

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

**PRODUÇÃO DE *HYPNEA PSEUDOMUSCIFORMIS* (RHODOPHITA) EM SISTEMAS LAND-
BASED E AVALIAÇÕES QUÍMICAS APLICADAS À BIOPRODUTOS**

OSEAS DE PAULA RIBEIRO

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVI POMPERMAYER MACHADO

ARARAQUARA (SP)

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PRODUÇÃO DE *HYPNEA PSEUDOMUSCIFORMIS* (RHODOPHYTA) EM SISTEMAS
LAND-BASED E AVALIAÇÕES QUÍMICAS APLICADAS À BIOPRODUTOS**

OSEAS DE PAULA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: PROF. DR. LEVI POMPERMAYER MACHADO

ARARAQUARA (SP)

2023

R791p Ribeiro, Oseas de Paula.
Produção de *Hypnea Pseudomusciformis* (Rhodophita) em sistemas
land-based e avaliações químicas aplicadas à bioprodutos / Oseas de
Paula Ribeiro. – Araraquara: [S.n.], 2023.
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual
Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e
Bioprocessos. Área de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Levi Pompermayer Machado.

1. Algicultura. 2. Macroalgas. 3. Biosistema de produção. 4.
Bioestimulantes. 5. Proteínas. 6. Pigmentos. 7. Minerais. I. Machado, Levi
Pompermayer, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção de *Hypnea pseudomusciformis* (Rhodophyta) em sistemas land-based e avaliações químicas aplicadas a bioprodutos

AUTOR: OSEAS DE PAULA RIBEIRO

ORIENTADOR: LEVI POMPERMAYER MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira do Campus de Registro da Unesp

Prof. Dr. ERNANI PINTO JUNIOR (Participação Virtual)
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - ESALQ/USP

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras do Campus de Assis da Unesp

Araraquara, 24 de março de 2023

Lista de Figuras

Figura 1 - Aspecto morfológico na natureza e estruturas da macroalga <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	12
Figura 2 - Diferentes tipos de carragena encontradas na parede celular de algas vermelhas.	13
Figura 3 - Maricultura da macroalga .	17
Figura 4 -Fluxograma de atividades desenvolvidas. As caixas em azul escuro destacam a situação escolhida no experimento anterior que serviu de base para a situação do próximo experimento.	20
Figura 5 - Sistema de filtragem mecânica e microbiológica adaptado para esterilização da água do mar.	24
Figura 6- a) Aspecto do cultivo unialgáceo da linhagem ES0120. b) aspecto dos cultivos contaminados com algas vermelhas filamentosas	25
Figura 7 - Sistema de produção de macroalga em tanques de 50 L sem circulação de água do mar	29
Figura 8 - Plantio das mudas de <i>Hypnea pseudomusciformis</i> produzidas em laboratório em rede tubular para cultivo em sistema <i>land-based</i>	30
Figura 9 - Cultivo de <i>Hypnea pseudomusciformis</i> em tanques cônicos de 60 L fluxo ascendente no modo <i>free-floating</i> .	31
Figura 10 - Aspecto da água no momento da captação e após 30 h de filtragem mecânica em filtro de areia na vazão de 3000 l/h.	35
figura 11 - Taxa de crescimento dos talos de <i>Hypnea. pseudomusciformis</i> em resposta a diferentes métodos de esterilização de do mar após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 60 micro mol fótons m ⁻² s ⁻¹ , temperatura de 24 ± 2 °C, salinidade de 25 e ciclo de luz de 12:12 h. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela anova unifatorial e teste de <i>Tukey</i> a 1%	36
Figura 12 – Aspecto do controle (esterilização convencional) e do tratamento (esterilização com ultravioleta) após 35 dias de manutenção em laboratório nas condições de 23±2 °C, ciclo de 12h luz: 12h escuro, salinidade 27, pH 7,8, densidade de fluxo fotônico de 60 μmol de fótons.m ⁻² .s ⁻¹ .	37

Figura 13 - Taxa de crescimento dos talos de *Hypnea pseudomusciformis* em resposta a soluções de nutrientes. a) após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade de 25 e ciclo de luz 12:12 h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão (n=3). (a) enriquecimento com solução de nutrientes minerais nas concentrações 10, 25 e 50 mL/L. (b) crescimento em resposta a solução de von Stosch e SNM 10 mL/L. 38

Figura 14 - a) Taxa de crescimento (b) % acumulada semanalmente de biomassa dos talos de *Hypnea pseudomusciformis* em resposta a soluções de nutrientes após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade de 25 ups e ciclo de luz 12:12 h. T1 - nutrientes minerais (SNM- 10mL/L); 2) T2 - SNM + vanádio e bromo quelato na concentração de 50 mg/L e 10 $\mu\text{g/L}$; 3) T3 - SNM + Tiamina, cianocobalamina e biotina (0,006, 0,00075 e 0,000001 mg/L respectivamente e T4 - SNM+ vanádio e bromo + vitaminas. Imagens algas após 28 dias de cultivo (c) T1 (d) T2; (e) T3 (f) T4. 39

Figura 15 - Taxa de crescimento relativo (%/dia) da macroalga *Hypnea pseudomusciformis* em resposta aos diferentes sistemas de cultivo *land-based* em escala piloto de produção. Linhas verticais representam desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela Anova unifatorial e teste de Tukey a 1%. Sistema 1 Caixa clara (d); 2 Caixa escura; (e) 3) *long-line* rede tubular (b) e 4) tanque cônico de fluxo ascendente (f) (g). 40

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Linhagens isoladas utilizadas no desenvolvimento do projeto.	22
Tabela 2 - Composição da solução mãe dos nutrientes adicionado meio de cultura composto por água do mar. VSES – von Stosch, SNM – Solução comercial de hidroponia.	26
Tabela 3 - Equações utilizadas para quantificar as concentrações de clorofila a (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) segundo Jeffrey & Humphrey (1975) e Lichtenthaler (1987) para os carotenóides totais e por Lorenze e Jeffrey (1980) para astaxantina e β -caroteno	33
Tabela 4 – Proteínas e Macro e micronutrientes na Biomassa seca de <i>Hypnea Pseudomusciformis</i> cultivadas em <i>land-based</i> , Mix macroalgas arribadas, <i>Kappaphycus alvarezii</i> e <i>Ascophyllum nodosum</i> . Valores apresentam médias e o desvio padrão (n=3).	41
Tabela 5 – Concentração de Pigmentos Fotossintetizantes na macroalga Biomassa seca de <i>Hypnea pseudomusciformis</i> cultivadas em <i>land-based</i> . Valores apresentam e médias e o desvio padrão (n=3).	42

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 A macroalga nativa <i>Hypnea pseudomusciformis</i> e potenciais biotecnológicos	12
3.2 Produção da macroalga <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Viabilidade de técnicas propagação vegetativa para manutenção de matrizes e produção de mudas de diferentes isolados da macroalga <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	21
4.2 Obtenção das matrizes	21
4.3 Esterilização da água do mar	23
4.4 Avaliação de formulação de solução de nutrientes para uso na manutenção de isolados e produção de biomassa	25
4.5 Produção em <i>land-based</i> de <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	27
4.5.1. Sistema 1: produção em tanques <i>free-floating</i> com aeração	28
4.5.2 Sistema 2: Produção em tanques com <i>long-line</i> tipo rede tubular	29
4.5.3. Sistema 3: Produção em reator de fluxo ascendente em sistema <i>free-floating</i>	30
4.6 Taxa de crescimento das macroalgas	32
4.7 Análises bioquímicas das macroalgas.....	32
4.7.1 Determinação de micro e macronutrientes minerais na macroalga	32
4.7.2 Análise de conteúdo de proteínas totais	32
4.7.3 Extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes	33
4.8 Análise dos resultados	34
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	35
5.1 Avaliação de formulação de solução de nutrientes para uso na manutenção de isolados e produção de biomassa	35
5.2 Produção em <i>land-based</i> e comercialização de <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	39
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS	45

RESUMO

A demanda mundial de macroalgas como matéria prima tem crescido nas últimas décadas para aplicação em diversos setores, especialmente alimentício humano e animal, farmacêutico e, mais recentemente, agrícola. Essas macroalgas marinhas constituem um recurso de relevante importância mundial, movimentando um mercado de US\$ 10 bilhões anualmente, seja em biomassa seca, ficocolóides como carragena e extratos. Ausência de bancos de matrizes, dificuldades no processo de produção de mudas de qualidade e da produção viável de biomassa de algas são os maiores desafios tecnológicos para produção em larga escala no Brasil. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo aplicar metodologias de micropropagação, cultivo em laboratório e produção em *land-based* para novas soluções de nutrientes e bioprocessos de produção para obtenção de biomassa bioprodutos com valor agregado. Assim, avaliamos: O crescimento da macroalga em resposta a meios de cultivo desenvolvidos com enriquecimento por nutrientes em comparação a formulações convencionais em sistema de micropropagação em laboratório; O efeito de técnicas de plantio no crescimento e qualidade das mudas de algas nos tanques de produção; Determinar o crescimento e teor de proteínas das algas mantidas em 1) *free floating* com aeração, 2) *Free floating* em tanques cônicos com fluxo ascendente de água e 3) dentro de redes tubulares e avaliar composição mineral, pigmentos e proteínas da macroalga cultivada nos diferentes tratamentos. Os resultados observados indicaram ausência de diferenças significativas em resposta a diferentes doses de solução de macro e micronutrientes minerais (SMN) e solução de *von Stosch* (VSES). A adição de bromo e vanádio bem como vitaminas ao SMN tiveram efeito positivo no crescimento. O tratamento em tanque cônico com fluxo ascendente apresentou os resultados superiores frente aos demais sistemas, sendo registrado $11,59 \pm 1,2$ %/dia para TCR (taxa de crescimento relativa). Os valores que obtivemos para proteínas totais, pigmentos e minerais em nosso sistema de produção foram equivalentes aos observados para espécies similares em unidades de produção *land-based* comercial de aquicultura em Israel e Portugal e superiores aos da maricultura no Brasil. Assim, o presente trabalho contemplou o desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologia de bioprocessos para sistema *land-based* de aquicultura em escala piloto, produção de biomassa da macroalga marinha e composição química adequada para utilização como matéria prima aplicada em bioprodutos para múltiplos usos, especialmente o agronegócio.

Palavras-chaves: Algicultura, Macroalgas, Biosistema de produção, Bioestimulantes, Proteínas, Pigmentos, Minerais.

ABSTRACT

The worldwide demand for macroalgae as raw material has grown in recent decades for application in various sectors, especially human and animal food, pharmaceutical and, more recently, agricultural. These marine macroalgae constitute a resource of relevant global importance, moving a market of US\$ 10 billion annually, whether in dry biomass, phycocoloids such as carrageenan and extracts. The greatest technological challenges for a large-scale production in Brazil are: absence of matrix banks, difficulties in the production process of quality seedlings and viable production of algae biomass. In this context, the present study aimed to apply micropropagation methodologies, laboratory cultivation and land-based production using new nutrient solutions and bioprocesses production in order to obtain bioproducts biomass at added value. Beside this, we evaluate: the growth of macroalgae in response to culture media developed with nutrient enrichment compared to conventional formulations in micropropagation system in laboratory; The effect of planting techniques on the growth and quality of algae seedlings in production tanks; Determination of the growth and protein content of algae maintained in 1) free floating with aeration, 2) free floating in conical tanks with upward flow of water and 3) inside tubular networks and evaluate mineral composition, pigments and proteins of macroalgae cultivated in different treatments. The results showed that there is no significant differences in response to different doses of macro and mineral micronutrients (SMN) and von Stosch solution (VSES). The addition of bromine and vanadium as well as vitamins to SMN had a positive effect on the growth. The treatment in conical tank with ascending flow presented the superior results compared to the others, being registered $11.59 \pm 1.2\%$ /day for TCR (relative growth rate). The values obtained for total proteins, pigments and minerals in our production system were equivalent to those observed for similar species in commercial land-based aquaculture production units in Israel and Portugal and higher than those of mariculture in Brazil. In final conclusion, this present project included the development and improvement of bioprocess technology for land-based aquaculture system on a pilot scale, biomass production of marine macroalgae and chemical composition suitable for use as raw material applied in bioproducts for multiple uses, especially agribusiness.

Keywords: Algiculture, Macroalgae, Production biosystem, Biostimulants, Proteins, Pigments, Minerals.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de macroalgas é dominada por China e Coreia do Sul, que correspondem a 92% da produção mundial, sendo produzida integralmente em aquicultura, movimentando anualmente um mercado de US\$ 10 bilhões (BUSCHMANN et al., 2017). A América Latina corresponde a apenas 1,4% da produção mundial, sendo o Chile o principal produtor com 95%, enquanto a produção brasileira representa menos de 5% (ALEMAÑ et al., 2019). O Brasil figura na lista de importadores de macroalgas, apresentando crescimento de demanda anual de 13% (NAYAR; BOTT, 2014).

As macroalgas apresentam uma ampla gama de usos e aplicações, como alimentação humana, aditivo para ração animal, fertilizantes agrícolas ou como fonte de hidrocolóides de interesse comercial (FERDOUSE et al., 2018; MCHUGH, 2003; VALDERRAMA et al., 2015; WHITE; WILSON, 2015). Além de serem organismos capazes de remover compostos inorgânicos da água (CHOPIN, 2014; EDWARDS, 2015) e sequestrar o carbono do ambiente realizando a fotossíntese (DUARTE et al., 2017).

