



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

Tatiane Beatriz Malinowski Baran

**Adição de bicarbonato de sódio como estratégia de manutenção de linhagens em cultivo
indoor da macroalga *Kappaphycus alvarezii***

Florianópolis

2021

Tatiane Beatriz Malinowski Baran

**Adição de bicarbonato de sódio como estratégia de manutenção de linhagens em cultivo
indoor da macroalga *Kappaphycus alvarezii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de mestre em
Aquicultura

Orientadora: Prof^ª. Leila Hayashi, Dr^ª.
Coorientador: Rafael Garcia Lopes, Dr.

Florianópolis

2021

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

Baran, Tatiane Beatriz Malinowski

Adição de bicarbonato de sódio como estratégia de otimização para o cultivo indoor da macroalga *Kappaphycus alvarezii* / Tatiane Beatriz Malinowski Baran ; orientador, Leila Hayashi, coorientador, Rafael Garcia Lopes, 2021.
44 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Carbono inorgânico. 3. Pigmentos fotossintetizantes. 4. Rhodophyta. I. Hayashi, Leila. II. Lopes, Rafael Garcia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Tatiane Beatriz Malinowski Baran

Adição de bicarbonato de sódio como estratégia de otimização para o cultivo *indoor* da macroalga *Kappaphycus alvarezii*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Leila Hayashi, Dra.
Universidade de Santa Catarina - UFSC

Prof. Cristian Bulboa Contador, Dr.
Universidad Andres Belo

Profa. Estela Maria Plastino, Dra.
Universidade de São Paulo – USP

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Leila Hayashi, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, pelo amor, incentivo e por compreenderem minhas ausências. Vocês são os principais responsáveis por eu ter chegado tão longe.

Ao Fernando pela ajuda na realização do trabalho, por estar sempre ao meu lado, por vibrar comigo nas conquistas e pela força nos momentos difíceis, deixando tudo mais leve.

Aos meus amigos que o mestrado me proporcionou, Kelvyn, Thais, Carol e Ailton. Obrigada pela amizade, pelo carinho e momentos de descontração. Levo vocês em meu coração.

À minha orientadora, Leila Hayashi, por seus conselhos e ensinamentos durante minha trajetória. E por ter acreditado em mim.

Ao meu coorientador, Rafael G. Lopes, pelas ideias, ensinamentos e apoio na realização desse trabalho.

À Cláudia, Carmen e Fernanda pela ajuda na realização do trabalho.

Ao professor Marcelo Maraschin pelas contribuições para o enriquecimento do projeto e pela disponibilização do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal.

À Prof.^a Zenilda Bouzon pela disponibilização do Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV).

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilidade dos equipamentos e por auxílio técnico.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Obrigada!

“Ser corajoso não significa não ter medo. Ser corajoso significa estar com medo, muito medo, mas mesmo assim fazer o que é certo.”

Coraline - Neil Gaiman

RESUMO

Em Santa Catarina, o cultivo de *Kappaphycus alvarezii* apresenta grande perda de biomassa nos períodos de baixa temperatura, sendo necessário manter os propágulos em cultivos *indoor*. Com o objetivo de verificar a eficácia da suplementação de bicarbonato de sódio como fonte de carbono nessa fase do cultivo, segmentos apicais do tetrasporófito verde foram cultivados em duas etapas. Na etapa 1, o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) nas concentrações de 1 e 3 mM foi adicionado em água do mar esterilizada enriquecida com solução von Stosch 50% durante três semanas. Propágulos cultivados sem a adição de NaHCO_3 foram utilizados como controle. Após esse período, as algas foram cultivadas apenas no meio de cultivo por mais três semanas (etapa 2), simulando a transferência para o mar. Semanalmente, a taxa de crescimento, o pH e alcalinidade da água foram avaliadas. Ao final de cada etapa, foram retiradas amostras para análises de concentração de clorofila a, carotenoides e ficobiliproteínas, atividade da enzima anidrase carbônica e microscopia de luz. Durante a primeira etapa, somente os talos tratados com 3 mM apresentaram diferença significativa no crescimento, com inibição na segunda semana e aumento significativo na terceira semana. Esses propágulos apresentaram aumento significativo na concentração de ficobiliproteínas, em relação ao controle. Na etapa 2, as taxas de crescimento dos propágulos desse mesmo tratamento aumentaram significativamente na primeira semana. Porém, nas semanas seguintes, as taxas de crescimento de todos os tratamentos foram similares. As concentrações de ficobiliproteínas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e controle. Além disso, as concentrações de clorofila a e carotenoides, além da atividade da anidrase carbônica não apresentaram diferenças significativas em ambas as etapas. No final do período experimental, foram observados espessamento da parede celular e aumento na quantidade de grãos de amido de florídeas nas algas suplementadas com bicarbonato, quando comparadas ao controle. De acordo com os resultados, é possível concluir que a adição de 3 mM de bicarbonato de sódio no cultivo *indoor* de *K. alvarezii* pode ser utilizada para manutenção da biomassa nos períodos desfavoráveis. As alterações celulares ocorridas após a suplementação demonstram que os propágulos podem responder de forma eficiente contra o estresse ambiental quando forem transferidos ao mar, resultando em benefícios logo no primeiro ciclo de cultivo após o inverno.

Palavras-chave: Aquicultura; Carbono inorgânico; Pigmentos fotossintetizantes; Rhodophyta.

ABSTRACT

In Santa Catarina, *Kappaphycus alvarezii* farming shows a significant biomass loss in low temperature, raising the necessity to keep the propagules indoors. In order to verify the effectiveness of sodium bicarbonate supplementation as a carbon source at this cultivation stage, apical segments of the green tetrasporophyte were cultivated in two phases. In the first phase, 1 and 3 mM sodium bicarbonate (NaHCO_3) was added to sterilized seawater enriched with 50% von Stosch solution for three weeks. Propagules cultivated without the addition of NaHCO_3 were used as a control. After this period, seaweed was cultivated only in the culture medium for another three weeks (phase 2), simulating the transfer to the sea. Weekly, the growth rate, pH, and water alkalinity were evaluated. At the end of each phase, samples were collected for chlorophyll a, carotenoids, and phycobiliproteins analysis, besides carbonic anhydrase enzyme activity and light microscopy. Only seedlings cultivated in 3 mM NaHCO_3 showed a significant difference in growth during the first phase, with inhibition in the second week and a significant increase in the third week. They showed a significant increase in the phycobiliproteins concentration compared to the control. In phase 2, the seedling's growth rates of this same treatment significantly increased in the first week. However, in the following weeks, the growth rates of all treatments and control were similar. The concentrations of phycobiliproteins did not show significant differences between treatments and control. The concentrations of chlorophyll a, carotenoids and carbonic anhydrase activity showed no significant differences in both stages. At the end of the experimental period, cell wall thickening and floridean starch grains increase were observed in all treatments, compared to the control. According to these results, adding 3 mM of sodium bicarbonate in the indoor cultivation of *K. alvarezii* can keep the biomass healthy in unfavorable periods. Cellular alterations after supplementation demonstrate that propagules can respond efficiently against environmental stress when transferred to the sea, resulting in benefits in the first cultivation cycle after winter.

Keywords: Aquaculture. Inorganic carbon. Photosynthetic pigments. Rhodophyta.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** Esquema das diferentes formas de carbono dissolvido na água do mar em função do pH 13
- Figura 2** Esquema sugerindo os mecanismos de concentração de carbono em *Kappaphycus alvarezii*..... 15

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Esquema representativo do delineamento experimental.....22
- Figura 2** Taxa de crescimento da *K. alvarezii* cultivada com 3 concentrações de bicarbonato de sódio em diferentes densidades de biomassa 7, 14 e 21 g L⁻¹..26
- Figura 3** Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas *in vitro* com suplementação semanal com bicarbonato de sódio (**a**) (Etapa 1). Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas *in vitro* sem a suplementação de bicarbonato de sódio (**b**) (Etapa 2).....28
- Figura 4** Média das taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas semanalmente com bicarbonato de sódio durante três semanas (**a**) e cultivada após essa suplementação por mais três semanas (**b**).....29
- Figura 5** 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 seta indica a parede celular das células corticais..... 32
- Figura 6** 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 (setas) nas células corticais (CC) e subcorticais (CS).....33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Valores de pH e alcalinidade total após cada semana de cultivo da *K. alvarezii*.
Etapa 1, adicionado bicarbonato de sódio semanalmente em cultivo em *vitro*. Etapa
2 após cultivo sem a suplementação de bicarbonato de sódio 30
- Tabela 2** Efeito do bicarbonato de sódio nos pigmentos fotossintetizantes de *K. alvarezii* após
três semanas de suplementação em cultivo em *vitro* (Etapa 1) e após cultivo sem a
suplementação de bicarbonato de sódio (Etapa 2). Clorofila *a*, carotenoides e
ficobiliproteínas (Ficoeritrina, Ficocianina e Aloficocianina)..... 31
- Tabela 3** Efeito do bicarbonato de sódio na atividade da enzima anidrase carbônica da *K.*
alvarezii após 3 semanas de suplementação em cultivo em *vitro* (Etapa 1) e após
cultivo sem a suplementação de bicarbonato de sódio (Etapa 2)..... 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC -	anidrase carbônica.
AT-O -	coloração azul de toluidina.
Ci -	carbono inorgânico.
CID -	carbono inorgânico dissolvido.
CMM -	<i>inorganic carbon concentrating mechanism</i>
CO ₂ -	dióxido de carbono.
CO ₃ ²⁻ -	carbonato.
FAO -	Food and Agriculture Organization.
HCO ₃ ⁻ -	bicarbonato.
ML -	microscopia de luz.
NaHCO ₃ -	bicarbonato de sódio
PAS -	coloração Ácido Periódico de Schiff.
H ₂ CO ₃ ⁻ -	ácido carbônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12	
1.1	IMPORTÂNCIA DO CARBONO	13	
1.2	SUPLEMENTAÇÃO DE CARBONO NOS CULTIVOS DE ALGAS	15	
1.3	OBJETIVOS	16	
1.3.1	Objetivo Geral	16	
1.3.2	Objetivos Específicos	17	
CAPÍTULO 1. ADIÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO COMO ESTRATÉGIA DE			
MANUTENÇÃO DE LINHAGENS EM CULTIVO INDOOR DA			
MACROALGA <i>KAPPAPHYCUS ALVAREZII</i>			18
1	INTRODUÇÃO	19	
2	MATERIAL E MÉTODOS	20	
2.1	LOCAL DE ESTUDO	20	
2.2	MATERIAL BIOLÓGICO	21	
2.3	EXPERIMENTOS PRELIMINARES - DEFINIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO E DENSIDADE DE BIOMASSA	21	
2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21	
2.4.1	Taxa de crescimento	22	
2.4.2	Pigmentos Fotossintetizantes	22	
2.4.3	Atividade da Anidrase Carbônica	23	
2.4.4	Microscopia de Luz	24	
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24	
3	RESULTADOS	25	
3.1	DEFINIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO E DENSIDADE DE BIOMASSA	25	
3.2	EFEITO DO BICARBONATO DE SÓDIO NO CULTIVO	27	
3.2.1	Pigmentos fotossintetizantes	30	
3.2.2	Anidrase carbônica	31	
3.2.3	Microscopia de luz	32	
4	DISCUSSÃO	33	
5	CONCLUSÃO	36	
	REFERÊNCIAS	36	
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	41	

1 INTRODUÇÃO

Kappaphycus e *Eucheuma* spp. são macroalgas vermelhas (Rhodophyta), fonte de um dos ficocolóides mais utilizado pela indústria, a carragenana (FAO, 2020). A demanda desse coloide tem sido crescente nos últimos anos devido as suas propriedades como espessante e estabilizante, que possuem ampla aplicabilidade nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (MC HUGH, 2003). A espécie *Kappaphycus alvarezii* (Doty) L. M. Liao, natural das Filipinas e Indonésia, além de ter destaque no mercado mundial devido ao predomínio de carragenana *kappa*, tem sido indicada como um excelente complemento nutricional, podendo ser incorporada à alimentação humana e animal (KUMAR et al., 2014) por conter compostos bioativos benéficos para a saúde (HAYASHI; REIS, 2012). Seu extrato pode ser utilizado como fertilizante agrícola (TRIVEDI et al., 2017; GELLI et al., 2020) e do ponto de vista ambiental, atua como agente biorremediador quando utilizada por exemplo, em sistema de cultivos multitróficos integrados, pois reduz os impactos causados pelo efluente de cultivos intensivos (CHOPIN et al., 2001; HAYASHI et al., 2008).

