

Rodrigo De Martino Ucedo

**USO DO EFLUENTE DE BIOFLOCOS NA MANUTENÇÃO DA  
MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* EM LABORATÓRIO E  
SEU DESENVOLVIMENTO NO MAR**

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

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

Florianópolis  
2019

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

Ucedo, Rodrigo De Martino

Uso do efluente de bioflocos na manutenção da  
macroalga *Kappaphycus alvarezii* em laboratório e seu  
desenvolvimento no mar / Rodrigo De Martino Ucedo ;  
orientador, Leila Hayashi, 2019.

70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Bioflocos. 3. Efluente. 4.  
Eucheumatoides. 5. Ficocolóides. I. Hayashi, Leila.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Uso do efluente de bioflocos na manutenção da macroalga  
*Kappaphycus alvarezii* em laboratório e seu desenvolvimento no mar**

Por

RODRIGO DE MARTINO UCEDO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

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



---

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

Banca Examinadora:



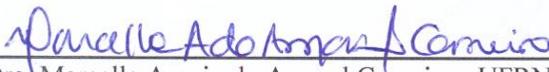
---

Dra. Leila Hayashi – Orientadora



---

Dr. Frank Belettini - UFSC



---

Dra. Marcella Araujo do Amaral Carneiro - UFRN



Este trabalho é dedicado aos meus colegas e amigos de classe e aos meus queridos familiares.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família, pelo incentivo, confiança, dedicação, apoio e por estarem sempre presentes quando precisei, sendo uma das maiores motivadoras para esta conquista.

A todos os amigos que tive o prazer de conhecer nesta trajetória, fazendo parte desta vitória.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, (PPGAQI) pela oportunidade que me foi dada e por toda sua equipe pela excelência de seus profissionais.

À professora Leila Hayashi pela orientação, pelos conselhos, ensinamentos e confiança nesta caminhada. Foram dois anos intensos de muito aprendizado, conversas, dramas e risadas. Um exemplo de que quando fazemos o que amamos, tempo e disposição nunca faltam.

Ao pesquisador Alex Alves do Santos e toda equipe da EPAGRI/CEDAP que sempre estiveram a disposição, principalmente nas saídas de campo para Fazenda Marinha Experimental do Sambaqui.

À toda equipe do Laboratório de Camarões Marinhos e da Seção de Macroalgas. Foram bons momentos de conversas, ensinamentos, discussões e auxílios ao longo do mestrado.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de conviver, pelos ensinamentos, ao longo da pós-graduação.

À CAPES e o CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse possível.

Obrigado!



Mas por quê? Questione-se sempre!  
(RDM, 2019)



## RESUMO

Em Santa Catarina, a viabilidade do cultivo de *Kappaphycus alvarezii* foi demonstrada em 2008. No entanto, o período de inverno continua sendo um problema para o cultivo, onde as baixas temperaturas da água causam perdas da biomassa nos cultivos. Estudos relacionados à manutenção dessas algas durante este período são cruciais para produção comercial. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o melhor regime de fertilização para manutenção em laboratório da macroalga *K. alvarezii* utilizando efluente do cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos (BFT), e avaliar seu desenvolvimento quando transplantada no cultivo no mar. Os talos ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) foram fertilizados com BFT diluído em 25% (BFT25) em diferentes regimes durante quatro semanas: fertilização única (FU); fertilização alternada (FA) e fertilização contínua (FC). Após o cultivo em laboratório, 100 g de cada unidade experimental foram retirados e transferidos para o cultivo no mar sendo mantidas durante 5 semanas. No laboratório, as taxas de crescimento dos tratamentos FU e FA não apresentaram diferenças significativas ( $0,67 \pm 0,15 \text{ \%dia}^{-1}$  e  $0,74 \pm 0,04 \text{ \%dia}^{-1}$ ) e foram maiores que FC ( $0,44 \pm 0,07 \text{ \%dia}^{-1}$ ). A quantidade de grãos de amido foi significativamente maior no tratamento FU ( $11,89 \pm 2,35 \text{ mg g}^{-1}$ ) em relação ao FA ( $6,88 \pm 1,57 \text{ mg g}^{-1}$ ) no início do cultivo no mar ( $T_i$ ), e uma redução significativa foi observada no tratamento FC ( $8,28 \pm 0,81 \text{ mg g}^{-1}$  para  $5,05 \pm 0,23 \text{ mg g}^{-1}$ ) entre o início e o final do cultivo no mar. A coloração dos talos se tornou mais escura com aumento da frequência de fertilização, no entanto durante o cultivo no mar clarearam e se mantiveram iguais. A concentração dos pigmentos fotossintetizantes das amostras tiveram alterações no início e no final do cultivo no mar, dependendo do tratamento. Nos tratamentos FA e FC, foi observada uma redução na concentração de carotenóides totais ( $1,06 \pm 0,18 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  para  $0,56 \pm 0,13 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,95 \pm 0,11 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  para  $0,63 \pm 0,10 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente), e nos tratamentos FU e FC, uma redução na concentração de ficoeritrina ( $5,31 \pm 1,80 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  para  $1,51 \pm 0,49 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  e  $6,37 \pm 1,45 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  para  $2,31 \pm 0,25 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente). O tratamento FU foi o único que apresentou aumento da concentração de ficocianina ( $4,73 \pm 1,00 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  para  $7,97 \pm 1,72 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ). No cultivo no mar, as taxas de crescimento dos tratamentos FA e FC não apresentaram diferenças significativas ( $4,16 \pm 0,19 \text{ \%dia}^{-1}$  e  $4,01 \pm 0,06 \text{ \%dia}^{-1}$ , respectivamente) e foram maiores que FU ( $3,46 \pm 0,18 \text{ \%dia}^{-1}$ ). O rendimento de carragenana não apresentou diferença

significativa entre os tratamentos e foram similares nos dois períodos. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a fertilização com BFT25 em semanas contínuas (FC) em laboratório pode ser utilizada para a manutenção dos propágulos em tanques contribuindo na aclimação, proteção e crescimento das algas quando estas forem transplantadas novamente para as fazendas marinhas.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Bioflocos; Efluente; Eucheumatoides; Ficocolóides.

## ABSTRACT

In Santa Catarina, the viability of *Kappaphycus alvarezii* cultivation was demonstrated in 2008. However, the winter period remains as a problem in the cultivation, because low water temperatures can cause biomass losses. Studies related to the maintenance of this seaweed during this period are crucial for commercial production. The aim of this work was to establish the best fertilization regime for laboratory maintenance of the seaweed *K. alvarezii* using effluent from the *Litopenaeus vannamei* shrimp rearing in biofloc system (BFT), and to evaluate its performance when transplanted to the sea. Seaweed thalli ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) were fertilized in laboratory with BFT diluted at 25% (BFT25) in different regimes for four weeks: single fertilization (FU); alternating fertilization (FA); and continuous fertilization (FC). After the laboratory cultivation, 100 g of each experimental unit were harvested and transferred to the sea cultivation, been kept for 5 weeks. The growth rates in laboratory of FU and FA treatments showed no significant differences ( $0.67 \pm 0.15 \text{ \%day}^{-1}$  and  $0.74 \pm 0.04 \text{ \%day}^{-1}$ ) and were higher than FC ( $0.44 \pm 0.07 \text{ \%day}^{-1}$ ). The amount of starch grains was significantly higher in FU treatment ( $11.89 \pm 2.35 \text{ mg g}^{-1}$ ) than in FA ( $6.88 \pm 1.57 \text{ mg g}^{-1}$ ) in the beginning of sea cultivation ( $T_i$ ), and a significant reduction was observed in FC treatment ( $8.28 \pm .,81 \text{ mg g}^{-1}$  to  $5.05 \pm 0.23 \text{ mg g}^{-1}$ ). The branches color became darker with the increasing of fertilization frequency however, during the sea cultivation they became clear and kept the same color. The concentration of photosynthetic pigments had changes in samples cultivated in the beginning and the end the sea cultivation, depending on the treatment. The concentration of carotenoids reduced in the FA and FC treatments ( $1.06 \pm 0.18 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  to  $0.56 \pm 0.13 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  and  $0.95 \pm 0.11 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  to  $0.63 \pm 0.10 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively), and in FU and FC treatments, the reduction of phycoerythrin was observed ( $5.31 \pm 1.80 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  to  $1.51 \pm 0.49 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  and  $6.37 \pm 1.45 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  to  $2.31 \pm 0.25 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively). The FU treatment was the only one which presented increase in phycocyanin. ( $4.73 \pm 1.00 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  to  $7.97 \pm 1.72 \text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ) In the sea cultivation, the growth rates of FA and FC treatments showed no significant differences ( $4.16 \pm 0.19 \text{ \%day}^{-1}$  and  $4.01 \pm 0.06 \text{ \%day}^{-1}$ , respectively) and were higher than FU ( $3.46 \pm 0.18 \text{ \%day}^{-1}$ ). The carrageenan yield showed no significant difference among treatments and were similar in both periods. Based on the results, we concluded that the fertilization with BFT25 in continuous weeks (FC) in laboratory

can be used for seedlings maintenance in tanks, contributing to the acclimation, protection and growth when they are transferred again to the sea farm.

**Keywords:** Aquaculture; Bioflocs; Effluents; Eucheumatoids; Phycocolloid.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Talo da linhagem verde de *K. alvarezii* aclimatado e mantido em laboratório durante 25 semanas, proveniente da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos..... 35
- Figura 2 - Esquema representativo dos regimes de fertilização realizados no cultivo em laboratório durante as 4 semanas de cultivo em laboratório. .... 37
- Figura 3 - Unidades experimentais distribuídas aleatoriamente na sala de cultivo experimental da Seção de Macroalgas no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) com talos de *K. alvarezii* da linhagem verde fertilizadas com BFT25. (A) Sala de manutenção de linhagens com as unidades experimentais; (B) Unidade experimental com os talos de *K. alvarezii*..... 37
- Figura 4 – Estruturas utilizadas para o cultivo de *K. alvarezii* com a rede de pesca de proteção à herbivoria dos peixes para cultivo no mar (B). .... 38
- Figura 5 – A. Taxa de crescimento média (%dia<sup>-1</sup>) e B. rendimento de carragenana (%) dos talos de *K. alvarezii* cultivados durante 28 dias em laboratório. Os valores representam a média ± intervalo de confiança (n = 3) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05)..... 44
- Figura 6 – A. Taxa de crescimento média (%dia<sup>-1</sup>) e B. rendimento de carragenana (%) dos talos de *K. alvarezii* durante 34 dias de cultivo no mar. Os valores representam a média ± intervalo de confiança (n = 3) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05)..... 46
- Figura 7 – Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Azul de Toluidina (AT-O). As imagens indicam a reação metacromática ao AT-O na parede celular das células corticais (cc) na região voltada para o exterior, indicando a presença de carragenana. CS: células subcorticais. A: tratamento FU laboratório; B: tratamento FA laboratório; C: tratamento FC laboratório; D: tratamento FU mar; E: tratamento FA mar; e F: tratamento FC mar. Escala: 50 µm..... 47
- Figura 8 - Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). As imagens indicam a presença de grãos de amido das florídeas (a, seta) nas células corticais (cc), células subcorticais (cs) e células medulares (cm) após

o cultivo em laboratório. PC: parede celular. A e B: tratamento FU; C e D: tratamento FA; E e F: tratamento FC. Escala: 50 µm..... 48

Figura 9 - Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). As imagens indicam a presença de grãos de amido das florídeas (a, seta) nas células corticais (cc), células subcorticais (cs) e células medulares (cm), após o cultivo no mar. PC: parede celular. A e B: tratamento FU; C e D: tratamento FA; E e F: tratamento FC. Escala: 50 µm. .... 49

