



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* CULTIVADA *in vitro*
COM EFLUENTE DE BIOFLOCOS E EXTRATO DE
*Ascophyllum nodosum***

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: Leila Hayashi
Coorientador: Marcelo Maraschin

Anna Gabrielle La Macchia Pedra

Florianópolis
2015

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

Pedra, Anna Gabrielle La Macchia

Crescimento e produção de compostos bioativos da macroalga *Kappaphycus alvarezii* cultivada in vitro com efluente de bioflocos e extrato de *Ascophyllum nodosum* / Anna Gabrielle La Macchia Pedra ; orientadora, Leila Hayashi ; coorientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC, 2015.

46 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. AMPEP. 3. bioestimulação. 4. cottoni. 5. manipulação epigenética. I. Hayashi, Leila. II. Maraschin, Marcelo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Crescimento e produção de compostos bioativos da macroalga
Kappaphycus alvarezii cultivada *in vitro* com efluente de bioflocos e
extrato de *Ascophyllum nodosum***

Por

ANNA GABRIELLE LA MACCHIA PEDRA

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 Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dra. Leila Hayashi – *Orientadora*

Dr. Bruno Corrêa da Silva

Dr. Leonardo Rubi Rörig

Dra. Renata Perpetuo Reis

Dedico este trabalho àqueles que me despedi na Bahia com o compromisso de não deixar que a saudade fosse em vão. Todo esse amor e apoio desconhecem a distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC pela infraestrutura e pelos profissionais envolvidos na minha formação, em especial ao Carlito Aloísio Klunk;

À Profa. Dra. Leila Hayashi pela dedicação e comprometimento como orientadora e por fornecer ensinamentos valiosos sobre as macroalgas e a vida;

Ao Prof. Marcelo Maraschin por ter aceitado me co-orientar e por viabilizar a minha primeira expedição à complexa e fascinante bioquímica;

À Profa. Dra. Guisla Boehs que será sempre um exemplo de educadora e pesquisadora;

Aos membros da banca pela disponibilidade, empenho e contribuições;

Aos meus colegas e amigos da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC. Filipe, Clóvis, Fábio, Eduardo, Mariane, Marina, Mathias, Ticiane, Ana Luiza, Marco, Vítor, Silvano, Evaldo e Ronaldo foi maravilhoso dividir o meu cotidiano com vocês;

Aos que trabalham no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, em especial a Fernanda Ramlov, Fernanda Kokowicz, Eva Regina e Cláudia por terem tido paciência com as minhas dúvidas mais tolas;

Ao Laboratório de Camarões Marinhos, pela infraestrutura, pelo efluente e por ter permeado todo o meu aprendizado. Em especial, agradeço ao Carlos, Marysol, Isabela e Suellen;

Ao Caio Magnotti que quase não conheço, mas que sempre servirá de exemplo de empatia;

Aos demais colegas do Programa que sempre cediam seu tempo para debater sobre a aquicultura ou qualquer outro assunto dos corredores do CCA ao beco dos coroas;

Aos que fazem parte da minha vida pessoal, espero ter sido **CONSTANTEMENTE** grata por tudo que fazem e representam para mim. Sem vocês viveria vazia de sonhos, felicidade e motivação. Como teria forças para sorrir e enfrentar esse mundo com otimismo?

“Supere seus limites. Não se conforme com a
informação. Busque, atreva, ultrapasse os muros
impostos.”

(A Carne dos Deuses - Alexandre Fontanelli, Graco e Edu Chapeu)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito bioestimulante do efluente do cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos (BFT) e do extrato comercial de *Ascophyllum nodosum* (AMPEP) no crescimento e perfil metabólico (carotenóides e compostos fenólicos) da macroalga *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro*. Os meios de cultura contendo água do mar esterilizada (controle) adicionada de solução von Stosch 50% (Vs), efluente de BFT 25% (BFT), AMPEP (0,1g L⁻¹, 30 min - Ap) e as combinações de tratamentos Vs+Ap e BFT+Ap mostraram-se adequados à sobrevivência de 100% dos talos. Em todos os tratamentos foi detectado a ocorrência da “doença” *ice-ice*. As amostras tratadas com Vs e BFT apresentaram as maiores taxas médias de crescimento, $1,70 \pm 0,14$ % dia⁻¹ e $1,56 \pm 0,08$ % dia⁻¹ respectivamente, não diferindo ($p > 0,05$) entre si. De outra forma, menores e similares incrementos de biomassa foram observados nos tratamentos controle ($0,51 \pm 0,05$ % dia⁻¹) e Ap ($0,57 \pm 0,07$ % dia⁻¹). A suplementação do meio de cultura com BFT estimulou a biossíntese de compostos fenólicos ($92,2 \pm 22,4$ µg g⁻¹ biomassa seca) e flavonóides totais ($18,8 \pm 0,6$ µg g⁻¹ biomassa seca), enquanto talos cultivados em BFT+Ap apresentaram conteúdos de carotenóides totais ($239,3 \pm 9,3$ µg g⁻¹ biomassa seca) superiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos. Maiores valores ($p < 0,05$) de inibição do radical DPPH foram observados nos extratos metanólicos das algas tratadas com Vs ($13,4 \pm 1,5\%$) e Vs+Ap ($13,4 \pm 0,6\%$). Os resultados demonstram que os tratamentos efetivamente alteraram as variáveis associadas ao crescimento e ao metabolismo de *K. alvarezii*, com destaque à suplementação da água do mar com Vs e BFT. Estes tratamentos propiciaram, concomitantemente, maiores incrementos de biomassa e aumentos da produção de compostos carotenóides e fenólicos de reconhecidos efeitos biológicos (e.g., antioxidantes). Além disso, o tratamento BFT destacou-se dos demais no aumento significativo de fenólicos e flavonóides totais sugerindo um contexto interessante à análise da manipulação epigenética dos cultivos de *K. alvarezii* em larga escala e seus eventuais desdobramentos para a engenharia de aquicultura e setores produtivos afins.

Palavras-chave: Aquicultura, AMPEP; bioestimulação; cottoni; manipulação epigenética.

ABSTRACT

This work aimed to determine *in vitro* the biostimulant effect of *Litopenaeus vannamei* effluent cultivation in bio-flocs system (BFT) and the commercial extract of *Ascophyllum nodosum* (AMPEP) on growth and metabolic profile (carotenoids and phenolic compounds) of the seaweed *Kappaphycus alvarezii*. Culture media containing sterilized seawater (control) added with von Stosch solution 50% (Vs), BFT effluent 25% (BFT), AMPEP (0.1g L⁻¹, 30 min - Ap), and combinations of treatments Vs Ap and BFT Ap allowed 100% survival of the propagules. In all treatments, ice-ice "disease" was detected. The samples treated with Vs and BFT had the highest average growth rates, i.e., 1.70 ± 0.14% day⁻¹ and 1.56 ± 0.08% day⁻¹ respectively, not differing (p<0.05) each other. Otherwise, smaller and similar increments of biomass were observed in the control (0.51% ± 0.05 day⁻¹) and Ap (0.57 ± 0.07% day⁻¹). Supplementation of culture medium with BFT stimulated biosynthesis of phenolic compounds (92.2 ± 22.4 µg g⁻¹ dry weight) and flavonoids (18.8 ± 0.6 µg g⁻¹ dry weight), while propagules grown on BFT Ap presented superior total carotenoid content (239.3 ± 9.3 µg g⁻¹ dry weight, p <0.05). Higher values (p <0.05) of inhibition of the DPPH radical were observed in seaweed methanolic extracts treated with Vs (13.4 ± 1.5%) and Vs+Ap (13.4 ± 0.6%). Results demonstrated that the treatments effectively altered both *K. alvarezii*'s growth and secondary metabolism, especially with supplementation of the seawater with Vs and BFT. These treatments produced increases of biomass and carotenoids and phenolic compounds of recognized biological effects (e.g., antioxidants). In addition, the BFT treatment highlight from others with significant increase of total phenolics and flavonoids suggesting an interesting context to the analysis of epigenetic manipulation of *K. alvarezii* crops on a large scale and their possible outcome in aquaculture engineering and related production sectors.