K. alvarezii foi introduzida no Brasil em 1995 com a finalidade de estudar a viabilidade de cultivos comerciais no Estado de São Paulo, a partir de uma muda importada do Japão e originária das Filipinas (PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002). Essa introdução foi justificada pela sua importância mundial e como alternativa às carragenófitas nativas, difíceis de serem cultivadas em grandes quantidades. Após apresentar resultados favoráveis, a espécie foi introduzida no Estado do Rio de Janeiro e Paraíba (REIS; BASTOS; GOES, 2007). Em 2008, o cultivo experimental com a espécie teve início no Estado de Santa Catarina, cujos resultados indicaram taxas de crescimento favoráveis nos meses mais quentes do ano; no inverno, as baixas temperaturas comprometem a sobrevivência da espécie (HAYASHI et al., 2011a).

Desde então o cultivo dessa espécie em tanques *indoor* foi considerado necessário para a manutenção da biomassa nos períodos frios, onde os talos podem ser mantidos em condições controladas até a próxima reintrodução no mar, garantindo linhagens saudáveis e mais resistentes para o próximo ciclo de cultivo. Diversos trabalhos foram desenvolvidos em Santa Catarina buscando aprimorar o cultivo em tanques *indoor*, principalmente para encontrar meios de fertilização alternativos e econômicos, como uso de efluente de produção de camarões marinhos em sistema de bioflocos (BFT) que melhorou as taxas de crescimento e os compostos bioquímicos da *K. alvarezii* (PEDRA et al., 2015; DE MARTINO et al., 2021; PIRES et al., 2021). Berchhof (2018) verificou ainda que é possível cultivar a *K. alvarezii* em

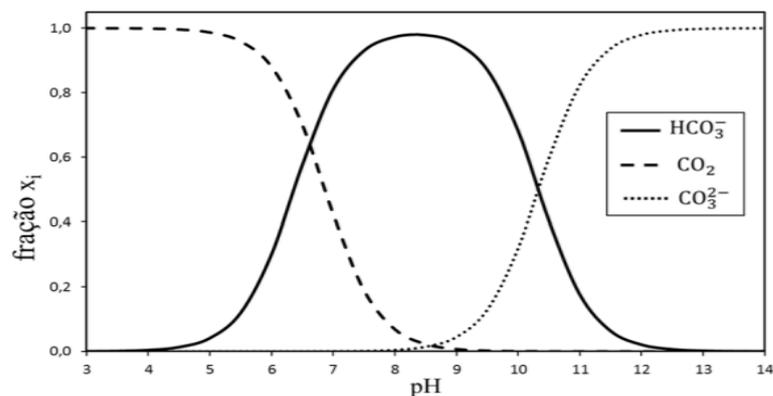
alta densidade de estocagem, de até 21 g L^{-1} , para manutenção das linhagens. A adição de carbono inorgânico a partir de dióxido de carbono gasoso (CO_2) também foi considerada, resultando em mudanças celulares, que seriam capazes de deixar os talos mais tolerantes ao estresse ambiental durante o seu transporte para o cultivo no mar (VENTURA et al., 2020). Entretanto, ainda existe o desafio de desenvolver um sistema economicamente viável, considerando que o cultivo de grande biomassa em tanques eleva o custo de manutenção, principalmente relacionados a equipamentos, materiais e insumos usados.

Em 2017, o cultivo experimental da *K. alvarezii* foi expandido em quatro locais do litoral de Santa Catarina, sendo dois em Florianópolis (Ribeirão da Ilha e Praia do Sambaqui), um em Governador Celso Ramos e outro em Penha, seguindo recomendações do IBAMA. O cultivo comercial no litoral de Santa Catarina da espécie foi autorizado em 2020 (IBAMA, 2020); sendo assim, fazendas comerciais devem estar operando nos próximos anos e dependerão da biomassa proveniente de cultivos em tanques.

1.1 IMPORTÂNCIA DO CARBONO

O carbono inorgânico dissolvido (CID) está disponível na água do mar nas formas de ácido carbônico (H_2CO_3), dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). As alterações das formas de carbono e a sua quantidade presente na água depende principalmente do pH (Figura 1), temperatura e salinidade (STUMM; MORGAN, 2012). Em pH abaixo de 6,4 predomina a forma de CO_2 ; na faixa entre 6,4 e 10,3 o HCO_3^- , que em geral é a forma mais abundante; e a partir de 10,3 o CO_3^{2-} (ESTEVES; 1988).

Figura 1. Esquema das diferentes formas de carbono dissolvido na água do mar em função do pH.



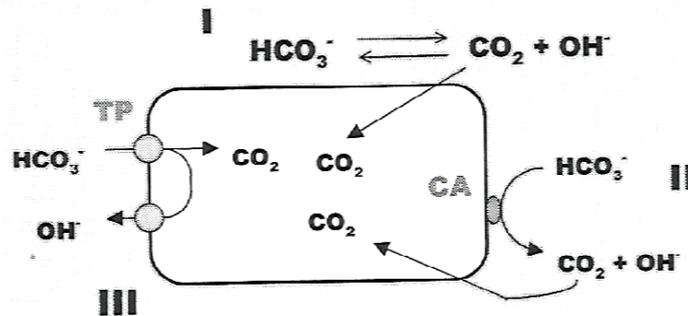
Fonte: Raven, 2005

Na água do mar (pH 8,2) 90% do CID está presente na forma de HCO_3^- , enquanto apenas 1% é CO_2 gasoso dissolvido (GAO; MCKINLEY, 1994). A maioria das macroalgas são conhecidas por utilizar essas duas formas de carbono para a fotossíntese, sendo o CO_2 a única fonte direta de carbono que pode ser assimilada por todos os organismos fotossintéticos através da difusão, apesar de limitante para a fotossíntese (BEER, 1994). Para manter um suprimento de carbono suficiente para a fotossíntese, estratégias específicas de absorção de carbono foram desenvolvidas nas algas ao longo do processo evolutivo, como o mecanismo de concentração de carbono (CCM – do inglês *inorganic carbon concentrating mechanism*) (GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009). Esse mecanismo permite que as algas utilizem o bicarbonato de forma eficiente, evitando as limitações de carbono (RAVEN 1996; JI et al 2016). Como resultado, ocorre um aumento na concentração de CO_2 em torno da enzima Rubisco e uma diminuição da fotorrespiração (BEER et al., 1994; RAVEN et al., 1997).

A maioria das macroalgas vermelhas possuem capacidade de usar o HCO_3^- presente na água do mar, e seu mecanismo de concentração de carbono já foi amplamente caracterizado, envolvendo a ação da enzima anidrase carbônica (LARSSON; AXELSSON, 1999; Zou et al., 2004). Esta enzima desempenha papel importante nesse mecanismo, pois participa do transporte de carbono inorgânico para células fotossintetizantes ativas e catalisa com alta eficiência a inter-conversão entre CO_2 e HCO_3^- (HENRY, 1996; KHALIFAH, 1971). Essa enzima atua em ambas as direções dependendo da concentração de CO_2 e HCO_3^- presente no meio (SMITH, 1988, GRANBOM, 2001). A capacidade de utilizar o HCO_3^- para a fotossíntese muda entre os taxa e está diretamente relacionada ao habitat que vivem, como uma vantagem adaptativa (MABERLY, 1990; LARSSON et al., 1997; ZHOU et al., 2016).

Existem três diferentes CCM em sistemas fotossintéticos: 1) A desidratação extracelular de HCO_3^- pela enzima anidrase carbônica para liberar CO_2 , que é então fixada pela Rubisco; 2) A absorção direta de HCO_3^- através da membrana plasmática facilitada por uma proteína de troca aniônica; 3) absorção ativa de HCO_3^- ou CO_2 por meio de uma H-ATPase do tipo P (JI et al 2016, BADGER; PRICE 1994). Desses três, a *Kappaphycus alvarezii* possui pelo menos dois para a utilização de HCO_3^- : um através de anidrase carbônica externa que faz parte do principal meio que garante o suprimento de C_i , e difusão facilitada de bicarbonato através de uma proteína de transporte de troca aniônica, o que demonstra a capacidade da espécie de se adaptar às mudanças do meio ambiente (Figura 2) (GRANBOM, 2001). A presença desses mecanismos é importante para seu crescimento; geralmente *K. alvarezii* é encontrada em lugares com baixas concentrações de CO_2 no mar (GRANBOM et al., 1999).

Figura 2. Esquema sugerindo os mecanismos de concentração de carbono em *Kappaphycus alvarezii*. I. Difusão simples de dióxido de carbono. O dióxido de carbono é formado por desidratação de bicarbonato não catalisado fora da célula. II. A anidrase carbônica (AC) extracelular atua na desidratação do bicarbonato em dióxido de carbono que, por sua vez, se difunde através da membrana celular. III. O bicarbonato é transportado para o interior da célula por uma proteína (TP) e o dióxido de carbono é formado dentro da célula devido à desidratação, possivelmente pela anidrase carbônica interna.



Fonte: Granbom, 2001

1.2 SUPLEMENTAÇÃO DE CARBONO NOS CULTIVOS DE ALGAS

A concentração de carbono inorgânico natural da água do mar não é saturante para a fotossíntese da maioria das macroalgas; por isso, para aumentar a taxa de crescimento, é possível melhorar a quantidade de carbono inorgânico no cultivo através da suplementação (GAO; MCKINLEY, 1994). Esse suprimento pode ser realizado através de injeção de CO_2 gasoso no cultivo ou adicionar nutrientes contendo carbono, como o bicarbonato de sódio (WANG et al., 2008).