Figura 10 - Coloração dos talos de *K. alvarezii* após os 28 dias de cultivo em laboratório: A: tratamento FU; B: tratamento FA; e C: tratamento FC e dos talos cultivados no mar (D) durante 34 dias na Fazenda Experimental do Sambaqui..... 50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de qualidade de água analisados semanalmente dos inóculos de BFT25 utilizados no cultivo em laboratório de talos de <i>K. alvarezii</i> .....	36
Tabela 2 – Temperatura (°C), salinidade (‰), pH e oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ): média, mínima (mín) e máxima (máx) durante 4 semanas do cultivo em laboratório de <i>K. alvarezii</i> . Os valores estão representados em média ± intervalo de confiança (n = 18, p < 0,05)....	43
Tabela 3 –Temperatura (°C) média, mínima e máxima coletados durante 5 semanas de cultivo no mar. Os valores estão representados em média ± intervalo de confiança (n = 168, p < 0,05).....	45
Tabela 4 – Concentração de amido (mg g <sup>-1</sup> ) de <i>K. alvarezii</i> do cultivo no mar no tempo inicial (T <sub>i</sub> ) e final (T <sub>f</sub> ). Os valores são representados em média ± intervalo de confiança (n = 3, p < 0,05). As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período de cultivo (p < 0,05) e as letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes períodos de cultivo no mesmo tratamento (p < 0,05). .....	50
Tabela 5 - Concentração de clorofila <i>a</i> (µg g <sup>-1</sup> ), carotenóides totais (µg g <sup>-1</sup> ) e ficobiliproteínas [ficoeritrina (µg g <sup>-1</sup> ), ficocianina (µg g <sup>-1</sup> ) e aloficocianina (µg g <sup>-1</sup> ) de <i>K. alvarezii</i> do cultivo no mar no tempo inicial (T <sub>i</sub> ) e final (T <sub>f</sub> ). Os valores são representados em média ± intervalo de confiança (n = 3, p < 0,05). As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período de cultivo (p < 0,05) e as letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes períodos de cultivo no mesmo tratamento (p < 0,05).....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- °C – Grau Celsius.
- µg – Micrograma.
- µm – Micrômetro.
- a – Grãos de amido das florídeas.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- AT-O – Azul de Toluidina.
- Bf – Biomassa final.
- Bi – Biomassa inicial.
- BFT – Sistema de bioflocos (*Biofloc Technology*).
- BFT25 – Efluente de sistema de bioflocos do camarão *Litopenaeus vannamei* diluído na proporção de 25% com água do mar esterilizada.
- cc – Células corticais.
- cm – Células medulares.
- cm – Centímetros.
- cs – Células subcorticais.
- DMSO – Dimetilsulfóxido.
- FA – Fertilização alternada.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FC – Fertilização contínua.
- FU – Fertilização única.
- g – Gramas.
- h – Hora.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
- KCl – Cloreto de potássio.
- KOH – Hidróxido de potássio.
- L – Litros.
- LCM – Laboratório de Camarões Marinhos.
- m – Metros.
- M – Molar.
- MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio.
- mg – miligramas.
- nm – Nanómetro.
- PAS – Ácido Periódico de Schiff.
- PS – Peso seco.
- s – Segundos.
- SC – Santa Catarina.

$t$  – Tempo.

TC – Taxa de crescimento.

$T_i$  – Tempo inicial.

$T_f$  – Tempo final.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

UV – Lâmpada ultravioleta.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>23</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
1.1.1	Objetivo geral .....	29
1.1.2	Objetivos específicos .....	29
<b>2</b>	<b>FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>31</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	35
2.2	EFLUENTE DO SISTEMA DE BIOFLOCOS .....	36
2.3	CULTIVO EM LABORATÓRIO.....	36
2.4	CULTIVO NO MAR .....	38
2.5	RENDIMENTO DE CARRAGENANA .....	39
2.6	MICROSCOPIA DE LUZ .....	39
2.7	CONCENTRAÇÃO DE AMIDO .....	40
2.8	PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES .....	40
2.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	41
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>65</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção aquícola mundial em 2016 foi de 110,2 milhões de toneladas, rendendo aproximadamente US\$ 243,5 bilhões, sendo que as plantas aquáticas foram responsáveis por 27% dessa produção com 30,1 milhões de toneladas (US\$ 11,7 bilhões) (FAO, 2018). Entre as plantas aquáticas, as macroalgas são predominantes e os cultivos estão crescendo rapidamente. Na última década, a produção expandiu 8% ao ano (FAO, 2016) e as principais espécies responsáveis foram as macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Euचेuma* spp. cultivadas comercialmente principalmente na Indonésia. Esse país aumentou sua produção de 4 milhões de toneladas de biomassa em 2010 para mais de 11 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018).

Conhecidas comercialmente como “cottoni” (*K. alvarezii*) e “spinosum” (*Euचेuma* spp.), essas macroalgas são as principais matérias-primas para produção de carragenana. A carragenana é um ficocolóide extraído de macroalgas vermelhas, utilizada como agente espessante e estabilizante nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (McHUGH, 2003). Em 2015, a produção de carragenana foi de aproximadamente 57.500 toneladas, com valor de US\$ 9 kg<sup>-1</sup>, rendendo 518 milhões de dólares. Os principais produtores desse ficocolóide foram os países da Ásia-Pacífico (72%), seguidos das Américas (15%) e Europa (13%) (PORSE; RUDOLPH, 2017). No mesmo ano, o Brasil importou 1.835 toneladas de carragenana, totalizando um gasto de US\$ 16,8 milhões. Em 2018, foram importadas 2.005 toneladas de carragenana, custando ao país 17,9 milhões de dólares (MDIC, 2019). Esse fato demonstra a grande dependência do país por esse produto.

A opção brasileira como matéria-prima de carragenana recai na espécie *Hypnea musciformis*, explorada desde a década de 1970. Apesar da ampla distribuição na costa brasileira, a demanda nacional pelo ficocolóide é maior que a coleta dessa macroalga nos bancos naturais e a espécie apresenta entraves que dificultam o seu cultivo (PAULA, 1998; CASTELAR et al, 2009a,b). A *K. alvarezii* foi introduzida no litoral de São Paulo (Ubatuba) em 1995 como uma alternativa para suprir a importação dessa matéria-prima e posteriormente, foram realizadas introduções nos Estados do Rio de Janeiro, Ceará, Pernambuco, Santa Catarina, Paraíba e Rio Grande do Norte, apesar de somente São Paulo e Santa Catarina possuírem licença dos órgãos governamentais documentadas em publicações (PAULA et al. 2002; CASTELAR et al.

2009a,b; OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2010; HAYASHI et al. 2011; ARAUJO et al., 2013).

Atualmente, existe apenas uma Instrução Normativa homologada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que autoriza o cultivo da *K. alvarezii* no país. A Instrução Normativa nº 185 de 22 de julho de 2008, permite o cultivo da espécie no litoral dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, entre Ilha Bela (SP) e a Baía de Sepetiba (RJ). Fora desse perímetro, a liberação do cultivo só é permitida após estudos e avaliação ambiental da região, comprovando a sua viabilidade (IBAMA, 2008). No Estado de Santa Catarina, as pesquisas com *K. alvarezii* iniciaram em 2008 na Fazenda Experimental do Sambaqui (UFSC) em Florianópolis/SC, com intuito de avaliar a viabilidade do cultivo da espécie na região. Porém, a licença para o cultivo da alga possuía validade apenas por três anos, e as atividades foram encerradas em 2011. Somente no início de 2017, o IBAMA concedeu uma nova autorização para o cultivo experimental de *K. alvarezii*, permitindo a ampliação dos estudos da Praia do Sambaqui para o Ribeirão da Ilha, em Florianópolis, Governador Celso Ramos e Penha (Autorização IBAMA para Introdução de Espécie Exótica – Pesquisa Aquícola - 01/2017).

No período da primeira autorização para cultivo experimental, foram elaborados trabalhos atestando a viabilidade ambiental, técnica e econômica do cultivo no Estado (HAYASHI et al., 2011; CASTELAR et al., 2015; SANTOS et al., 2018). Hayashi et al. (2011) observaram que o cultivo de *K. alvarezii* em águas subtropicais não oferece risco ambiental e foi tecnicamente viável nos meses de primavera, verão e outono. O uso de redes tubulares foi fundamental para o desenvolvimento do cultivo da espécie na região devido às fortes correntes marítimas. Já no inverno, foi observado que as algas param de crescer ou morrem, fato que ocorre devido às baixas temperaturas da água (<18 °C). A temperatura é um dos fatores mais importantes para o crescimento da espécie, sendo temperaturas entre 25 °C e 30 °C as que promovem uma maior produção de biomassa e um rápido crescimento (AZANZA; ASK, 2017). Para evitar o comprometimento do próximo ciclo de cultivo, são necessárias alternativas que solucionem esse entrave.

A manutenção em laboratório das algas (cultivo *indoor*) é uma alternativa para os períodos desfavoráveis para o cultivo no mar, onde as mudas poderiam ser mantidas em condições controladas de temperatura, permanecendo saudáveis e aptas a serem transplantadas e cultivadas novamente no mar. Alguns trabalhos já foram realizados com

*K. alvarezii* em tanques, onde foram avaliadas a viabilidade de crescimento da espécie, a manutenção de matrizes e a capacidade de remoção de nutrientes (RODRIGUEZA; MONTAÑO, 2007; HAYASHI et al., 2008; FLORES, 2014; LUHAN et al., 2015; ZULDIN; SHAPAWI, 2015; ZULDIN et al., 2016; PIRES, 2017, BERCHOF, 2018).

Em tanques, o cultivo pode ter as suas condições físico-químicas controladas e ser enriquecido com os nutrientes adequados (ISRAEL et al., 2006). Porém os equipamentos, materiais e insumos usados para manter as condições de cultivo ótimas aumentam os custos de produção. A temperatura dos tanques deve ser regulada através de sistemas de refrigeração ou aquecimento da água. Para o fornecimento de luz, são usados filtros, telas e lâmpadas, adequando a qualidade e intensidade de luz. A rotação das macroalgas é realizada por injetores de ar comprimido para geração do fluxo da água, causando sua movimentação. A salinidade deve ser checada e corrigida com água doce quando necessário. A fertilização das algas com nutrientes pode ser realizada de forma constante ou em intervalos, dependendo das frequências das trocas de água do sistema utilizado (TITLYANOV; TITLYANOVA, 2010).

As macroalgas necessitam de uma variedade de nutrientes para seu crescimento. Quando cultivadas no mar, o nitrogênio e o fósforo são os principais nutrientes limitantes. Já na aquicultura, o carbono pode ser outro limitador, sendo necessário adicioná-lo ao cultivo (HARRISON; HURD, 2001). No cultivo em laboratório, os nutrientes podem ser provenientes de meios de cultura formulados (como as soluções nutritivas von Stosch, F/2, Saga e Provasoli), fertilizantes comerciais e efluentes da aquicultura (DAWES et al., 1994; PAULA et al., 2001; HAYASHI et al., 2008). Entretanto, o uso de soluções formuladas em maior escala é complicado e oneroso.

A manutenção das linhagens de *K. alvarezii* em tanques em particular pode não ser vantajosa, uma vez que o valor desse tipo de cultivo não paga os custos de produção. Uma alternativa para resolver esse entrave seria aproveitar as estruturas de cultivo em tanques de outros organismos. Por exemplo, os tanques de larvicultura ou maturação de uma fazenda de cultivo de camarão poderiam ser utilizados no inverno pelas macroalgas. Além disso, os efluentes desses cultivos poderiam ser usados como fertilizantes, minimizando os custos e tornando a atividade viável. Esse tipo de co-cultivo poderia trazer vantagens para ambas as espécies, uma vez que as algas poderiam ser

mantidas e fertilizadas em períodos de baixas temperaturas, e os efluentes dos outros cultivos seriam tratados.

Nas últimas décadas, o uso de macroalgas em sistemas multitróficos integrados vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisas, podendo ser inserida em cultivos de moluscos, camarões e peixes. O cultivo multitrófico integrado consiste na combinação da produção de organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, buscando o equilíbrio da gestão do ecossistema, tanto em cultivos no mar quanto em tanques. A ideia é utilizar organismos que recuperem alguns dos nutrientes ou energias perdidas em monocultivos, transformando esses resíduos em cultivos adicionais com valor comercial (CHOPIN et al., 2001; TROELL et al., 2009). Nesses sistemas, as macroalgas são utilizadas principalmente devido a sua capacidade de assimilação de compostos nitrogenados e fosfatos, principais causadores da eutrofização das atividades aquícolas. As macroalgas convertem esses nutrientes para seu desenvolvimento, utilizando-os para seu crescimento, produção de ficocolóides e metabólitos secundários (QIAN et al., 1996; CHOPIN et al., 2001; HARRISON; HURD, 2001; RODRIGUEZA; MONTAÑO, 2007; HAYASHI et al., 2008; TROELL et al., 2009; PEDRA et al., 2015; BRITO et al., 2016; PIRES, 2017).