Keywords: Aquaculture, AMPEP; biostimulation; cottoni; epigenetic manipulation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
1- <i>Kappaphycus alvarezii</i>	17
2- Cultivos <i>in vitro</i> e em tanques	18
3- AMPEP e efluentes de sistemas de bioflocos.....	18
4- Compostos bioativos.....	19
OBJETIVO GERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
1- AMPEP e efluente do sistema de bioflocos.....	24
2- <i>Kappaphycus alvarezii</i> cultivada <i>in vitro</i> em diferentes condições bioestimulantes	24
3- Análise dos compostos bioativos	25
3.1- Fenólicos totais	26
3.2- Flavonóides totais.....	26
3.3-Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) .	26
3.4- Carotenóides totais	27
4- Análises estatísticas.....	27
RESULTADOS	27
1- <i>Kappaphycus alvarezii</i> cultivada <i>in vitro</i> em diferentes condições bioestimulantes	27
2- Análise dos compostos bioativos	30
2.1- Fenólicos totais	30
2.2- Flavonóides totais.....	32
2.3-Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) .	32

2.4- Carotenóides totais	32
DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS.....	37
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	42
ANEXO I - Composição química da solução nutritiva de von Stosch (Edwards, 1970).	46

INTRODUÇÃO GERAL

1- *Kappaphycus alvarezii*

A macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva e espécies do gênero *Euचेuma* são as principais espécies cultivadas para a extração de carragenana (FAO, 2014). Este ficocolóide possui uma ampla aplicação em setores industriais devido às suas propriedades emulsificante e estabilizante (YONG et al., 2013). A grande demanda industrial por este subproduto e o domínio das técnicas de cultivo mantêm a produção destas carragenófitas em destaque na algicultura mundial. Em 2012, a produção ultrapassou a marca de 8 milhões de toneladas de biomassa úmida, liderando o *ranking* das algas mais produzidas mundialmente (FAO, 2014).

O cultivo de *K. alvarezii* já se encontra bem estabelecido em diversos países, destacando-se a Indonésia e Filipinas (HURTADO et al., 2014). No Brasil, a espécie foi introduzida em 1995, em cultivo em escala experimental no litoral norte do Estado de São Paulo (PAULA; PEREIRA; OSTINI, 1998). Esta introdução ocorreu principalmente devido à dificuldade de desenvolver técnicas de cultivo bem sucedidas de *Hypnea musciformis*, principal carragenófito nativa explorada (PAULA; ERBERT; PEREIRA, 2001). Desde então, pesquisas têm sido realizadas em outros estados, e particularmente em Santa Catarina, referência no âmbito da produção nacional aquícola, onde os cultivos de moluscos, peixes e camarões já estão estabelecidos.

As facilidades do cultivo desta espécie têm impulsionado estudos para encontrar novos produtos que somados ao ficocolóide aumentem o seu valor agregado e favoreçam o desenvolvimento econômico dos cultivos. Um exemplo disto são os trabalhos realizados para avaliar o seu potencial antimicrobiano (ABIRAMI; KOWSALYA, 2011; PRABHA; PRAKASH; SUDHA, 2013; PUSHPARAJ; RAUBBIN; BALASANKAR, 2014), o perfil da sua composição nutricional e bioquímica (FAYAZ et al., 2005; CHEW et al., 2008; ABIRAMI; KOWSALYA, 2011) e o uso do seu extrato na agricultura (RATHORE et al., 2009; ZODAPE et al., 2009; ZODAPE et al., 2010). Esta última aplicação tem mostrado resultados positivos no incremento do crescimento, rendimento e qualidade de alguns cultivos como soja, trigo e feijão (RATHORE et al., 2009; ZODAPE et al., 2009; ZODAPE et al., 2010). A presença de compostos bioativos e atividade antimicrobiana foram detectados por Prabha, Prakash e Sudha (2013)

em extratos de *K. alvarezii*, estimulando a realização de novas investigações sobre os seus compostos e possíveis aplicações.

2- Cultivos *in vitro* e em tanques

Além do cultivo em larga escala, esta espécie também é cultivada *in vitro*, principalmente para a realização de estudos acerca da sua biologia e respostas a estímulos que favorecem a seleção e manutenção de linhagens do cultivo massivo. O cultivo em tanques também pode ser utilizado para auxiliar na manutenção de linhagens pré-selecionadas. Em ambos os casos, torna-se essencial fornecer soluções que favoreçam o metabolismo das algas e, conseqüentemente, o seu crescimento e sobrevivência. A solução de nutrientes de von Stosch é bastante utilizada na cultura *in vitro* e corresponde a um mix de nutrientes, minerais e vitaminas (EDWARDS, 1970). Entretanto, o seu uso em maior escala torna-se economicamente inviável e estudos com novos produtos para fertilizar as macroalgas nestas condições tornam-se necessários.

Dentre os novos produtos para incrementar o cultivo de macroalgas pode-se destacar o extrato comercial da macroalga *Ascophyllum nodosum*, conhecido pela denominação *Acadian Marine Plant Extract Powder* (AMPEP), e como uma alternativa ao desenvolvimento de cultivos aquícolas sustentáveis, o uso do efluente oriundo da aquicultura desenvolvida em sistema de bioflocos (*Biofloc Technology System* - BFT).

3- AMPEP e efluentes de sistemas de bioflocos

O AMPEP vem sendo testado na agricultura (KOK et al., 2010) e, recentemente, em cultivos da macroalga *K. alvarezii* (HURTADO et al., 2009; LOUREIRO; REIS; CRITCHLEY, 2010; BORLONGAN et al., 2011; LOUREIRO et al., 2012; HURTADO et al., 2012; LOUREIRO et al., 2014). Em ambas as aplicações, o extrato se mostrou eficiente como bioestimulador de crescimento, mesmo quando aplicado nas concentrações de 0,01 e 0,1 g L⁻¹ (HURTADO et al., 2012). Seus efeitos positivos para *K. alvarezii* também estão relacionados à diminuição da ocorrência de epífitas (LOUREIRO; REIS; CRITCHLEY, 2010; BORLONGAN et al., 2011; LOUREIRO et al., 2012).

O sistema de bioflocos (BFT) é um complexo sistema de cultivo superintensivo utilizado na piscicultura e na carcinicultura, com pouca ou nenhuma renovação de água, usando bactérias heterotróficas e quimioautotróficas que contribuem à assimilação dos dejetos gerados e à

melhoria da qualidade da água do sistema (AVNIMELECH, 2006; SCHRYVER et al., 2008). Entretanto, parte do que é metabolizado pelos microrganismos constituintes não é assimilado, gerando um efluente rico em nutrientes e matéria orgânica. Este efluente, o seu destino final e as suas possíveis aplicações tem gerado uma nova discussão no setor aquícola, sendo cogitado seu uso para fertilizar macroalgas.

Recentemente, estudos sobre o uso de macroalgas em cultivos de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos foram iniciados para verificar a influência da macroalga nos parâmetros de qualidade de água e desempenho do camarão (BRITO et al., 20014a; BRITO et al., 2014b), entretanto os parâmetros de desenvolvimento da macroalga não foram observados. Em Pires (2014), o efluente gerado nos cultivos de *L. vannamei* em BFT favoreceu o crescimento *in vitro* de talos de *K. alvarezii*, principalmente utilizado na diluição de 25% de efluente em água do mar. Efluentes de outros setores aquícolas são comumente testados para o desenvolvimento de macroalgas e prospecção do seu potencial biorremediador. Esta alternativa é plausível devido à comprovação da capacidade de biofiltro das macroalgas em cultivos integrados (CARMONA; KRAEMER; YARISH, 2006; HAYASHI et al., 2008, ABREU et al., 2011), uma vez que ela é capaz de utilizar a carga de nutrientes presente no efluente para o seu desenvolvimento.

Na procura de novas soluções nutritivas e bioestimulantes para o cultivo de macroalgas torna-se essencial avaliar os efeitos de tais soluções no desenvolvimento dos talos e na produção de compostos metabólicos.

