



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**ANA CHRISTINA VERÍSSIMO OLIVEIRA**

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ALGA VERMELHA**  
***Gracilaria birdiae* EM CULTURA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)**

**FORTALEZA**

**2017**

ANA CHRISTINA VERÍSSIMO OLIVEIRA

EFEITOS DA APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ALGA VERMELHA *Gracilaria  
birdiae* EM CULTURA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O45e Oliveira, Ana Christina Veríssimo.  
Efeitos da aplicação do extrato bruto da alga vermelha *Gracilaria birdiae* em cultura de alface (*Lactuca sativa*) / Ana Christina Veríssimo Oliveira. – 2017.  
79 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.
1. Biofertilizante. 2. Bioestimulante. 3. Macroalgas vermelhas. 4. Horticultura. I. Título.  
CDD 661
-

ANA CHRISTINA VERÍSSIMO OLIVEIRA

EFEITOS DA APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA ALGA VERMELHA *Gracilaria  
birdiae* EM CULTURA DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Ticiania de Brito Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao querido amigo Israel Aguiar, que foi muito cedo se encontrar com os outros anjos, mas que deixou sua marca aqui na Terra e um grande vazio no meu coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a Deus, que me deu forças para seguir meu caminho mesmo com todas as dificuldades que encontrei nessa jornada.

Aos meus pais, Sérgio Luis e Francisca Ivaneide, que me apoiaram em minhas escolhas e que, além de me darem a vida, contribuíram todos esses anos com seu amor, dedicação e educação para que eu me tornasse a mulher que sou hoje.

Ao meu irmão, Rafael Veríssimo, que está sempre do meu lado dando conselhos, abraços e me enchendo de orgulho.

Aos meus avós, Luzia Xavier e Francisco Carvalho, que são duas das pessoas mais incríveis e importantes que Deus colocou na minha vida. Também ao meu primo Felipe Veríssimo e aos meus tios Francisca Ivanete, Sylmara Xavier e Marcos Leandro, que tanto amo e respeito.

Ao meu companheiro, Marcus Rafael, que foi um dos melhores presentes que essa graduação me deu. Agradeço pelo seu apoio, seu amor e pelos “puxões de orelha” que você me dá sempre que preciso.

Aos meus amigos de graduação Matheus Girão, Éwerton Lima, Ingrid Queiroz, Carol Landim, Luca Milério, Lucas Lopes, Lucas Bedê, Wallady Barroso, Ellivelton Lima, Carol Dantas, Bruno Henrique e Patrícia Gomes por me proporcionarem ótimos momentos descontração que renderam muitas risadas e histórias para contar.

Ao Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas, em especial à minha orientadora Márjory Holanda, que me acolheu e me agraciou com seus conhecimentos e sua paciência. Também aos meus companheiros Acrísio, George, Vilmara, Áurea e Adson, que me deram suporte e me proporcionaram um clima de trabalho mais agradável.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, principalmente à professora Cristina Paiva, por me acolher como monitora, pelos ensinamentos que me deu e pela parceria na execução deste trabalho. Aos amigos Carol, Isabel, Misrael, Jamili, George, Caio e Levi, que me ajudaram quando precisei e tornaram meus dias de trabalho ainda melhores e mais especiais.

Ao Laboratório de Estudos em Química Aplicada, principalmente à professora Wladiana Matos, pela parceria na realização do trabalho.

Ao secretário Gilmar Ferreira, que por diversas vezes me auxiliou e me trouxe um pouco de tranquilidade em momentos de turbulência.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por toda a estrutura proporcionada para minha formação e a todos os meus professores que souberam assumir sua vocação com dignidade.

À Universitat Politècnica de València e ao Programa Ciências Sem Fronteiras, por me proporcionarem uma das experiências mais incríveis da minha vida.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro que me permitiu desenvolver todos os meus projetos durante a graduação.

Por fim, a todos os projetos de extensão dos quais participei, PIQD, AUG Biotec e CABG, e ao Programa Integrado de Monitoria, por contribuírem para minha formação complementar.

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que  
você não conhece como eu mergulhei. Não se  
preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer  
entendimento.”