Diversos trabalhos apresentaram os efeitos da aplicação de CO_2 gasoso nos cultivos de macroalgas, que refletiram diretamente no crescimento e alterações no metabolismo biológico, devido ao aumento da disponibilidade de carbono para a atividade fotossintética (GAO et al. 1993; GARCIA SANCHEZ, 1994; MERCADO et al. 1999; SUÁREZ-ÁLVAREZ et al., 2012; JIANG et al. 2016; SEBOK et al. 2017; XU et al., 2010). Para *K. alvarezii*, a suplementação com CO_2 resultou em alterações fisiológicas que podem fazer com que a macroalga responda melhor ao estresse quando transportada para as fazendas marinhas, e possivelmente em aumento de produtividade (VENTURA et al., 2020). Entretanto, a suplementação de CO_2 nos cultivos torna-se limitada economicamente, em razão ao elevado custo de implementação na estrutura e equipamentos.

A suplementação com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é uma alternativa viável ao carbono inorgânico gasoso (PIMOLRAT et al., 2010; WHITE et al., 2013). Possui maior

solubilidade na água do que o CO₂, o que gera alta eficiência na utilização de carbono. Além do processo geral ser mais econômico, os procedimentos de aplicação são simples e fáceis de controlar (KIM et al., 2017; HSUEH et al., 2007). A eficiência do bicarbonato de sódio como suplemento de carbono já foi bem explorado no cultivos de microalgas (JAYASANKAR; VALSALA, 2008; PIMOLRAT et al., 2010; GARDNER et al., 2013; WHITE et al., 2013; PANCHA et al., 2015; MOKASHI, 2016; KIM et al., 2017), cujos principais resultados podem ser observados no aumento da taxa fotossintética, da biomassa, na quantidade de pigmentos fotossintetizantes, aumento na quantidade de grãos de amido, redução de estresse oxidativo e aumento da atividade da enzima anidrase carbônica (PANCHA et al., 2015; MOKASHI et al., 2016; PENG et al., 2017; SRINIVASAN et al., 2018; KIM et al., 2017; WANG et al., 2021).

Nos cultivos de macroalgas, foi demonstrado que uma adição adequada de bicarbonato de sódio pode aumentar a atividade fotossintética, além de regular a atividade da enzima anidrase carbônica (MERCADO et al., 1997; MENEZES et al., 2001; ZHOU et al., 2016). Debusk e Ryther (1984) verificaram que a adição de bicarbonato de sódio no cultivo de *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) dobrou a produtividade em comparação ao tratamento controle. ZHOU et al. (2016) verificaram que o NaHCO₃ pode acelerar a síntese de pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila e a ficoeritrina, e, portanto, a fotossíntese, estimulando a atividade da enzima anidrase carbônica; como consequência, o crescimento de *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria vermiculophylla*, e *Gracilaria chouae* foi promovido.

No entanto, ainda não foram observados trabalhos direcionados ao efeito de sais de bicarbonato de sódio no cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii*. Portanto, espera-se com esse trabalho verificar se a adição de bicarbonato de sódio no cultivo aumentará os compostos de reserva de energia responsáveis pelo crescimento, e que a partir disso, os talos fiquem mais resistentes na transferência para o cultivo no mar.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Verificar a influência da suplementação de bicarbonato de sódio como fonte de carbono no cultivo *indoor* da macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da adição de bicarbonato de sódio na taxa de crescimento;
- Quantificar os pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila α , carotenoides e ficobiliproteínas após os tratamentos com bicarbonato de sódio;
- Analisar a influência do bicarbonato de sódio na atividade da enzima anidrase carbônica;
- Verificar através da microscopia de luz a influência do bicarbonato de sódio na presença de polissacarídeos ácidos (carragenana) e dos polissacarídeos neutros (grãos de amido).

CAPÍTULO 1. Artigo científico

O artigo gerado por este trabalho será submetido para publicação à revista Journal of Applied Phycology.

Adição de bicarbonato de sódio como estratégia de manutenção de linhagens em cultivo indoor da macroalga *Kappaphycus alvarezii*

Tatiane Beatriz Malinowski Baran*, Fernando Z. Silva, Cláudia Marlene Bauer, Fernanda Bouvie, Carmen Simioni, Marcelo Maraschin, Zenilda Laurita Bouzon, Rafael Garcia Lopes, Leila Hayashi.

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

*Autor correspondente. Tel: +55 48 996496515

Endereço de e-mail: tatybmb@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Kappaphycus alvarezii* (Doty) L. M. Liao, natural das Filipinas e Indonésia, se destaca no mercado mundial devido ao predomínio de carragenana *kappa*, ficocolóide amplamente utilizado pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (FAO, 2020) devido às suas propriedades como espessante e estabilizante (MC HUGH, 2003). Essa espécie foi introduzida em cultivos experimentais no Brasil em 1995, como alternativa às carragenófitas nativas, difíceis de serem cultivadas em grandes quantidades (PAULA; PEREIRA; OHNO, 2002). Em 2008, o cultivo em caráter experimental com a *K. alvarezii* foi iniciado no Estado de Santa Catarina e os resultados indicaram taxas de crescimento favoráveis nos meses mais quentes do ano, enquanto no inverno, as baixas temperaturas comprometem a sobrevivência da espécie no mar (HAYASHI et al., 2011).

O cultivo em tanques *indoor* foi considerado necessário para a manutenção de biomassa nos períodos frios, onde os talos podem ser mantidos em condições controladas até a próxima reintrodução no mar, garantindo linhagens saudáveis para o próximo ciclo de cultivo. Desde então, diversos trabalhos foram desenvolvidos para desenvolver o cultivo *indoor* da *K. alvarezii* em Santa Catarina (FLORES et al., 2014; PEDRA et al., 2017; VENTURA et al., 2020; PIRES et al., 2021).

Na água do mar, 90% do carbono inorgânico está presente na forma de bicarbonato (HCO_3^-), enquanto apenas 1% é gás carbônico (CO_2) dissolvido (GAO; MCKINLEY, 1994). A maioria das macroalgas são conhecidas por utilizar essas duas formas de carbono para a fotossíntese, apesar do CO_2 ser a única fonte direta de carbono que pode ser assimilada através da difusão (BEER, 1994). Várias macroalgas vermelhas possuem a capacidade de usar o HCO_3^- presente na água do mar, através do mecanismo de concentração de carbono (CCM – do inglês *inorganic carbon concentrating mechanism*), envolvendo a ação da enzima anidrase carbônica (LARSSON; AXELSSON, 1999; ZOU et al., 2004). GRANBOM (2001) sugere que a *Kappaphycus alvarezii* possui pelo menos dois mecanismos para a utilização de HCO_3^- , um através de anidrase carbônica externa, que faz parte do principal meio que garante o suprimento de carbono inorgânico (Ci), e difusão facilitada de bicarbonato através de uma proteína de transporte de troca aniônica, o que demonstra sua capacidade de se adaptar às mudanças do meio ambiente.

É possível melhorar o cultivo de macroalgas aumentando a quantidade de carbono inorgânico no cultivo (GAO; MCKINLEY, 1994). Esse suprimento pode ser realizado através de injeção de CO_2 gasoso ou adicionando nutrientes contendo carbono, como o bicarbonato

de sódio (WANG et al., 2008). Diversos trabalhos verificaram a influência da suplementação de carbono a partir da aplicação de CO₂ gasoso nos cultivos de macroalgas, o que refletiu diretamente no crescimento e alterações no metabolismo biológico, devido ao aumento da disponibilidade de carbono para a atividade fotossintética (GAO et al. 1993; GARCIA SANCHEZ,1994; MERCADO et al.1999; XU et al., 2010; SUÁREZ-ÁLVAREZ et al.,2012; JIANG et al. 2016; SEBOK et al. 2017). Para *K. alvarezii*, a suplementação com CO₂ resultou em alterações fisiológicas que podem fazer com que a espécie responda melhor ao estresse quando transportada para as fazendas marinhas, e possivelmente aumento de produtividade (VENTURA et al. 2020). Entretanto, ainda existe o desafio de desenvolver um sistema economicamente viável, considerando que o cultivo de grande biomassa em tanques eleva o custo de manutenção, devido ao uso de equipamentos, materiais e insumos.

A suplementação com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) é uma alternativa ao carbono inorgânico gasoso (PIMOLRAT et al., 2010; WHITE et al., 2013), mais econômico, de fácil aplicação e controle (KIM et al., 2017; HSUEH et al., 2007). Nos cultivos de macroalgas marinhas, foi demonstrado que uma adição adequada de bicarbonato de sódio pode aumentar a atividade da enzima anidrase carbônica, a síntese de pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila e a ficoeritrina, e portanto a fotossíntese, estimulando assim o crescimento (MERCADO et al., 1997; MENEZES et al., 2001; ZHOU et al., 2016). Debusk & Ryther (1984) observaram que a adição de bicarbonato de sódio no cultivo de *Gracilaria tikvahiae* dobrou sua produtividade (DEBUSK; RYTHYER, 1984). No entanto, ainda não foram observados trabalhos direcionados ao efeito de sais de bicarbonato de sódio nos cultivos da *Kappaphycus alvarezii*. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi verificar a influência da suplementação de bicarbonato de sódio como fonte de carbono no cultivo *indoor* da macroalga *Kappaphycus alvarezii*, como uma estratégia para manutenção em tanques nos períodos mais frios do litoral do sul do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Macroalgas, pertencente ao Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina – LCM Macroalgas /UFSC, localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Segmentos apicais do tetrasporófito verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivados na Fazenda Marinha Atlântico Sul, localizada no Ribeirão da Ilha (27°73'80"S/48°56'08"N), foram utilizados. Os talos foram aclimatados durante 30 dias antes do início do experimento em água do mar esterilizada enriquecida com solução nutritiva de von Stosch 50%, sob irradiância de $200 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h, temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 35‰ e aeração constante (PAULA et al., 2001).

2.3 EXPERIMENTOS PRELIMINARES - DEFINIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO E DENSIDADE DE BIOMASSA

Para definir a melhor concentração de bicarbonato de sódio e densidade de cultivo, os talos foram cultivados em três concentrações de bicarbonato de sódio de grau analítico (NaHCO_3): 0, 1, 2 e 3 mM diluídas em solução von Stosch 50% (ZHOU et al. 2016), em três densidades de biomassa: 7, 14 e 21 g L^{-1} , nas mesmas condições da aclimação. Os talos foram cultivados em triplicatas e o cultivo foi separado em duas etapas. Etapa 1: cultivo com adição semanal de bicarbonato de sódio e troca de meio de cultura semanal durante três semanas. E etapa 2: três semanas de cultivo sem bicarbonato de sódio com troca semanal de meio de cultivo. Semanalmente foi calculada a taxa de crescimento.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após determinar a melhor concentração de bicarbonato de densidade de biomassa, o experimento foi realizado em duas etapas (Figura 1). Na primeira etapa, os talos foram cultivados em frascos de 1 L, em densidade de 7 g L^{-1} durante três semanas, em água do mar esterilizada enriquecida com solução von Stosch 50% com suplementação semanal de 1 (T1) e 3 mM (T3) de bicarbonato de sódio. Propágulos cultivados sem a adição de NaHCO_3 foram utilizados como controle (C). Tanto tratamentos quanto controle foram realizados em réplicas (n=3). Semanalmente, o meio de cultura e o recipiente foram trocados.

Na segunda etapa, a densidade da biomassa foi ajustada para 7 g L^{-1} e as algas, tanto dos tratamentos quanto do controle, foram cultivadas apenas com água do mar enriquecida com solução von Stosch 50% por mais três semanas, simulando a transferência para o mar. Semanalmente, a água do mar e o recipiente foram trocados.