4- Compostos bioativos

Os compostos bioativos são definidos como aqueles produzidos pelo metabolismo, principalmente o secundário, que apesar de não serem essenciais à sobrevivência do organismo, contribuem significativamente à sua adaptação ao ambiente (MASCHEK; BAKER, 2008). Os metabólitos secundários em geral, são produzidos em baixas quantidades, são específicos para algumas espécies ou grupos taxonômicos, protegem a alga contra agentes bióticos e abióticos, podem ter um efeito tóxico e refletir reações do organismo a alguma perturbação (MASCHEK; BAKER, 2008). Estas características são os principais fatores que impulsionam estudos acerca destes compostos, com eventual potencial de aplicação em diversos setores biotecnológicos.

Alguns metabólitos secundários possuem atividade antioxidante e são importantes para o organismo, minimizando os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) que são peças-chave em processos metabólicos essenciais. O excesso/desequilíbrio destes reativos ameaça a integridade de organelas e compostos celulares importantes como lipídeos, proteínas e nucleotídeos (KUMAR; GANESAN; RAO, 2008). Os antioxidantes atuam para manter o equilíbrio dos radicais livres e impedir os efeitos negativos que podem causar danos irreversíveis às células, tendo sido avaliados em alguns trabalhos relacionados aos potenciais bioativos de macroalgas (FAYAZ et al., 2005; CHEW et al., 2008; KUMAR; GANESAN; RAO, 2008). Essa atividade pode ser quantificada a partir de várias técnicas, a exemplo da inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Alguns grupos de metabólitos secundários também podem atuar como antioxidantes, incluindo os compostos fenólicos (MANACH et al., 2004), dentre eles os flavonóides e os carotenóides (KARSTEN, 2008) que são pigmentos acessórios. Além desta função, os fenólicos contribuem para combater a herbivoria e o estresse abiótico e os carotenóides auxiliam no processo fotossintético e na fotoproteção.

A produção de compostos bioativos pode ser otimizada com o emprego de diversas técnicas durante a cultura *in vitro*, a exemplo da manipulação epigenética, que consiste na seleção de linhagens e manipulação de fatores abióticos e do meio de cultura para estimular o metabolismo secundário (MARASCHIN; VERPOORTE, 1999). Entretanto, esses autores salientam que a determinação de um meio de cultura que seja adequado, simultaneamente, à produção de biomassa e do metabolito alvo é bastante desafiadora.

Desta maneira acredita-se que os talos de *K. alvarezii* cultivados com aplicação do extrato *A. nodosum* e efluente do sistema de bioflocos sejam capazes de utilizar os nutrientes e compostos presentes para o seu desenvolvimento. Além disso, os microrganismos e seus metabólitos podem agir como agentes bioestimulantes à produção de compostos bioativos relevantes às indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (e.g.), acoplando a produção de biomassa algácea à química fina de interesse.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do efluente do cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos e do extrato comercial de *Ascophyllum nodosum* no crescimento e na produção de compostos bioativos da *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento de talos de *K. alvarezii* cultivados *in vitro* com efluente do cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos e extrato comercial de *A. nodosum*;
- Comparar de forma quantitativa a produção de compostos fenólicos, flavonólicos, carotenóidicos e o potencial de inibição do radical DDPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) presentes nos talos da macroalga cultivados *in vitro* com efluente do cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos e extrato comercial de *A. nodosum*;

O artigo gerado por este trabalho será submetido ao jornal Aquaculture.

Crescimento e produção de compostos bioativos de *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro* com efluente de bioflocos e extrato de *Ascophyllum nodosum*

Anna Gabrielle La Macchia Pedra^a *; Fernanda. Ramlov^b; Marcelo Maraschin^b; Leila Hayashi^a

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

^bDepartamento de Fitotecnia, UFSC, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, bloco B, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

*Autor correspondente. Tel: +55 48 3721 6389

Endereço de e-mail: annagabrielle.lmp@gmail.com

INTRODUÇÃO

Subprodutos de algas são utilizados em setores industriais, aquícolas (Cardozo et al., 2007) e agrícolas (Zamani et al., 2013). A carragenana extraída de *Kappaphycus alvarezii* se destaca neste cenário e impulsiona o setor produtivo desta macroalga que, juntamente com carragenófitas do gênero *Eucheuma*, lideram o *ranking* de produção mundial de algas com uma produção de 8 milhões de toneladas de biomassa úmida em 2012 (FAO, 2014).

Outra importante aplicação das macroalgas refere-se ao seu potencial de biofiltro comumente testado em sistemas integrados (Neori et al., 2004), à biorremediação de efluentes e promoção do crescimento de algas. Talos de *K. alvarezii* já foram testados neste tipo de sistema e apresentaram potencial de remoção de nutrientes (Hayashi et al., 2008) e incremento de biomassa (Rodríguez e Montaña, 2007; Pires, 2014). Pires (2014) observou durante o cultivo *in vitro* de *K. alvarezii* que o efluente do complexo sistema superintensivo de cultivo de *Litopenaeus vannamei* em bioflocos (*Biofloc Technology System* - BFT) foi um fertilizante eficiente, principalmente quando utilizado na diluição de 25% do efluente em água do mar.

O potencial fertilizante dos efluentes aquícolas pode reduzir o tempo de cultivo das macroalgas, contribuindo significativamente à produtividade. A redução do tempo de cultivo também é importante para minimizar os efeitos negativos da exposição prolongada dos talos às condições ambientais adversas. O extrato comercial de *Ascophyllum nodosum* (*Acadian Marine Plant Extract Powder* - AMPEP) tem sido testado em cultivos de *K. alvarezii* para atender as demandas de crescimento e resistência à exposição ambiental, principalmente contra o epifitismo (Hurtado et al., 2009; Loureiro et al., 2010; Borlongan et al., 2011; Loureiro et al., 2012; Hurtado et al., 2012; Loureiro et al., 2014).

Os cultivos de *K. alvarezii* são realizados no mar e em menor proporção em tanques e *in vitro* para selecionar e manter linhagens matrizes. Para além do uso tradicional da macroalga como fonte de carragenana (e seus parâmetros de qualidade), o potencial de aplicação da biomassa de *K. alvarezii* é sugerido, devido à presença de compostos bioativos (Hayashi e Reis, 2012), cujos teores poderão ser incrementados via manipulação epigenética dos meios de cultivo *in vitro* (Maraschin e Verpoorte, 1999). Neste contexto, as diferentes condições de cultivo fornecidas pelos efluentes e extratos comerciais podem provocar efeitos positivos no crescimento e produção de compostos bioativos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os

efeitos do AMPEP e do efluente do cultivo de *Litopenaeus vannamei* em BFT no crescimento e produção de compostos bioativos de *K. alvarezii* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

1- AMPEP e efluente do sistema de bioflocos

O extrato comercial em pó de *Ascophyllum nodosum* (Acadian Marine Plant Extract Powder - AMPEP) utilizado foi cedido pela empresa Acadian Seaplants Limited, Nova Scotia, Canadá.

O efluente da carcinicultura de camarão do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) em sistema de bioflocos utilizado nos experimentos foi cedido pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC) e coletado de um tanque de reprodutores no 112º dia de cultivo. Previamente, o efluente foi decantado durante 30 minutos, filtrado em elemento filtrante tipo *bag* em polipropileno (20 µm) e a solução resultante congelada (-17°C) para armazenamento do lote. Antes do congelamento, foi coletada amostra do efluente para realização da sua caracterização quanto à presença de clorofila, nitrato, nitrito, amônia e ortofosfato, cujas análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Água do LCM (UFSC). As informações sobre os parâmetros do efluente coletado estão disponíveis na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da qualidade da amostra de água do mar em efluente coletado em tanque de cultivo de reprodutores de *L. vannamei* em sistema de bioflocos.

Parâmetro	Valor
Amônia (µM)	32,14
Nitrito (µM)	17,85
Nitrato (µM)	885,71
Ortofosfato (µM)	57,41
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	96
pH	8,04
Salinidade (‰)	36
Clorofila (µg L ⁻¹ de clorofila a)	10

2- *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro* em diferentes condições bioestimulantes

Talos do tetrasporófito marrom de *K. alvarezii* provenientes do banco de linhagens da Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), da Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC) foram cultivados em água do mar esterilizada após decantação por uma semana, filtragem mecânica (1 μm) e exposição a luz UV (salinidade de 35‰), enriquecida com solução de von Stosch (Edwards, 1970 – ANEXO I) a 50% (Paula et al., 2001), temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de $200 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 12h e aera\u00e7\u00e3o constante.