Recentemente, o uso de macroalgas integrado ao sistema de bioflocos de camarão começou a ser estudado. Dos poucos trabalhos publicados, todos utilizaram as algas como biorremediadoras de nutrientes do sistema de cultivo (BRITO et al., 2014; BRITO et al., 2016; FOUROOGHIFARD et al., 2017; BRITO et al., 2018a; BRITO et al., 2018b). A tecnologia de cultivo em bioflocos (BFT – *Biofloc Technology*, do inglês) é considerado uma alternativa de produção mais sustentável para aquicultura, pois apresenta como característica a troca mínima ou nula de água. Esse sistema é considerado um sistema superintensivo fechado que gera menos efluentes, caracterizado por possuir elevada densidade de cultivo, adição de carbono orgânico para formação dos bioflocos e intensa aeração durante o cultivo em pequenas áreas. O BFT é formado pela interação de macroagregados (bioflocos) de bactérias, microalgas, fungos, protozoários, nematoides, rotíferos, entre outros. Esses organismos desempenham um papel fundamental para manutenção da qualidade de água e reciclagem de resíduos para produção de um alimento de alto valor (CRAB et al., 2012; EMERENCIANO et al., 2017). Apesar das vantagens do uso do BFT, o acúmulo de compostos nitrogenados e fosfatados pode ser um problema para o sistema ao longo do tempo, e para produção de camarões (SILVA

et al., 2013). O cultivo das macroalgas seria uma solução para mitigar esse acúmulo de resíduos no cultivo.

A presença desses microrganismos e a variedade de micro e macronutrientes no BFT parecem contribuir para fertilização de *K. alvarezii* em cultivos em laboratório. Pires (2014) constatou que o uso do efluente do BFT do camarão *Litopenaeus vannamei* quando diluído na proporção de 25% (BFT25), pode ser usado como substituinte do meio de cultura von Stosch 50% para *K. alvarezii* cultivada *in vitro*. Pedra et al. (2015) observou que quando fertilizada com BFT25, a mesma espécie apresentou bons resultados nas taxas de crescimento e aumentou a produção de metabólitos secundários em cultivo *in vitro*. Pires (2017) concluiu que a *K. alvarezii* apresenta um eficaz potencial de biorremediação do fosfato e nitrogênio do BFT25. Além disso, o BFT25 melhorou a qualidade da carragenana, aumentando a força do gel e a viscosidade. Já Berchof (2018), verificou que a manutenção em tanques da espécie durante 4 semanas com fertilização contínua de BFT25 em densidade de até 21 g L<sup>-1</sup> é viável para preservar as matrizes das algas e não apresentam prejuízos na taxa de crescimento quando transplantadas para o cultivo no mar.

Além disso, trabalhos demonstraram que a fertilização de macroalgas em tanques com nutrientes inorgânicos e efluentes de cultivo de camarões e peixes, pode ser usada para enriquecer os talos que serão posteriormente transplantadas e cultivadas no mar, incrementando a taxa de crescimento (NELSON et al, 2001; NAGLER et al., 2003; HAYASHI et al., 2008).



## 1. OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estabelecer o melhor regime de fertilização para manutenção em laboratório da macroalga *Kappaphycus alvarezii* utilizando efluente do cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos e avaliar seu desenvolvimento quando transplantada para cultivo no mar.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Determinar o melhor regime de fertilização com efluente de sistema de bioflocos de *Litopenaeus vannamei* em laboratório.

Avaliar a taxa de crescimento da macroalga após regime de fertilização com efluente do sistema de bioflocos de camarão no cultivo em laboratório e no mar.

Avaliar o rendimento de carragenana das algas após o cultivo em laboratório e no mar.

Analisar as macroalgas fertilizadas em laboratório e cultivadas no mar por microscopia de luz.

Quantificar os grãos de amido das amostras cultivadas no mar.

Analisar os pigmentos fotossintetizantes das amostras cultivadas no mar.

## 2 FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em introdução geral, objetivos e “capítulo 1”. O “capítulo 1” é referente ao artigo que será submetido para publicação no *Journal of Applied Phycology*.



## Capítulo 1

### **Uso do efluente de bioflocos na manutenção da macroalga *Kappaphycus alvarezii* em laboratório e seu desenvolvimento no mar**

Rodrigo De Martino Ucedo<sup>1\*</sup>, Luiza Vieira Mariot<sup>1</sup>, Fernando Zwierzikowski da Silva<sup>1</sup>, Carmen Simioni<sup>2</sup>, Eva Regina Oliveira<sup>3</sup>, Marcelo Maraschin<sup>3</sup>, Alex Alves dos Santos<sup>4</sup>, Leila Hayashi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Itacorubi, 88034-000, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Trindade, 88049-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Itacorubi, 88034-000, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>4</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão de Santa Catarina, Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca, Rodovia Admar Gonzaga, 1188, Itacorubi, 88010-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

\*Autor correspondente: +55 48 999101835, e-mail: rdm.demartino@gmail.com.



## 1 INTRODUÇÃO

As macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp. foram as plantas aquáticas mais produzidas em 2016, com uma produção de 12 milhões de toneladas de biomassa (FAO, 2018). Essas algas são as principais fontes de carragenana, colóide extraído de macroalgas vermelhas, utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos como agente espessante e estabilizante (McHUGH, 2003). Em 2018, o Brasil importou 2.005 toneladas de carragenana, totalizando um gasto de 17,9 milhões de dólares ao país (MDIC, 2019).

Em Santa Catarina, a introdução da *K. alvarezii* ocorreu em 2008 e o seu desenvolvimento foi tecnicamente viável somente nos meses de primavera, verão e outono com o uso de redes tubulares. As redes tubulares foram essenciais para o cultivo na região devido as fortes correntes marítimas. Já no inverno, a temperatura da água alcançou valores abaixo de 18 °C, prejudicando o crescimento da espécie (HAYASHI et al., 2011b). Uma alternativa para evitar essa perda na produção, seria a manutenção das algas em tanques com efluentes de outras atividades aquícolas, minimizando os custos.

A tecnologia de cultivo em bioflocos (BFT – *Biofloc Technology*) é um exemplo de sistema de produção em que as macroalgas podem ser integradas como biorremediadoras (BRITO et al., 2014; BRITO et al., 2016; FOUROOGHIFARD et al., 2017; BRITO et al., 2018a; BRITO et al., 2018b). O BFT é um sistema considerado mais sustentável para aquicultura, pois apresenta como característica a troca mínima ou nula de água e altas densidades de cultivo. É formado pela interação de macroagregados (bioflocos) de bactérias, microalgas, fungos, protozoários, nematoides, rotíferos, entre outros. Esses organismos desempenham um papel fundamental para manutenção da qualidade de água e reciclagem de resíduos (CRAB et al., 2012; EMERENCIANO et al., 2017).

A presença desses microrganismos e a variedade de micro e macronutrientes no BFT parecem contribuir para fertilização de *K. alvarezii* em cultivos em laboratório. Pires (2014) constatou que o uso do efluente do BFT do camarão *L. vannamei*, quando diluído na proporção de 25% (BFT25), pode ser usado como substituinte do meio de cultura von Stosch 50% para *K. alvarezii* cultivada *in vitro*. Pedra et al. (2015) observaram que quando fertilizada com BFT25, a mesma espécie apresentou bons resultados na taxa de crescimento em cultivo *in vitro* e aumento da produção de metabólitos secundários. Pires (2017) concluiu que a *K. alvarezii* pode ser eficaz na biorremediação de fosfato

e nitrogênio do BFT25 e o uso do efluente na fertilização melhorou a qualidade da carragenana, aumentando a força do gel e a viscosidade. Berchhof (2018) verificou que a manutenção em tanques das matrizes de *K. alvarezii* durante 4 semanas fertilizadas de forma contínua com BFT25 em densidade de até 21 g L<sup>-1</sup> é viável. Além disso, este último autor observou que as macroalgas não apresentaram prejuízos na taxa de crescimento quando transplantadas para o cultivo no mar.

Diversos trabalhos demonstraram que a fertilização de macroalgas em tanques com nutrientes inorgânicos e efluentes de cultivo de camarões e peixes pode ser usada para enriquecer os talos das algas que serão posteriormente transplantadas e cultivadas no mar (NELSON et al, 2001; NAGLER et al., 2003; HAYASHI et al., 2008). Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar a taxa de crescimento, rendimento de carragenana, estrutura celular, concentração de grãos de amido e pigmentos fotossintetizantes para estabelecer o melhor regime de fertilização para manutenção em laboratório da macroalga *K. alvarezii* utilizando efluente do cultivo de camarão *L. vannamei* em sistema de bioflocos, e avaliar o desenvolvimento da alga no mar após a fertilização.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo em laboratório foi realizado na Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos - LCM (27°34'57"S; 48°26'28"W) localizado na Barra da Lagoa, e o cultivo no mar foi realizado na Fazenda Marinha Experimental do Sambaqui (27°29'19"S; 48°32'18"W), ambos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados 3,15 kg da linhagem verde de *Kappaphycus alvarezii* provenientes da Fazenda Marinha Experimental do Sambaqui. Essas algas foram aclimatadas e mantidas durante 25 semanas em laboratório. A aclimação e manutenção foram realizadas em caixas plásticas de 74 L (volume útil de 50 L) com fotoperíodo de 12 h, irradiância de  $165 \pm 7 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aeração constante, temperatura de  $23 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , salinidade de 35‰ em regime de fertilização semanal alternada de efluentes de bioflocos ou água do mar esterilizada. O efluente de sistema de bioflocos de camarão foi filtrado e diluído com água do mar esterilizada na concentração de 25% - BFT25 (PIRES, 2014). A esterilização da água do mar foi através de uma sequência de filtros de 25, 10 e 5  $\mu\text{m}$  seguidos por esterilização com lâmpada ultravioleta (UV).

Figura 1 - Talo da linhagem verde de *K. alvarezii* aclimatado e mantido em laboratório durante 25 semanas, proveniente da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos.



## 2.2 EFLUENTE DO SISTEMA DE BIOFLOCOS

O efluente foi coletado semanalmente de um tanque de 50 m<sup>3</sup> de cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos do LCM. Os camarões eram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial (35% de proteína bruta), de acordo com a tabela de alimentação proposta por Van Wyk (1999). Após a coleta, o efluente foi filtrado com filtro tipo *Bag* de 25 µm para remoção dos sólidos e diluído com água do mar esterilizada na concentração de 25%, de acordo com a metodologia proposta por Pires (2014). Desse efluente diluído, foram avaliados os parâmetros de qualidade de água: nitrogênio amoniacal total, nitrito, ortofosfato dissolvido (GRASSHOFF et al., 1983), sólidos suspensos totais, sólidos voláteis, alcalinidade (APHA, 2005) e nitrato (método HACH, redução de cádmio) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de qualidade de água analisados semanalmente dos inóculos de BFT25 utilizados no cultivo em laboratório de talos de *K. alvarezii*.

Parâmetros dos inóculos (BFT25)	Semanas			
	1	2	3	4
Nitrogênio amoniacal total - N (mg L <sup>-1</sup> )	0,10	0,55	0,35	0,11
Nitrito (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup> )	0,02	0,01	0,04	0,10
Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup> )	3,00	2,40	7,80	1,90
Ortofosfato dissolvido (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	1,05	0,60	0,53	0,64
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	144	124	112	117
Sólidos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	30	28	22	33
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )	128	112	124	140

## 2.3 CULTIVO EM LABORATÓRIO

Previamente à fertilização, as macroalgas foram mantidas durante duas semanas em água do mar esterilizada, salinidade de 35‰, temperatura de 23 ± 0,5 °C e sem adição de nutrientes para aclimação. Durante a aclimação foi realizado o manejo das algas com a troca semanal da água do mar esterilizada. O intuito da aclimação foi anular os efeitos da fertilização alternada, nas quais as algas eram mantidas, conforme descrito anteriormente.