Nas duas etapas, as demais condições de cultivo foram as mesmas do período de aclimatação.

Figura 1. Esquema representativo do delineamento experimental.

Tratamentos	Etapa 1			Etapa 2		
	Semanas					
	1	2	3	1	2	3
C						
T1						
T3						

 Com NaHCO₃  Sem NaHCO₃

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao final de cada semana foi calculado a taxa de crescimento, o pH foi monitorado através de um pHmetro digital e a alcalinidade monitorada por meio de volumetria de neutralização, utilizando ácido clorídrico e como indicadores, verde bromocresol e vermelho de metila (APHA, 2005).

Ao final de cada etapa, foram retiradas amostras de 1 g de todas as réplicas e armazenadas a -80 °C para posterior análise da atividade da anidrase carbônica e pigmentos fotossintetizantes. Amostras também foram retiradas e processadas para Microscopia de Luz.

2.4.1 Taxa de crescimento

Semanalmente, no momento das trocas dos meios de cultura, os segmentos apicais foram lavados com água do mar esterilizada, secos com papel toalha e pesados para calcular a taxa de crescimento específico (TC) diária de acordo com a fórmula proposta por Yong *et al.* (2013) (1).

$$TC = \left[\left(\frac{B_f}{B_i} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

onde TC = Taxa média de crescimento; B_f = Biomassa final; t = tempo em dias.

2.4.2 Pigmentos Fotossintetizantes

As concentrações da clorofila *a* e carotenoides foram determinadas de acordo com Hiscox e Israelstam (1979). A extração de clorofila *a* foi realizada a partir de 1 grama de

amostra de cada tratamento em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt,FRG) a 40 °C durante 45 minutos e quantificadas por espectrofotômetro. A absorvância de 665 nm foi utilizada para o cálculo de clorofila (equação 2) e de 480 nm para carotenoides (equação 3).

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = 12,19 \times A_{665} - 3,45 \times A_{649} \quad (2)$$

$$\text{Carotenóides Total (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = (1000 \times A_{480} - 2,14 \text{ Chl } a) / 220 \quad (3)$$

As ficobiliproteínas (aloficocianina - AFC, ficocianina - FC e ficoeretrina - FE) foram extraídas a partir de 1 g de amostra triturada e extraída em tampão fosfato 0,5 M, pH 6,4, a 4 °C no escuro. O homogeneizado foi centrifugado a 2.000 xg por 20 min, com centrífuga a 4 °C. Os níveis de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foram determinados por espectrofotômetro e calculados usando as equações 4,5 e 6, descritas por Kursar *et al.* (1983).

$$\text{AFC (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = (181,3 \times \text{abs } 651) - (22,3 \times \text{abs } 614) \quad (4)$$

$$\text{FC (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = (151,1 \times \text{abs } 615) - (99,1 \times \text{abs } 651) \quad (5)$$

$$\text{FE (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = (155,8 \times \text{abs } 498) - (40 \times \text{abs } 614) - (10,5 \times \text{abs } 651) \quad (6)$$

2.4.3 Atividade da Anidrase Carbônica

A atividade da anidrase carbônica foi adaptada da metodologia titrimétrica do protocolo de Warriar (2014). Cerca de 0,5 g do talo fresco foram congelados em -80 °C. Posteriormente, o rompimento celular foi promovido por tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., EUA) por um período de 2 minutos em 1 mL de tampão Tris-HCl, 0.1 M pH 8.3. Durante todo o processo, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Após a etapa de rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas a 4 °C por 25 min a 5000 rpm (2300 xg), e o sobrenadante utilizado para leitura da atividade enzimática.

A atividade da anidrase carbônica foi analisada sob condições refrigeradas, misturando o sobrenadante com 1 mL da solução tampão Tris HCl 0,1M contendo o indicador de azul de bromotimol a 20 ppm, adicionando gentilmente 3 mL de água saturada com dióxido de carbono gasoso (CO₂). O tempo para a mudança de cor (azul para amarelo) foi marcado (Tc).

Para a determinação da taxa de reação não enzimática (T_b), foi adicionada água saturada com CO_2 ao tampão sem o extrato enzimático. O tempo foi novamente marcado (T_b) para a mudança de cor (azul para amarelo).

A atividade da anidrase carbônica foi expressa como unidades mL^{-1} de enzima, e calculado conforme a equação 7.

$$\text{Unidade (U mL}^{-1}\text{)} = df \left(\frac{T_b}{T_c} - 1 \right) \quad (7)$$

onde df = fator de diluição, T_b = Tempo necessário para a mudança de cor da amostra sem enzima, T_c = Tempo necessário para mudança de cor na amostra.

2.4.4 Microscopia de Luz

Ao fim de cada etapa, amostras de cada tratamento e controle foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e armazenadas em temperatura de 4 °C. Após a fixação, o material foi lavado três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M, desidratado em soluções crescentes de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100%, e infiltrado com historesina glicolmetacrilato (BOUZON, 2006). As secções foram realizadas em micrótomo (modelo Leica RM 2135) com espessura de 3 μm .

Para realizar os testes histoquímicos, as secções foram coradas com Azul de toluidina (AT-O) para observar polissacarídeos ácidos pela reação de metacromasia, e com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para identificar os polissacarídeos neutros. O material foi fotografado e analisado com um microscópio (Olympus BX 41) equipado com imagem QCapture Pro Software 5.1 (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos resultados dos experimentos preliminares foram submetidos aos testes de homocedasticidade e normalidade e realizado ANOVA multifatorial, seguido de teste *a posteriori* de Newman-Keuls, utilizando o software Statistica 10.0.

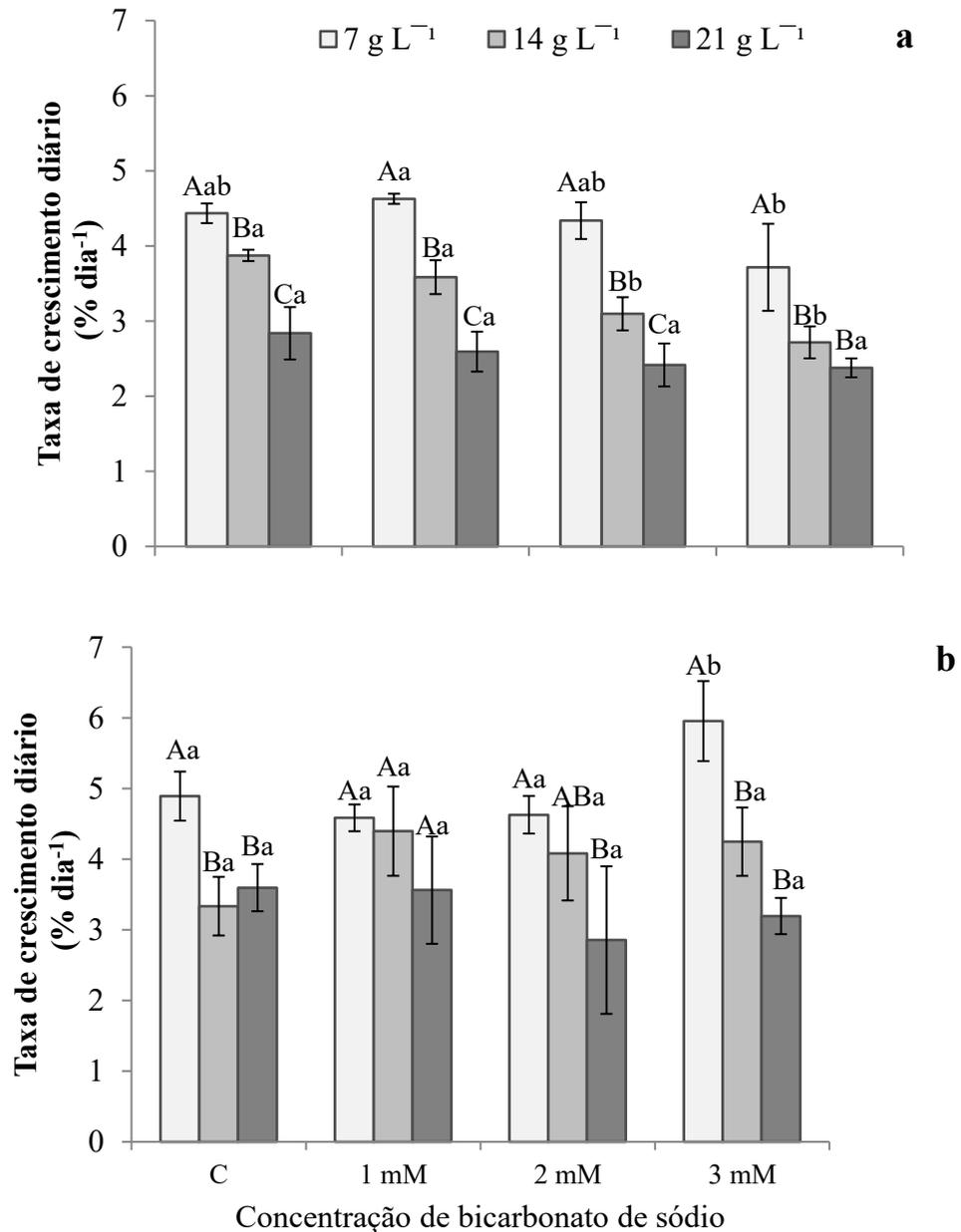
Os demais resultados foram submetidos aos testes de homocedasticidade e normalidade e aplicada a ANOVA, seguida pelo teste de comparação de médias de Bonferroni (no nível de significância de $p < 0,05$), utilizando o software GraphPad Prism 8.

3 RESULTADOS

3.1 DEFINIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE BICARBONATO E DENSIDADE DE BIOMASSA

Nos estudos preliminares, foi verificado que as algas cultivadas com a densidade de 7 g L^{-1} apresentaram maiores taxas de crescimento em todos os tratamentos durante a primeira etapa (Figura 2a). Nessa etapa, as taxas de crescimento das algas cultivadas nas densidades de 7 e 14 g L^{-1} com 3 mM foram significativamente menores do que os outros tratamentos e o controle. Na etapa 2, as taxas de crescimento de algas cultivadas em densidade de 7 g L^{-1} no tratamento com 3 mM foram significativamente maiores aos demais tratamentos e densidades (Figura 2b). Nas densidades de 14 e 21 g L^{-1} nenhum tratamento teve diferença significativa na taxa de crescimento em comparação ao controle. No tratamento com 2 mM , as taxas de crescimento resultaram em valores semelhantes ao controle e ao tratamento de 1 mM em todas as densidades. Portanto, a densidade de biomassa escolhida foi de 7 g L^{-1} nas concentrações de 1 mM e 3 mM de NaHCO_3 .

Figura 2. Taxa de crescimento da *K. alvarezii* cultivada com 3 concentrações de bicarbonato de sódio em diferentes densidades de biomassa 7, 14 e 21 g L⁻¹. **a** Etapa 1: Cultivo com adição semanal de bicarbonato de sódio, durante 3 semanas. **b** Etapa 2: Cultivo sem adição de bicarbonato de sódio. Valores apresentados em médias de cada tratamento (n=3). A barra vertical representa o intervalo de confiança. Letras maiúsculas representam as diferenças entre as densidades de biomassa de cada tratamento, e as letras minúsculas representam as diferenças entre as concentrações de bicarbonato de sódio e controle dentro de cada densidade de biomassa ($p = 0,0454$; $f = 2,575$).