As macroalgas foram cultivadas durante cinco semanas em recipientes pl\u00e1sticos de 5L, inicialmente, com 3L de meio de cultura e biomassa inicial m\u00e9dia de $15,61 \pm 0,12\text{g}$ (m\u00e9dia \pm intervalo de confian\u00e7a), respeitando-se durante todo o per\u00edodo de cultivo a densidade m\u00e1xima de 10g L^{-1} recomendada por Paula et al. (2001). As condi\u00e7\u00f5es de cultivo foram as mesmas descritas acima, exceto o enriquecimento com solu\u00e7\u00e3o nutritiva de von Stosch que variou de acordo com os tratamentos.

Foram testados cinco tratamentos, em triplicata, cujas concentra\u00e7\u00f5es foram dilu\u00eddas em \u00e1gua do mar esterilizada enriquecida com:

- a) solu\u00e7\u00e3o de von Stosch 50% (Vs) (Paula et al., 2001),
- b) efluente de bioflocos 25% (BFT) (Pires, 2014),
- c) AMPEP $0,1\text{g L}^{-1}$ (Ap) (Hurtado et al., 2012),
- d) combina\u00e7\u00e3o de Vs e Ap (Vs+Ap) e
- e) combina\u00e7\u00e3o de BFT e Ap (BFT+Ap).

No controle (C), as algas foram cultivadas apenas em \u00e1gua do mar esterilizada. Em todos os tratamentos e controle foram utilizados como meios de cultura o Vs, BFT ou apenas \u00e1gua do mar esterilizada. Estes meios foram renovados semanalmente e a solu\u00e7\u00e3o AMPEP foi adicionada de acordo com Hurtado et al. (2012), por 30 min a cada troca de meio, em mesa agitadora a 85 (± 5) rpm. Ap\u00f3s aplica\u00e7\u00e3o, os talos foram lavados em \u00e1gua do mar para remo\u00e7\u00e3o da solu\u00e7\u00e3o e realocados em recipientes pl\u00e1sticos contendo os meios de cultura de acordo com os tratamentos correspondentes. Semanalmente, al\u00e9m da renova\u00e7\u00e3o dos meios de cultura, as algas foram limpas e secas com o aux\u00edlio de papel absorvente e pesadas para determina\u00e7\u00e3o da taxa de crescimento conforme a f\u00f3rmula: $TC = [(Bf/Bi)^{1/t} - 1] \times 100$, onde Bf= biomassa final, Bi= biomassa inicial e t= tempo e as taxas expressas em $\% \text{ dia}^{-1}$ (Lignell e Penders\u00e9n, 1989).

3- An\u00e1lise dos compostos bioativos

Ap\u00f3s o cultivo *in vitro*, os talos de *K. alvarezii* foram encaminhados ao Laborat\u00f3rio de Morfog\u00eane e Bioqu\u00edmica Vegetal

(LMBV – CCA/UFSC) para realização das análises dos compostos bioativos. As algas foram dessalinizadas com solução de formiato de amônio a 0,5 M, secas em estufa (45°C com ventilação por 72h), maceradas em graal com auxílio de nitrogênio líquido e pistilo e congeladas (-80°C) para posterior preparação dos extratos e análises.

Alíquotas (1g de biomassa seca) foram adicionadas em 10 mL de solução de metanol 80% (v/v) e incubadas em ausência de luz, por uma hora. O extrato metanólico foi recuperado com micropipeta e utilizado na determinação dos teores totais de compostos fenólicos e flavonóides e na determinação da atividade antioxidante (DPPH) deste. Para a determinação dos carotenóides utilizou-se um extrato obtido a partir de 1g de biomassa seca adicionada em 10 mL de solução hexano:acetona (1/1 v/v) contendo 0,001% de tetra-butil-hidroxitolueno (m/v).

3.1- Fenólicos totais

A análise de quantificação dos fenólicos totais foi realizada segundo Schiavon et al. (2012), com modificações. Cem microlitros de extratos foram incubados com 75 µL de reativo de Folin-Ciocalteu e 825 µL de carbonato de sódio 2% (m/v) durante 1 h no escuro. Após esse período, a absorbância (750 nm) do meio de reação foi determinada em leitor de microplacas e a quantificação dos compostos fenólicos totais calculada via curva padrão de ácido gálico (5 a 750 µg mL⁻¹ – $y = 0,0044x$, $r^2 = 0,99$). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µg de ácido gálico por g de biomassa seca.

3.2- Flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais foi realizada de acordo com Zacarias et al. (2007). Foram utilizados 500 µL de extrato, 2,5 mL de etanol (p.a.) e 500 µL de cloreto de alumínio 2% (m/v) em metanol 80% (v/v). O meio de reação foi homogeneizado em vórtex e incubado durante 1h na ausência de luz. Após esse período, a absorbância da solução foi lida (420 nm) e o teor de flavonóides totais calculado, a partir da curva padrão de quercetina (10 a 200 µg mL⁻¹ – $y = 0,01x$, $r^2 = 0,99$). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µg de quercetina por g de biomassa seca.

3.3- Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A análise da inibição do radical DPPH foi realizada segundo Kim et al. (2002) com modificações. Cem microlitros de extrato foi adicionado à alíquota de 2,9 mL de solução do radical DPPH (Sigma,

0,1 mM, em metanol 80%). A leitura em espectrofotômetro UV-Vis (530 nm) foi realizada após 30 min de incubação da amostra. O potencial de inibição do extrato foi calculado a partir da fórmula: $Ab - Ae/Abx100$, onde Ab é a absorbância da solução DPPH/MEOH (branco) e Ae a absorbância da amostra.

3.4- Carotenóides totais

Alíquotas de 1g de alga seca foram adicionadas em 10 mL da solução hexano: acetona (1:1 v/v) contendo 0,001% de tetra-butil-hidroxitolueno (m/v) por uma hora no escuro, em ultrassom – 2,5 GHz (Aman et al., 2005). Após este período, o sobrenadante foi coletado e centrifugado durante 10 minutos, a 4 krpm. Os extratos coletados após a centrifugação foram concentrados com auxílio de nitrogênio gasoso e ressuspendidos em 3 mL de hexano, para análise por espectrofotometria de varredura (200 – 700 nm). A absorbância das amostras em 450 nm foi utilizada para quantificação dos metabólitos de interesse com o auxílio da curva padrão de β -caroteno ($1 a 50 \mu\text{g mL}^{-1} - y = 0,55x, r^2 = 0,99$). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de β -caroteno por g de biomassa seca.

4- Análises estatísticas

Testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homocedasticidade foram realizados nos dados obtidos. Análise paramétrica (ANOVA unifatorial), com realização de teste *a posteriori* de Fischer foi realizada para o potencial de inibição do DPPH e não paramétrica (Kruskal Wallis) para as taxas de crescimento, os fenólicos, flavonóides e carotenóides totais. Para a variável acúmulo de biomassa ao longo do período de cultivo foram construídos modelos de regressão linear. O nível de significância de 5% foi considerado para todas as análises.

RESULTADOS

1- *Kappaphycus alvarezii* cultivada *in vitro* em diferentes condições bioestimulantes

Todos os talos sobreviveram às diferentes condições e apresentaram maior ganho de biomassa nos quatro tratamentos que continham soluções nutritivas de uso contínuo (Vs ou BFT). O modelo de regressão linear apresentou confiabilidade ($p < 0,05$) e adequação ($r^2 \geq 0,89$) à elucidação da relação de incremento de biomassa algácea ao longo do período de cultivo para todos os tratamentos (Tabela 2).