**Clarice Lispector**

## RESUMO

O agronegócio é o setor responsável por grande parte do PIB do Brasil, mas para obter a elevada produtividade anual do país é necessária a utilização de fertilizantes e estimulantes, os quais são importados em sua maioria. A utilização de fertilizantes orgânicos (biofertilizantes) é uma opção para driblar os altos custos de importação desse tipo de insumo, sendo os adubos de dejetos animais a opção mais utilizada. Esses, entretanto, não podem ser utilizados em algumas hortaliças consumidas cruas, como a alface, devido a possível contaminação com microrganismos patogênicos. A alface é a folhosa mais consumida do Brasil e, nesse caso, os extratos de macroalgas marinhas se tornam uma boa opção graças ao seu caráter biodegradável e atóxico ao ambiente e aos seres vivos. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um extrato aquoso com potencial bioestimulante e/ou biofertilizante para plantas a partir da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*. Para isso, realizou-se uma extração aquosa da macroalga e a composição bioquímica, bem como o rendimento desse extrato, denominado EB-Gb, foram determinados. O efeito de diferentes concentrações de EB-Gb (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 g.L<sup>-1</sup>) sobre a porcentagem, tempo, velocidade e índice de sincronização de germinação de sementes foram determinados para as alfaces americana e crespa em duas condições de temperatura distintas (20 e 28 °C). Já o efeito de diferentes concentrações de EB-Gb sobre o desenvolvimento de mudas de alface americana em meio líquido *in vitro* foi avaliado sobre a biomassa da parte aérea e sistema radicular, número de folhas, comprimento da folha e da raiz principal. Os resultados sugeriram potencial biofertilizante e bioestimulante do EB-Gb uma vez que mostrou efeitos positivos sobre a sincronização da germinação nas duas cultivares utilizadas no estudo, a porcentagem de germinação de alface crespa em condições de estresse, o crescimento da parte aérea e da raiz principal, número de folhas e de raízes laterais e porcentagem de biomassa seca da parte aérea dessas plantas.

**Palavras-chave:** Biofertilizante; bioestimulante; macroalgas vermelhas; horticultura.

## ABSTRACT

The agribusiness is responsible for a major part of Brazil's GDP, but to achieve its high annual productivity, Brazil needs to utilize fertilizers and stimulants, which are mostly imported. The use of organic fertilizers (biofertilizers) is an option to overcome the high costs of this input, being manure of animal rejects the most used option. These, however, cannot be used in some vegetables consumed rawly, such as lettuce, due to possible contamination of pathogenic microorganisms. Lettuce is the most consumed leafy vegetable in Brazil and, in this case, extracts from marine seaweeds are a good option thanks to their biodegradable character and because they are atoxic to both environment and living beings. The present work aimed to obtain an aqueous extract with potential of being biostimulating and/or biofertilizer to plants from the red macro algae *Gracilaria birdiae*. For that, an aqueous extraction was performed and the biochemical composition as well as the yield of this extract, named EB-Gb, were determined. The effect of different concentrations of EB-Gb (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 g.L<sup>-1</sup>) on percentage, time, speed and synchronization index of germination of seeds were determined for iceberg and baby lettuce in two distinct temperature conditions (20 and 28 °C). The effect of different concentrations of EB-Gb on the development of iceberg lettuce sprouts in liquid medium in vitro was evaluated upon biomass of shoot and root, number of leaves, length of leaf and primary root. The results suggest biofertilizer and biostimulating potential of EB-Gb, once it has showed positive effects on germination synchronization on both crops used in the study, percentage of baby lettuce germination in stress conditions, growth of shoot and primary root, number of leaves and secondary roots and percentage of shoot dry biomass of these plants.