O período de cultivo em tanques durou 4 semanas e consistiu em três tratamentos em triplicata (n=3) com diferentes regimes de fertilização com BFT25 (Figura 2):

- Fertilização única (FU): uma semana de cultivo com BFT25 seguido de três semanas de cultivo em água do mar esterilizada;
- Fertilização alternada (FA): uma semana de cultivo com BFT25 alternada com outra semana de cultivo em de água do mar esterilizada;
- Fertilização contínua (FC): todas as semanas de cultivo com BFT25.

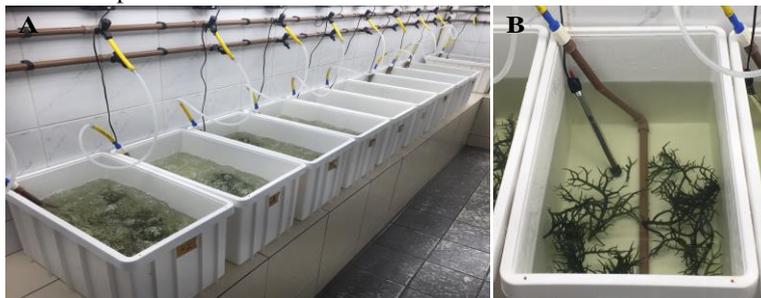
Figura 2 - Esquema representativo dos regimes de fertilização realizados no cultivo em laboratório durante as 4 semanas de cultivo em laboratório.

Tratamentos	Semanas			
	1	2	3	4
FU	■	□	□	□
FA	■	□	■	□
FC	■	■	■	■

■ BFT25      □ Água do mar esterilizada

Cada unidade experimental consistia em uma caixa plástica de 74 L (35 x 41 x 68 cm) com volume útil de 50 L e areação constante distribuídas aleatoriamente. As algas foram cultivadas na densidade de  $7 \text{ g L}^{-1}$ , com fotoperíodo de 12 h e irradiância de  $165 \pm 7 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A água foi mantida com temperatura média de  $23 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e salinidade de 35‰ (Figura 3).

Figura 3 - Unidades experimentais distribuídas aleatoriamente na sala de cultivo experimental da Seção de Macroalgas no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) com talos de *K. alvarezii* da linhagem verde fertilizadas com BFT25. (A) Sala de manutenção de linhagens com as unidades experimentais; (B) Unidade experimental com os talos de *K. alvarezii*.



A temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados duas vezes por semana. O BFT25 ou a água do mar esterilizada foram renovados semanalmente, conforme o tratamento. No momento do manejo, as caixas foram limpas e as algas pesadas para determinar a taxa de crescimento de acordo com Yong et al. (2013).

$$TC (\% \text{ dia}^{-1}) = \left[ \left( \frac{Bf}{Bi} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100$$

onde, TC = Taxa de crescimento; Bf = Biomassa final;  
Bi = Biomassa inicial; t = Tempo de cultivo.

Após o período de cultivo, amostras de cada tratamento foram separadas para as análises de rendimento de carragenana, microscopia de luz e pigmentos fotossintetizantes.

## 2.4 CULTIVO NO MAR

Após o período de cultivo em laboratório, as macroalgas foram transferidas para o cultivo na Fazenda Marinha Experimental do Sambaqui por 34 dias, entre outubro de 2018 e novembro de 2018. Amostras de 100 g de macroalgas foram retiradas de cada unidade experimental do laboratório e colocadas em redes tubulares com  $22 \pm 1$  cm de comprimento. As redes tubulares foram distribuídas aleatoriamente na balsa de cultivo e uma rede de pesca foi colocada abaixo da balsa para evitar herbivoria por peixes (Figura 4). As algas foram pesadas na primeira, quarta e quinta semana durante o cultivo no mar para determinação das taxas de crescimento, de acordo com Yong et al. (2013). A temperatura foi registrada diariamente com um *Optic StowAway Tidbit Data Logger* a 30 cm da superfície.

Figura 4 – Estruturas utilizadas para o cultivo de *K. alvarezii* com a rede de pesca de proteção à herbivoria dos peixes para cultivo no mar (B).



Após o período de cultivo, amostras de cada tratamento foram separadas para as análises de rendimento de carragenana, microscopia de luz e pigmentos fotossintetizantes.

## 2.5 RENDIMENTO DE CARRAGENANA

Para o rendimento de carragenana, amostras das algas frescas de cada tratamento do cultivo em laboratório e no mar foram secas em estufa a 35 °C por 24 h e posteriormente por 60 °C por mais 24 h. Para a extração da carragenana, foram pesados 5 g de alga seca de cada tratamento e realizado o tratamento alcalino em solução de KOH 6%. As algas foram colocadas em banho-maria a 80 °C com agitação por 2 h, em seguida foram filtradas e lavadas por 20 h em água corrente. Após esse período, as algas foram mantidas em água destilada com agitação constante durante 4 h a 60 °C. Faltando 5 minutos para o término da digestão aquosa, foi acrescentado celite para auxiliar na filtração. A filtração foi realizada com bomba de baixa pressão e a carragenana resultante foi gelificada com KCl a 0,2% e congelada. A separação foi realizada por congelamento e descongelamento. O cálculo do rendimento foi realizado pelo percentual da massa das fibras de carragenana secas em estufa a 60 °C por 12 h em relação a massa seca da alga (HAYASHI et al., 2007a).

## 2.6 MICROSCOPIA DE LUZ

Amostras de algas frescas de aproximadamente 5 mm de comprimento dos tratamentos do cultivo em laboratório e do mar foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante 12 h, em temperatura de 4 °C. Após esse período, o material foi lavado três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M e desidratado em soluções crescentes de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100% (BOUZON et al., 2006). A pré-infiltração e a infiltração das amostras foram feitas em historesina glicolmetacrilato e os blocos foram montados na mesma historesina adicionando um endurecedor. As secções foram realizadas com espessura de 4 µm em micrótomo modelo Leica RM 2125 com navalha de tungstênio e foram dispostas em lâminas para a aplicação de técnicas de histoquímicas:

a) Azul de toluidina (AT-O) (GORDON E MCCANDLESS, 1973). Esta técnica foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas com as secções foram coradas por cerca de 60 segundos, lavadas em água corrente e secas em

temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.

b) Ácido Periódico de Schiff (PAS) (GAHAN, 1984). Esta técnica foi utilizada para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As lâminas com as secções foram imersas em solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 15 minutos. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 15 minutos, e o reativo de Schiff foi aplicado durante 20 minutos no escuro. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em água corrente durante 15 minutos, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá.

## 2.7 CONCENTRAÇÃO DE AMIDO

Para extração e quantificação de amido, amostras de 50 mg de *K. alvarezii* secas ( $n = 3$ ) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em solução de metanol: clorofórmio: água (MCW, 12:5:3 v/v/v). Os extratos em MCW foram submetidos a reações conforme descrito por Umbreit e Burris (1964), com modificações. Para isso, 2 mL de reagente de antrona (200 mg de antrona em 100 mL de  $H_2SO_4$  concentrado) foram adicionados em alíquotas (1 mL) e a solução final foi submetida a vórtice e aquecida por 3 minutos a 100 °C. A fase sólida resultante da extração foi submetida a reação de ácido perclórico 30% (1 mL) e antrona 2% em  $H_2SO_4$  (2 mL) seguindo os procedimentos de aquecimento e leitura em espectrofotômetro a 630 nm (espectrofotômetro UV-2000A, Instrutherm, Brasil). O teor de amido foi calculado a partir de curva de calibração externa em concentrações de 10 a 500  $\mu g mL^{-1}$  ( $y = 0,0075x$ ;  $r^2 = 0,997$ ).

## 2.8 PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, carotenóides totais e ficobiliproteínas), amostras de algas frescas de 1 g de cada tratamento do cultivo em laboratório e do mar foram armazenadas a -20 °C. Clorofila *a* e carotenóides foram extraídos em 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 40 °C durante 40 minutos e quantificadas de acordo com Hiscox e Israelstam (1979). A determinação do teor de ficobiliproteínas foi realizada por trituração do material a um pó com nitrogênio líquido e extraída em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,4, a 4 °C no escuro. Os níveis de ficobiliproteínas [ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) e aloficocianina (APC)] foram

determinados por espectrometria e calculados usando as equações de Kursar et al. (1983).

## 2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Homocedasticidade e normalidade foram testados através de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA unifatorial, seguido de teste Tukey para comparação de médias entre os tratamentos no mesmo período de cultivo (laboratório ou mar). Para comparação entre os mesmos tratamentos em períodos diferentes de cultivo (laboratório ou mar) foi realizado Teste *t* de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) com auxílio do software *Statistica* (Statsoft, versão 10.0.1).



### 3 RESULTADOS

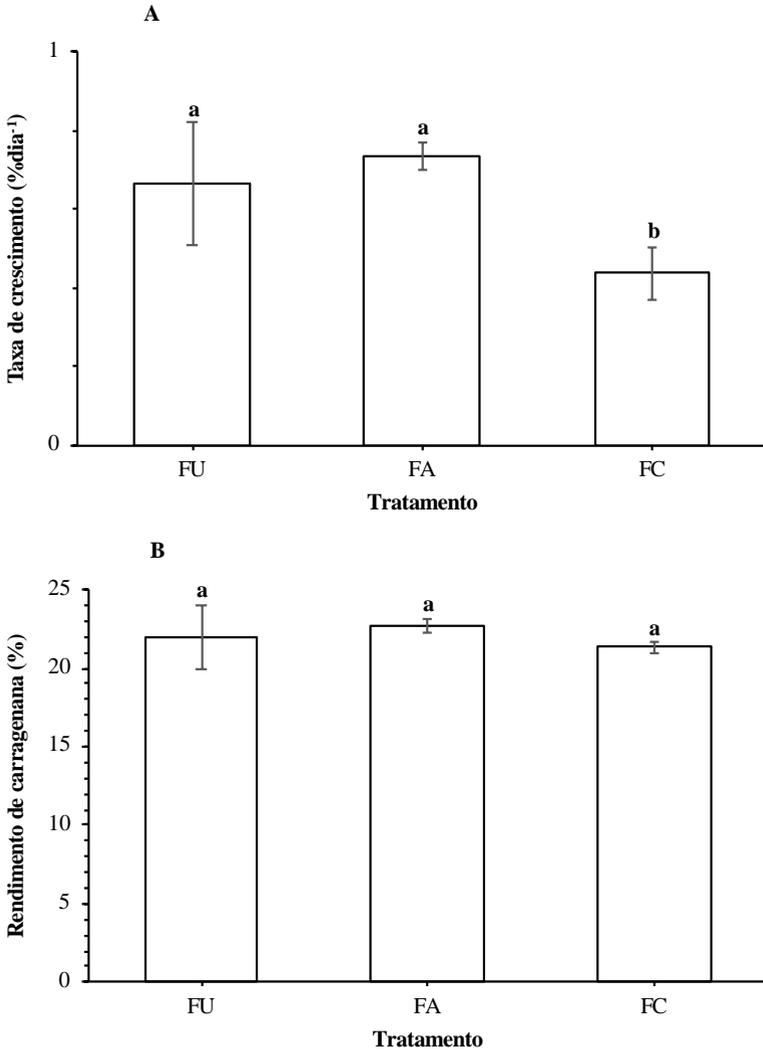
Os parâmetros de temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido do período de cultivo em laboratório são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Temperatura (°C), salinidade (‰), pH e oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>): média, mínima (mín) e máxima (máx) durante 4 semanas do cultivo em laboratório de *K. alvarezii*. Os valores estão representados em média ± intervalo de confiança (n = 18, p < 0,05).