Essas características tornam o cultivo de algas uma produção de baixo impacto ambiental e capaz de fornecer serviços ecossistêmicos (CHOPIN, 2014; TROELL et al., 1999). Estudos também apontam a atividade como promotora de melhorias sociais, principalmente em países em desenvolvimento (MSUYA, 2014; VALDERRAMA et al., 2003).

A produção de algas no Brasil se limita a cultivos experimentais com uma espécie de macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii*, possuindo limitações relevantes nos aspectos legais e licenciamento ambientais, devido ao risco de bioinvasão e produtivos por se tratar de uma produção baseada em propagação vegetativa, que apresenta baixa variabilidade genética (BRAKEL et al. 2021).

Outra iniciativa envolveu a produção da macroalga nativa *Gracilaria domingensis* em conjunto com comunidades de pescadores no Nordeste. A produção parou devido à falta de domesticação da espécie e utilização de mudas provenientes de bancos naturais (MARINHO-SORIANO, 2016). Esse processo passou por limitações similares às observadas na indústria mundial de algas.

A demanda de macroalgas para o mercado de bioprodutos, especialmente aplicados à agricultura (YAKHIN et al. 2017) proporciona uma oportunidade para estabelecimento de uma cadeia produtiva. As empresas produtoras dessas macroalgas têm enfrentado relevantes limitações tecnológicas para desenvolvimento. A produção de mudas de forma contínua e com qualidade, estabelecimento de bancos de cultura e germoplasma que permitam a seleção de linhagens e genótipos são fundamentais para o desenvolvimento da atividade (HAYASHI et al., 2020).

Os desafios tecnológicos para garantir o provimento da macroalga como matéria prima incluem a domesticação e desenvolvimento de metodologias de micropropagação em laboratório, desenvolvendo processos de produção de mudas com garantia de qualidade para produção (VALERO et al., 2017). Nesse aspecto reside a possibilidade de determinar meios eficientes de produção de mudas e biomassa em escala e de forma contínua e padronizada (TITLYANOV; TITLYANOVA, 2010), bem como avaliação criteriosa de custos de infraestrutura, manejo dos sistemas de produção (KITE-POWELL, 2022).

A produção de macroalgas não é realidade no Brasil em função da ausência de diversos fatores da cadeia produtiva (REIS et al., 2017). Pereira et al. (2020) demonstraram a viabilidade do cultivo de *H. pseudomusciformis* em maricultura no Nordeste, apenas no cenário para produção de extratos. No entanto, não foram abordados aspectos relativos à produção de mudas, que foram baseadas tanto em mudas extraídas da natureza quanto de replantio. Esse tipo de muda não garante perenidade nem qualidade para produção a longo prazo, conforme diagnóstico das fazendas de macroalgas nas Filipinas estão passando por graves problemas (KAMBEY et al., 2020) em função de falta de produção de mudas em escala industrial.

Nesse contexto, o presente projeto propõe enfrentar dois desafios tecnológicos: o primeiro será avaliar métodos alternativos para redução de custo através da diminuição de tempo e mão de obra para esterilização da água do mar e suplementos mais baratos, aumentando a viabilidade técnica de manutenção do banco de matrizes e a produção de mudas jovens da macroalga. O segundo desafio será aperfeiçoar metodologias existentes de plantio e manejo para produção das mudas em tanques *land-based* de 400 L, adequando as metodologias de manejo para as condições e espécies locais de forma a obter eficiência de crescimento da alga.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Aplicar metodologias de propagação vegetativa, cultivo em laboratório e produção em *land-based* para novas soluções de nutrientes e bioprocessos de produção para obtenção de biomassa bioprodutos com valor agregado.

Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de *Hypnea pseudomusciformis* em resposta a meios de cultivo desenvolvidos com enriquecimento por nutrientes em comparação a formulações convencionais em sistema de propagação vegetativa em laboratório;
- Avaliar o efeito de técnicas de plantio no crescimento e qualidade das mudas de a algas nos tanques de produção;
- Determinar o crescimento e teor de proteínas das algas em diferentes métodos de cultivo em larga escala;
- Avaliar composição mineral, pigmentos e proteínas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A macroalga nativa *Hypnea pseudomusciformis* e potenciais biotecnológicos

O complexo de espécies referido ao gênero *Hypnea* apresenta elevada dificuldade de delimitação das espécies com base apenas na morfologia. Os espécimes desse grupo são intensamente ramificados, sendo que cada ramo possui uma série de estruturas laterais cobertas por ramos espinescentes. Dentre essas se destaca a espécie *Hypnea pseudomusciformis* (Figura 1), caracterizada pela presença de ganchos ou gavinhas que facilitam o hábito epifítico, estando restrita ao Hemisfério Sul (NAUER et al., 2015).

FIGURA 1 - Aspecto morfológico na natureza e estruturas da macroalga *Hypnea pseudomusciformis*.

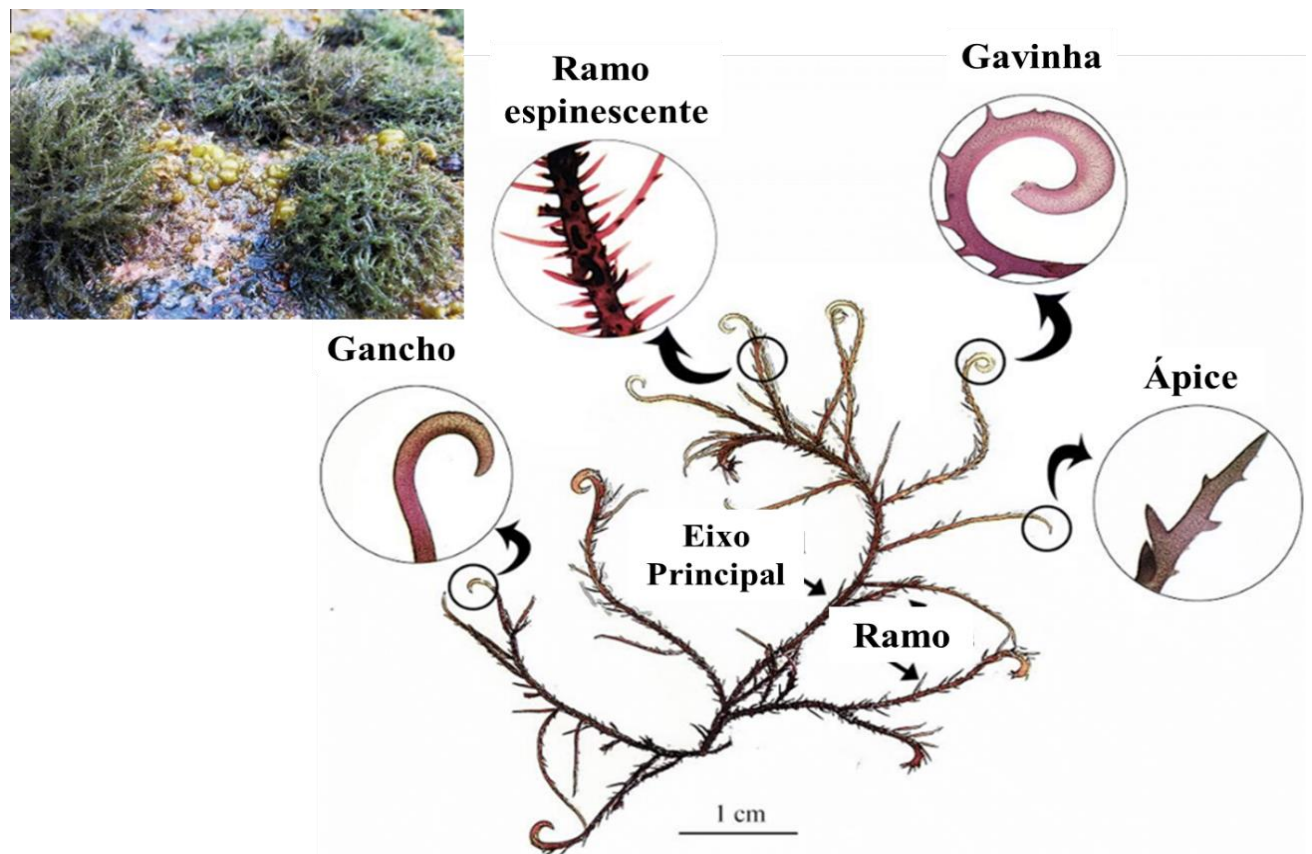


Figura 1

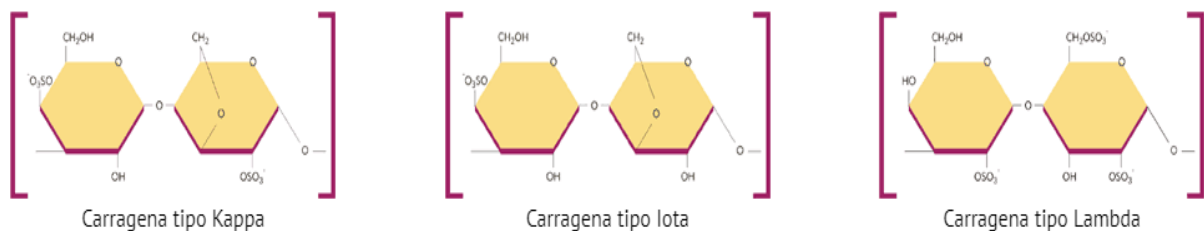
Fonte: Adaptada (YOKOYA et al., 2020).

A macroalga *Hypnea pseudomusciformis* representa uma das espécies de macroalgas marinhas nativas do Brasil mais bem pesquisadas em relação à aspectos biotecnológicos para desenvolvimento tanto de bioprodutos quanto para bioprocessos voltados à obtenção de biomassa. São descritos diversos potenciais de utilização das substâncias extraídas dessa espécie, destacando antibacteriano, antifúngico, antivirais, inibidos da acetilcolinesterase e hemoaglutinante (YOKOYA et al., 2020).

A espécie *Hypnea pseudomusciformis* possui elevada importância por produzir a carragena, um polissacarídeo sulfatado utilizado como emulsificante e estabilizante em diversos setores da indústria (CARDOZO et al., 2007). A indústria de hidrocolóides de algas marinhas, que compreendem ágar, alginato e carragena, tem crescido anualmente 3%, esses polissacarídeos em aplicações como emulsificante e estabilizante em diversos setores da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica com mercado global estimado de US\$ 864,3 milhões. (PORSE; RUDOLPH, 2017).

As macroalgas do filo *Rhodophyta* são produtoras dos polissacarídeos ágar ou carragena, sendo a segunda o tipo verificado na parede celular da espécie *H. pseudomusciformis*. A carragena ainda pode ser classificada nos tipos *kappa*, *iota* e *lambda* (figura 2). A *H. pseudomusciformis* apresenta dominância do tipo *Kappa*, caracterizada por conter entre 25% de éster sulfato e entre 35% de 3,6- AG (Anidro Galactose). Devido a esse alto teor de 3,6-AG, essas carragenas formam géis firmes (USOV, 2011).

FIGURA 2 - Diferentes tipos de carragena encontradas na parede celular de algas vermelhas.



Fonte: Agargel

A *H. pseudomusciformis* ainda é uma importante fonte de minerais, com potencial aplicação tanto em setores nutraceuticos (CIRCUNCISÃO et al., 2018) quanto para aplicação como

biofertilizante, especialmente em função da elevada concentração de potássio (KARTHIKEYAN; SHANMUGAM, 2017).

Os pigmentos de macroalgas vermelhas são outra classe de metabólitos com elevado potencial biotecnológico (FREITAS et al., 2021). A *H. pseudomusciformis* é uma fonte natural dessas substâncias, destacando os carotenóides (NAUER et al., 2019). A extração e aplicação dessa classe de compostos são amplas no campo nutricional e agrícola (PANGESTUTI et al., 2019).

Para utilização e desenvolvimento de uma indústria baseada na *H. pseudomusciformis* é necessário a compreensão de aspectos fundamentais da biologia de dessa espécie para de cultivos visando a produção de biomassa com sustentabilidade econômica e ambiental. Aspectos como crescimento, composição de bioquímica justificam o desenvolvimento de esforços para utilização desta macroalga (NAUER et al., 2019).

A utilização de extratos macroalgas na agricultura é um tema de pesquisa de elevado destaque dentre as aplicações que transpuseram a barreira da academia para indústria (KHAN et al., 2009). Nesse contexto, a *H. pseudomusciformis* é uma das espécies de interesse tendo em vista o potencial biotecnológico descrito (CARVALHO et al., 2019) e a possibilidade de produção de biomassa.

3.2 Produção da macroalga *Hypnea pseudomusciformis*

Para esta espécie já estão descritos protocolos para isolamento de culturas (FERNANDES et al., 2011), além de pesquisas já terem avaliado os resultados ecofisiológicos e de crescimento em resposta aos nutrientes dissolvidos na água do mar, em resposta a carbono dissolvido (MACHADO, 2014).

H. pseudomusciformis possui variações fenotípicas intraespecíficas representadas por linhagens pigmentares que apresentam diferenças em relação à tolerância aos fatores ambientais, à produção de biomassa e composição química (MARTINS et al., 2011; MARTINS; YOKOYA, 2010; MARTINS et al., 2007; YOKOYA et al., 2007). Essas linhagens naturais apresentam diferentes desempenhos em resposta a condições ambientais, rendimentos produtivos, composição química e potencial biotecnológico (MACHADO, 2014; MARTINS, 2013).