**Keywords:** Biofertilizer; biostimulating; red seaweed; horticulture.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relação entre quantidade de fertilizantes produzidos, importados e exportados pelo Brasil por ano .....	18
<b>Figura 2.</b> Funções dos hormônios vegetais no crescimento vegetativo (A) e no crescimento reprodutivo e na senescência (B) .....	22
<b>Figura 3.</b> Ciclo hormonal das plantas e seus nutrientes-chave em cada etapa do crescimento vegetal .....	22
<b>Figura 4.</b> Efeitos do uso de extratos de macroalgas no crescimento de plantas .....	26
<b>Figura 5.</b> Cultivo de macroalgas marinhas em sistema de maricultura por meio da técnica de long-line. Desenho esquemático de uma estrutura de cultivo long-line (A) e Maricultura de macroalga a 200 m da costa na praia de Flecheiras, município de Trairi/CE (latitude -3.2159133 e longitude -39.2629757), a uma profundidade média de 5 m (B) .....	29
<b>Figura 6.</b> Macroalga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> coletada na praia de Flecheiras, município de Trairi, Ceará .....	31
<b>Figura 7.</b> Ranking dos tipos de alface mais consumidos no Brasil com algumas das suas características morfológicas, sensoriais e nutricionais .....	32
<b>Figura 8.</b> Localização do banco natural de algas na praia de Flecheiras, município de Trairi/CE (latitude -3.2159133 e longitude -39.2629757) .....	35
<b>Figura 9.</b> Etapas da germinação de semente de alface americana <i>cv. Rafaela</i> .....	40
<b>Figura 10.</b> Ilustração do sistema de cultivo de plantas de alface em meio líquido <i>in vitro</i> ..	42
<b>Figura 11.</b> Desenvolvimento de mudas de alface americana em meio líquido <i>in vitro</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> Composição bioquímica e rendimento do extrato EB-Gb da macroalga marinha <i>G. birdiae</i> .....	45
<b>Figura 13.</b> Desenvolvimento de explantes foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> em meio MS contendo fitormônios e extrato de <i>G.birdiae</i> (EB-Gb) após quatro semanas .....	48
<b>Figura 14.</b> Germinação acumulada de sementes de alface crespa na presença de extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) .....	50
<b>Figura 15.</b> Crescimento médio, por semana, da parte aérea (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb). Valores não cumulativos .....	53

<b>Figura 16.</b> Comprimento médio da parte aérea (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) após 30 dias. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	55
<b>Figura 17.</b> Biomassas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) <i>in vitro</i> . Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	56
<b>Figura 18.</b> Tamanho médio da maior folha (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) <i>in vitro</i> . Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	58
<b>Figura 19.</b> Número médio de folhas em mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) <i>in vitro</i> . Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	58
<b>Figura 20.</b> Aspecto visual de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido sob o tratamento controle (A) e com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) a $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ (B) .....	59
<b>Figura 21.</b> Comprimento médio da raiz principal (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb). Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	60
<b>Figura 22.</b> Aspecto visual de raízes de mudas de alface americana cultivada <i>in vitro</i> em meio líquido (A) e suplementado com de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) a $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ (B) quatro semanas após a aplicação do extrato .....	61
<b>Figura 23.</b> Número médio de raízes laterais em mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb). Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de fertilizantes com base em sua natureza segundo a legislação brasileira .....	19
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal da macroalga marinha vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> úmida .....	30
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio nutritivo Murashige e Skoog (MS) utilizado em cultivo de plantas <i>in vitro</i> .....	38
<b>Tabela 4.</b> Concentração de minerais ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) no extrato liofilizado de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) .....	47
<b>Tabela 5.</b> Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em $\text{dia}^{-1}$ e índice de sincronização de germinação (ISG) de sementes de alface crespa cv. <i>Grand rapids</i> na presença de diferentes concentrações de extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) .....	50
<b>Tabela 6.</b> Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em $\text{dia}^{-1}$ e índice de sincronização de germinação (ISG) com sementes de alface americana e crespa em condições ótimas de temperatura (20 °C) .....	51
<b>Tabela 7.</b> Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em $\text{dia}^{-1}$ e índice de sincronização de germinação (ISG) com sementes de alface americana e crespa em condições de estresse por temperatura (28 °C) .....	52
<b>Tabela 8.</b> Resumo dos efeitos do extrato de <i>G. birdiae</i> (EB-Gb) sobre mudas de alface americana quando suplementado em meio de nutritivo líquido .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AJ	Ácido jasmônico
Albamar	Algas y Bioderivados Marinos, S.A. de C.V.
AMAR	Associação das Maricultoras de Rio do Fogo
ANA	Ácido naftalenoacético
APAFG	Associação de Produtores de Alga de Flecheiras e Guajiru
AX	Auxina
BAP	6-Benzilaminopurina
BR	Brassinosteróide
CK	Citocinina
CN	Controle negativo
CPA	Controle positivo da presença de auxina
CPC	Controle positivo da presença de citocinina
CPCA	Controle positivo da presença de citocinina e auxina
EB-Gb	Extrato bruto de <i>Gracilaria birdiae</i>
ET	Etileno
GA	Giberelina
iP	Isopenteniladenina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Murashige e Skoog
PIB	Produto Interno Bruto