Cultivo em Laboratório				
Semanas	Temperatura (°C)		Salinidade (‰)	
	Média	Mín - Máx	Média	Mín - Máx
1	23,59 ± 0,53	21,20 – 25, 70	34,00 ± 0,00	34
2	23,40 ± 0,28	22,10 – 24,50	34,30 ± 0,22	34,00 – 35,00
3	23,67 ± 0,43	22,10 – 24,80	35,00 ± 0,00	35
4	23,41 ± 0,15	22,90 – 24,30	34,33 ± 0,22	34,00 – 35,00
Semanas	pH		Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	
	Média	Mín - Máx	Média	Mín - Máx
1	7,79 ± 0,04	7, 63 – 7,96	6,14 ± 0,12	5,40 – 6,60
2	8,08 ± 0,19	7,64 – 8,52	6,82 ± 0,20	6,00 – 7,31
3	8,26 ± 0,03	8,16 – 8,34	6,19 ± 0,09	5,90 – 6,80
4	8,09 ± 0,09	7,82 – 8,34	6,07 ± 0,14	5,50 - 6,50

No cultivo em laboratório, as médias das taxas de crescimento dos tratamentos FU e FA não apresentaram diferenças significativas ( $0,67 \pm 0,15$  %dia<sup>-1</sup> e  $0,74 \pm 0,04$  %dia<sup>-1</sup>, respectivamente) e foram significativamente maiores que FC ( $0,44 \pm 0,07$  %dia<sup>-1</sup>). Para o rendimento de carragenana, não foram observadas diferenças significativas nas médias dos tratamentos FU, FA e FC ( $22,45 \pm 1,06\%$ ,  $22,71 \pm 0,45\%$  e  $21,33 \pm 0,32\%$ , respectivamente) (Figura 5).

Figura 5 – A. Taxa de crescimento média (%dia<sup>-1</sup>) e B. rendimento de carragenana (%) dos talos de *K. alvarezii* cultivados durante 28 dias em laboratório. Os valores representam a média  $\pm$  intervalo de confiança (n = 3) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05).



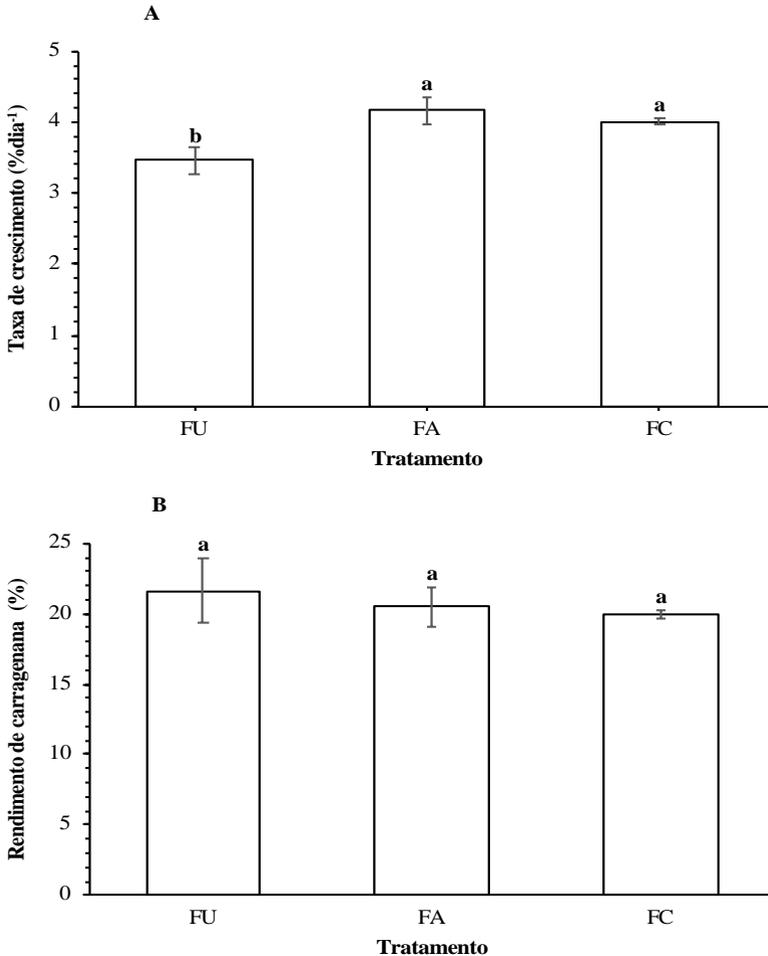
Os parâmetros de temperatura do cultivo no mar são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 –Temperatura (°C) média, mínima e máxima coletados durante 5 semanas de cultivo no mar. Os valores estão representados em média  $\pm$  intervalo de confiança (n = 168, p < 0,05).

<b>Cultivo no Mar</b>			
<b>Semanas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>		
	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	21,75 $\pm$ 0,08	20,63	22,86
<b>2</b>	22,33 $\pm$ 0,04	21,71	23,30
<b>3</b>	22,11 $\pm$ 0,08	21,53	24,54
<b>4</b>	22,54 $\pm$ 0,09	21,56	24,54
<b>5</b>	24,20 $\pm$ 0,18	22,32	26,51

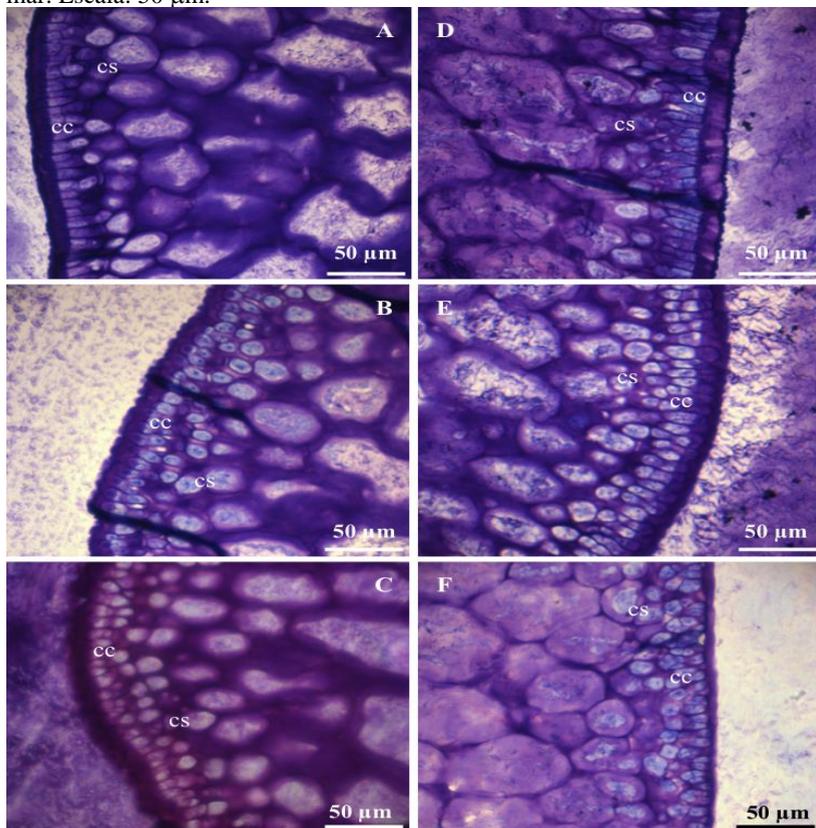
No cultivo no mar, as médias das taxas de crescimento dos tratamentos FA e FC foram semelhantes entre si (4,16  $\pm$  0,19 %dia<sup>-1</sup> e 4,01  $\pm$  0,06 %dia<sup>-1</sup>, respectivamente) e significativamente maiores em relação ao tratamento FU (3,46  $\pm$  0,18 %dia<sup>-1</sup>). Em relação ao rendimento de carragenana, não foram observadas diferenças significativas entre as médias (21,63  $\pm$  2,24%, 20,53  $\pm$  1,24% e 19,91  $\pm$  0,32%, respectivamente) em todos os tratamentos (Figura 6).

Figura 6 – A. Taxa de crescimento média (%dia<sup>-1</sup>) e B. rendimento de carragenana (%) dos talos de *K. alvarezii* durante 34 dias de cultivo no mar. Os valores representam a média  $\pm$  intervalo de confiança (n = 3) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05).



As amostras de *K. alvarezii* observadas sob microscopia de luz mostraram forte reação metacromática à coloração com Azul de Toluidina (AT-O) (Figura 7). Podemos observar que a reação ao AT-O foi similar em todos os tratamentos, mostrando a presença de carragenana nas regiões das células corticais e subcorticais.

Figura 7 – Microscopia de luz de seções transversais de *K. alvarezii* coradas com Azul de Toluidina (AT-O). As imagens indicam a reação metacromática ao AT-O na parede celular das células corticais (cc) na região voltada para o exterior, indicando a presença de carragenana. CS: células subcorticais. A: tratamento FU laboratório; B: tratamento FA laboratório; C: tratamento FC laboratório; D: tratamento FU mar; E: tratamento FA mar; e F: tratamento FC mar. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .



Nas amostras observadas sob microscopia de luz, também podemos observar uma intensa reação ao Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Figura 8) evidenciando a presença de grãos de amido das florídeas nas células corticais e subcorticais em todos os tratamentos (Figura 8A, C e E) e nas células medulares dos tratamentos FU e FC (Figura 8B e F) no cultivo em laboratório. Após o cultivo no mar, foi observado uma aparente redução nessa quantidade de grãos de amido das florídeas em todos os tratamentos. Nesse período, o tratamento FU

(Figura 9A) apresentou maior presença dos grãos de amido nas células corticais e células subcorticiais em relação aos demais (Figura 9C e E). Nas células medulares foram observados poucos grãos de amido nos tratamentos FU e FA (Figura 9B e D), e ausência no tratamento FC (Figura 9F).

Figura 8 - Microscopia de luz de seções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). As imagens indicam a presença de grãos de amido das florídeas (a, seta) nas células corticais (cc), células subcorticiais (cs) e células medulares (cm) após o cultivo em laboratório. PC: parede celular. A e B: tratamento FU; C e D: tratamento FA; E e F: tratamento FC. Escala: 50  $\mu$ m.

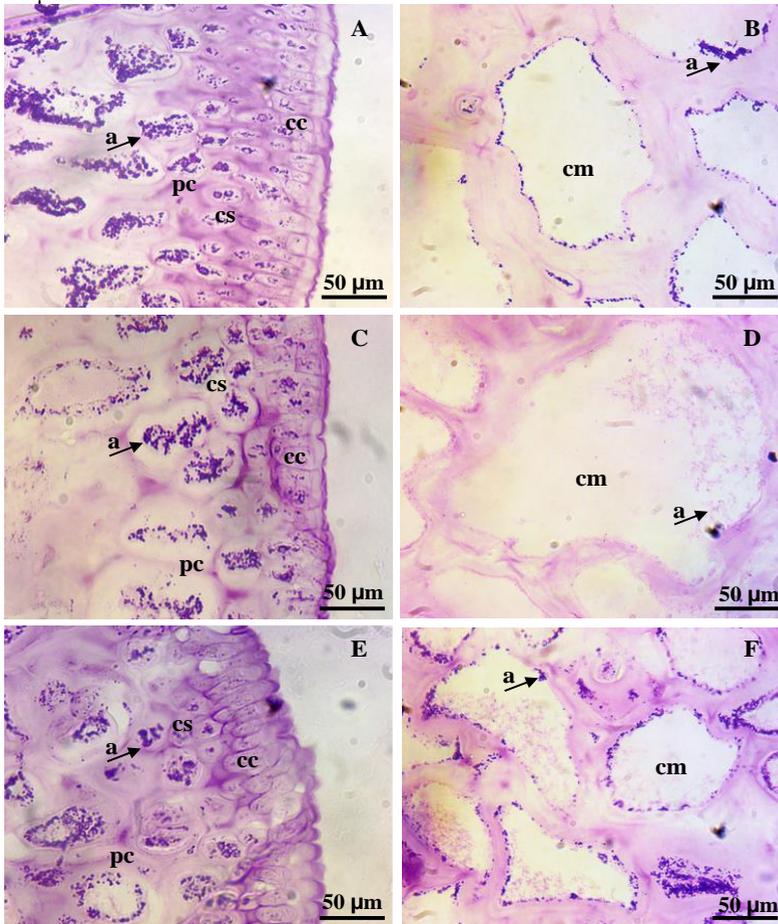
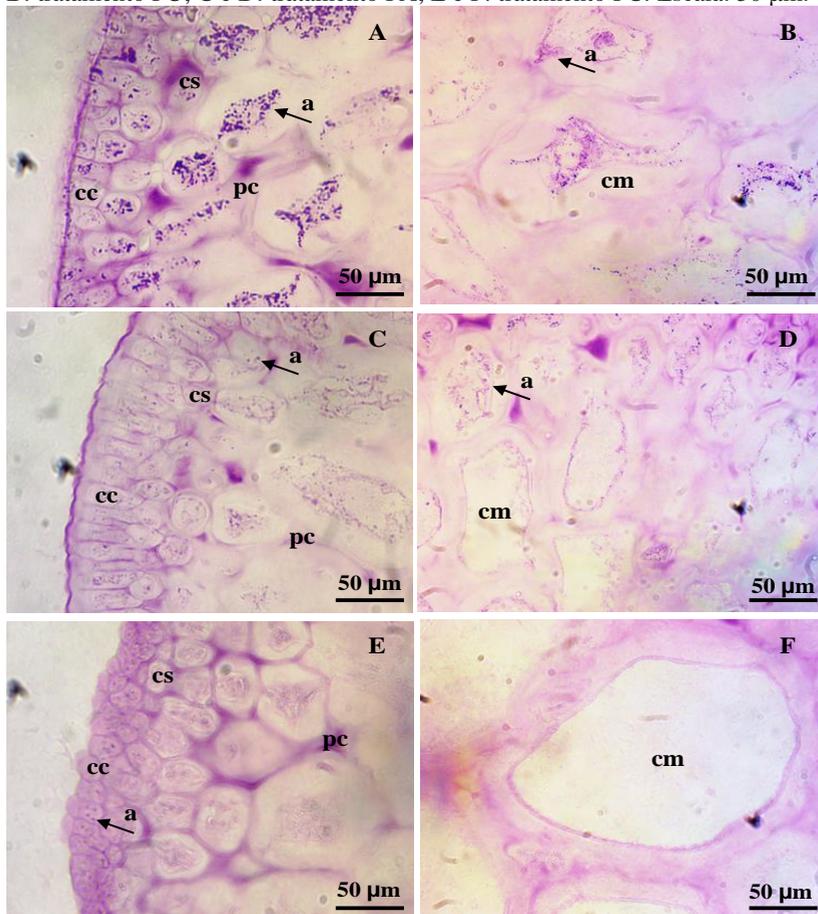