Essas linhagens podem ser selecionadas e reproduzidas controladamente na estrutura de produção que estamos propondo, permitindo desenvolver cultivares (que atendam a lei Nº 9.456,

de 25 de abril de 1997 sobre Proteção de Cultivares) que apresentem melhores rendimentos. Esta ainda é uma limitação relevante para a produção comercial de algas no mundo (HAFTING et al., 2015).

Outro parâmetro importante para a implantação da produção em escala desta macroalga foi determinado no estudo que avaliou a produção da alga em maricultura, obtendo excelentes indicadores de sustentabilidade ambiental do processo de produção. Foi verificada a viabilidade econômica para comercialização da macroalga seca e de extrato glicólico (possível insumo aplicável na agricultura) (PEREIRA, 2019). No entanto, essa avaliação não abordou a perenidade da produção bem como os aspectos relativos à obtenção de mudas viáveis e de forma contínua.

A produção da alga apresenta relevante impacto ambiental positivo, promovendo a fixação de 73.2 kg CO₂ por 1000 litros de extrato produzido (VIJAY ANAND et al., 2018). Nessa produção comercial, o cultivo de algas iniciou-se por meio de mudas obtidas diretamente na natureza. Essas mudas foram cultivadas em ciclos de 50 dias e parte da produção foi utilizada para iniciar um novo ciclo. Esse procedimento revelou a limitação para aplicação a longo prazo, com redução da taxa de crescimento entre os ciclos e maior susceptibilidade a epífitas danosas (GANESAN et al., 2011).

Apesar de todos os dados existentes sobre o potencial cultivo da macroalga *H. pseudomusciformis*, esta espécie ainda não pode ser considerada domesticada para a produção comercial. Da mesma forma, a algicultura é uma atividade ainda incipiente no Brasil (REIS et al., 2016). Além da introdução de espécies exóticas, houve iniciativa de produção de uma espécie de macroalga nativa junto a comunidades tradicionais no Nordeste. Essa produção não obteve sucesso devido especialmente por não ter contemplado a produção de mudas e nem abranger a domesticação da macroalga. Todo processo foi baseado, somente, na exploração de bancos naturais que levou à drástica redução da disponibilidade desses estoques e significativos impactos ambientais (MARINHO-SORIANO, 2017).

Mundialmente, a domesticação de macroalgas é uma limitação relevante, especialmente devido à baixa tecnologia agregada e baixa capacitação de pessoal. Processos como o uso de propágulos ou mudas retiradas da natureza, possuem baixas variabilidades genética e ausência de rastreabilidade, que são demandas de conhecimento aplicado para desenvolvimento (LOUREIRO et al., 2015).

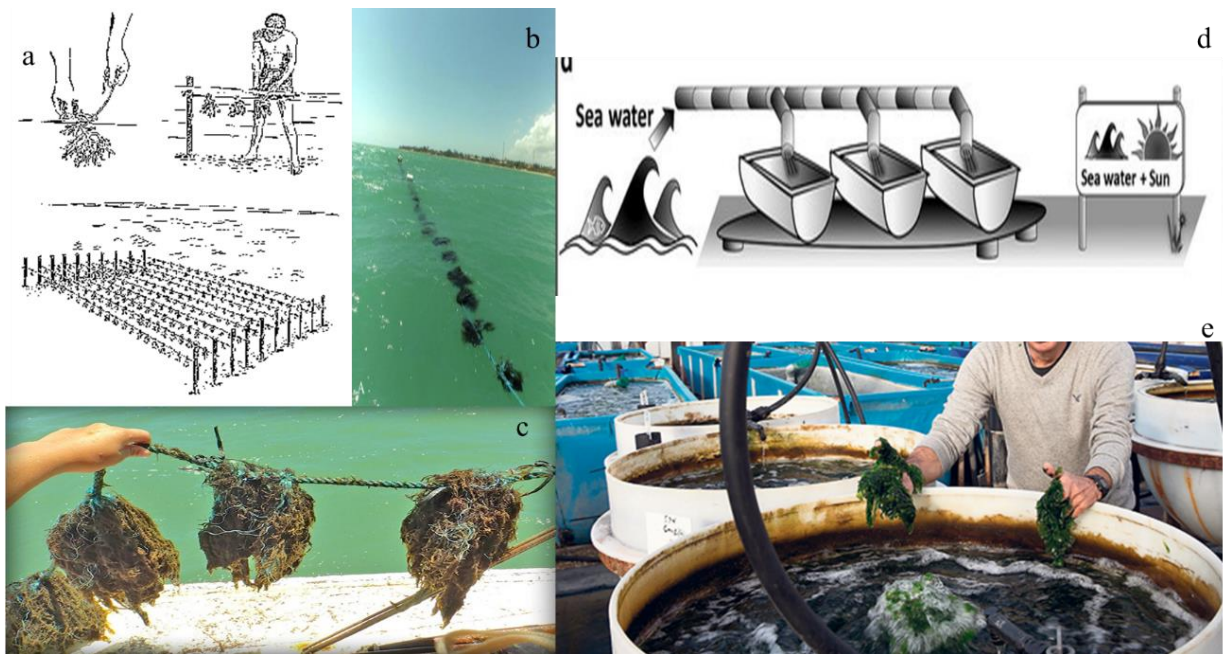
Esses fatores limitantes na algicultura são agravados no contexto de mudanças climáticas que tornam essas produções mais suscetíveis a pragas e baixa tolerância a condições ambientais.

Estes cenários são agravados pela falta de informações referentes aos impactos ambientais desses cultivos. Essa interação de fatores vem promovendo uma corrida, por um lado para obtenção de cepas de crescimento rápido, resistentes a doenças e tolerantes a temperatura, e por outro lado buscando validar e viabilizar sistemas de produção *land-based*, que são fechados e apresentam maior controle dos parâmetros (HAYASHI et al., 2020).

O cultivo de *H. pseudomusciformis* em maricultura (figura 3) direta foi avaliado no Brasil, em escala experimental de pesquisa. As primeiras tentativas foram realizadas no litoral norte de São Paulo e revelaram a dificuldade da seleção de locais em função de herbivoria (BERCHEZ et al., 1989). A maricultura da macroalga no litoral do Rio de Janeiro apresentou problemas em relação à presença de epibiontes (REIS et al., 2006). Recentemente foi desenvolvida tecnologia de cultivo em maricultura (PEREIRA et al., 2020a). A avaliação bioeconômica da maricultura para produção de biomassa indicou viabilidade para mercado de extratos aplicáveis à agricultura (PEREIRA et al., 2020b).

A tecnologia de produção em sistemas *land-based* (figura 3-e) para produção de macroalgas marinhas possibilita melhor controle de variáveis como intempéries, além de permitir o adensamento e a produção intensiva. Apesar de pouco explorado no Brasil, essa ferramenta vem sendo sistematicamente implementada com avaliação de viabilidade, em estudo utilizando diversas macroalgas, inclusive a *H. pseudomusciformis* (NEORI et al., 2020). Em Israel, devido à limitação de recursos, promoveu avanços significativos na tecnologia (FRIEDLANDER, 2008), por outro lado, Canadá e outros países com tradição em maricultura estão sistematicamente aperfeiçoando a técnica com desenvolvimento de produtos e processos aplicados (HAFTING, 2012).

FIGURA 3 - Maricultura da macroalga.



Fonte: a - Panorama da aquicultura, b e c - (PEREIRA, S. A ET AL., 2020), d - (ASHKENAZIAB, D.Y et al., 2020)

Apesar desses avanços obtidos nas últimas décadas, os processos de produção foram desenvolvidos baseados exclusivamente a partir de mudas obtidas diretamente da natureza ou de ápices produzidos no cultivo e replantados. Essa condição não garante a sustentabilidade do processo a longo prazo, levando a perda do vigor e da qualidade da biomassa produzida, esse processo já é vastamente documentado para outras espécies cultivadas por esse tipo de produção de mudas, colocando em risco a biossegurança das indústrias de macroalgas na Ásia (KAMBEY et al., 2020).

A tecnologia de produção em sistemas *land-based* para produção de macroalgas marinhas possibilita melhor controle de variáveis e permite o adensamento e a produção intensiva, atendendo demanda do mercado de forma contínua e padronizada e explorando tecnologias que viabilizem a produção em escala (NEORI et al., 2020).

Os aspectos para a produção das macroalgas nos sistemas *land-based* englobam três aspectos relevantes: 1) esterilização da água do mar; 2) Soluções de nutrientes simples e de baixo custo e 3) design do sistema de produção.

No aspecto da esterilização de água do mar o objetivo principal envolve a redução do crescimento de outros organismos, especialmente microalgas que afetam negativamente os cultivos. Para tanto, a utilização de aquecimento, substâncias químicas e radiação ultravioleta são os tratamentos mais utilizados (SIMON et al., 2014; PENRU et al., 2013; JORQUERA et al., 2002).

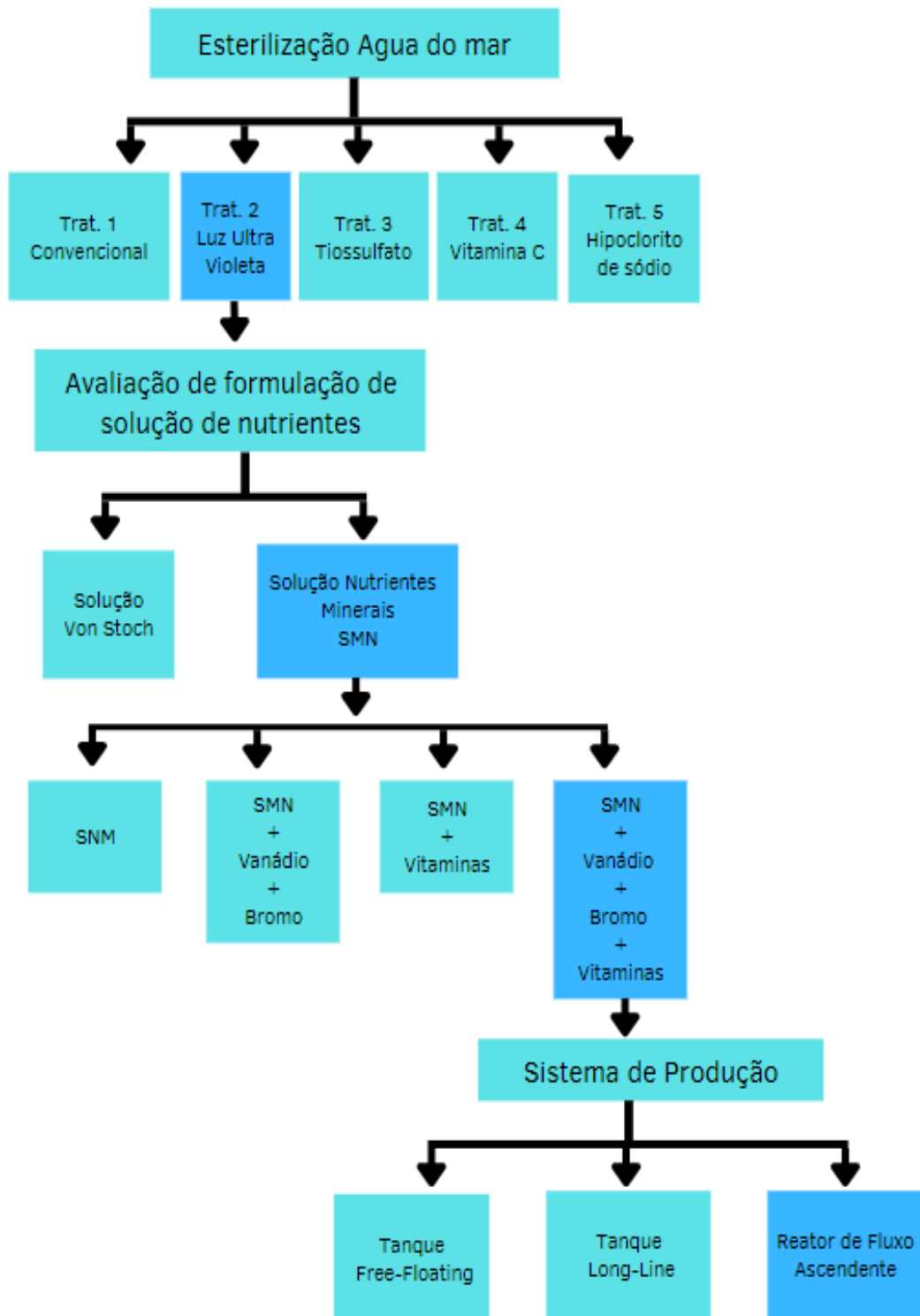
As soluções de nutrientes são fundamentais para o crescimento das macroalgas, atualmente os esforços de pesquisa estão focados no desenvolvimento da aquicultura integrada multitrófica no qual os efluentes da produção animal são utilizados como nutrientes para produção de biomassa das macroalgas (DUARTE et al., 2022; PARK et al., 2021). No entanto, esses processos são extremamente complexos para produção industrial e requerem mão de obra intensiva e especializada. O desenvolvimento de soluções adequadas representa uma possibilidade para a redução de custos e produção de biomassa com qualidade e padronizada (REDMOND et al., 2014).