3.2 EFEITO DO BICARBONATO DE SÓDIO NO CULTIVO

Na primeira semana da etapa 1 (suplementação semanal de bicarbonato de sódio), as algas cultivadas nos tratamentos não apresentaram diferenças significativas no crescimento ($p < 0,0001$) (Figura 3a). Na segunda semana, algas do T3 apresentaram diminuição do crescimento; entretanto, na semana seguinte, as taxas de crescimento apresentaram um aumento significativo ($5,25 \pm 0,25 \text{ %dia}^{-1}$) em relação ao controle ($4,54 \pm 0,09 \text{ %dia}^{-1}$) e T1 ($4,46 \pm 0,14 \text{ %dia}^{-1}$) ($p < 0,0001$; $f = 8,721$) (Figura 3a). Na primeira semana da etapa 2, as taxas de crescimento de T3 aumentaram significativamente em relação ao controle, enquanto os valores de T1 foram iguais ao C e T3 ($4,25 \pm 0,53 \text{ %dia}^{-1}$ para controle- C, $4,95 \pm 0,66 \text{ %dia}^{-1}$ para T1 e $5,60 \pm 0,41 \text{ %dia}^{-1}$ para T3) ($p < 0,0001$; $f = 8,721$). Porém, nas semanas subsequentes, as taxas de crescimento dos tratamentos e controle não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 3b). Observando as médias das taxas de crescimento das três semanas de cultivo, de cada etapa, na primeira etapa os valores não apresentaram diferenças significativas. Porém, na segunda etapa, o crescimento das algas do T3 foi significativamente maior que o C ($p = 0,0407$; $f = 5,722$) (Figura 4).

Figura 3. Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas *in vitro* com suplementação semanal com bicarbonato de sódio (a) (Etapa 1). Taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas *in vitro* sem a suplementação de bicarbonato de sódio (b) (Etapa 2). Valores apresentados em médias de cada tratamento (n=3). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos de cada semana ($p < 0,0001$; $f = 8,721$). A barra vertical representa o intervalo de confiança.

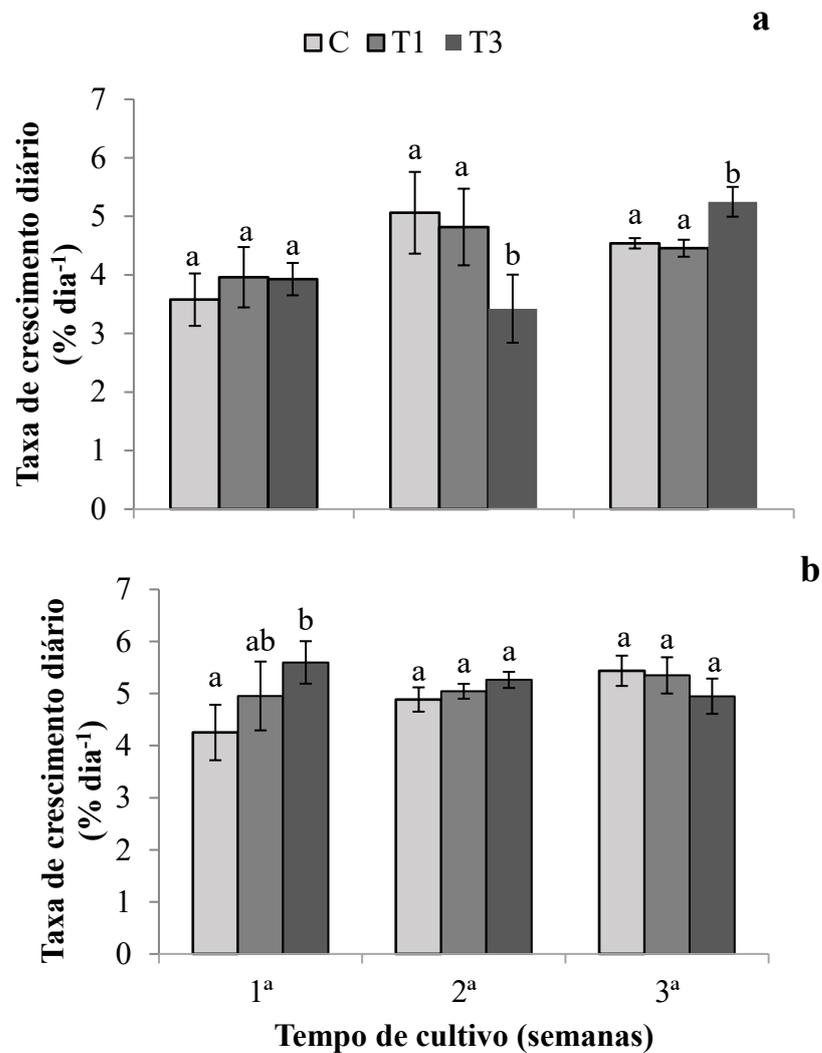
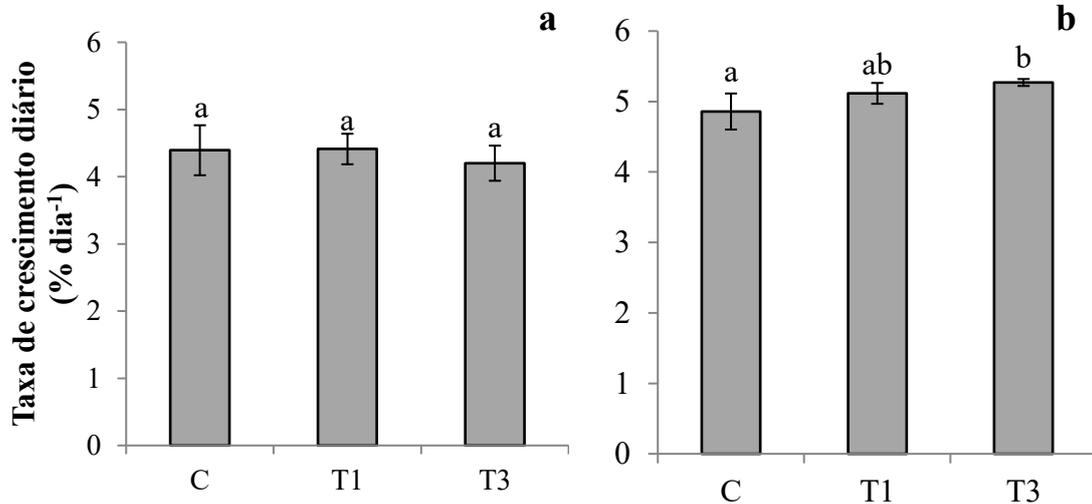


Figura 4. Média das taxas de crescimento de *K. alvarezii* cultivadas semanalmente com bicarbonato de sódio durante três semanas (a) e cultivada após essa suplementação por mais três semanas (b). Valores apresentados em médias de cada tratamento (n=3). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos ($p = 0,0407$; $f = 5,722$). A barra vertical representa o intervalo de confiança.



A adição de bicarbonato de sódio no cultivo reduziu os valores de pH, em relação ao controle, iniciando com os valores de 8,12 (C), 8,08 (T1) e 8,01 (T3). No final do cultivo da primeira semana da etapa 1, os valores de pH de todos os tratamentos aumentaram, para $8,30 \pm 0,05$ (C), $8,41 \pm 0,04$ (T1) e $8,15 \pm 0,03$ (T3). Foi observado que os valores de pH de T1 permaneceram significativamente maiores aos demais em todas as semanas da primeira etapa. Os valores de T3, na primeira semana, foram significativamente menores que os demais, porém na segunda e terceira semanas não foram observadas diferenças significativas aos valores do controle. Na segunda etapa, não houve nenhuma diferença significativa entre os valores de pH dos tratamentos (Tabela 1).

A adição de bicarbonato de sódio no cultivo elevou os valores de alcalinidade para 164 mg L^{-1} (T1) e 264 mg L^{-1} de CaCO_3 (T3), em relação ao C (116 mg L^{-1} de CaCO_3). Após uma semana de cultivo com bicarbonato de sódio, os valores de alcalinidade do C ($141,6 \pm 5,87 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3), e T1 ($194,4 \pm 5,87 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3) aumentaram em relação aos valores iniciais, enquanto de T3 reduziu ($130,4 \pm 15,20 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3). O T1 permaneceu com alcalinidade alta até o final de cada semana de cultivo, com diferença significativa em relação aos demais. Já o T3 apresentou precipitação de carbonato e alcalinidade reduzida no final de cada semana de cultivo, apresentando valores iguais ao do controle. Na segunda etapa, não houve nenhuma diferença significativa entre os valores dos tratamentos e controle (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de pH e alcalinidade total após cada semana de cultivo da *K. alvarezii*. Etapa 1, adicionado bicarbonato de sódio semanalmente em cultivo em *vitro*. Etapa 2 após cultivo sem a suplementação de bicarbonato de sódio. Os valores são representados em média \pm intervalo de confiança (n=3). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos de cada variável (p<0,05).

Etapa 1						
Semanas	pH			Alcalinidade (mg L ⁻¹ de CaCO ₃)		
	C	T1	T3	C	T1	T3
0	8,12	8,08	8,01	116	164	264
1	8,3 \pm 0,05 ^a	8,41 \pm 0,04 ^b	8,15 \pm 0,03 ^c	141 \pm 5,87 ^a	194 \pm 5,87 ^b	130 \pm 15,20 ^a
2	8,35 \pm 0,03 ^a	8,45 \pm 0,02 ^b	8,33 \pm 0,06 ^a	152 \pm 3,51 ^a	200 \pm 4,57 ^b	158 \pm 27,00 ^a
3	8,24 \pm 0,01 ^a	8,36 \pm 0,04 ^b	8,23 \pm 0,06 ^a	151 \pm 2,93 ^a	201 \pm 3,14 ^b	141 \pm 23,07 ^a

Etapa 2						
Semanas	pH			Alcalinidade (mg L ⁻¹ de CaCO ₃)		
	C	T1	T3	C	T1	T3
0	8,12	8,12	8,12	120	120	120
1	8,31 \pm 0,01 ^a	8,31 \pm 0,00 ^a	8,33 \pm 0,02 ^a	152 \pm 1,57 ^a	156 \pm 4,57 ^a	153 \pm 1,92 ^a
2	8,54 \pm 0,02 ^a	8,59 \pm 0,07 ^a	8,61 \pm 0,13 ^a	152 \pm 2,93 ^a	153 \pm 1,92 ^a	152 \pm 1,57 ^a
3	8,46 \pm 0,03 ^a	8,46 \pm 0,08 ^a	8,41 \pm 0,06 ^a	158 \pm 3,14 ^a	160 \pm 3,14 ^a	160 \pm 2,93 ^a

3.2.1 Pigmentos fotossintetizantes

A influência do bicarbonato de sódio nos pigmentos fotossintetizantes da *K. alvarezii* é apresentada na Tabela 2. Na primeira etapa, não houve diferenças significativas na concentração de clorofila *a*, enquanto no final da segunda etapa somente algas do T1 apresentaram um aumento significativo de clorofila *a* em relação ao C. A concentração de carotenoides não apresentou diferenças significativas em nenhuma das duas etapas.

