.; NISHA S. A.; PANDIAN, S. K.; DEVI, K. P. Evaluation of *Gelidiella acerosa,* the red algae inhabiting South Indian coastal area for antioxidant and metal chelating potential. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, n. 3, p. 399-406, 2013.

SURGET, G.; ROBERTO, V. P.; LANN, K. L.; MIRA, S.; GUERARD, F.; LAIZE, V.; POUPART, N.; CANCELA, M. L.; STIGER-POUVREAU. Marine green macroalgae: a source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. **Journal of Applied Phycology**, n.1 v.29, p.575-584, 2017.

TANNA, B.; CHOUDHARY, B.; MISHRA, A. Metabolite profiling antioxidant, scavenging and anti-proliferative activites of selected tropical green seaweeds reveal the nutraceutical potencial of *Caulerpa* spp.. **Algal Research**, n. 36, p.96-105, 2018.

TASKIN, E. & SUKATAR, A. The Red Algal Genera *Laurencia, Osmundea* and *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, n. 13, p. 713-723, 2013.

VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; VASCONCELOS J. B.; REIS, T. N. V.; CONCENTINO, A. L. M.; MALLEA, A. J. A.; MARTINS, G. M.; NETO, A. I.; FUJII, M. T. Macroalgal responses to coastal urbanization: relative abundance of indicator species. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

VOLKMANN-ROCCO, B. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the Gracilis group. **Archivio di Oceanografia Limnologia**, v. 18, p. 71-90, 1973.

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. Enzyme-assistent extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. **Fitoterapia**, v. 83, p. 6-12, 2012.

YU, K.; WONG, C. AHMAD, R.; JANTAN, I. Larvicidal activity, inhibition effects on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes eagypti* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacifc Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 12, p.1006-1012, 2015.