Por fim, o desenvolvimento de infraestrutura, processos e sistemas de produção são fundamentais fazendas em *land-based*. Nesses “*Hatchery*” as condições substrato, aeração, movimento de água, irradiância, densidade e manejo influenciam diretamente a eficiência, qualidade e dinâmica da algicultura (FORBORD et al., 2020; SCHMEDES; NIELSEN, 2020).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado em duas fases, a primeira englobou a realização de 4 diferentes experimentos em laboratório e a segunda pela produção em escala piloto. As melhores condições selecionadas em cada experimento foram utilizadas como base para a etapa subsequente (figura 4).

FIGURA 4 -Fluxograma de atividades desenvolvidas. As caixas em azul escuro destacam a situação escolhida no experimento anterior que serviu de base para a situação do próximo experimento.



4.1 Viabilidade de técnicas propagação vegetativa para manutenção de matrizes e produção de mudas de diferentes isolados da macroalga *Hypnea pseudomusciformis*

A domesticação de macroalgas marinhas engloba uma série de etapas tecnológicas com envolvimento tanto de infraestrutura de equipamentos específicos quanto insumos e reagentes, fatores que elevam significativamente os custos dos processos laboratoriais (HAYASHI et al., 2020). Esses aspectos são obstáculos para a viabilidade comercial dessas tecnologias.

Inúmeras tecnologias, processos e infraestruturas já foram estabelecidas, especialmente para a maricultura da espécie *Hypnea pseudomusciformis* (PEREIRA et al., 2020). O estabelecimento de bancos de matrizes de algas mantidas em condição de cultivo é uma premissa fundamental para o desenvolvimento da produção de macroalgas em qualquer escala. No entanto, o desafio da semente ainda é uma das demandas mais urgentes para a nascente indústria de algicultura mundial (JIKSING et al., 2022). A biossegurança e viabilidade econômica e ambiental dos processos dependem do desenvolvimento e aprimoramento constante das técnicas e de produtos aplicados a esses sistemas (KAMBEY et al., 2020).

Em geral a abordagem para desenvolvimento de berçários industriais de algas marinhas envolve técnicas de micropropagação utilizando tanto estruturas reprodutivas maduras (gametófitos e esporófitos), estruturas de reprodução esporica assexuada por meio de monósporos ou obtenção de plântulas a partir de técnicas de fragmentação, seja pelo cultivo de segmentos apicais ou por regeneração de partes intermediárias do talo da alga (YOKOYA; YONESHIGUE-VALENTIN, 2011; BAWEJA et al., 2009).

Dessa forma, nessa fase realizamos as seguintes etapas: 4.1.1) Obtenção das matrizes; 4.1.2) Processo de esterilização da água do mar; 4.1.3) Avaliação de formulação solução de nutrientes para uso na manutenção de isolados e produção de biomassa.

4.2 Obtenção das matrizes

As matrizes da *Hypnea pseudomusciformis* foram obtidas a partir de diferentes linhagens coletadas em diferentes momentos e locais. Essa abordagem é fundamental para futura definição de cultivares mais produtivos, tanto em aspectos relacionados ao crescimento de biomassa quanto

à composição química. No presente trabalho foram obtidos sete isolados da espécie, apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - Linhagens isoladas utilizadas no desenvolvimento do projeto.

Isolado	Origem	Data	Fase de ciclo de vida
ES0120	Serra - ES	jan/20	Gametófito
ES0120a	Serra - ES	jan/20	Tetrasporófito
SP20	Peruíbe - SP	out/20	Gametófito
ES22	Serra - ES	mar/22	Gametófito
RJ22	Paraty - RJ	fev/22	Gametófito
RJ22a	Angra dos Reis - RJ	fev/22	Gametófito
SP22	Ubatuba - SP	fev/22	Gametófito

Os isolados ES0120 e ES0120a já haviam sido coletados e mantidos em laboratório de pesquisa na UNESP.

Os espécimes que deram origem aos isolados SP20, ES22, RJ22, RJ22a, SP22 foram coletados no litoral dos estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. As macroalgas foram trabalhadas durante dois meses seguindo o protocolo de descontaminação e isolamento de cultivos descrito por Fernandes et al. (2011).

Os ápices obtidos foram mantidos a baixa intensidade luminosa, densidade de fluxo fotônico de $15 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, visando manter a alga viva em estado mínimo de crescimento. A manutenção foi realizada com a troca semanal do meio de cultura. Foram utilizados

frascos de vidro de 120 ml, contendo 80 ml de meio de cultura. A vidraria utilizada tanto para o isolamento, quanto para a propagação das culturas foi autoclavada a 121°C durante meia hora e os cultivos foram mantidos em água do mar esterilizada (salinidade 25 ups e pH 7,8), enriquecida com solução de *von Stosch* 50% (VSES/2), 24 ± 2 °C, irradiância de 10 ± 5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com 12:12 h de ciclo de luz.

Nessa fase, a água do mar foi esterilizada por filtração em membrana de celulose Millipore AP 20 e submetida, por duas vezes, ao banho-maria durante 1 hora, contados após o início da fervura do banho. Os instrumentos utilizados no manuseio das algas foram esterilizados em etanol 70% e flambados, enquanto as vidrarias foram lavadas e esterilizadas em micro-ondas.

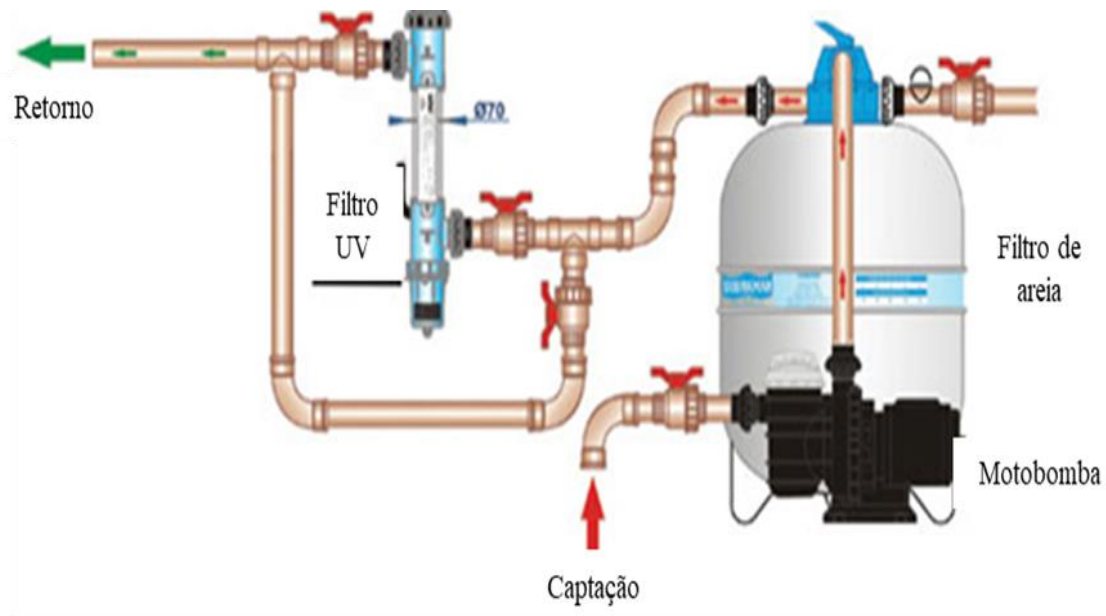
4.3 Esterilização da água do mar

EXPERIMENTO 1: Os meios de cultura foram preparados com água do mar na unidade de produção localizada em Ilha Comprida (SP), captada por meio de bomba submersa. Foram coletados 300 litros de água em período de maré alta, na salinidade adequada, sendo medida por meio de refratômetro portátil.

Após a coleta foram iniciados os testes de eficiência do processo de esterilização da água do mar para manutenção de matrizes e crescimento da biomassa de macroalga. Para tanto, a esterilização da água do mar foi avaliada por cinco diferentes tratamentos que serão descritos a seguir, visando reduzir tempo e custo aumentando a capacidade de produção de água do mar esterilizada. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas e cada repetição continha três segmentos apicais (100 mg) em frasco contendo 330 mL de meio de cultura. O experimento foi realizado em Estufa BOD com controle de temperatura e luminosidade.

Para todos, os experimentos a água do mar passaram um sistema de filtração mecânica, com filtro de areia até a água atingir transparência e não apresentar cor ou turbidez, processo conduzido com vazão de 3000 L/h (figura 5).

FIGURA 5 - Sistema de filtragem mecânica e microbiológica adaptado para esterilização da água do mar.



Foram realizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1) processo convencional (controle), filtragem em membrana Millipore AP 20 e aquecido duas vezes em banho-maria durante 1 hora, contados a partir do início da fervura, esse procedimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 5 litros.

Tratamento 2) Esterilização microbiológica com luz ultravioleta. Esse sistema foi montado acoplado a um tanque de 300 litros, com filtragem ultravioleta com vazão calibrada para 400 L/h durante 48 h com lâmpada de 9w.

Tratamento 3) Adição de 5 ml/L de hipoclorito de sódio (12%) para esterilização dos microrganismos presentes durante 24 h. Em seguida a solução foi tratada com uma solução 10 g/L de Tiosulfato de Sódio, da qual foram adicionados 2mL/L na água do mar clorada. A amostra foi mantida em descanso durante 24 h.

Tratamento 4) Adição de 5 mL/L de hipoclorito de sódio (12%) para esterilização dos microrganismos presentes durante 24 h. Em seguida à foi tratada com uma solução 4ppm de vitamina C diluída em 100mL de água destilada a cada 1L de água-marinha, foi mantido em descanso durante 24 h. A amostra foi mantida em descanso durante 24 h para remoção do hipoclorito de sódio.

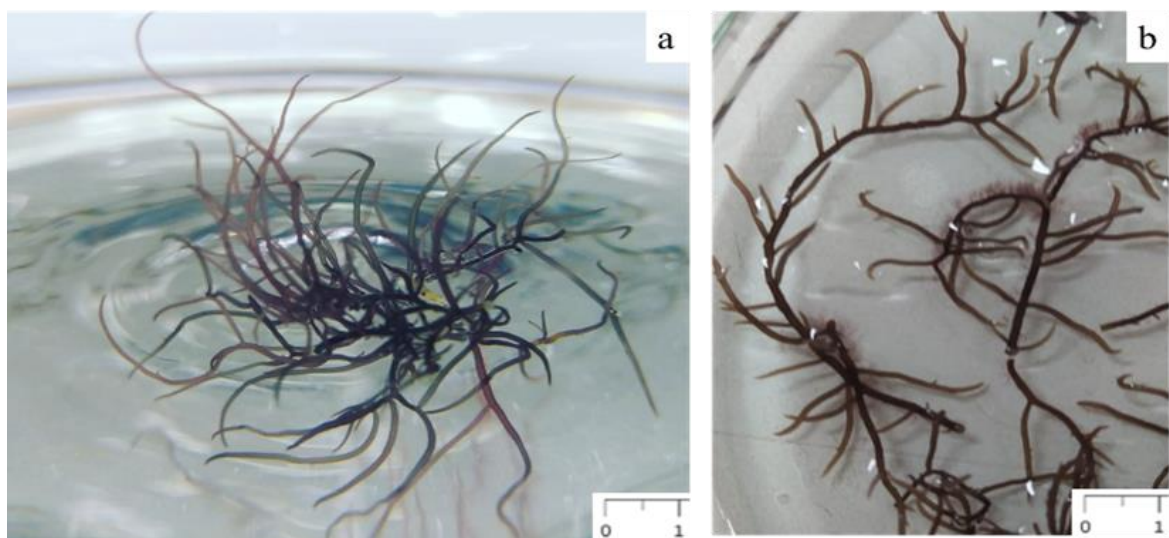
Tratamento 5) Adição de 5 mL/L de hipoclorito de sódio (12%) para esterilização dos microrganismos presentes durante 24 h. A remoção deste cloro ativo foi feita por meio de aeração com 50 L/min de ar.

As melhores condições foram submetidas ao teste de potencial de esterilização por longo prazo. Para tanto, foi avaliado por meio de ensaio realizado nas condições descritas no item 5. Dessa forma, potes de 100 ml esterilizados foram preenchidos com 80 ml provenientes do tratamento convencional e do tratamento industrial (n=5). Esses potes foram mantidos na incubadora por 30 dias ou até se observar algum crescimento de microalga ou organismo contaminante indesejado.

4.4 Avaliação de formulação de solução de nutrientes para uso na manutenção de isolados e produção de biomassa

Os experimentos foram todos conduzidos com o isolado ES0120 (Gametófito) que apresentou boa taxa de crescimento e principalmente menor severidade de contaminação por algas filamentosas, cianobactérias e diatomáceas (Figura 6).

FIGURA 6- A) Aspecto do cultivo unialgáceo da linhagem ES0120. b) aspecto dos cultivos contaminados com algas vermelhas filamentosas.



Os experimentos foram desenvolvidos de forma a avaliar estratégias para definir soluções de nutrientes “*Read to use*” de forma a facilitar os processos em larga escala, bem como o crescimento da macroalga em resposta à solução de nutrientes para determinação de sistema de cultivo para obtenção de biomassa.

Os segmentos apicais, cinco ápices por frasco com cinco frascos por tratamento, foram cultivados em 600 ml de meio, composto por água do mar estéril enriquecida, a qual foi totalmente repostada semanalmente, neste momento a macroalga foi pesada para avaliação de crescimento. Todos os experimentos foram conduzidos durante 28 dias.