Algas do controle apresentaram as menores taxas de crescimento, $0,51 \pm 0,05$ % dia⁻¹ (média \pm intervalo de confiança), e diferiram significativamente das maiores taxas obtidas nos talos cultivados em Vs ($1,70 \pm 0,14$ % dia⁻¹ - Tabela 2). Em contrapartida, algas dos demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si e nem em relação aos talos do controle e do Vs.

Tabela 2: Taxas de crescimento (% dia⁻¹) e modelos de regressão linear de talos do tetrasporófito marrom de *K. alvarezii* cultivados *in vitro* durante 35 dias. Valores apresentados em média \pm intervalo de confiança (n = 3). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos, considerando $p < 0,05$.

Tratamento	Taxa de Crescimento	Equação	r ²
C	$0,51 \pm 0,05^a$	$y = 0,5816x + 15,188$	0,99
Vs	$1,7 \pm 0,14^b$	$y = 2,5122x + 11,571$	0,92
BFT	$1,56 \pm 0,08^{ab}$	$y = 2,1782x + 12,278$	0,93
Ap	$0,58 \pm 0,07^{ab}$	$y = 0,687x + 14,825$	0,98
Vs+Ap	$1,38 \pm 0,26^{ab}$	$y = 1,915x + 12,282$	0,89
BFT+Ap	$1,42 \pm 0,01^{ab}$	$y = 1,9227x + 12,687$	0,92

C= água do mar (controle); Vs= solução de von Stosch 50%; BFT= efluente do cultivo de camarões em bioflocos 25%; Ap= extrato de *A. nodosum* 0,1g L⁻¹ (AMPEP) e água do mar; Vs+Ap= Vs e AMPEP; BFT+Ap= BFT e AMPEP.

No controle e Ap, os talos apresentaram perda de coloração por análise visual, enquanto em Vs e BFT, os talos apresentaram uma coloração marrom mais intensa (Figura 1). Foi registrada a ocorrência da “doença” *ice-ice* a partir da segunda semana no tratamento BFT+Ap e, posteriormente, em todos os tratamentos. Nas amostras controle, o *ice-ice* foi observado apenas na última semana de cultivo, não resultando no rompimento do talo (Figura 2).

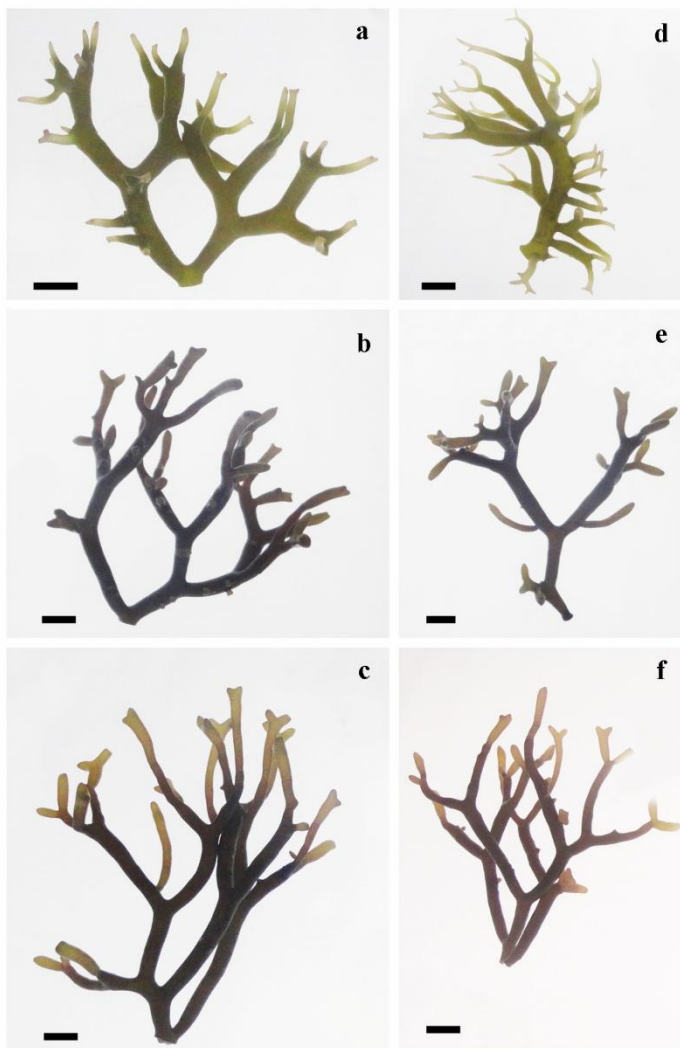


Figura 1: Talos do tetrasporófito marrom de *K. alvarezii* cultivados *in vitro* por 35 dias nos seguintes tratamentos: a) água do mar (controle); b) solução de von Stosch 50% (Vs); c) efluente do cultivo de camarões em bioflocos 25% (BFT); d) AMPEP e água do mar (Ap); e) Vs e AMPEP (Vs+Ap); f) BFT e AMPEP (BFT+Ap). A escala indica 1 cm de comprimento.



Figura 2: Detalhe do talo do tetrasporófito marrom de *K. alvarezii* cultivado *in vitro* por 35 dias em água do mar esterelizada apresentando ocorrência de *ice-ice* (seta).

2- Análise dos compostos bioativos

2.1-Fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais (Figura 3a) foi maior nos extratos dos talos do tratamento BFT ($92,2 \pm 22,4 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca) apresentando diferenças significativas em relação ao tratamento Ap, onde a menor concentração destes metabólitos ($19,7 \pm 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca) foi detectada.

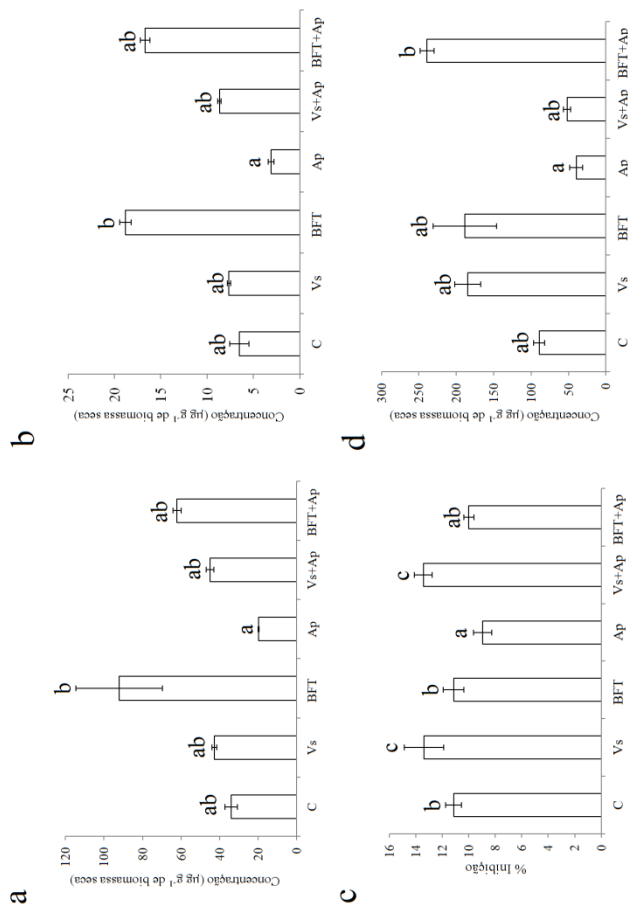


Figura 3: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa seca) de compostos fenólicos totais (a), flavonóides totais (b) e carotenóides (d) e potencial de inibição (%) do radical DPPH (c) em talos do tetrasporófito marrom *Kappaphycus alvarezii* cultivados *in vitro* durante 35 dias, em: a) água do mar (controle - C); b) solução de von Stosch 50% (Vs); c) efluente do cultivo de camarões em bioflocos 25% (BFT); d) extrato de *A. nodosum* $0,1\text{g L}^{-1}$ (AMPEP) e água do mar (Ap); e) Vs e AMPEP (Vs+Ap); f) BFT e AMPEP (BFT+Ap). Valores apresentados em média ($n=3$). As barras verticais representam os intervalos de confiança e as letras as diferenças significativas, considerando $p < 0,05$.