Figura 9 - Microscopia de luz de seções transversais de *K. alvarezii* coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS). As imagens indicam a presença de grãos de amido das florídeas (a, seta) nas células corticais (cc), células subcorticais (cs) e células medulares (cm), após o cultivo no mar. PC: parede celular. A e B: tratamento FU; C e D: tratamento FA; E e F: tratamento FC. Escala: 50  $\mu$ m.



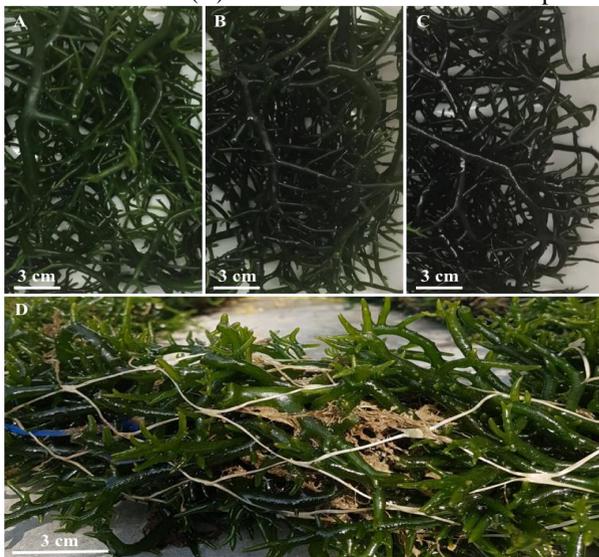
As amostras de *K. alvarezii* dos tratamentos FU ( $11,89 \pm 2,35$   $\text{mg g}^{-1}$ ) apresentaram quantidades significativamente maiores de amido no final do cultivo em laboratório ( $T_i$ ) em relação ao tratamento FA ( $6,88 \pm 1,57$   $\text{mg g}^{-1}$ ). Após o cultivo no mar ( $T_f$ ) ocorreu uma redução significativa somente na concentração de amido do tratamento FC ( $8,28 \pm 0,81$   $\text{mg g}^{-1}$  para  $5,05 \pm 0,23$   $\text{mg g}^{-1}$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de amido ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de *K. alvarezii* do cultivo no mar no tempo inicial ( $T_i$ ) e final ( $T_f$ ). Os valores são representados em média  $\pm$  intervalo de confiança ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período de cultivo ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes períodos de cultivo no mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ).

Tratamentos	Tempo inicial ( $T_i$ )		
	FU	FA	FC
Concentração de amido ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$11,89 \pm 2,35^a$	$6,88 \pm 1,57^b$	$8,28 \pm 0,81^{abA}$
Tratamentos	Tempo final ( $T_f$ )		
	FU	FA	FC
Concentração de amido ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$7,72 \pm 2,92$	$7,08 \pm 2,40$	$5,05 \pm 0,23^B$

Ao final do cultivo em laboratório, foi possível observar uma coloração diferente nos talos das algas, os quais se tornaram mais escuros conforme o aumento do regime de fertilização. Já as algas cultivadas no mar apresentaram a mesma coloração após os 34 dias de cultivo (Figura 10).

Figura 10 - Coloração dos talos de *K. alvarezii* após os 28 dias de cultivo em laboratório: A: tratamento FU; B: tratamento FA; e C: tratamento FC e dos talos cultivados no mar (D) durante 34 dias na Fazenda Experimental do Sambaqui.



As concentrações de clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas [ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) e aloficocianina (APC)] foram similares entre todos os tratamentos no final do cultivo em laboratório ( $T_i$ ). Ao final do cultivo no mar ( $T_f$ ), foi observado somente diferença significativa na ficocianina entre os tratamentos. A ficocianina nesse período foi significativamente maior no tratamento FU ( $7,97 \pm 1,72 \mu\text{g g}^{-1}$ ) em relação ao tratamento FC ( $3,90 \pm 1,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Quando os tratamentos entre os diferentes períodos são considerados, é possível verificar que os carotenoides dos tratamentos FA e FC reduziram significativamente ( $1,06 \pm 0,18 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $0,56 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,95 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $0,63 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente). A redução significativa da concentração de ficoeritrina também pode ser observada nos tratamentos FU e FC ( $5,31 \pm 1,80 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $1,51 \pm 0,49 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $6,37 \pm 1,45 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $2,31 \pm 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente). Um aumento significativo da concentração de ficocianina foi observado no tratamento FU ( $4,73 \pm 1,00 \mu\text{g g}^{-1}$  para  $7,97 \pm 1,72 \mu\text{g g}^{-1}$ ) considerando o início e o final dos cultivos no mar (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), carotenóides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e ficobiliproteínas [ficoeritrina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), ficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e aloficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *K. alvarezii* do cultivo no mar no tempo inicial ( $T_i$ ) e final ( $T_f$ ). Os valores são representados em média  $\pm$  intervalo de confiança ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). As letras minúsculas representam as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período de cultivo ( $p < 0,05$ ) e as letras maiúsculas representam as diferenças significativas entre os diferentes períodos de cultivo no mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ).

Tratamento	Tempo Inicial ( $T_i$ )		
	FU	FA	FC
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4,70 $\pm$ 2,27	6,37 $\pm$ 1,75	5,96 $\pm$ 1,92
Carotenóides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,82 $\pm$ 0,16	1,06 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup>	0,95 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>
Ficoeritrina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	5,31 $\pm$ 1,80 <sup>A</sup>	4,83 $\pm$ 0,46	6,37 $\pm$ 1,45 <sup>A</sup>
Ficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4,73 $\pm$ 1,00 <sup>B</sup>	6,54 $\pm$ 0,48	7,08 $\pm$ 3,92
Aloficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	2,95 $\pm$ 1,89	2,66 $\pm$ 0,38	3,40 $\pm$ 1,39
Tratamento	Tempo final ( $T_f$ )		
	FU	FA	FC
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	4,82 $\pm$ 0,54	4,78 $\pm$ 2,08	4,76 $\pm$ 2,73
Carotenóides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,71 $\pm$ 0,13	0,56 $\pm$ 0,13 <sup>B</sup>	0,63 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup>
Ficoeritrina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1,51 $\pm$ 0,49 <sup>B</sup>	3,14 $\pm$ 1,40	2,31 $\pm$ 0,25 <sup>B</sup>
Ficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	7,97 $\pm$ 1,72 <sup>aA</sup>	5,91 $\pm$ 1,15 <sup>ab</sup>	3,90 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>
Aloficocianina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	3,16 $\pm$ 0,90	3,87 $\pm$ 1,51	1,83 $\pm$ 0,62

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que a *Kappaphycus alvarezii* pode ser mantida em laboratório usando o BFT25 como fertilizante durante 4 semanas e que os regimes de fertilização não prejudicaram o desenvolvimento da alga quando transplantada para o mar. Os parâmetros de luz, temperatura, salinidade e pH são fatores abióticos importantes que interferem na fisiologia das algas e se mantiveram dentro das condições ideais para o desenvolvimento da alga durante o experimento (TRONO; OHNO, 1989; GRANBOM et al., 2001; HAYASHI et al., 2011a; ARAUJO et al., 2014; TEE et al. 2015; BORLONGAN et al., 2016). As macroalgas utilizam principalmente nitrogênio e fósforo como os principais nutrientes para o seu desenvolvimento (HARRISON; HURD, 2001), e esses estavam presentes em quantidade que pareceu suficiente para o seu desenvolvimento.

Entretanto, a aclimação das algas transferidas do mar para os tanques foi um desafio. As algas coletadas no início do inverno (21 de junho) que seriam utilizadas no experimento sofreram grande mortalidade causada principalmente por *ice-ice*. O *ice-ice* é uma doença bacteriana responsável pelas maiores perdas de produção nos cultivos de *K. alvarezii*, e ocorre normalmente após estresses abióticos como variações bruscas de temperatura e salinidade (LARGO et al., 1995a; LARGO et al., 1995b; HAYASHI et al. 2010). O mesmo não ocorreu com as algas coletadas no início do outono (28 de março), que apesar de também ter ocorrido *ice-ice* nos talos, a perda de biomassa foi mínima e não afetou a sobrevivência. Por esse motivo, foram utilizados nesse experimento talos que já estavam aclimatadas em laboratório.

No inverno, a água normalmente precisa ser aquecida nos cultivos em laboratório. Nessa época do ano, foi observado que um estresse de temperatura pode ocorrer no momento da troca de água, comprometendo a manutenção das linhagens em laboratório. A captação da água do laboratório é realizada a partir de ponteiras localizadas na praia (Barra da Lagoa/SC) e utilizadas para o manejo das macroalgas, onde é esterilizada para o uso. Quando a água captada para troca não é aquecida foi observada perda de biomassa. Protocolos de aclimação nos meses de inverno estão sendo estabelecidos para evitar essas perdas durante as fases de aclimações.

Após o período de aclimação, as algas apresentaram resultados favoráveis ao desenvolvimento dos talos utilizando o BFT25 como fonte de nutrientes. Segundo Pires (2014), o BFT25 pode ser usado como

alternativa de substituição da solução von Stosch 50% no cultivo em tanques de *K. alvarezii*, meio de cultura comumente utilizado para manutenção e cultivo em laboratório. Esse autor ainda destaca que a utilização de um fertilizante é essencial para a manutenção das linhagens nessas condições. Durante o cultivo em laboratório, as algas apresentaram um ligeiro crescimento durante todo o período, mostrando que o BFT25 não prejudicou a manutenção das matrizes de *K. alvarezii*.