EXPERIMENTO 2: Neste experimento foi avaliada a condição de controle composta por solução de nutrientes de *von Stoch* - VSES (modificada por Yokoya, 1996). O tratamento foi composto por solução de macro e micronutrientes minerais – SMN (minerais, preparada a partir da combinação das seguintes formulações na tabela 2. Adicionalmente foi realizado experimento com a SNM nas concentrações de 10, 25 e 50 mL/L.

TABELA 2 - Composição da solução mãe dos nutrientes adicionado meio de cultura composto por água do mar. VSES – von Stosch, SNM – Solução comercial de hidroponia.

Elementos	VSES	SMN
N	94,1%	36%
P	5,6%	9%
K	-	22%
Ca	-	15,60%
Fe	0,21%	0,15%
Enxofre	0,01%	3,00%
Mn	0,01%	0,05%
Mg	-	0,6%
Zn	-	0,001%
B	0,05%	0,04%
Cu	-	0,003%
Mo	-	0,01%
Cianocobalamina	0,00074%	-
Biotina	0,000001%	-
Tiamina	0,0059%	-

EXPERIMENTO 3: Este experimento utilizou a melhor condição de tratamento de esterilização de água do mar realizado no primeiro experimento. Foram avaliadas duas condições,

na primeira foi adicionado bromo (na forma KBr) e vanádio (na forma vanádio quelato). Esses dois elementos não são nutrientes essenciais para o crescimento da macroalga, mas foram considerados benéficos para o crescimento e para fisiologia nos cultivos *in vitro* (MACHADO et al., 2019; FRIES, 1982).

A segunda condição avaliada foi a adição do conjunto de biotina, tiamina e cianocobalamina. Essas vitaminas são substância que possuem efeitos benéficos fundamentais, especialmente no cultivo de algas vermelhas (REDMOND et al., 2014).

O experimento foi conduzido com quatro tratamentos: 1) Controle - Solução de nutrientes minerais (SNM); 2) Tratamento 1 - SNM + vanádio quelato e bromo na concentração de 50 mg/L e 10 ug/ml; 3) Tratamento 2 - SNM + Tiamina, cianocobalamina e biotina (0,006, 0,00075 e 0,000001 mg/L respectivamente e 4) tratamento 3 - SNM+ vanádio quelato e bromo + vitaminas. Essas soluções foram adquiridas em farmácia de manipulação em soluções 10.000 vezes concentradas para diluição direta em água do mar.

Taxa de crescimento

A massa da matéria fresca dos espécimes cultivados nos diferentes tratamentos foi determinada semanalmente utilizando balança analítica. Antes da pesagem, o excesso de água foi retirado utilizando papel absorvente. As taxas de crescimento relativo (TCR) foram calculadas utilizando a fórmula: $TCR = (In\ Massa\ final - In\ Massa\ inicial) / (Tempo\ final - Tempo\ inicial)$.

Condições laboratoriais

Todos os experimentos foram realizados em incubadora tipo BOD temperatura média de 23 ± 2 °C, ciclo de 12h luz: 12h escuro, densidade de fluxo fotônico de $60\ \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provenientes de uma lâmpada de LED de 30 W do tipo “luz do dia”.

4.5 Produção em *land-based* de *Hypnea pseudomusciformis*

A linhagem ES120, previamente selecionada na fase anterior, que apresentou maior capacidade de crescimento em resposta às condições estabelecidas, foi utilizada para produção de biomassa. Foram testados diferentes modelos de sistemas em escala piloto, sendo que cada um possui especificidades quanto a simplicidade de instalação e manejo, custo, uso de recursos (RENGEL et al., 2010).

Os meios de cultura foram preparados com água do mar na unidade de produção localizada em Ilha Comprida (SP), captada por meio de bomba submersa. Foram coletados 300 litros de água em período de maré alta, na salinidade adequada, sendo medida por meio de refratômetro portátil. Na primeira fase do projeto selecionamos o sistema de tratamento industrial baseado na filtragem mecânica, com filtro de areia, seguido de esterilização microbiológica com luz ultravioleta.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata. Os cultivos foram conduzidos em condições de iluminação e temperatura ambientais. A irradiação local dentro da água foi estimada em 670 e 400 μmol de fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na caixa clara e escura respectivamente. A temperatura média do ar foi de 27,5 °C no período experimental, no entanto houve máxima de 40 e mínima de 19 °C. A temperatura da água oscilou entre 20 e 31 °C na caixa transparente e 20 e 27,8 °C na caixa escura. O cultivo foi mantido com aeração intermitente de 20 L/min de ar durante 20 minutos a cada uma hora.

4.5.1. Sistema 1: produção em tanques *free-floating* com aeração

O sistema de produção de algas em tanques é comumente utilizado, nesta metodologia as mudas iniciais são dispostas e soltas em tanques que podem ter fluxo contínuo, intermitente ou de recirculação de água do mar (ZULDIN et al., 2016) ou serem cultivadas e sistema de batelada com enriquecimento com nutrientes e reposição periódica por meio de troca parcial de parte do volume. A aeração é fundamental para a melhora da perfusão do meio de cultura e ampliar a capacidade de crescimento das macroalgas cultivadas (LÜNING; PANG, 2003).

O experimento foi conduzido em unidades tanques de 70 L (volume útil de 50 L) compostos por caixas com medidas de: 66 cm (comp) x 41 cm (larg) x 38 cm (alt). Nessas caixas foram adicionadas a água do mar esterilizada e enriquecida com solução de macro e micronutrientes minerais (conforme condições adequadas definidas em experimento na fase de propagação de mudas em laboratório). O experimento foi conduzido inicialmente em caixas transparentes para maior fornecimento de luz para as algas. No entanto, questões como temperatura e crescimento de epífitas nos levou a conduzir experimento em paralelo com tanques escuros. Os resultados serão apresentados para ambos os tipos de tanques (Figura 7).

FIGURA 7 - Sistema de produção de macroalga em tanques de 50 L sem circulação de água do mar.



4.5.2 Sistema 2: Produção em tanques com *long-line* tipo rede tubular

Esse sistema foi conduzido em condições similares ao anterior, com a diferença de que as macroalgas foram colocadas em redes tubulares. Essa estratégia foi adotada em função de três aspectos: 1) explorar o hábito epifítico da espécie, que possui gavinhas para se enganchar em substratos (REIS et al., 2003); 2) tornar mais simples rápido o processo de plantio, biometria e colheita da macroalga; 3) fornece condições mais uniformes e constantes para crescimento (NEORI et al., 2020) (Figura 8).

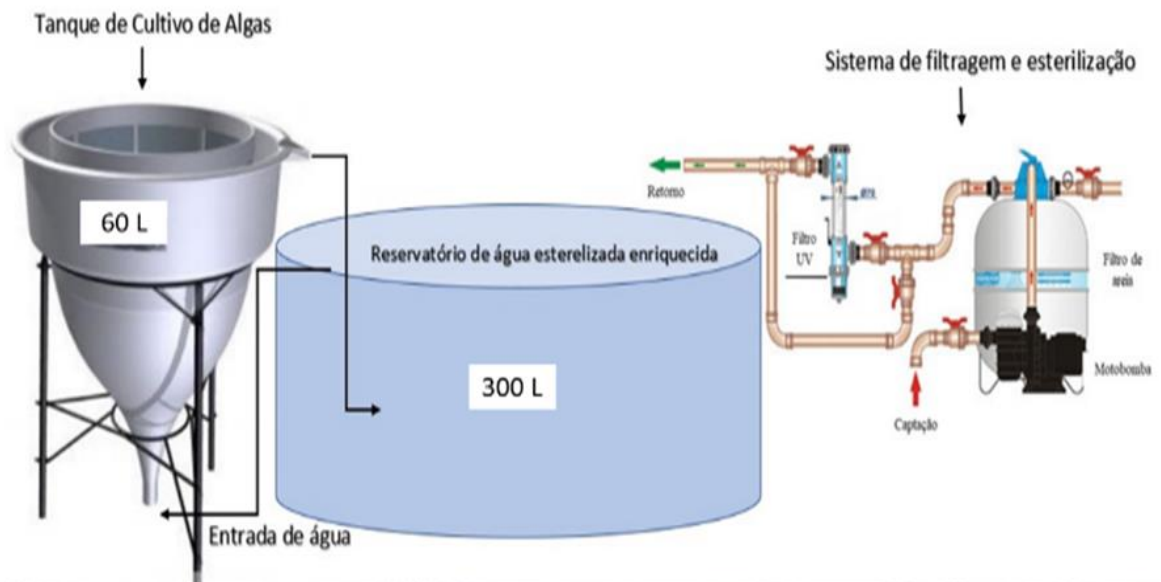
FIGURA 8 - Plantio das mudas de *Hypnea pseudomusciformis* produzidas em laboratório em rede tubular para cultivo em sistema *land-based*.



4.5.3. Sistema 3: Produção em reator de fluxo ascendente em sistema *free-floating*

A estrutura foi montada com tanques cônicos do tipo incubadora para ovos e alevinos de peixes. O sistema foi composto por três tanques de 60 L, o fluxo de água foi criado por meio de bombas submersas de circulação com vazão de 400 L/h. Essas bombas foram inseridas em um reservatório de 300 L contendo a água do mar enriquecida com nutrientes minerais. Dessa forma a bomba inseriu água do mar pelo fundo do tanque cônico que voltava para o reservatório por gravidade. A macroalga foi plantada no sistema *free - floating* (SCHMEDES; NIELSEN, 2020) (Figura 9).

FIGURA 9 - Cultivo de *Hypnea pseudomusciformis* em tanques cônicos de 60 L fluxo ascendente no modo *free-floating*.



4.6 Taxa de crescimento das macroalgas

Em cada tanque foram plantadas as macroalgas micropropagadas em laboratório na densidade inicial de 100 mg/L. Os cultivos foram conduzidos por 21 dias com monitoramento semanal de crescimento por meio da avaliação da biomassa fresca e cálculo da taxa de crescimento específico (TCR) em porcentagem por dia conforme a seguinte fórmula: $TCR = (In\ Massa\ final - In\ Massa\ inicial) / (Tempo\ final - Tempo\ inicial)$.

4.7 Análises bioquímicas das macroalgas

Em função da demanda de biomassa essas análises foram realizadas apenas com as macroalgas produzidas no sistema *land-based* que obtivemos as melhores taxas de crescimento e produção de biomassa

4.7.1 Determinação de micro e macronutrientes minerais na macroalga

As amostras de biomassa seca trituradas foram enviadas para o Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas – LAFEN, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Registro, sendo determinados os teores de micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn e Zn) e macronutrientes (N; P; K; Ca; Mg e S). O N pelo método Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006), o P por colorimetria, o S por turbidimetria do sulfato de bário, o B por Azometina-H e o K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nítrico-perclórica segundo propostos por Malavolta et al. (1997). Os resultados foram expressos em teores de g do elemento por kg de biomassa seca (g/kg).

4.7.2 Análise de conteúdo de proteínas totais

A porcentagem de proteína bruta (PB) de biomassa seca foi determinada pelo método de Kjeldahl (Equação 6). Na determinação da proteína bruta, o valor de nitrogênio total encontrado na análise de macronutrientes foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25 utilizado para plantas forrageiras, rações concentradas, entre outros materiais. Considerando assim, que a maioria das

proteínas contêm nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio (GALVANI; GAERTNER, 2006).

$$\%PB = NT \times FN \text{ (6)}$$

Onde: PB: teor de proteína bruta na amostra; FN: fator de conversão de 6,25.

4.7.3 Extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes

A extração de pigmentos fotossintetizantes foi realizada pela trituração de 80mg de massa fresca em nitrogênio líquido de amostras de cada repetição (n=3). Ao material triturado foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4 °C. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 14000 g a 4 °C. O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi mantido no escuro em *eppendorfs*, para posterior leitura em espectrofotômetro.

O sedimento foi ressuspendido em acetona 90% para obter um homogeneizado e foi centrifugado a 12000 g a 4 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante (contendo a clorofila e carotenóides) foi transferido para *eppendorfs* e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro. As concentrações Jeffrey e Humphrey (1975) Lichtenthaler (1987) para os carotenóides totais e por Lorenze e Jeffrey (1980) para astaxantina e β -caroteno, respectivamente, e estão representadas na tabela 3.

TABELA 3 - Equações utilizadas para quantificar as concentrações de clorofila a (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) segundo Jeffrey e Humphrey (1975) e Lichtenthaler (1987) para os carotenóides totais e por Lorenze e Jeffrey (1980) para astaxantina e β -caroteno

Pigmento	Equação
Clorofila a (Cla)	$\text{Cla} = 12,25 A_{664} - 2,79 A_{647}$
Clorofila b (Cb)	$\text{Clb} = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{664}$
Carotenóides Totais (CT)	$\text{CT} = [1000 A_{470} - 1,82\text{Ca} - 104,96 \text{Cb} / 198]$
Astaxantina (As)	$\text{As} = 4,59 A_{468}$
β -caroteno (Bc)	$\text{Bc} = 4,0 A_{454}$

$A_{498,5}$ = Valor da absorbância no comprimento de onda de 498,5 nm; A_{614} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 614 nm; A_{630} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 630 nm; A_{647} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 647 nm; A_{651} = Valor da absorbância no comprimento de onda de 651nm.

Os valores obtidos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram convertidos para mg de pigmento por g de massa fresca, considerando a biomassa inicial (80 mg) utilizada para a extração.