2.2- Flavonóides totais

A análise dos conteúdos totais de flavonóides (Figura 3b) revelou um perfil similar ao observado aos compostos fenólicos totais como esperado, dada à sua natureza fenólica. A maior concentração de flavonóides foi observada no tratamento BFT ($18,8 \pm 0,63 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca) diferindo significativamente do extrato das amostras cultivadas em Ap, que apresentou o menor teor médio destes metabólitos, $3,1 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca.

2.3- Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Os valores de potencial de inibição de radicais livres (DPPH - Figura 3c) dos tratamentos contendo efluente não diferiram significativamente entre si, tampouco em comparação ao controle. Os extratos das biomassas cultivadas em meio suplementado com Vs causaram as maiores percentagens de inibição de radicais livres (entre $13,4 \pm 1,5\%$ de inibição e $13,45 \pm 0,6\%$ de inibição) e não apresentaram diferenças significativas entre si. Ao contrário, foi observado que o extrato do tratamento Ap foi menos efetivo na inibição ($8,9 \pm 0,7\%$ de inibição) do radical, sendo similar ao extrato do tratamento BFT+Ap ($10 \pm 0,4\%$ de inibição).

2.4- Carotenóides totais

Algas cultivadas em BFT+Ap produziram extratos com maior concentração de carotenóides totais ($239,3 \pm 9,3 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca - Figura 3d) e diferiram significativamente da menor concentração obtida nos extratos das amostras de algas do tratamento Ap ($39,7 \pm 8,7 \mu\text{g g}^{-1}$ biomassa seca).

DISCUSSÃO

Os resultados de crescimento algáceo evidenciaram a importância do uso de soluções nutritivas/bioestimulantes no desenvolvimento de *K. alvarezii* quando cultivada *in vitro*. A ocorrência da “doença” *ice-ice* foi observada e pode estar relacionada ao estresse abiótico e a presença de bactérias que promovem a perda de coloração e textura dos talos, provocando o seu rompimento (Largo et al., 1995). É provável que a variação nutricional/bioestimulante possa interferir na ocorrência desta “doença” e/ou que os talos utilizados no experimento estivessem previamente mais suscetíveis àquela condição, tendo em vista que ela ocorreu em todos os tratamentos.

O efluente BFT utilizado apresentou a mesma razão N:P (16:1) da solução Vs, este último meio comumente utilizado para fertilizar macroalgas *in vitro*. Além disso, as taxas de crescimento dos talos cultivados nestes meios foram similares demonstrando o potencial fertilizante do efluente testado no presente trabalho e corroborando com o observado por Pires (2014). Similarmente, Rodrigueza e Montañó (2007) avaliaram talos de três espécies do gênero *Kappaphycus*, incluindo *K. alvarezii*, em tanques contendo efluente do peixe *Chanos chanos* e observaram aumento nas taxas de crescimento comparativamente ao controle (talos cultivados em água do mar). Lombardi et al. (2006) testando o policultivo de *K. alvarezii* e *L. vannamei* em gaiolas observaram que os parâmetros de desenvolvimento do camarão foram similares ao controle (monocultivo). Por sua vez, no policultivo houve um incremento de biomassa das algas demonstrando que não houve prejuízos no desenvolvimento das espécies co-cultivadas. Hayashi et al. (2008), em um cultivo de *K. alvarezii* em tanques contendo efluente do cultivo de *Trachinotus carolinus* (pampus), observaram que as algas tratadas com efluente e as amostras controle (água do mar) apresentaram ocorrência de *ice-ice* e baixas taxas de crescimento ($<1\% \text{ dia}^{-1}$). Entretanto, quando as algas foram transferidas para cultivos no mar, as taxas atingiram até $10,9\% \text{ dia}^{-1}$. No tratamento com efluente de peixes este fato foi atribuído à capacidade da macroalga em acumular nutrientes e utilizá-los posteriormente em uma nova condição de cultivo. Os autores evidenciaram ainda que as algas expostas ao efluente apresentaram maior número de ramificações e coloração mais escura. A variação de coloração também foi observada no presente trabalho e ambos os efeitos foram descritos por Pires (2014), onde talos de *K. alvarezii* foram cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de efluente do cultivo em bioflocos de *L. vannamei*.

Borlongan et al. (2011) e Hurtado et al. (2012) observaram um incremento nas taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas no mar e expostas ao AMPEP ($0,1\text{g L}^{-1}$ por 30 min). No primeiro trabalho, foi constatado também benefícios na redução de epífitas, enquanto no segundo, modificações nas concentrações de compostos e aumento de ramificações nos talos foram observadas. O crescimento, rendimento de carragenana e mecanismos de defesa de *K. alvarezii* exposta ao AMPEP (20g L^{-1} por uma hora) foram avaliados por Loureiro et al. (2012). Os autores concluíram que o AMPEP pode ter um efeito indutor de resistência ao epifitismo, favorecendo o crescimento da macroalga. Outros trabalhos também ressaltam os efeitos positivos do uso do

AMPEP em talos de *K. alvarezii* usando diferentes concentrações do extrato, diferentes linhagens e tipos de cultivo (Hurtado et al., 2009; Loureiro et al., 2010; Hurtado et al., 2012; Loureiro et al., 2014). Estes efeitos são desejáveis nos cultivos, entretanto, nos parâmetros avaliados no presente trabalho estes não foram observados, sobretudo quando o AMPEP foi utilizado em talos cultivados apenas em água do mar.

A aplicação de AMPEP na concentração de $0,1\text{g L}^{-1}$ e o tempo de exposição semanal de 30 min foram suficientes para alterar a produção dos metabólitos secundários de interesse, assim como o efluente de BFT diluído e o tratamento Vs comumente utilizado em cultivo *in vitro* desta macroalga.

As algas expostas ao AMPEP apresentaram baixa concentração dos metabólitos analisados. Hurtado et al. (2012) durante cultivo no mar de linhagens de *K. alvarezii* e *K. striatus*, nas Filipinas, entre setembro de 2010 e fevereiro de 2011 não observaram efeito do AMPEP ($0,1\text{g L}^{-1}$, por 30 min) sobre o conteúdo total de compostos fenólicos em extratos metanólicos. Por sua vez, o AMPEP favoreceu a atividade antioxidante de talos de *K. striatus* (*sacol green*) em outubro e novembro e a atividade ferro quelante de talos de *K. alvarezii* (*tambalang purple*) entre os meses de setembro e outubro e janeiro e fevereiro. No presente trabalho, a concentração de fenólicos totais nos extratos mostrou-se reduzida com o uso do AMPEP, não tendo sido identificado aumento da inibição do radical DPPH. Por outro lado, os extratos de talos cultivados em efluente de BFT apresentaram aumento na concentração dos metabólitos secundários avaliados. Todavia, o potencial de inibição de DPPH dos talos cultivados em meio suplementado com BFT foi menor quando comparado aos melhores resultados obtidos nos tratamentos Vs e Vs+Ap. A combinação BFT+Ap favoreceu a concentração de carotenóides totais e apresentou intervalos de confiança menores em comparação ao tratamento suplementado apenas por BFT. Neste último caso, a aplicação do extrato Ap pode ter atuado como um agente estabilizante do meio BFT, embora este uso em combinação tenha reduzido a concentração dos outros metabólitos avaliados. O aumento das concentrações dos compostos secundários pode favorecer diversos mecanismos, destacando a ação antioxidativa em que todos os compostos avaliados contribuem. Uma maior concentração de carotenóides (e.g.) pode favorecer ainda a captação de luz e fotoproteção que, consequentemente, contribuem no processo fotossintético.