A quantidade de ficoeritrina e ficocianina nas algas do T1 não apresentou diferença significativa em relação as algas do C e o T3. Porém, as algas do T3 apresentaram diferenças significativas em relação ao C e atingiu 90,38 \pm 15,40 $\mu\text{g g}^{-1}$ de ficoeritrina, e 42,24 \pm 9,35 $\mu\text{g g}^{-1}$ de ficocianina, enquanto o controle apresentou 65,77 \pm 6,99 e 30,07 \pm 1,54, respectivamente. Entretanto, na segunda etapa não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e controle.

Na etapa 1, as algas do T3 apresentaram diferenças significativas na quantidade de alofocianina (82,33 \pm 19,95 $\mu\text{g g}^{-1}$), em relação as algas do C (52,51 \pm 5,32 $\mu\text{g g}^{-1}$) e do T1 (55,79 \pm 6,60 $\mu\text{g g}^{-1}$). Na segunda etapa, algas do T3 não apresentaram diferenças significativas com as algas do C, porém as diferenças significativas continuaram em relação as algas do T1.

Tabela 2. Efeito do bicarbonato de sódio nos pigmentos fotossintetizantes de *K. alvarezii* após três semanas de suplementação em cultivo em *vitro* (Etapa 1) e após cultivo sem a suplementação de bicarbonato de sódio (Etapa 2). Clorofila *a*, carotenoides e ficobiliproteínas (Ficoeritrina, Ficocianina e Aloficocianina). Os valores são representados em média \pm intervalo de confiança (n=3). As letras representam as diferenças significativas entre os tratamentos de cada variável (p<0,05).

Pigmentos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Etapa 1		
	C	T1	T3
Clorofila	0,41 \pm 0,12 ^a	0,30 \pm 0,09 ^a	0,48 \pm 0,11 ^a
Carotenoides	23,04 \pm 4,05 ^a	21,89 \pm 3,13 ^a	30,26 \pm 6,24 ^a
Ficoeritrina	65,77 \pm 6,99 ^a	73,56 \pm 10,96 ^{ab}	90,38 \pm 15,40 ^b
Ficocianina	30,07 \pm 1,54 ^a	34,91 \pm 5,59 ^{ab}	42,24 \pm 9,35 ^b
Aloficocianina	52,51 \pm 5,32 ^a	55,79 \pm 6,60 ^a	82,33 \pm 19,95 ^b
Pigmentos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Etapa 2		
	C	T1	T3
Clorofila	0,34 \pm 0,05 ^a	0,59 \pm 0,12 ^b	0,44 \pm 0,11 ^{ab}
Carotenoides	12,69 \pm 4,05 ^a	16,98 \pm 3,13 ^a	13,05 \pm 6,24 ^a
Ficoeritrina	85,47 \pm 9,71 ^a	63,95 \pm 14,84 ^a	77,94 \pm 1,10 ^a
Ficocianina	36,26 \pm 2,53 ^a	31,29 \pm 4,63 ^a	31,44 \pm 2,18 ^a
Aloficocianina	73,05 \pm 14,87 ^{ab}	54,22 \pm 6,50 ^a	85,14 \pm 3,48 ^b

3.2.2 Anidrase carbônica

A atividade da enzima anidrase carbônica foi verificada no final de cada etapa do experimento. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e controle e em nenhuma das etapas (Tabela 3).

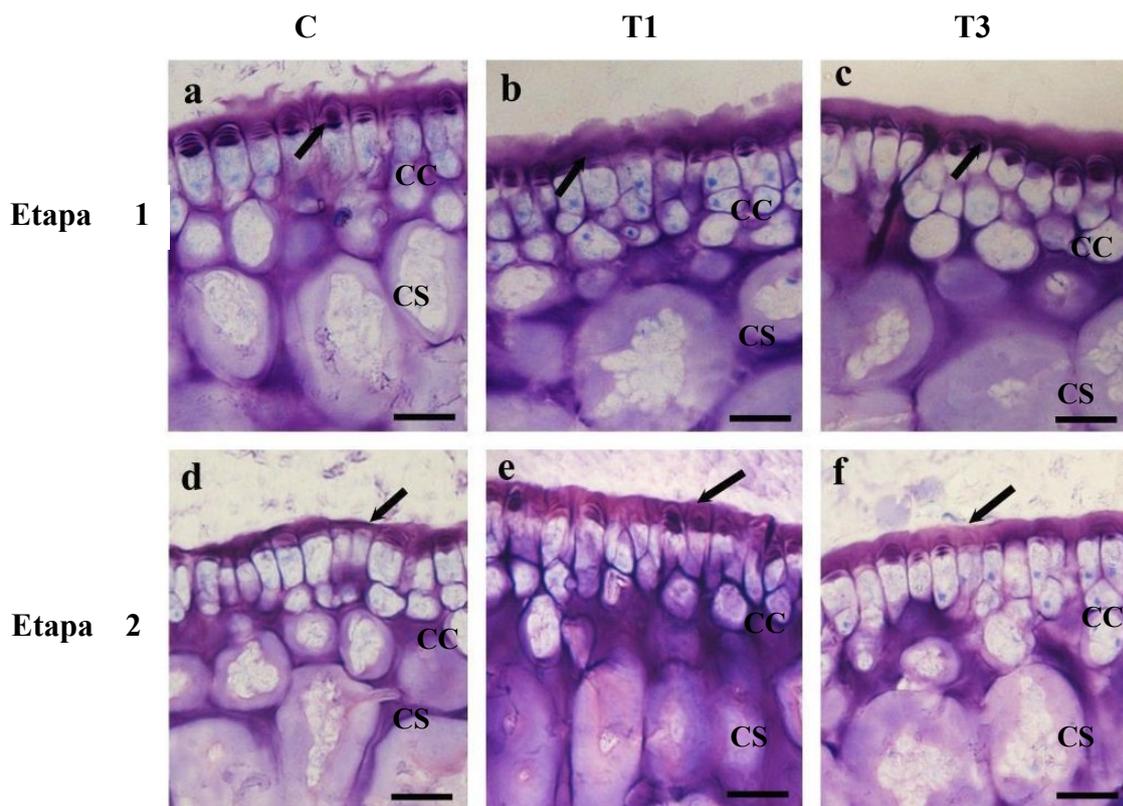
Tabela 3. Efeito do bicarbonato de sódio na atividade da enzima anidrase carbônica da *K. alvarezii* após 3 semanas de suplementação em cultivo em *vitro* (Etapa 1) e após cultivo sem a suplementação de bicarbonato de sódio (Etapa 2). Valores apresentados em médias de cada tratamento \pm intervalo de confiança (n=3).

	C	T1	T3
Etapa 1	3,06 \pm 0,66 ^a	3,40 \pm 0,21 ^a	3,10 \pm 0,25 ^a
Etapa 2	3,03 \pm 0,34 ^a	3,03 \pm 0,34 ^a	2,99 \pm 0,24 ^a

3.2.3 Microscopia de luz

Todas as amostras apresentaram forte reação metacromática à coloração com Azul de Toluidina (AT-O) após a primeira etapa (Figura 5 a,b,c). Os tratamentos apresentaram um espessamento da parede celular das células corticais em relação ao controle, sendo observado maior espessamento para o T1 no final da etapa 1 e 2 (Figura 5 d,e,f).

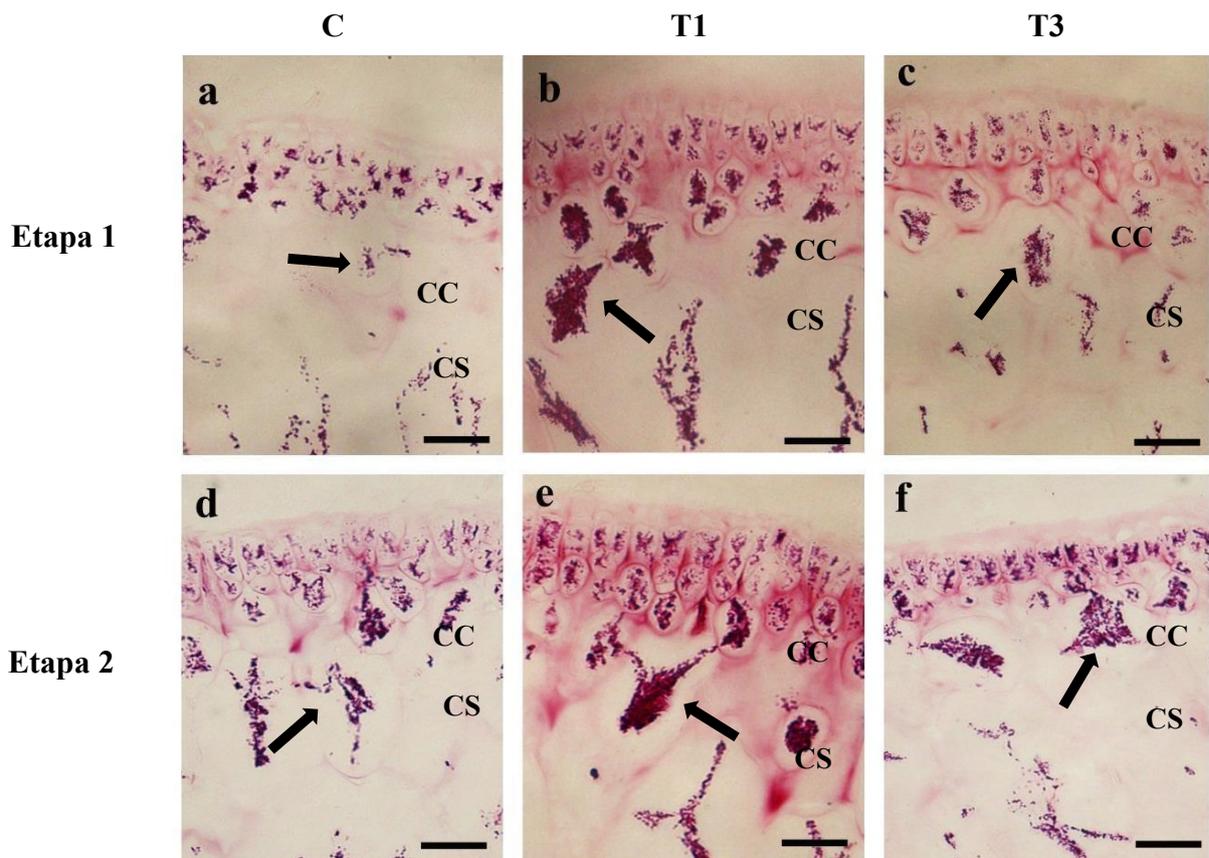
Figura 5. Microscopia de luz de secções transversais de *K. alvarezii* coradas com Azul de Toluidina (AT-O). As imagens indicam a reação metacromática ao AT-O na parede celular das células corticais (CC) na região voltada para o exterior, indicando a presença de carragenana. (A seta indica a parede celular das células corticais. (a) Amostra controle da etapa 1. (b) T1 após três semanas cultivadas com bicarbonato de sódio com espessamento na parede celular. (c) T3 após três semanas cultivadas com bicarbonato de sódio com espessamento da parede celular. (d) Amostra controle da etapa 2. (e) T1 após três semanas cultivadas sem bicarbonato de sódio com espessamento da parede celular. (f) T3 cultivada três semanas sem adição de bicarbonato de sódio com espessamento na parede celular. (CS) Células subcorticais. Escala: 50µm.