4.8 Análise dos resultados

Os resultados do experimento, conduzido de forma inteiramente casualizada, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial e a identificação de diferenças estatisticamente significativas realizada pelo teste de *Tukey* no programa *Assistat* 7.5 beta.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Avaliação de formulação de solução de nutrientes para uso na manutenção de isolados e produção de biomassa

EXPERIMENTO 1

A água do mar captada teve os seguintes parâmetros: salinidade de 27 e pH de 7.8. Nas condições avaliadas no experimento de esterilização da água do mar foi possível verificar que na condição do local de captação de água do mar o tratamento industrial necessitou de 30 h para reduzir a cor da água e a turbidez para condições adequadas para manutenção dos cultivos de laboratório (Figura 10).

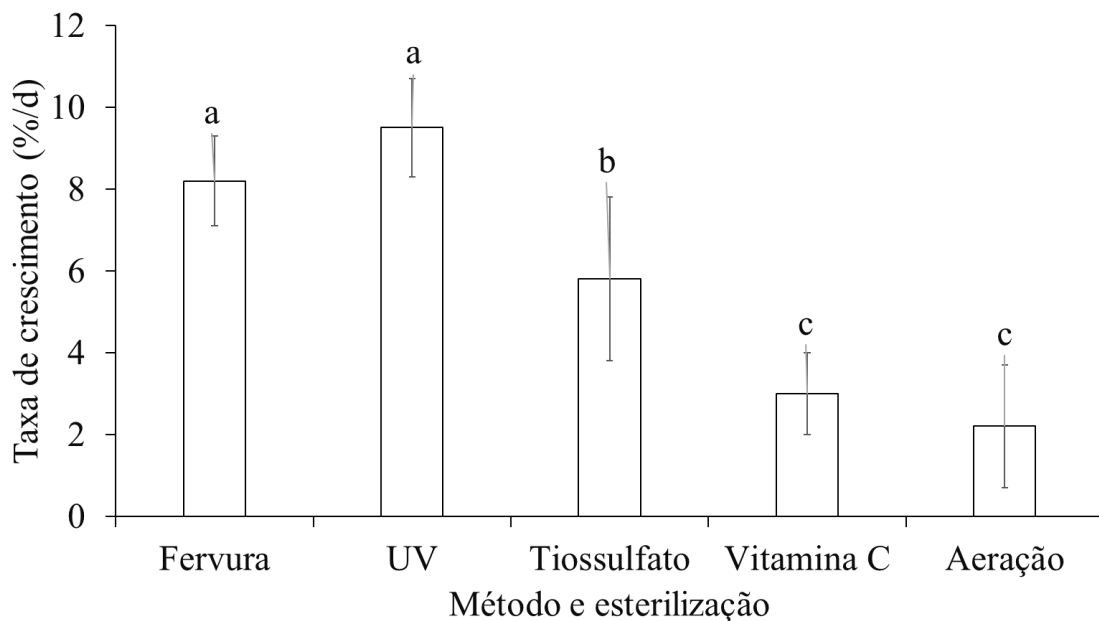
FIGURA 10 - Aspecto da água no momento da captação e após 30 h de filtragem mecânica em filtro de areia na vazão de 3000 l/h.



Os talos de *Hypnea pseudomusciformis* apresentaram diferentes taxas de crescimento quando cultivados na água do mar submetida a tratamentos para esterilização (Figura 11). A maior

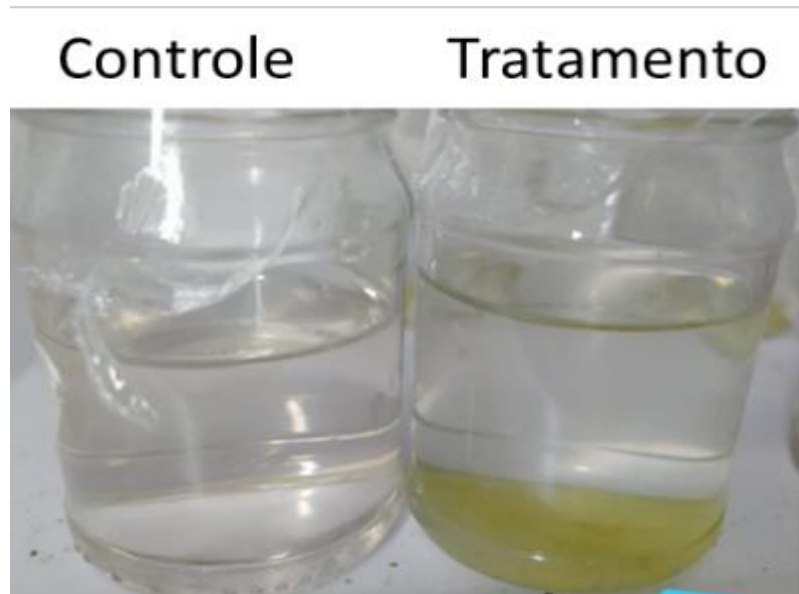
taxa de crescimento foi obtida no tratamento 2 (esterilização com ultravioleta) e 1 tratamento convencional, que diferiram significativamente dos demais ($F = 28.2252$, $p < 0.001$).

FIGURA 11 - Taxa de crescimento dos talos de *Hypnea. pseudomusciformis* em resposta a diferentes métodos de esterilização de do mar após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $60 \text{ micro mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade de 25 e ciclo de luz de 12:12 h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela anova unifatorial e teste de *Tukey* a 1%.



A esterilização por ultravioleta na vazão de 400 L/h com filtro equipado com lâmpada de 9w foi eficiente para manter as condições da água adequadas para o cultivo em laboratório por 35 dias. Após esse prazo foi observado o início de crescimento de diatomáceas no frasco (figura 12), fator que ameaça a qualidade de manutenção das mudas.

FIGURA 12 – Aspecto do controle (esterilização convencional) e do tratamento (esterilização com ultravioleta) após 35 dias de manutenção em laboratório nas condições de 23 ± 2 °C, ciclo de 12h luz: 12h escuro, salinidade 27, pH 7,8, densidade de fluxo fotônico de $60 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

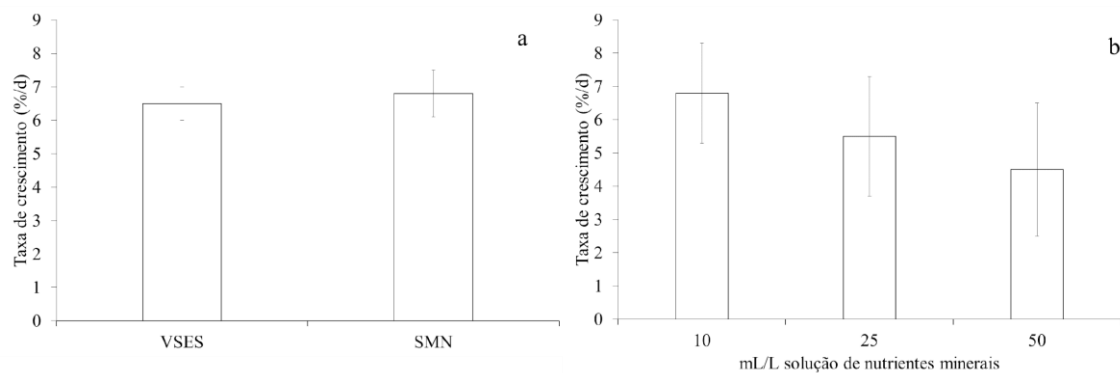


As diatomáceas foram controladas em cultivo com o uso de dióxido de germânio na concentração de 1mg/L (FERNANDES et al., 2011). No entanto, essa prática se torna inviável para utilização em escala industrial. Dessa forma serão realizados testes complementares com redução da vazão no filtro ultravioleta e redução do volume filtrado em cada ciclo (PENRU et al., 2012).

EXPERIMENTO 2

A linhagem ES0120 de *H. pseudomusciformis* foi cultivada em 600 ml de água do mar esterilizada e diferentes condições de enriquecimento por nutrientes. Os resultados observados (figura 13) indicaram ausência de diferenças significativas em resposta a diferentes doses de solução de macro e micronutrientes minerais (SNM) solução de von Stosch (VSES). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo selecionada a condição SMN 10mL por litro de água do mar.

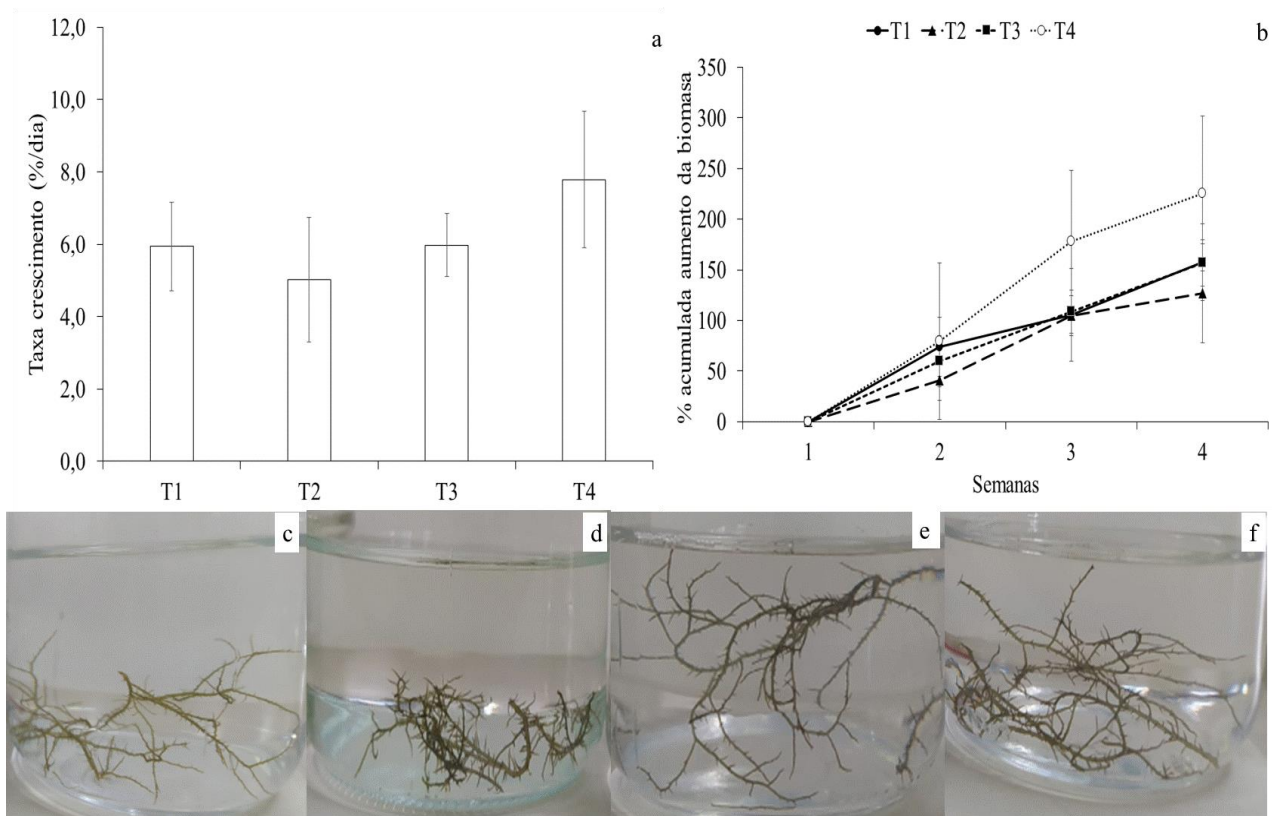
FIGURA 13 - Taxa de crescimento dos talos de *Hypnea pseudomusciformis* em resposta a soluções de nutrientes. a) após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade de 25 e ciclo de luz 12:12 h. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). (a) enriquecimento com solução de nutrientes minerais nas concentrações 10, 25 e 50 mL/L. (b) crescimento em resposta a solução de von *Stosch* e SNM 10 mL/L.



EXPERIMENTO 3

Após a seleção da melhor condição das soluções de nutrientes foi avaliado a adição de substâncias visando melhorar a condição de cultivo da macroalga. Não foram observadas diferenças significativas, no entanto a condição T4 indica maior potencial de acúmulo de biomassa para realização de cultivos em longo prazo (Figura 14).

FIGURA 14 - A) Taxa de crescimento (b) % acumulada semanalmente de biomassa dos talos de *Hypnea pseudomusciformis* em resposta a soluções de nutrientes após 28 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, salinidade de 25 ups e ciclo de luz 12:12 h. T1 - nutrientes minerais (SNM- 10mL/L); 2) T2 - SNM + van\u00e1dio e bromo quelato na concentra\u00e7\u00e3o de 50 mg/L e 10 ug/L; 3) T3 - SNM + Tiamina, cianocobalamina e biotina (0,006, 0,00075 e 0,000001 mg/L respectivamente e T4 - SNM+ van\u00e1dio e bromo + vitaminas. Imagens algas ap\u00f3s 28 dias de cultivo (c) T1 (d) T2; (e) T3 (f) T4.