As macroalgas são alvos de estudos com efluentes (Neori et al., 2004), principalmente pela sua capacidade de absorção de nutrientes,

contribuindo à biorremediação. Em contrapartida, as vantagens para macroalga estão relacionadas ao potencial fertilizante dos efluentes. Carmona et al. (2006) usando solução von Stosch enriquecida com compostos nitrogenados (nitrato e amônia) para simular um efluente de peixes, avaliaram a eficiência de remoção destes sais, o crescimento e a concentração de ficobiliproteínas em amostras de espécies de *Porphyra*. As espécies avaliadas foram eficientes na remoção das formas nitrogenadas, embora o aporte de nutrientes tenha promovido efeitos indesejáveis no desenvolvimento da macroalga, sugerindo que diluições do efluente poderiam otimizar o uso de macroalgas em sistemas integrados. Além disso, não houve uma relação direta entre a absorção de nutrientes e taxas de crescimento, e as concentrações de ficobiliproteínas variaram nas diferentes concentrações dos compostos nitrogenados testados. Os autores relacionaram estes resultados à capacidade de absorção e metabolização dos nutrientes das algas, produzindo efeitos que não estão restritos apenas ao crescimento. Pires (2014) observou que a menor concentração de efluente de bioflocos testada (25%) mostrou-se mais efetiva ao desenvolvimento de *K. alvarezii*. Estas informações, somadas às obtidas no presente trabalho, demonstram que os nutrientes presentes nos meios de cultura estudados podem ser, em alguma extensão, absorvidos e metabolizados pela alga. Tal assertiva baseia-se, por exemplo, nos perfis distintos de metabólitos secundários apresentados por *K.alvarezii* consoante aos tratamentos em estudo. Este enfoque é pouco explorado atualmente, mas pode contribuir para consolidar e aprimorar sistemas integrados de cultivo mais efetivos.

Recentemente, o extrato hidroalcoólico de *K. alvarezii* favoreceu a inibição do *Vibrio harveyi* durante a larvicultura de *Penaeus monodon* (Sivakumar et al., 2014). Os autores ressaltaram o potencial desta macroalga como fonte de compostos bioativos importantes à larvicultura de camarões e sugeriram novos estudos para validar as suas aplicações na aquicultura, com a vantagem de potencialmente reduzir os custos e os impactos ambientais causados pelo uso de produtos sintéticos. Outros trabalhos comprovaram o potencial nutritivo e as atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica (e.g.) de extratos de *K. alvarezii* (Estevez et al, 2004; Fayaz et al., 2005; Hong et al., 2007; Chew et al., 2008; Kumar et al., 2008; Rajasulochana et al., 2009; Rajasulochana et al., 2010; Abirami e Kowsalya, 2011; Ling et al., 2013; Prabha et al., 2013; Renuga et al., 2013; Raman e Doble, 2014). Em seu conjunto, os dados da literatura indicam que macroalgas cultivadas em meios suplementados com compostos potencialmente bioestimulantes, como os testados no presente trabalho, possam gerar

extratos com funções nutricionais e atividades biológicas já comprovadas e de interesse à aquicultura.

Os registros na literatura de trabalhos que avaliam os efeitos das condições nutricionais no crescimento e produção de metabólitos secundários de *K. alvarezii* são escassos, sendo concentrados no uso do AMPEP e restritos às alterações na produção/acúmulo de biomassa em trabalhos com efluentes. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o meio de cultura efetivamente alterou as variáveis associadas ao crescimento e metabolismo de *K. alvarezii*.

Os tratamentos suplementados com Vs e BFT apresentaram os melhores resultados promovendo, concomitantemente, maiores incrementos de biomassa e aumentos da produção de metabólitos secundários de reconhecidos efeitos biológicos (e.g., antioxidantes). Sendo assim, o efluente de BFT testado na concentração de 25% mostrou-se como uma alternativa análoga e econômica ao Vs, comumente utilizado para promover o crescimento desta macroalga *in vitro*. O tratamento BFT ainda destacou-se dos demais no aumento significativo de fenólicos e flavonóides sugerindo um contexto interessante à análise da manipulação epigenética dos cultivos de *K. alvarezii* em larga escala e seus eventuais desdobramentos à engenharia de aquicultura e setores produtivos afins.

REFERÊNCIAS

- Abirami, R.G., Kowsalya, S. 2011. Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. Journal of Agricultural Science and Technology. 2 (1), 109-115.
- Aman, R., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U., Schieber, A. 2005. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A. 1074, 99–105. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.055
- Borlongan, I.A.G., Tibubos, K.R., Yunque, D.A.T., Hurtado, A.Q., Critchley, A.T. 2011. Impact of AMPEP on the growth and occurrence of epiphytic *Neosiphonia* infestation on two varieties of commercially cultivated *Kappaphycus alvarezii* grown at different depths in the Philippines. J Appl Phycol. 23, 615-621. DOI: 10.1007/s10811-010-9649-9
- 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. 2007. Metabolites from algae with economical impact. Comparative Biochemistry and Physiology. 146, 60–78. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007
- Carmona, R., Kraemer, G.P., Yarish, C. 2006. Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish–algal aquaculture system. Aquaculture. 252, 54–65. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.11.049
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT. 41, 1067-1072. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.06.013
- Edwards, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contrib Mar Sc Austin. 15, 1-228.
- Estevez, J.M., Ciancia, M., Cerezo, A.S. 2004. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. Carbohydrate Research. 339, 2575–2592. DOI: 10.1016/j.carres.2004.08.010

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Rome. FAO (243 pp.)

Fayaz, M., Namitha, K.K., Murthy, K.N.C., Swamy, M.M., Sarada, R., Khanam, S., Subbarao, P.V., Ravishankar, G.A. 2005. Chemical Composition, Iron Bioavailability, and Antioxidant Activity of *Kappaphycus alvarezii* (Doty). J. Agric. Food Chem. 53, 792–797. DOI: 10.1021/jf0493627

Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereira, R.T.L., Braga, E.S., Oliveira, E.C. 2008. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water. Aquaculture. 277, 185-191. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.02.024

Hayashi, L., Reis, R.P. 2012. Cultivation of the red algae *Kappaphycus alvarezii* in Brazil and its pharmacological potential. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 22 (4), 748-752. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000055

Hong, D.D., Hien, H.M., Son, P.N. 2007. Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. J Appl Phycol. 19, 817–826. DOI 10.1007/s10811-007-9228-x

Hurtado, A.Q., Yunque, D.A., Tibubos, K., Critchley, A.T. 2009. Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. J Appl Phycol. 21, 633-639. DOI: 10.1007/s10811-008-9395-4

Hurtado, A.Q., Joe, M., Sanares, R.C., Fan, D., Prithiviraj, B., Critchley, A.T. 2012. Investigation of the application of Acadian Marine Plant Extract Powder (AMPEP) to enhance the growth, phenolic content, free radical scavenging, and iron chelating activities of *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). J Appl Phycol. 24, 601-611. DOI: 10.1007/s10811-011-9785-x

Kim, Y.K., Guo, Q., Packer, L. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. Toxicology. 172, 149–156. DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00585-6

- Kumar, K.S., Ganesan, K., Rao, P.V.S. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. Food Chemistry. 107, 289–295. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.016
- Largo, D.B., Fukami, K., Nishijima, T. 1995. Occasional pathogenic bacteria promoting ice-ice disease in the carrageenan-producing red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Euclidean denticulatum* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). J. Appl Phycol. 7, 545-554.
- Lignell, A., Pedersén, M. 1989. Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Botanica Marina. 32, 219-227. DOI: 10.1515/botm.1989.32.3.219
- Ling, A.L.M., Yasir, S.M., Matanjun, P., Bakar, M.F.A. 2013. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of selected commercial seaweeds of Sabah, Malaysia. Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res. 3 (3), 234-238.
- Lombardi, J.V., Marques, H.L.A., Pereira, R.T.L., Barreto, O.J.S., Paula, E.J. 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. Aquaculture. 258, 412–415. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.022
- Loureiro, R.R., Reis, R.P., Critchley, A.T. 2010. *In vitro* cultivation of three *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) variants (green, red and brown) exposed to a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Fucaceae, Ochrophyta). J Appl Phycol. 22, 101-104. DOI: 10.1007/s10811-009-9412-2
- Loureiro, R.R., Reis, R.P., Berrogain, F.D., Critchley, A.T. 2012. Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a “vaccine-like” effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. J Appl Phycol. 24, 427-432. DOI: 10.1007/s10811-011-9735-7
- Loureiro, R.R., Reis, R.P., Berrogain, F.D., Critchley, A.T. 2014. Effects of a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* on the biomass production of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.