As taxas de crescimento dos tratamentos FU e FA ( $0,67 \pm 0,15 \text{ \%dia}^{-1}$  e  $0,74 \pm 0,04 \text{ \%dia}^{-1}$ , respectivamente) foram maiores que o tratamento FC ( $0,44 \pm 0,07 \text{ \%dia}^{-1}$ ) durante o período experimental, sendo menores que os resultados observados por Pedra et al. (2015) e Pires (2017) ( $1,56 \pm 0,14 \text{ \%dia}^{-1}$  em FC e  $1,19 \pm 0,04 \text{ \%dia}^{-1}$  em FU, respectivamente), em cultivos realizados durante 5 semanas, e maiores que Berchof (2018) ( $0,29 \pm 0,04 \text{ \%dia}^{-1}$  em FC) em cultivos de 4 semanas. No entanto, as concentrações de nutrientes dos inóculos de BFT25 observados por Pedra et al. (2015) e Pires (2017) foram maiores, o que justificaria a diferença nas taxas de crescimento. Nesse período, provavelmente a alga acumulou os nutrientes inorgânicos disponíveis no BFT25. Algumas algas vermelhas possuem essa capacidade de acumular reservas de nitrogênio e utilizá-las posteriormente em seu desenvolvimento (REED, 1990). Hayashi et al. (2008) e Pires (2017) também observaram esse possível acúmulo de nutrientes em *K. alvarezii* cultivada com o uso de efluentes aquícolas.

Pela análise de microscopia de luz, foi possível observar a presença de grãos de amido das florídeas, nas estruturas celulares corticais, subcorticais e medulares. Com a quantificação da concentração desses grãos foi possível comprovar que ao final do período de fertilização ( $T_i$ ) o tratamento FU apresentou maior concentração de amido. Provavelmente a alga acumulou amido como reserva e estratégia de proteção no tratamento FU, devido a menor frequência de fertilização. Os grãos de amidos das florídeas são compostos de reservas de energia e carbono das algas, responsáveis por diversos processos celulares (ex.: crescimento) e proteção a fatores de estresse (VITOVA et al., 2015).

Além disso, uma variação na coloração das algas também foi observada. O tratamento FC apresentou maior coloração dos talos, seguido por FA e FU, respectivamente, durante os cultivos em laboratório. Essa coloração sugere uma maior concentração de nitrogênio tecidual na alga, como observado por Nagler et al. (2003) na fertilização de *Gracilaria parvispora* em tanques. A concentração de

nitrogênio disponível no ambiente de cultivo influencia na produção de pigmentos fotossintetizantes, micosporinas e no crescimento das algas, contribuindo na aclimação e fotoproteção (DAVISON et al., 2007; BARUFI et al., 2011). No entanto, os pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, carotenóides totais e ficobiliproteínas) analisados mantiveram-se estáveis, não apresentando diferenças significativas após o período de fertilização em laboratório ( $T_1$ ).

No período de cultivo no mar, os talos não sofreram danos aparentes ou ocorrência de *ice-ice* durante o período de cultivo e as algas permaneceram saudáveis. As taxas de crescimento dos tratamentos FA e FC ( $4,16 \pm 0,19 \text{ %dia}^{-1}$  e  $4,01 \pm 0,06 \text{ %dia}^{-1}$ , respectivamente) foram superiores ao tratamento FU ( $3,46 \pm 0,18 \text{ %dia}^{-1}$ ). Esses valores são maiores que os observados por Hayashi et al. (2011b) na mesma estação do ano e local. Isso sugere que a fertilização com BFT25 dos propágulos em laboratório pode gerar um efeito importante nos cultivos no mar, e que o aumento do regime de fertilização está relacionado com as maiores taxas de crescimento. Esses resultados corroboram com os resultados de NELSON et al. (2001), NAGLER et al. (2003) e HAYASHI et al. (2008).

As reservas dos grãos de amido nas estruturas celulares aparentemente sofreram alterações, como observado em todos os tratamentos analisados por microscopia de luz. Entretanto, essa redução foi comprovada pela quantificação desses grãos apenas no tratamento FC ( $8,28 \pm 0,81 \text{ mg g}^{-1}$  para  $5,05 \pm 0,23 \text{ mg g}^{-1}$ ). A taxa de crescimento, sugere que o regime de fertilização com menor frequência (FU) resultou numa menor capacidade de adaptação às novas condições de cultivo. Estudos anteriores já demonstraram que fatores de estresse como a limitação de nutrientes e variações de salinidade em macroalgas podem aumentar as reservas de amido de florídeas nas estruturas celulares como estratégia de proteção (HAYASHI et al., 2011a; PRABHU et al., 2019). Além disso, foram observados uma coloração mais clara e uniforme dos talos e uma redução nos pigmentos fotossintetizantes, sugerindo que as algas utilizaram esses compostos armazenados no cultivo em laboratório para aclimação e crescimento no mar.

Quanto ao rendimento de carragenana, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nos cultivos em laboratório e no mar, sendo os valores similares entre as duas fases. Esse resultado foi evidenciado nas análises de microscopia de luz, o espessamento das paredes celulares foi similar nos dois períodos de cultivo. Os rendimentos observados foram semelhantes aos encontrados

no cultivo no mar de algas fertilizadas com efluente de peixes (HAYASHI et al. 2008) e menores aos encontrados por Pires (2017) em cultivos de laboratório utilizando BFT25 para fertilização. Já no cultivo no mar, o rendimento foi similar aos observados anteriormente em Santa Catarina e São Paulo (HAYASHI et al., 2007a; HAYASHI et al., 2007b; HAYASHI et al., 2011b). Essa manutenção do rendimento de carragenana é um resultado interessante, uma vez que a fertilização em laboratório com BFT25 não comprometeu a produção de carragenana no início do ciclo produtivo da alga no mar.

Os resultados observados são importantes para definição de estratégias e protocolos para a manutenção de *K. alvarezii* em laboratório. Tanto o tratamento FA quanto FC apresentaram resultados interessantes considerando a resposta à fertilização no cultivo no mar. Ambos os tratamentos não apresentaram sinais de estresse na transferência do laboratório para o mar, e tanto o crescimento quanto o rendimento de carragenana foram similares. O tratamento FC apresentou taxas de crescimento significativamente menores em laboratório, o que pode ser interessante se for considerado a manutenção das linhagens nesse ambiente de cultivo. O aumento de biomassa significa aumento de custos de manutenção em laboratório, principalmente em bombas e aeradores. O tratamento FC também poderia ser considerado em casos de cultivos multitróficos integrados em sistemas de bioflocos, uma vez que o efluente poderia circular constantemente dentro do sistema. Por outro lado, o tratamento FA poderia promover uma menor ocorrência de possíveis epífitas que podem surgir com o uso contínuo de nutrientes formulados ou efluentes aquícolas (microalgas, bactérias, outras macroalgas, entre outros). Esse problema também poderia ser contornado, aumentando a densidade de macroalgas nos tanques de cultivo. Novos estudos deverão ser realizados, considerando a densidade na manutenção dessas linhagens.

## **5 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a fertilização em laboratório com BFT25 contribuiu na aclimação e proteção das algas quando cultivadas no mar, aumentando as reservas nas estruturas celulares para manutenção das matrizes em épocas desfavoráveis para o cultivo. O tratamento FC é o mais indicado para manutenção de algas em cultivos.



## REFERÊNCIAS

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005). **Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater**. 21st ed. Washington, DC.
- ARAÚJO PG, RIBEIRO ALN, YOKOYA NS, FUJII MT (2014). Temperature and salinity responses of drifting specimens of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) farmed on the Brazilian tropical coast. **Journal of applied phycology**, v. 26, n. 5, p. 1979-1988.
- BARUFI JB, KORBEE N, OLIVEIRA MC, FIGUEROA FL (2011). Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 457-466.
- BERCHOF FF (2018). **Influência de diferentes densidades de cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na manutenção de linhagens em laboratório e no cultivo no mar**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Curso de Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 29 p.
- BOUZON ZL, OURIQUES LC, OLIVEIRA EC (2006). Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of applied phycology**, v. 18, p. 287-294.
- BORLONGAN IAG, LUHAN MRJ, PADILLA PIP, HURTADO AQ (2016). Photosynthetic responses of ‘*Neosiphonia* sp. epiphyte-infected’ and healthy *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) to irradiance, salinity and pH variations. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 5, p. 2891-2902.
- BRITO LO, ARANTES R, MAGNOTTI C, DERNER R, PCHARA F, OLIVERA A, VINATEA L (2014). Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 497-508.
- BRITO LO, CHAGAS AM, DA SILVA EP, SOARES RB, SEVERI W, GÁLVEZ AO (2016). Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an

integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). **Aquaculture research**, v. 47, n. 3, p. 940-950.

BRITO LO, JUNIOR LC, ABREU JL, SEVERI W, MORAES LB, GALVEZ AO (2018a). Effects of two commercial feeds with high and low crude protein content on the performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in an integrated biofloc system with the seaweed *Gracilaria birdiae*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 1, p. e0603.

BRITO LO, JUNIOR LDOC, LAVANDER HD, ABREU JLD, SEVERI W, GÁLVEZ AO (2018b). Bioremediation of shrimp biofloc wastewater using clam, seaweed and fish. **Chemistry and Ecology**, v. 34, n. 10, p. 901-913.

CRAB R, DEFOIRDT T, BOSSIER P, VERSTRAETE W (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356, p. 351-356.

DAVISON IR, JORDAN TL, FEGLEY JC, GROBE CW (2007). Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation<sup>1</sup>. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 636-646.

EMERENCIANO MGC, MARTÍNEZ-CÓRDOVA LR, MARTÍNEZ-PORCHAS M, MIRANDA-BAEZA A (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. In: **Water Quality**. InTech.

FAO (2018). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome. 210 p.

FOUROOGHIFARD H, MATINFAR A, MORTAZAVI MS, GHADIKOLAEI RK, MIRBAKHS M (2017). Growth parameters of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and red seaweed *Gracilaria corticata* in integrated culturing method under zero water exchange system. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 10, p. 5235-5242.

GAHAN PB (1984). **Plant histochemistry and cytochemistry**. Academic Press.

- GORDON EM, MCCANDLESS EL (1973). Ultrastructure and Histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. **Proceedings of Nova Scotia Institute Science**, 27, 111-133.
- GRANBOM M, PEDERSÉN M, KADEL P, LÜNING K (2001). Circadian rhythm of photosynthetic oxygen evolution in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): dependence on light quantity and quality. **Journal of phycology**, v. 37, n. 6, p. 1020-1025.
- GRASSHOFF K, EHRHARDT M, KREMLING K (1983). **Methods of Seawater Analysis**. 2nd ed. Verlag Chemie, Weinheim, New York, 419 p.
- HARRISON PJ, HURD CL (2001). Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture. **Cahiers de biologie marine**, v. 42, n. 1-2, p. 71-82.
- HAYASHI L, PAULA EJ, CHOW F (2007a). Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 393-399.
- HAYASHI L, OLIVEIRA EC, BLEICHER-LHONNEUR G, BOULENGUER P, PEREIRA RT, von SECKENDORFF R, SHIMODA VT, LEFLAMAND A, VALLÉE P, CRITCHLEY AT (2007b). The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 5, p. 505.
- HAYASHI L, YOKOYA NS, OSTINI S, PEREIRA RTL, BRAGA ES, OLIVEIRA EC (2008). Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water. **Aquaculture**, v. 277, p. 185-191.
- HAYASHI, L, HURTADO AQ, MSUYA FE, BLEICHER-LHONNEUR G, CRITCHLEY AT (2010). A review of *Kappaphycus* farming: prospects and constraints. In: **Seaweeds and their role in globally changing environments**. Springer, Dordrecht, p. 251-283.

- HAYASHI L, FARIA GS, NUNES BG, ZITTA CS, SCARIOT LA, ROVER T, FELIX MRL, BOUZON ZL (2011a). Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 439-447.
- HAYASHI L, SANTOS AA, NUNES BG, SOUZA MS, FONSECA ALD, BARRETO PLM., OLIVEIRA EC, BOUZON ZL (2011b). *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical water in Southern Brasil. **Journal of Applied Phycology**. v. 23, p. 337-343.
- HISCOX JD, ISRAELSTAM GF (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334.
- KURSAR TA, VAN DER MEER J, ALBERTE RS (1983). Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses of pigment mutations. **Plant Physiology**, v. 73, n. 2, p. 353-360.
- LARGO DB, FUKAMI K, NISHIJIMA T, OHNO M (1995a). Laboratory-induced development of the ice-ice disease of the farmed red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 6, p. 539-543.
- LARGO DB, FUKAMI K, NISHIJIMA T (1995b). Occasional pathogenic bacteria promoting ice-ice disease in the carrageenan-producing red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of applied phycology**, v. 7, n. 6, p. 545-554.
- McHUGH DJ (2003). **A guide to the seaweed industry**. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 105 p.
- MDIC (2019). MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO. **Exportação e importação geral (Comex Stat)**. Período da consulta: 01/2018 a 12/2018). Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acessado em: 11 jan. 2019.