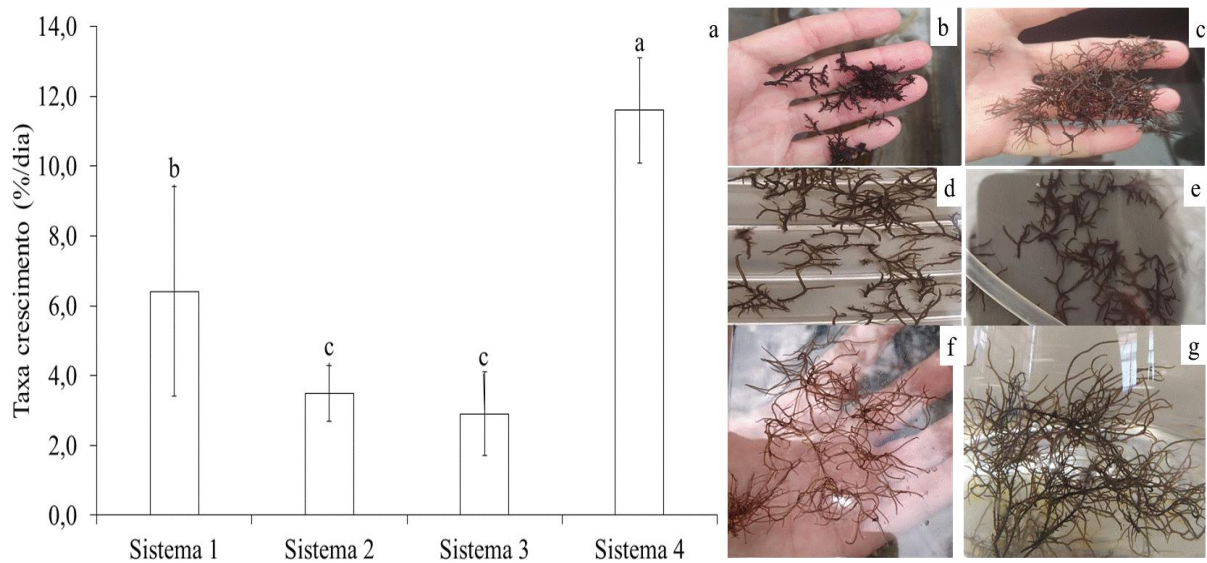
5.2 Produ\u00e7\u00e3o em land-based e comercializa\u00e7\u00e3o de *Hypnea pseudomusciformis*

EXPERIMENTO 4

A taxa de crescimento relativo diferiu significativamente nos tratamentos avaliados ($F = 24.2252$, $p < 0.001$). O tratamento em tanque c\u00f4nico com fluxo ascendente apresentou os resultados superiores frente aos demais sistemas, sendo registrado $11,59 \pm 1,2 \text{ %/dia}$ para TCR. A menor taxa

de crescimento foi observada no tratamento com as algas cultivadas em tanque e com rede tubular, TCR de $2,53 \pm 1,2$ %/dia (Figura 15).

FIGURA 15 - Taxa de crescimento relativo (%/dia) da macroalga *Hypnea pseudomusciformis* em resposta aos diferentes sistemas de cultivo *land-based* em escala piloto de produção. Linhas verticais representam desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pela Anova unifatorial e teste de *Tukey* a 1%. Sistema 1 Caixa clara (d); 2 Caixa escura; (e) 3) *long-line* rede tubular (b) e 4) tanque cônico de fluxo ascendente (f) (g).



Ainda sim os resultados obtidos indicaram elevado potencial de produção de biomassa dessa macroalga, muito superior aos 2,85 %/d (REIS et al., 2006) e 5,7 %/d (PEREIRA et al., 2020) em cultivos realizados na maricultura e aos verificados por Neori et al. 2020 em *land-based*.

Estudos indicam que o potencial bioestimulante dos extratos de macroalgas marinhas possuem correlação positiva com a quantidade de proteínas e minerais disponíveis (tabela 4) na matéria prima utilizada para obtenção do bioprodutos (MACHADO et al., 2018; SANTOS et al., 2021).

TABELA 4 – Proteínas e Macro e micronutrientes na Biomassa seca de *Hypnea Pseudomusciformis* cultivadas em *land-based*, Mix macroalgas arribadas, *Kappaphycus alvarezii* e *Ascophyllum nodosum*. Valores apresentam médias e o desvio padrão (n=3).

	<i>Hypnea pseudomusciformis</i> ¹	Mix macroalgas arribadas ²	<i>Kappaphycus alvarezii</i> ³	<i>Ascophyllum nodosum</i> ⁴
Proteínas totais (g.kg⁻¹)	250	137,25	19,24	87
Macronutrientes (g.kg⁻¹)				
N	40	22	3,1	13,9
P	2,3	1,7	1,2	ND
K	32	33	41	378,1
Ca	33	42	8,4	9,8
Mg	7,5	6,9	7,4	8,6
S	21,0	1,7	110,2	ND
Micronutrientes (mg.kg⁻¹)				
B	43	81	28,1	ND
Cu	8,3	8,3	7,6	ND
Fe	1170	1730	65,9	13,3
Mn	170	176	11,0	1,96
Zn	28	22	18,5	ND

Fonte: ¹Presente estudo; ² Informação pessoal Cia das Algas; ³Kumar et al., 2015; ⁴Lorenzo et al., 2017.

Ao analisar a tabela acima podemos observar que os valores de macro e micronutrientes minerais das principais macroalgas utilizadas como matéria primas para desenvolvimento de biofertilizante já em fase comercial: Mix de macroalgas (Cia das algas) *Kappaphycus alvarezii* (recentemente introduzida e cultivada em maricultura no Brasil para este fim) e *Ascophyllum nodosum* (empresa Acadian seaplants) foram muito similares aos verificados no presente estudo. Destacando-se os teores de nitrogênio e fósforo como atributos fundamentais para os biofertilizantes.

Os valores obtidos no nosso sistema de produção, para proteínas totais foram equivalentes aos observados para espécies em unidades de produção comercial de aquicultura integrada multitrófica em Israel (NEORI et al., 2020).

Em análise ao gráfico denota-se que os valores da *Hypnea pseudomusciformis* são superiores aos da *Kappaphycus alvarezzi*, espécie exótica introduzida para maricultura no Brasil, e principal matéria prima para biofertilizantes derivados de macroalgas (HAYASHI et al., 2017).

Diversos estudos demonstram que quanto maior a quantidade de proteína existente nas algas, maior é o seu potencial bioestimulante, e no caso em estudo, a *Hypnea pseudomusciformis* é a que apresenta maior teor proteico. De acordo com Soares et al., Machado (2021, 2018), foi demonstrado que algas que tinham conteúdos superiores a 18% apresentaram maior potencial de estímulo à germinação e crescimento vegetal.

Ao realizarmos uma pesquisa de mercado, identificamos que o valor do produto da empresa Cia das Algas, extrato de *mix* de algas arribadas é comercializado ao preço de R\$ 45,00 (quarenta e cinco reais) o litro, o valor do produto da empresa Acadian Seaplants, extrato de *Ascophyllum nodosum* é vendido a R\$ 150,00 (cento e cinquenta reais) o litro, já o extrato de algas de *Kappaphycus alvarezzi* é vendido pela empresa Algar Tech a R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) o litro.

Por fim, os valores observados na composição de pigmentos da macroalga cultivada com a solução de nutrientes minerais acrescida de bromo, vanádio e vitaminas é apresentada na tabela 5. Sendo que tais valores são similares aos obtidos por Machado et al. (2019), no cultivo de macroalga vermelha em meio de cultura enriquecida com bromo.

TABELA 5 – Concentração de Pigmentos Fotossintetizantes na macroalga Biomassa seca de *Hypnea pseudomusciformis* cultivadas em *land-based*. Valores apresentam médias e desvio padrão (n=3).

Pigmentos	(mg.g)
Clorofila a	0,63±0,17
Clorofila b	0,06±0,03
Astaxantina	0,06±0,02
β-caroteno	0,14±0,04
Carotenóides TOTAIS	0,69±0,01

A microalga *Haematococcus pluvialis* vem sendo utilizada mundialmente como fonte de carotenoides tanto para alimentação humana e animal, o conteúdo de carotenoides totais dessa microalga é de 16%, enquanto os de proteínas é de 29% (MULARCZYK et al., 2020). No presente estudo observamos valores de 6,9 e 25% respectivamente indicando que a *H. pseudomusciformis* produzida na planta piloto de bioprocessos é adequada como fonte nutracêutica.

Os antioxidantes naturais, carotenos, são fundamentais para o desenvolvimento de bioprodutos aplicados ao agronegócio, como os bioestimulantes vegetais. Essas moléculas desempenham papel fundamental na resposta fisiológica das plantas e na defesa de condições de estresse ou patógenos (BOUKHARI et al., 2020).

6. CONCLUSÃO

Dessa forma, são apresentados produtos e processos para desenvolvimento e manutenção de matrizes de macroalgas por propagação vegetativa e produção de biomassa em sistema de cultivo *land-based*.

Todos os experimentos propostos no projeto foram concluídos, assim, as próximas etapas serão de aperfeiçoamento da revisão de literatura e da discussão para defesa da dissertação.

O primeiro processo aprimorado foi a esterilização de água do mar em escala industrial utilizando filtro mecânico com areia e filtro biológico com lâmpada ultravioleta. Esse sistema foi avaliado para produção de 300 litros de água do mar. No entanto, pode ser facilmente expandido para maiores volumes. A principal contribuição deste estudo foi determinar que a qualidade da água do mar é adequada tanto para cultivo em laboratório quanto para produção de biomassa.

A solução de nutrientes “*read to use*” baseada em fertilizantes minerais para hidroponia e complementada com bromo e vanádio quelatos e com as vitaminas (tiamina, biotina e cianocobalaminas) foi o produto desenvolvido nesta pesquisa. Essa solução é viável para enriquecer 50.000 L de água do mar ao custo de R\$ 300. O protótipo dessa solução ainda pode ser aperfeiçoado para obter resposta de maiores taxas de crescimento da macroalga.

Por fim, avaliamos que tanques de fluxo ascendente foram o melhor sistema para produção de biomassa na unidade piloto de produção. No experimento foi adaptado um tanque cônico utilizado para berçário de piscicultura. Essa estrutura não é adequada para implantação de uma fazenda, sendo necessários o aprimoramento e desenvolvimento de estruturas específicas.

A biomassa produzida com taxas de crescimento de 11,59% ao dia, valor que permitiu acumular 200% em biomassa ao longo de 28 dias de produção em unidade experimental apresentou composição química adequada quando comparada com outras matérias primas que estão sendo utilizadas para produção de biofertilizante comercial baseado em macroalgas marinhas.

Por fim, o presente trabalho contempla o desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologia de bioprocessos para sistema *land-based* de aquicultura em escala piloto para produção de biomassa macroalga marinha com composição química adequada para utilização como matéria prima aplicada em bioprodutos aplicados ao agronegócio e outros setores.

7. REFERÊNCIAS

- ALEMAÑ, A. E.; ROBLEDO, D.; HAYASHI, L. *Development of seaweed cultivation in Latin America: current trends and future prospects*. *Phycologia*, v. 58, p. 462-471, 2019.
- ASHKENAZIAB, D.Y.; SEGAL, Y.; BEN-VALID, S.; PAZ, G.; TSUBERY, M.N.; SALOMON, E.; ABELSONA, A.; ISRAELB, A. Enrichment of nutritional compounds in seaweeds via abiotic stressors in integrated aquaculture, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 80, 103067, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103067>.
- BAWEJA, P.; SAHOO, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, P.; ROBAINA, P.R. *Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects*. *Phycological Research*; v. 57, p.45–58, 2009.
- BERCHEZ, F.A.S.; PEREIRA, R.T.L.; MARQUES, H.L. A influência da predação na maricultura de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Ínsula* 19:71-82, 1989.
- BOUKHARI, M. M.; BARAKATE, M.; BOUHIA, Y; LYAMLOULI, K. *Trends in Seaweed Extract Based Biostimulants: Manufacturing Process and Beneficial Effect on Soil-Plant Systems*. *Plants*, v. 359, n. 9, p. 1-23, 2000.
- BRAKEL, J.; SIBONGA, R. C.; DUMILAG, R. V.; MONTALESCOT, V.; CAMPBELL, I.; COTTIER-COOK, E. J.; GACHON, C. M. M. *Exploring, harnessing and conserving marine genetic resources towards a sustainable seaweed aquaculture*. *Plants, People, Planet*, v. 3, n. 4, p. 337–349, 2021. doi:10.1002/ppp3.10190.
- BUSCHMANN, A.H; CAMUS, C.; INFANTE, J.; NEORI, A.; ISRAEL, A.; HERNÁNDEZGONZÁLEZ, M. C.; PEREDA, S. V.; GOMEZ-PINCHETTI, J.; GOLBERG, A.; TADMORSHALEV, N.; CRITCHLEY A. T. *Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity*, *European Journal of Phycology*, v. 52, n. 4, p. 391-406, 2017.
- CARDOZO, K H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M P.; FALCÃO, V R.; TONON, A.P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. *Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*, v. 14, p. 60-78, 2007.
- CARVALHO, R.P.; PASQUAL, M.; SILVEIRA, H.R.O.; MELO, P.C.; BISPO, D.F.A.; LAREDO, R.R.; SALDANHA, L.A. “Niágara Rosada” table grape cultivated with seaweed extracts: physiological, nutritional, and yielding behavior. *Journal of Applied Phycology* v. 31, p. 2053–2064, 2019.
- CIRCUNCISÃO, A.R.; CATARINO. M.D.; CARDOSO, S.M.S.; SILVA, A.M.S. *Minerals from Macroalgae Origin: Health Benefits and Risks for Consumers*. *Marine Drugs* Mar. Drugs v. 16, n. 11, p. 400, 2018. <https://doi.org/10.3390/md16110400>.