As amostras do final de cada etapa apresentaram reação intensa ao Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Figura 6), indicando presença de grãos de amido das florídeas nas células corticais, subcorticais, aparentemente com maior quantidade nas amostras cultivadas com bicarbonato

de sódio na etapa 1. Na etapa 2, foi observado maior densidade de grãos de amido das florídeas somente no tratamento T1 em relação as outras amostras (Figura 6e).

Figura 6. 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 (setas) nas células corticais (CC) e subcorticais (CS). (a) Controle da primeira etapa de cultivo. (b) T1 após três semanas cultivadas com bicarbonato de sódio. (c) T3 após três semanas cultivadas com bicarbonato de sódio. (d) Amostra controle da etapa 2. (e) T1 após três semanas cultivadas sem bicarbonato de sódio. (f) T3 cultivada três semanas sem adição de bicarbonato de sódio. Escala: 50µm.



4 DISCUSSÃO

A suplementação de carbono no cultivo a partir de adição de bicarbonato de sódio é uma forma de estimular o crescimento de macroalgas (DEBUSK; RYOTHER, 1984; ANDRIA et al., 2001; ZHOU et al., 2016). Porém, no presente trabalho, a suplementação de 3 mM no cultivo de *K. alvarezii* diminuiu temporariamente o crescimento durante a segunda semana de cultivo em relação ao tratamento T1 e controle; por outro lado, na terceira semana, houve um aumento significativo na taxa de crescimento. Essa diminuição temporária pode ter ocorrido devido a uma possível aclimatação ao aumento da alcalinidade do meio de cultivo, que é diretamente proporcional ao aumento da concentração de bicarbonato de sódio no meio

(WHITE et al., 2013). De fato, após uma semana, a alcalinidade do meio de cultura do tratamento T3 diminuiu e ficou similar ao controle, ou seja, condições normalmente encontradas para o crescimento dessa espécie. Essa redução da alcalinidade pode estar associada à absorção do HCO_3^- e/ou precipitação de CaCO_3 , uma vez que o efluxo de íons hidróxido que está associado à captação de HCO_3^- , e pode causar a precipitação de carbonatos (MENENDEZ et al. 2001). Por outro lado, no tratamento T1, os valores de pH e alcalinidade aumentaram em relação aos demais tratamentos durante a primeira etapa, sem influenciar a taxa de crescimento, possivelmente como uma consequência de absorção de carbono inorgânico pela fotossíntese e assimilação de nitrato (UUSITALO et al., 1996).

Durante todo o experimento, os valores de pH permaneceram dentro da faixa ótima de crescimento para a maioria das algas, entre 8,2 e 8,7 (TEE et al 2015). Foi sugerido que a partir de pH 8,4 até 9 a macroalga *K. alvarezii* pode utilizar o HCO_3^- na fotossíntese através da enzima anidrase carbônica (GRANBOM, 2001; TEE et al., 2015). Porém, no presente trabalho, a influência do bicarbonato de sódio na atividade da anidrase carbônica da *K. alvarezii* não foi verificada. Provavelmente a adição de bicarbonato não influenciou no crescimento na primeira etapa, porque os íons de bicarbonato na solução precisam de conversão para formar um gradiente de CO_2 por meio da atividade de enzima, a fim de ser utilizado para fotossíntese (ZHOU et al. 2016).

Espécies de microalgas e macroalgas possuem sensibilidades diferentes sob as mesmas condições de cultivo com suplementação de carbono inorgânico, resultando em respostas específicas em relação à divisão celular, e afetando a utilização de nutrientes, taxas de crescimento, eficiência fotossintética e atividade da anidrase carbônica (LARSSON et al. 1997; ANDRIA et al., 2001; ZHOU ; GAO 2009; AXELSSON; BEER, 2012; GARDNER et al., 2013; WHITE et al., 2013; ZHOU et al., 2016). Segundo Rivers e Peckol (1995), o enriquecimento de Ci somente aumentou o crescimento e a fotossíntese de *Cladophora vagabunda* e *Gracilaria tikvahiae* quando essas espécies estavam com quantidades suficientes de nitrogênio no cultivo. O mesmo foi observado para *G. gaditana* (ANDRIA,1999). Gordillo et al., (2001) observaram que o crescimento de *Ulva rigida* suplementada com alta concentração de CO_2 foi devido a um aumento na assimilação de N, onde uma parcela maior de energia foi atribuída no transporte e redução de nitratos (GORDILLO et al 2003). Zhou et al. (2016) sugeriram que uma quantidade adequada de bicarbonato pode aumentar a síntese de pigmentos fotossintetizantes, refletindo no aumento das concentrações de ficoeritrina e clorofila *a*, acelerando a fotossíntese e promovendo o crescimento. No presente trabalho, foi verificado que a suplementação com bicarbonato de sódio por três semanas estimulou

somente a biossíntese de ficobiliproteínas da *K. alvarezii* sem influenciar no crescimento, enquanto as concentrações de carotenoides e clorofila não apresentaram alterações durante todo o experimento. Essas alterações também podem ter ocorrido na última semana da primeira etapa devido a limitação de espaço e nutrientes, que ocorrem quando a biomassa das algas passam de 10 g L^{-1} , estabilizado assim o crescimento (PAULA et al., 2001).

A alteração da quantidade de ficobiliproteínas não é suficiente para indicar uma aclimatação ao ambiente, pois o aumento da quantidade desses pigmentos não significa apenas maior eficiência na captação de luz, mas também armazenamento de nitrogênio ou dissipação do excesso de energia (TALARICO et al., 2000). ZOU & GAO (2009) observaram que devido às vias metabólicas do carbono e do nitrogênio serem altamente coordenadas e acopladas, a adição de bicarbonato de sódio no cultivo pode aumentar a demanda metabólica de nitrato para a síntese de componentes celulares (WHITE et al., 2013; ZHOU et al., 2016). Isso explicaria o aumento nas concentrações de ficoeritrina no presente trabalho, que são pigmentos também usados como reservatório de nitrogênio (ZHOU; GAO 2009) mesmo não refletindo em melhor crescimento (WHITE et al., 2013).

No início da segunda etapa, as taxas de crescimento aumentaram de acordo com as concentrações de bicarbonato e com as concentrações de ficobiliproteínas disponíveis na etapa anterior. Porém, no fim da segunda etapa, foi verificada uma redução na concentração de ficobiliproteínas dos dois tratamentos, apresentando valores similares ao controle. Provavelmente, a alga pode ter utilizado o reservatório de nitrogênio das ficobiliproteínas para o crescimento, pois algumas algas vermelhas possuem a capacidade de acumular reservas de nitrogênio e utilizá-las posteriormente em seu desenvolvimento (REED, 1990). O mesmo foi verificado em talos de *K. alvarezii* cultivadas em tanques com efluente de peixe, onde acumularam nutrientes sem aumentar a biomassa, e isso refletiu em maiores taxas de crescimento quando foram cultivadas em mar aberto (HAYASHI et al., 2008).

A adição de bicarbonato de sódio também pode aumentar a disponibilidade de carbono para o metabolismo celular, fazendo com que o fluxo de carbono se direcione para compostos de armazenamento (ANDRIA et al., 1999; WANG et al., 2021). Ventura et al. (2020) observaram que *K. alvarezii*, cultivada com suplementação de Ci proveniente de CO_2 , acumulou grãos de amido de florídeas e promoveu espessamento da parede celular, apesar de não aumentar a biomassa. Isso sugere uma maior ativação das vias de utilização do excesso de Ci disponível no meio e/ou como resposta ao estresse ao meio externo. Resultado similar foi observado no presente trabalho, onde o bicarbonato de sódio afetou o metabolismo celular dos tratamentos. Além do espessamento da parede celular ser um indicativo de aumento da

carragenana, o aumento na quantidade de grãos de amido também pode resultar em um aumento futuro da quantidade de carragenana, devido à degradação das reservas de amido (FOURNET et al., 1999). Além disso, alguns autores relataram que o aumento nas reservas de amido e espessamento da parede celular da *K. alvarezii* podem agir também como mecanismos de defesa e ser uma forma de mitigar o estresse ambiental (HAYASHI et al., 2011b; PRABHU et al., 2019; SCHMIT et al., 2010; VENTURA et al. 2020).

5 CONCLUSÃO

A suplementação de carbono a partir de adição de 3 mM de bicarbonato de sódio no cultivo *indoor* de *K. alvarezii* pode ser uma estratégia utilizada para manutenção da biomassa nos períodos desfavoráveis. Em razão de não aumentar a biomassa na primeira etapa, não aumentará os custos de manutenção durante esse período. Porém, devido às alterações bioquímicas, os propágulos podem responder de forma eficiente contra o estresse ambiental quando forem transferidos ao mar, resultando em benefícios logo no primeiro ciclo de cultivo após o inverno.

REFERÊNCIAS

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater**. 21st ed. Washington, DC. 2005.
- ANDRIA, J. R. et al. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp.(Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 497-504, 1999.
- ANDRIA, J. R. et al. Acclimation responses of *Gracilaria* sp.(Rhodophyta) and *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) to changes in the external inorganic carbon concentration. **Botanica Marina**, v. 44, p. 361-370, 2001.
- AXELSSON, L.; BEER, S. Carbon limitation. *In*: RAI, Lal Chand; GAUR, Jai Prakash (Ed.). **Algal adaptation to environmental stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms**. Springer Science & Business Media, 2012.
- BEER, S. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine microalgae (with special reference to the Chlorophyta). **Progress in Phycological Research**, v. 10, p. 179-179, 1994.
- BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Rev Bras Bot** 29:229–238. 2006.

DE MARTINO, R. et al. Effects of biofloc effluent in different regimes as a fertilizer for *Kappaphycus alvarezii*: indoor maintenance and sea cultivation. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-13, 2021.

DEBUSK, T. A.; RYTHER, J. H. Effects of seawater exchange, pH and carbon supply on the growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in large-scale cultures. **Botanica Manrina**.v XXVII, pp.357-362, 1984.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

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

FOURNET, Isabelle et al. Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 2, p. 125-130, 1999.

GAO, K. et al. Influence of enhanced CO₂ on growth and photosynthesis of the red algae *Gracilaria* sp. and *G. chilensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 6, p. 563-571, 1993.

GAO, K.; MCKINLEY, K. R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 45–60, 1994.

GARCIA-SANCHEZ, M. J.; FERNANDEZ, J. A.; NIELL, X. Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata*. **Planta**, v. 194, n. 1, p. 55-61, 1994.

GARDNER, R. D. et al. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 87-96, 2013.

GORDILLO, F. JL; NIELL, F. X.; FIGUEROA, F. L. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). **Planta**, v. 213, n. 1, p. 64-70, 2001.

GORDILLO, F. JL; FIGUEROA, F. L.; NIELL, F. X.. Photon-and carbon-use efficiency in *Ulva rigida* at different CO₂ and N levels. **Planta**, v. 218, n. 2, p. 315-322, 2003.

GRANBOM, M. **Circadian rhythms and carbon acquisition in the red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Euchema denticulatum***. Tese de doutorado, departamento de botânica, Universidade de Estocolmo. 2001.

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.

HAYASHI, L. et al. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 337-343, 2011a.