C. Silva and its carrageenan yield and gel quality cultivated in Brazil. *J Appl Phycol.* 26, 763–768. DOI: 10.1007/s10811-013-0210-5

Maraschin, M., Verpoorte, R. 1999. Engenharia do Metabolismo Secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento.* 23, 24-28.

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture.* 231, 361–391. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.11.015

Paula, E.J., Erbert, C., Pereira, R.T.L. 2001. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. *Phycological Research.* 49, 155-161. DOI: 10.1046/j.1440-1835.2001.00235.x

Pires, C.M. 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) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (25 pp.).

Prabha, V., Prakash, D.J., Sudha, P.N. 2013. Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. *International Journal Of Pharmeceutical Sciences And Research.* 4 (1), 306-310.

Rajasulochana, P., Dhamotharan, R., Krishnamoorthy, P. 2009. Primary phytochemical analysis of *Kappaphycus* sp. *Journal of American Science.* 5 (2), 91-96.

Rajasulochana, P., Krishnamoorthy, P., Dhamotharan, R. 2010. Amino acids, fatty acids and minerals in *Kappaphycus* sps. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science.* 5 (5), 1-12.

Raman, M., Doble, M. 2014. Physicochemical and structural characterisation of marine algae *Kappaphycus alvarezii* and the ability

of its dietary fibres to bind mutagenic amines. *J Appl Phycol.* 26, 2183–2191. DOI: 10.1007/s10811-014-0241-6

Renuga, G., Osman, A., Thandapani, A.B. 2013. Evaluation of marine algae *Kappaphycus alvarezii* as a source of natural preservative ingredient. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 4 (9), 3548-3555. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.4(9).3548-55

Rodrigueza, M.R.C., Montaña, M.N. E. 2007. Bioremediation potential of three carrageenophytes cultivated in tanks with seawater from fish farms. *J Appl Phycol.* 19, 755–762. DOI 10.1007/s10811-007-9217-0

Schiavon, M., Moro, I., Pilon-Smits, E.A.H., Matozzo, V., Malagoli, M., Vecchia, F.D. 2012. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic Toxicology.* 122–123, 222–231. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.06.014

Sivakumar, K., Kannappan, S., Dineshkumar, M., Patil, P.K. 2014. Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African Journal of Microbiology Research.* 8 (6), 458-469. DOI: 10.5897/AJMR2013.6232

Zacarias, A.A., Moresco, H.H., Horst, H., Brighente, I.M.C., Marques, M.C.A., Pizzollati, M.G. 2007. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Zamani, S., Khorasaninejad, S., Kashefi, B. 2013. The importance role of seaweeds of some characters of plant. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences.* 5 (16), 1789-1793.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABIRAMI, R. G.; KOWSALYA, S. Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2 (1), p. 109-115. 2011.

ABREU, M. H. et al. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. **Aquaculture**, v. 312, p.77-87. 2011.

AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, v. 34, p.172-178, 2006.

BORLONGAN, I. A. G. et al. Impact of AMPEP on the growth and occurrence of epiphytic *Neosiphonia* infestation on two varieties of commercially cultivated *Kappaphycus alvarezii* grown at different depths in the Philippines. **J Appl Phycol**. v. 23, p. 615-621. 2011.

BRITO, L. O. et al. (a) Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. **Aquacult Int**. v. 22, p. 497–508. 2014.

BRITO, L. O. et al. (b) Water quality, phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with *Gracilaria birdiae* (Greville) and *Gracilaria domingensis* (Kützinger). **Aquacult Int**. v. 22, p. 1649-1664. 2014.

CARMONA, R.; KRAEMER, G.P.; YARISH, C. Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish–algal aquaculture system. **Aquaculture**. v. 252, p. 54–65. 2006.

CHEW, Y. L. et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT**. v. 41, p. 1067-1072. 2008.

EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. **Contrib Mar Sc Austin**. v. 15, p. 1-228. 1970.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture:**

Opportunities and challenges. Rome. Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO), 2014. 243 p.

FAYAZ, M. et al. Chemical Composition, Iron Bioavailability, and Antioxidant Activity of *Kappaphycus alvarezii* (Doty). **J. Agric. Food Chem.** v. 53, p. 792–797. 2005.

HAYASHI, L. et al. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in recirculating water. **Aquaculture.** v. 277, p.185-191. 2008.

HURTADO, A. Q. et al. Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. **J Appl Phycol.** v. 21, p. 633-639. 2009.

HURTADO, A. Q. et al. Investigation of the application of Acadian Marine Plant Extract Powder (AMPEP) to enhance the growth, phenolic content, free radical scavenging, and iron chelating activities of *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **J Appl Phycol.** v. 24, p. 601-611. 2012.

HURTADO, A. Q. et al. *Kappaphycus* (Rhodophyta) Cultivation: Problems and the Impacts of Acadian Marine Plant Extract Powder. In: PEREIRA, L.; MAGALHAES NETO, J. **Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology.** [s. L.]: CRC Press, 2014. Cap. 8, p. 252. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b17540-9>>. Acesso em: 21 nov. 2014.

KARSTEN, U. Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar Ultraviolet Radiation. In: AMSLER, C. D. **Algal Chemical Ecology.** [s. L.]: Springer, 2008. Cap. 13, p. 287.

KUMAR, K. S.; GANESAN, K.; RAO, P.V. S. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. **Food Chemistry.** v. 107, p. 289–295. 2008.

KOK, D. et al. The influences of different seaweed doses on table quality characteristics of cv. trakya ilkeren (*Vitis vinifera* L.). **Bulgarian Journal Of Agricultural Science.** v. 16, p. 429-435. 2010.

LOUREIRO, R. R. et al. Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a “vaccine-like” effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. **J Appl Phycol.** v. 24, p. 427-432. 2012.

LOUREIRO, R. R. et al. Effects of a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* on the biomass production of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva and its carrageenan yield and gel quality cultivated in Brazil. **J Appl Phycol.** v. 26, p. 763–768. 2014.

LOUREIRO, R. R.; REIS, R. P.; CRITCHLEY, A. T. *In vitro* cultivation of three *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) variants (green, red and brown) exposed to a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Fucaceae, Ochrophyta). **J Appl Phycol.** v. 22, p. 101-104. 2010.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v. 79, p. 727–747. 2004.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento.** v. 23, p. 24-28. 1999.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. In: AMSLER, C. D. **Algal Chemical Ecology.** [s. L.]: Springer, 2008. Cap. 1, p. 1-2.

PAULA E. J.; PEREIRA R. T. L.; OSTINI S. Introdução de espécies exóticas de *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica experimental. In: PAULA, E. J. et al. ANAIS DO CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FICOLOGIA, II REUNIÃO IBERO-AMERICANA DE FICOLOGIA E VII REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA. Caxambú, 1998. p 340-357.

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

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. 2014. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

PRABHA, V.; PRAKASH, D. J.; SUDHA, P. N. Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. **International Journal Of Pharmeceutical Sciences And Research**. v. 4(1), p. 306-310. 2013.

PUSHPARAJ, A.; RAUBBIN, R. S.; BALASANKAR, T. Antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bactéria. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**. v. 3(1), p. 432-436. 2014.

RATHORE, S. S. et al. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**. v. 75, p. 351–355. 2009.

SCHRYVER, P. et al. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v. 277, p.125-137. 2008.

YONG, W. T. L. et al. Profiling of lectin production in wild-type and *in vitro* cultivated *Kappaphycus alvarezii*. **European International Journal of Science and Technology**. v. 2 (9), p. 125-132. 2013.

ZODAPE, S. T. et al. Effect of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex silva. extract on grain quality, yield and some yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal Of Plant Production**. v. 3 (2), p. 97-101. 2009.

ZODAPE, S. T. et al. Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. **Journal Of Scientific & Industrial Research**. v. 69, p. 468-471. 2010.

ANEXO I

Composição química da solução nutritiva de von Stosch (Edwards, 1970).

Componentes	Quantidade para um litro de meio
NaNO_3	42.50 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10.75 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.00 μg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	19.80 μg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.72 mg
Tiamina.HCl	0.20 mg
Biotina	1.00 μg
Cianocobalamina	1.00 μg