DUARTE, C.M.; BRUHN, A.; KRAUSE-JENSEN, D. *A seaweed aquaculture imperative to meet global sustainability targets*. *Nat Sustain* v. 5, p. 185–193, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00773-9>. Acesso em: 18 de set. de 2022.

FERNANDES, D.R.P.; YOKOYA, N.S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. *Protocol for seaweed decontamination to isolate unialgal cultures*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 21, p. 313-316, 2011.

FORBORD, S.; STEINHOVDEN, K.B.; SOLVANG, T. et al. *Effect of seeding methods and hatchery periods on sea cultivation of *Saccharina latissima* (Phaeophyceae): a Norwegian case study*. *J Appl Phycol* v. 32, p. 2201–2212, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01936-0>.

FREITAS. M.V.; PACHECO. D.; COTAS., J.; MOURA. T.; AFONSO. C.; PEREIRA. L. *Red Seaweed Pigments from a Biotechnological Perspective*. *Phycology* v. 2, n. 1, p. 1-29, 2022.

FRIEDLANDER, M. *Israeli R & D activities in seaweed cultivation*. *Israel Journal of Plant Sciences*, v. 56, n. 1-2, p. 15-28, 2008.

FRIES, L. *Influence of iodine and bromine on growth of some red algae in axenic culture*. *Physiologia Plant*. v. 19, p. 800-808, 1996.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. *Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 9 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, n. 63).

GANESAN, M.; SAHU, N.; ESWARAN, K. *Raft culture of *Gracilaria edulis* in open sea along the south-eastern coast of India*. *Aquaculture*, v. 321, n. 2, 145-151.x. 2011.

HAFTING, J. T.; CRAIGIE, J. S.; STENGEL, D. B.; LOUREIRO, R. R.; BUSCHMANN, A. H., YARISH, C.; CRITCHLEY, A. T. *Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives*. *Journal of Phycology*, v. 51, n. 5, p. 821–837, 2015.

HAFTING, J.T.; CRITCHLEY, A.T.; CORNISH, M.L.; HUBLEY, S.A.; ARCHIBALD, A.F. *On-land cultivation of functional seaweed products for human usage*. *Journal of Applied Phycology*, 24, 385-392, 2012.

HAYASHI, L.; CANTARINO, S.; CRITCHLEY, A. T. *Challenges to the future domestication of seaweeds as cultivated species: understanding their physiological processes for large-scale production*. *Advances in Botanical Research*, v. 95, p. 1-27, 2020.

HAYASHI, L.; REIS, R.P.; DOS SANTOS, ALEX ALVES.; CASTELAR, B.; ROBLEDO, D.; VEGA, G.; BATISTA.; M, FLOWER E.; ESWARAN, K.; YASIR, S.; ALI, M.K.M.; HURTADO, A.Q. *The Cultivation of *Kappaphycus* and *Eucheuma* in Tropical and Sub-Tropical Waters*. In: Hurtado, A.Q. Critchley A.T., Iain C. N. (Org.). *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities*. 1 ed.: Springer International Publishing, v. , p. 55-90, 2017.

Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NDU4Ng==>. Acesso em: 18 de set. de 2022.

JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. *New espectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. v.167, p. 191-194, 1975.

JKSING, C.; ONGKUDON M.M.; THIEN V.Y.; RODRIGUES, K.F.; YONG, W.T.L. *Recent advances in seaweed seedling production: a review of eucheumatoids and other valuable seaweeds*. *Algae*; 37(2): 105-121, 2022.

JORQUERA, A.M.; VALENCIA, G.; EGUCHI, M.; KATAYOSE, M.; RIQUELME, C.; *Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using electrolytic water treatment*, *Aquaculture*, Volume 207, Issues 3–4, 2002, Pages 213-224, 2002.

KAMBEY, C. S. B.; CAMPBELL, I.; SONDAK, C. F. A.; NOR, A. R. M.; LIM, P. E.; COTTIER-COOK, E. J. *An analysis of the current status and future of biosecurity frameworks for the Indonesian seaweed industry*. *Journal of Applied Phycology*, 32, 2147–2160, 2020.

KARTHIKEYAN, K.; SHANMUGAM, M. *The effect of potassium-rich biostimulant from seaweed*. *Journal of Applied Phycology* volume 29, pages 3245–3252, 2017.

LICHTENTHALER, H. K. *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*. *Methods in enzymology*, v. 148, p. 350-382, 1987.

LORENZEN, C. J.; JEFFREY, S.W. *Determination of chlorophyll in seawater. Report of intercalibration tests*. (1980) *Unesco Technical papers in marine science*. v. 35, 21 p, 1980.

LORENZO, J.M.; AGREGÁN, R.; MUNEKATA, P.E.S.; FRANCO, D.; CARBALLO, J.; SAHIN, S.; LACOMBA, R.; BARBA, F.J. *Proximate Composition and Nutritional Value of Three Macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata**. *Mar. Drugs* 2017, 15(11), 360.

LOUREIRO, R.; GACHON, C.M.M.; REBOURS, C. *Seaweed cultivation: potential and challenges of crop domestication at an unprecedented pace*. *New Phytologist*, v. 206, n. 2, p. 489-492, 2015.

LUNING K.; PANG, S. *Mass cultivation of seaweeds: Current aspects and approaches*. *Journal of Applied Phycology*, 15, 115-119, 2003.

MACHADO, L.P. et al. *Effects of bromide-enriched natural seawater culture medium on protein and monoterpenes output of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Gigartinales)*. *J Appl Phycol* 31, 3831–3839, 2019.

MACHADO, L.P.; SANTOS, N. H. S.; BASTOS, K. V.; COSTA, D. M. *Biostimulant effect of seaweed extracts applied on beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Cultura Agronômica, v. 27, p. 101-110, 2018.

MACHADO, L.P. Determinação dos metabolitos com atividade antifúngica e cultivo em biorreatores para obtenção de bioativos de *Ochtodes secundiramea* e de linhagens pigmentares de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente - São Paulo, 203 p.2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípio e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós. 319 p, 1997.

MALWINA, M.; IZABELA, M.; KRZYSZTOF, M. *Astaxanthin and other Nutrients from Haematococcus pluvialis—Multifunctional Applications*. Marine Drugs, 18(9), 459, 2020.

MARINHO-SORIANO, E. *Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil*. Journal of Applied Phycology, v. 29, n. 2, p. 665–671, 2017.

PANORAMA DA AQUICULTURA. *Macroalgas Marinhas de Valor Comercial*.1997. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/macroalgas-marinhas-de-valor-comercial/>. Acesso em: 13 de março de 2023.

MARTINS, A.P. Potencial biotecnológico de macroalgas marinhas. Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade de São Paulo - USP, 199 p, 2013.

MARTINS A.P.; NECCHI JR.; O., COLEPICCOLO, P.; YOKOYA, N. S. *Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). Revista Brasileira de Farmacognosia, v.2 p. 340-348, 2011.

MARTINS, A.P.; YOKOYA, N.S. *Intraspecific variation in the colour morphs of Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. Hoehnea, v. 37, p.599-613, 2010.

MARTINS, A.P.; YOKOYA, N. S.; CARVALHO, M.A.M.; PLASTINO, E. M. *Effects of kinetin and nitrogen on growth rates, pigment and protein contents in wild and phycoerythrindeficient strains of Hypnea musciformis* (Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, v. 20, p.767–773, 2007.

NAUER, F.; AYRES-OSTROCK, L.; AMORIM, A.M.; SANTOS, J.P.; CHOW, F.; PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, M.C. = *Life history, growth, and pigment content of two morphological variants of Hypnea pseudomusciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). J Appl Phycol 31:1271–1284, 2019.

NAUER, FABIO.; CASSANO, VALÉRIA.; OLIVEIRA, MARIANA C. *Description of Hypnea pseudomusciformis* sp. nov., a new species based on molecular and morphological analyses, in the context of the *H. musciformis* complex (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, v. 27, p. 2405-2417, 2015.

NAYAR, S.; BOTT, K. *Current status of global cultivated seaweed production and markets. Journal of the World Aquaculture Society*, v.45 n. 2, p.32-37, 2014.

NEORI, A.; BRONFMAN, Y.; VAN RIJN, J.; GUTTMAN, L.; KRUPNIK, N.; SHPIGEL, M.; ISRAEL, Á. *The suitability of Ulva fasciata, Ulva compressa, and Hypnea musciformis for production in an outdoor spray cultivation system, with respect to biomass yield and protein content. Journal of Applied Phycology*. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02130-3>. Acesso em 13 de fev. de 2023.

O QUE É CARRAGENA. Disponível em: <https://agargel.com.br/carragena/-2023>. Acesso em: em 13 de março de 2023.

PANGESTUTI. R.; TILAHUN. A.; GETACHEW.; SIAHAAN. E.A.; CHUN. B.S. Characterization of functional materials derived from tropical red seaweed *Hypnea musciformis* produced by subcritical water extraction systems. *Journal of Applied Phycology* volume 31, pages2517–2528, 2019.

Park, J.S.; Shin, S.K.; Wu, H.; Yarish, C.; Yoo, H.; Kim, J.K. *Evaluation of nutrient bioextraction by seaweed and shellfish aquaculture in Korea. Journal of the World Aquaculture Society* Volume 52, Issue 5: Seaweed aquaculture-From historic trends to current innovation Oct 2021. Pages1001-1157.

PENRU, Y.; GUASTALLI A.R.; ESPLUGAS, S.; BAIG, S. *Application of UV and UV/H₂O₂ to seawater: Disinfection and natural organic matter removal. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 233, p.40-45, 2012.

PENRU, Y.; GUASTALLI A.R.; ESPLUGAS, S.; BAIG, S. *Disinfection of Seawater: Application of UV and Ozone, Ozone: Science & Engineering*, 35:1, 63-70, 2013.

PEREIRA, S. A.; KIMPARA, J. M.; VALENTI, W. C. *A simple substrate to produce the tropical epiphytic algae Hypnea pseudomusciformis. AQUACULTURAL ENGINEERING*, v. 89, p. 102066-5, 2020 (a).

PEREIRA, S. A.; KIMPARA, J. M.; VALENTI, W. C. *A bioeconomic analysis of the potential of seaweed Hypnea pseudomusciformis farming to different targeted markets. Aquaculture Economics & Management*, 1–19, 2020 b.

PEREIRA, S. A. Viabilidade econômica e sustentabilidade do cultivo da macroalga *Hypnea pseudomusciformis*. *Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura*, 69 p, 2019.

PORSE, H.; RUDOLPH, B. *The seaweed hydrocolloid industry: updates, requirements, and outlook. Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 5, 2187–2200, 2017.

REDMOND, S.; GREEN L.; YARISH, C.; KIM, J.; NEEFUS, C. *New England Seaweed Culture Handbook. Connecticut Sea Grant CTSG-14-01*, Connecticut, 92 p, 2014.

REIS, R. P.; CASTELAR, B.; SANTOS, A. A. *Why is algaculture still incipient in Brazil? Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 673-682, 2016.

REIS, R. P.; CALDEIRA, A. Q.; MIRANDA, A. P. S.; BARROS-BARRETO, M. B. Potencial para maricultura da carragenófita *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales - Rhodophyta) na Ilha da Marambaia, Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 4, p.763-769, 2006.

REIS, R.; CORREA, M.; LEAL, R. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta-Gigartinales). *Acta Bot Bras* 17/2:279–286, 2003.

RENGEL A. *Energy and environmental analyses of a bioreactor for microalgae culture for energy production. Chemical and Process Engineering. École Nationale Supérieure des Mines de Paris*.2010.

SANTOS, N. H. S.; SILVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, V. O.; MACHADO, L.P. Efeito do extrato de algas no desempenho germinativo e crescimento radicular em sementes de feijão BRS Estilo em resposta a diferentes métodos de aplicação. *HOEHNEA*, v. 48, p. e1002020.2021.

SCHMEDES, P.S., NIELSEN, M.M. *New hatchery methods for efficient spore use and seedling production of *Palmaria palmata* (dulse)*. *J Appl Phycol* 32, 2183–2193, 2020.

SIMON, F.X.; BERDALET, E.; GRACIA, F.A.; ESPAÑA, F.; LLORENS, J. *Seawater disinfection by chlorine dioxide and sodium hypochlorite. A comparison of biofilm formation. Water, Air, & Soil Pollution volume 225, Article number: 1921*. 2014.

USOV, AI. *Polysaccharides of the red algae. Adv Carbohydr Chem Biochem*. 65:115-217,2011.

VIJAY ANAND, K. G.; ESWARAN, K.; GHOSH, A. *Life cycle impact assessment of a seaweed product obtained from *Gracilaria edulis* – A potent plant biostimulant. Journal of Cleaner Production*, 170, 1621–1627, 2018.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. *Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective*. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1-32 2017.

YOKOYA, N.S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. *Micropropagation as a tool for sustainable utilization and conservation of populations of Rhodophyta*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21: 334-339, 2011.

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

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

YOKOYA, N. S.; NAUER, F.; OLIVEIRA, M. C. *Concise review of the genus Hypnea J.V. Lamouroux, 1813*. *JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY*, v. 32, p. 3585-3603, 2020.

ZULDIN, W, H.; SUHAIMI, Y.; ROSSITA, S. *Growth and biochemical composition of Kappaphycus (Rhodophyta) in customized tank culture system*. *Journal of Phycology*, 28, 2016.