- HAYASHI, L. et al. 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, 2011b.
- HAYASHI, L.; REIS, R. P. Cultivation of the red algae *Kappaphycus alvarezii* in Brazil and its pharmacological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 748-752, 2012.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.
- HSUEH, H. T.; CHU, H.; YU, S.T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. **Chemosphere**, v. 66, n. 5, p. 878-886, 2007.
- JIANG, H.; ZOU, D.; LI, X. Growth, photosynthesis and nutrient uptake by *Grateloupia livida* (Halymeniales, Rhodophyta) in response to different carbon levels. **Phycologia**, v. 55, n. 4, p. 462-468, 2016.
- KIM, G. Y. et al. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 72-77, 2017.
- KURSAR, T. A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses of pigment mutations. **Plant Physiology**, v. 73, n. 2, p. 353-360, 1983.
- LARSSON, C. et al. Photosynthetic carbon utilization by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) from a Swedish rockpool. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 49-54, 1997.
- LARSSON, C.; AXELSSON, L. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 1, p. 79-86, 1999.
- MC HUGH, D. J. A guide to the seaweed industry FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2003.
- MENENDEZ, M. et al., A. A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 256, n. 1, p. 123-136, 2001.
- MERCADO, J. M. et al. Regulation of the mechanism for HCO_3^- use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jolis (Rhodophyta). **Planta**, v. 201, n. 3, p. 319-325, 1997.
- MERCADO, J. M. et al. Effects of different levels of CO_2 on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*. **Journal of applied phycology**, v. 11, n. 5, p. 455-461, 1999.
- PAULA, E. J. et al. 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. et al. 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, 2017.
- PIMOLRAT, P. et al. The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. **Journal of Fisheries and Environment**, v. 34, n. 2, p. 40-47, 2010.
- PIRES, C. M. et al. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* using biofloc effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 2, p. 1047-1058, 2021.
- PRABHU, M. et al. 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, 2019.
- REED, R.H. Solute accumulation and osmotic adjustment. KM Cole, RG Sheath (Eds.). **Biology of the red algae**, Cambridge University Press, Cambridge, p. 147-170. 1990.
- PECKOL, P.; RIVERS, J. S. Physiological responses of the opportunistic macroalgae *Cladophora vagabunda* (L.) van den Hoek and *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan) to environmental disturbances associated with eutrophication. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 190, n. 1, p. 1-16, 1995.
- SCHMIDT, E. C. et al., Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia**, v. 649, n. 1, p. 171-182, 2010.
- SEBÖK, S. et al. Red alga *Palmaria palmata*—growth rate and photosynthetic performance under elevated CO₂ treatment. **Journal of applied phycology**, v. 29, n. 1, p. 381-393, 2017.
- SUÁREZ-ÁLVAREZ, S. et al. Effects of increased CO₂ levels on growth, photosynthesis, ammonium uptake and cell composition in the macroalga *Hypnea spinella* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 4, p. 815-823, 2012.
- TALARICO, L.; MARANZANA, G. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2000.
- TEE, M. Z. et al. Growth rate analysis and protein identification of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) under pH induced stress culture. **Aquaculture Reports**, v. 2, p. 112-116, 2015.
- UUSITALO, J. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH ("alkalinization"), exemplified with a pH-drift experiment. **Scientia Marina**, v. 60, n. 1, p. 129-134, 1996.

- VENTURA, T. F. B. et al. Addition of carbon dioxide, followed by irradiance increase, as optimization strategy for the cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 4113–4126, 2020.
- WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.
- WANG, M. et al. Exogenous NaHCO₃ enhances growth and lipid accumulation of the highly NaHCO₃-tolerant *Nannochloris* sp. JB17. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 1, p. 241-253, 2021.
- WARRIER, R. R.; et al. A modified assay of carbonic anhydrase activity in tree species. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 48-55, 2014.
- WHITE, D. A. et al. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 1, p. 153-165, 2013.
- XU, Z.; ZOU, D.; GAO, K. Effects of elevated CO₂ and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). **Botanica Marina** 53:123–129. 2010.
- YONG, Y. S.; YONG, W. T. L.; ANTON, A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 6, p. 1831-1834, 2013.
- ZHOU, W. et al. Effects of sodium bicarbonate concentration on growth, photosynthesis, and carbonic anhydrase activity of macroalgae *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria vermiculophylla*, and *Gracilaria chouae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Photosynthesis research**, v. 128, n. 3, p. 259-270, 2016.
- ZOU, D.; GAO, K. Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. **Phycologia**, v. 48, n. 6, p. 510-517, 2009.
- ZOU, D. et al. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). **Aquaculture**, v. 237, n. 1-4, p. 421-431, 2004.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 45, n. 1, p. 369-392, 1994.

BEER, S. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine microalgae (with special reference to the Chlorophyta). **Progress in Phycological Research**, v. 10, p. 179-179, 1994.

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

CHOPIN, T. et al. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 6, p. 975-986, 2001.

DEBUSK, T. A.; RYTHER, J. H. Effects of seawater exchange, pH and carbon supply on the growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in large-scale cultures. **Botanica marina**, v. 27, n. 8, p. 357-362, 1984.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de limnologia. 2 a edição. **Interciência (Ed.), Rio de Janeiro**, 1998.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

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

GAO, K. et al. Influence of enhanced CO₂ on growth and photosynthesis of the red algae *Gracilaria* sp. and *G. chilensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 6, p. 563-571, 1993.

GAO, K.; MCKINLEY, K. R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 45–60, 1994.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, X. Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata*. **Planta**, v. 194, n. 1, p. 55-61, 1994.

GARDNER, Robert D. et al. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 87-96, 2013.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L.W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2009.

GRANBOM, M.; PEDERSÉN, M. Carbon acquisition strategies of the red alga *Eucheuma denticulatum*. **Hydrobiologia**. 398/399: 349-354. 1999.

GRANBOM, M. **Circadian rhythms and carbon acquisition in the red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Euchema denticulatum***. Tese de doutorado, departamento de botânica. Universidade de Estocolmo. 2001.

HAYASHI, L. *et al.* *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 337-343, 2011.

HAYASHI, L.; REIS, R. P. Cultivation of the red algae *Kappaphycus alvarezii* in Brazil and its pharmacological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 748-752, 2012.

HENRY, R. P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. **Annual review of physiology**, v. 58, n. 1, p. 523-538, 1996.

HSUEH, H. T.; CHU, H.; YU, S.T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. **Chemosphere**, v. 66, n. 5, p. 878-886, 2007.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa IBAMA N° 1, de 21 de janeiro de 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-21-de-janeiro-de-2020-239404226>. Acessado em: 10 jun 2021, 2020.

JAYASANKAR, R.; VALSALA, K. K. Influence of different concentrations of sodium bicarbonate on growth rate and chlorophyll content of *Chlorella salina*. **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 50, n. 1, p. 74-78, 2008.

JI, Y. *et al.* Ecophysiological responses of marine macroalgae to climate change factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2953–2967, 2016.

JIANG, H.; ZOU, D.; LI, X. Growth, photosynthesis and nutrient uptake by *Grateloupia livida* (Halymeniales, Rhodophyta) in response to different carbon levels. **Phycologia**, v. 55, n. 4, p. 462-468, 2016.

KHALIFAH, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 8, p. 2561-2573, 1971.

KIM, G. Y. *et al.* Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 72–77, 2017.

KUMAR, K. S. *et al.* Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—An edible seaweed. **Food chemistry**, v. 153, p. 353-360, 2014.

LARSSON, C. *et al.* Photosynthetic carbon utilization by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) from a Swedish rockpool. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 49-54, 1997.

LARSSON, C.; AXELSSON, L. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 1, p. 79-86, 1999.

MABERLY, S. C. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. **Journal of Phycology**, v. 26, n. 3, p. 439-449, 1990.

MC HUGH, D. J. A guide to the seaweed industry FAO Fisheries Technical Paper 441. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome**, 2003.

MENENDEZ, M. et al. A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 256, n. 1, p. 123-136, 2001.

MERCADO, J. M. et al. Regulation of the mechanism for HCO_3^- use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jolis (Rhodophyta). **Planta**, v. 201, n. 3, p. 319-325, 1997.

MERCADO, J. M. et al. Effects of different levels of CO_2 on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*. **Journal of applied phycology**, v. 11, n. 5, p. 455-461, 1999.

MOKASHI, K. et al. Sodium bicarbonate as inorganic carbon source for higher biomass and lipid production integrated carbon capture in *Chlorella vulgaris*. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 111-117, 2016.

PANCHA, I. et al. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource technology**, v. 193, p. 315-323, 2015.

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. *et al.* 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, 2017.

PENG, L. et al. Alleviation of oxygen stress on *Neochloris oleoabundans*: effects of bicarbonate and pH. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 143-152, 2017.

PIMOLRAT, P. *et al.* The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. **Journal of Fisheries and Environment**, v. 34, n. 2, p. 40-47, 2010.

PIRES, C. M. et al. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* using biofloc effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 2, p. 1047-1058, 2021.

RAVEN, J. A. Inorganic carbon assimilation by marine biota. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 203, n. 1, p. 39-47, 1996.

RAVEN, J. A. Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. **Advances in botanical research**, v. 27, p. 85-209, 1997.

- RAVEN, J. et al. **Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide**. The Royal Society, 2005.
- REIS, R. P.; BASTOS, M.; GÓES, H. G. Cultivo de *Kappaphycus alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 89, p. 42-47, 2007.
- EBÖK, S.; HERPPICH, W. B.; HANELT, D. Red alga *Palmaria palmata*—growth rate and photosynthetic performance under elevated CO₂ treatment. **Journal of applied phycology**, v. 29, n. 1, p. 381-393, 2017.
- SRINIVASAN, R. et al. Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.
- STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. v.126. John Wiley & Sons, 2012.
- SUÁREZ-ÁLVAREZ, S.; GÓMEZ-PINCHETTI, J. L.; GARCÍA-REINA, G. Effects of increased CO₂ levels on growth, photosynthesis, ammonium uptake and cell composition in the macroalga *Hypnea spinella* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 4, p. 815-823, 2012.
- TRIVEDI, K. et al. Crop stage selection is vital to elicit optimal response of maize to seaweed bio-stimulant application. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 2135-2144, 2017.
- VENTURA, T. F. B. et al. Addition of carbon dioxide, followed by irradiance increase, as optimization strategy for the cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 4113–4126, 2020.
- WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008.
- WANG, M. et al. Exogenous NaHCO₃ enhances growth and lipid accumulation of the highly NaHCO₃-tolerant *Nannochloris* sp. JB17. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 1, p. 241-253, 2021.
- WHITE, D. A. et al. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 1, p. 153-165, 2013.
- XU, Z.; ZOU, D.; GAO, K. Effects of elevated CO₂ and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). **Botanica Marina** 53:123–129. 2010.
- ZHOU, W. et al. Effects of sodium bicarbonate concentration on growth, photosynthesis, and carbonic anhydrase activity of macroalgae *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Gracilaria vermiculophylla*, and *Gracilaria chouae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Photosynthesis research**, v. 128, n. 3, p. 259-270, 2016.
- ZOU, D.; XIA, J.; YANG, Y. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). **Aquaculture**, v. 237, n. 1-4, p. 421-431, 2004.