- NAGLER PL, GLENN EP, NELSON SG, NAPOLEAN S (2003). Effects of fertilization treatment and stocking density on the growth and production of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in cage culture at Molokai, Hawaii. **Aquaculture**. v. 219, p. 379-391.
- NELSON SG, GLENN EP, CONN J, MOORE D, WALSH T, AKUTAGAWA M (2001). Cultivation of *Gracilaria parvispora* (Rodophyta) in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: a two-phase polyculture system. **Aquaculture**. v. 193, p. 239-248.
- PEDRA AGLM, RAMLOV F, MARASCHIN M, HAYASHI L (2015). Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, v. 479, p. 297-303.
- PIRES CM (2014). **Análise do potencial de fertilização da macroalga *Kappaphycus alvarezii* com efluentes oriundos da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema de bioflocos**. TCC (Graduação em Engenharia de Aquicultura) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 25 p.
- PIRES CM (2017). **Aproveitamento do efluente da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* em sistema bioflocos pela macroalga *Kappaphycus alvarezii***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 54 p.
- PRABHU M, CHEMODANOV A, GOTTLIEB R, KAZIR M, NAHOR O, GOZIN M, ISRAEL A, LIVNEY YD, GOLBERG A (2019). Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. **Algal Research**, v. 37, p. 215-227.
- REED RH (1990). Solute accumulation and osmotic adjustment. KM Cole, RG Sheath (Eds.). **Biology of the red algae**, Cambridge University Press, Cambridge, p. 147-170.
- TEE MZ, YONG YS, RODRIGUES KF, YONG WTL (2015). Growth rate analysis and protein identification of *Kappaphycus alvarezii*

(Rhodophyta, Gigartinales) under pH induced stress culture. **Aquaculture Reports**, v. 2, p. 112-116.

TRONO GC, OHNO M (1989). Seasonality in the biomass production of *Eucheuma* strains in northern Bohol, Philippines. **In: Scientific survey of marine algae and their resources in the Philippine Islands. A Technical Report of the Manisstry of Educati**, p. 71–80.

UMBREIT WW, BURRIS RH (1964). **Method for glucose determination and other sugars**. Manometric techniques, Burgess Publishing Co, Red Lion, PA, USA.

VAN WYK, P (1999). Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, p. 125-139.

VITOVA M, BISOVA K, KAWANO S, ZACHLEDER V (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1204-1218.

YONG YS, YONG WTL, ANTON A (2013). Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 1831-1834.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ARAUJO, P. G.; MIRANDA, G. E.; BARROS-BARRETO, M. B.; FUJII, M. Molecular identification of the exotic lineage of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) cultivated in the tropical region of Brazil. **Phytotaxa**, v. 109, n. 1, p. 17-26, 2013.

AZANZA, R. V.; ASK, E. Reproductive Biology and Eco-physiology of Farmed *Kappaphycus* and *Eucheuma*. In: **Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities**. Springer, Cham, p. 45-53, 2017.

BERCHOF, F. F. **Influência de diferentes densidades de cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na manutenção de linhagens em laboratório e no cultivo no mar**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Curso de Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 29 p., 2018.

BRITO, L. O.; ARANTES, R.; MAGNOTTI, C.; DERNER, R.; PCHARA, F.; OLIVERA, A.; VINATEA, L. Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 497-508, 2014.

BRITO, L. O.; CHAGAS, A. M.; DA SILVA, E. P.; SOARES, R. B.; SEVERI, W.; GÁLVEZ, A. O. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). **Aquaculture research**, v. 47, n. 3, p. 940-950, 2016.

BRITO, L. O.; JUNIOR, L. C.; ABREU, J. L.; SEVERI, W.; MORAES, L. B.; GALVEZ, A. O. Effects of two commercial feeds with high and low crude protein content on the performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in an integrated biofloc system with the seaweed *Gracilaria birdiae*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 1, p. e0603, 2018a.

BRITO, L. O.; JUNIOR, L. D. O. C.; LAVANDER, H. D.; ABREU, J. L. D.; SEVERI, W.; GÁLVEZ, A. O. Bioremediation of shrimp biofloc wastewater using clam, seaweed and fish. **Chemistry and Ecology**, v. 34, n. 10, p. 901-913, 2018b.

CASTELAR, B.; REIS, R. P.; BASTOS, M. Contribuição ao protocolo de monitoramento ambiental da maricultura de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex PC Silva (Areschougiaceae-Rhodophyta) na baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 613-617, 2009a.

CASTELAR, B.; REIS, R. P.; MOURA, A. L.; KIRK, R. Invasive potential of *Kappaphycus alvarezii* off the south coast of Rio de Janeiro state, Brazil: a contribution to environmentally secure cultivation in the tropics. **Botanica Marina**, v. 52, n. 4, p. 283-289, 2009b.

CASTELAR, B.; SIQUEIRA, M. F.; SÁNCHEZ-TAPIA, A.; REIS, R. P. Risk analysis using species distribution modeling to support public policies for the alien alga *Kappaphycus alvarezii* aquaculture in Brazil. **Aquaculture**, v. 446, p. 217-226, 2015.

CHOPIN, T., BUSCHMANN, A.H., HALLING, C., TROELL, M., KAUTSKY, N., NEORI, A., KRAEMER, G.P., ZERTUCHE-GONZALEZ, J.A., YARISH, C., NEEFUS, C. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key towards sustainability. **Journal of Phycology**. v. 37, p. 975–986, 2001.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356, p. 351-356, 2012.

DAWES, C. J.; LLUISMA, A. O.; TRONO, G. C. Laboratory and field growth studies of commercial strains of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. **Journal of applied phycology**, v. 6, n. 1, p. 21-24, 1994.

EMERENCIANO, M. G. C.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. In: **Water Quality**. InTech, p. 91-109, 2017.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome. 243 p., 2016.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome. 210 p., 2018.

FLORES, A. L. G. **Viabilidade do cultivo em tanques de macroalgas *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, gigartinales) para manutenção de matrizes**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 73 p., 2014.

FOUROOGHIFARD, H.; MATINFAR, A.; MORTAZAVI, M. S.; GHADIKOLAEI, R. K.; MIRBAKHSH, M. Growth parameters of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and red seaweed *Gracilaria corticata* in integrated culturing method under zero water exchange system. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 10, p. 5235-5242, 2017.

HARRISON, P. J.; HURD, C. L. Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture. **Cahiers de biologie marine**, v. 42, n. 1-2, p. 71-82, 2001.

HAYASHI, L., YOKOYA, N. S., OSTINI, S., PEREIRA, R. T. L., BRAGA, E. S., OLIVEIRA, E. C. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water. **Aquaculture**, v. 277, p. 185-191, 2008.

HAYASHI, L., SANTOS, A. A., NUNES, B. G., SOUZA, M. S., FONSECA, A. L. D., BARRETO, P. L. M., OLIVEIRA, E. C., BOUZON, Z. L. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougaceae) cultivated in subtropical water in Southern Brasil. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 337-343, 2011.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Instrução Normativa IBAMA N° 185**, de 22 de julho de 2008. Disponível em: [http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao\\_no\\_rmativa/2008/in\\_ibama\\_185\\_2008\\_permitircultivokappaphycus\\_alvareii\\_rsscrevogainibama1652007.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_no_rmativa/2008/in_ibama_185_2008_permitircultivokappaphycus_alvareii_rsscrevogainibama1652007.pdf). Acessado em: 10 dez 2018, 2008.

ISRAEL, A.; LEVY, I.; FRIEDLANDE R, M. Experimental tank cultivation of *Porphyra* in Israel. In: **Eighteenth International Seaweed Symposium**. Springer, Dordrecht, p. 9-14, 2006.

LUHAN, M. R. J.; AVAÑCENA, S. S.; MATEO, J. P. Effect of short-term immersion of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty in high nitrogen on the growth, nitrogen assimilation, carrageenan quality, and

occurrence of “ice-ice” disease. **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 2, p. 917-922, 2015.

McHUGH, D. J. **A guide to the seaweed industry**. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 105 p., 2003.

MDIC. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO. **Exportação e importação geral (Comex Stat)**. Período da consulta: 01/2015 a 12/2015 e 01/2018 a 12/2018). Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acessado em: 11 jan. 2019.

NAGLER, P. L., GLENN, E. P., NELSON, S. G., NAPOLEAN, S. Effects of fertilization treatment and stocking density on the growth and production of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in cage culture at Molokai, Hawaii. **Aquaculture**. v. 219, p. 379-391, 2003.

NELSON, S. G., GLENN, E. P., CONN, J., MOORE, D., WALSH, T., AKUTAGAWA, M. Cultivation of *Gracilaria parvispora* (Rodophyta) in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: a two-phase polyculture system. **Aquaculture**. v. 193, p. 239-248, 2001.

OLIVEIRA, E. C.; SILVA, B.N.T.; AMÂNCIO, C.D. Fitobentos (Macroalgas). In: LOPES, R. M. **Informe sobre as espécies invasoras marinhas do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 107-139, 2009.

PAULA, E. J. Da marinomia a maricultura da alga exótica, *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama Aquicultura**, v. 8, p. 10-15, 1998.

PAULA, E. J.; ERBERT, C.; PEREIRA, R. T. L. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in vitro. **Phycological research**, v. 49, n. 3, p. 155-161, 2001.

PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L.; OHNO, M. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, v. 50, n. 1, p. 1-9, 2002.

PEDRA, A. G. L. M.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; HAYASHI, L. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, v. 479, p. 297-303, 2015.

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

PIRES, C. M. **Aproveitamento do efluente da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* em sistema biofoco pela macroalga *Kappaphycus alvarezii*.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 54 p., 2017.

PORSE, H.; RUDOLPH, B. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2187-2200, 2017.

QIAN, P. Y.; WU, C. Y., WU, M.; XIE, Y. K. Integrated cultivation of the red alga *Kappaphycus alvarezii* and the pearl oyster *Pinctada martensi*. **Aquaculture**, v. 147(1), p. 21-35, 1996.

RODRIGUEZA, M. R. C.; MONTAÑO, M. N. E. Bioremediation potential of three carrageenophytes cultivated in tanks with seawater from fish farms. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 6, p. 755-762, 2007.

SANTOS, A. A.; DOROW, R.; ARAÚJO, L. A.; HAYASHI, L. Socioeconomic analysis of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* and mollusks (*Crassostrea gigas* and *Perna perna*) farming in Santa Catarina State, Southern Brazil. **CUSTOS E AGRONEGOCIO ON LINE**, v. 14, n. 3, p. 443-472, 2018

SILVA, B. N. T.; AMANCIO, C. E.; OLIVEIRA FILHO, E. C. Exotic marine macroalgae on the Brazilian coast: a revision. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 2, p. 403-414, 2010.

SILVA, K. R.; WASIELESKY JR, W.; ABREU, P. C. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 1, p. 30-41, 2013.

TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V. Seaweed cultivation: methods and problems. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 36, n. 4, p. 227-242, 2010.

TROELL, M., JOYCE, A., CHOPIN, T., NEORI, A., BUSCHMANN, A. H., FANG, J. G. Ecological engineering in aquaculture potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. **Aquaculture**. v. 297, n. 1, p. 1-9, 2009.

ZULDIN, W. H.; SHAPAWI, R. Performance of red seaweed (*Kappaphycus* sp.) cultivated using tank culture system. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 10, p. 1-12, 2015.

ZULDIN, W. H.; YASSIR, S.; SHAPAWI, R. Growth and biochemical composition of *Kappaphycus* (Rhodophyta) in customized tank culture system. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 4, p. 2453-2458, 2016.