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
%BS	Porcentagem de biomassa seca
%G	Germinabilidade
=	Igualdade
±	Mais ou menos
Σ	Somatório
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μ	Micro
E	Einstein
fi	Frequência relativa de germinação
g	Gramas
ISG	Índice de sincronização da germinação
L	Litro
m	Mili / Massa / Metro
M	Molar
N	Número total de sementes
Ng	Número total de sementes germinadas
ni	Número de sementes germinadas por dia
nm	Nanometro
P	Peso

p	Pico
ti	Tempo de incubação
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
TMG	Tempo médio de germinação
V	Volume
VMG	Velocidade média de germinação
xg	Força G

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1</b>	<b>Impacto econômico do agronegócio no Brasil</b> .....	18
<b>1.2</b>	<b>Fertilizantes, Biofertilizantes e Bioestimulantes de Plantas</b> .....	19
<b>1.3</b>	<b>Macroalgas marinhas como fontes de biofertilizantes e bioestimulantes de plantas</b> .....	24
1.3.1	<i>Macroalgas vermelhas</i> .....	27
1.3.1.1	<i>Gracilaria birdiae</i> .....	28
<b>1.4</b>	<b>Consumo e cultivo de alface no Brasil</b> .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	34
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>3.1</b>	<b>Macroalga marinha</b> .....	35
<b>3.2</b>	<b>Obtenção do extrato aquoso de <i>Gracilaria birdiae</i> (EB-Gb)</b> .....	35
<b>3.3</b>	<b>Caracterização bioquímica do EB-Gb</b> .....	36
3.3.1	<i>Proteínas solúveis</i> .....	36
3.3.2	<i>Carboidratos</i> .....	36
3.3.3	<i>Umidade</i> .....	36
3.3.4	<i>Lipídios</i> .....	36
3.3.5	<i>Resíduos minerais</i> .....	37
<b>3.4</b>	<b>Teste qualitativo da presença de auxina e citocinina</b> .....	39
<b>3.5</b>	<b>Obtenção e desinfestação superficial das sementes de alface</b> .....	39
<b>3.6</b>	<b>Efeito do EB-Gb na germinação de sementes de alface</b> .....	40
3.6.1	<i>Germinabilidade</i> .....	40
3.6.2	<i>Tempo médio de germinação</i> .....	41
3.6.3	<i>Velocidade média de germinação</i> .....	41
3.6.4	<i>Índice de sincronização da germinação</i> .....	41
<b>3.7</b>	<b>Obtenção de mudas <i>in vitro</i> de alface americana</b> .....	42
<b>3.8</b>	<b>Efeito de EB-Gb no desenvolvimento de mudas de alface americana</b> .....	43
<b>3.9</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45

<b>4.1</b>	<b>Caracterização bioquímica e rendimento do EB-Gb .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Teste qualitativo da presença de auxinas e citocininas no EB-Gb .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Efeito do EB-Gb na germinação de sementes de alface .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito do EB-Gb no desenvolvimento de mudas de alface americana .....</b>	<b>53</b>
<i>4.4.1</i>	<i>Parte aérea .....</i>	<i>53</i>
<i>4.4.2</i>	<i>Folhas .....</i>	<i>57</i>
<i>4.4.3</i>	<i>Raízes .....</i>	<i>59</i>
<i>4.4.4</i>	<i>Considerações finais .....</i>	<i>62</i>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

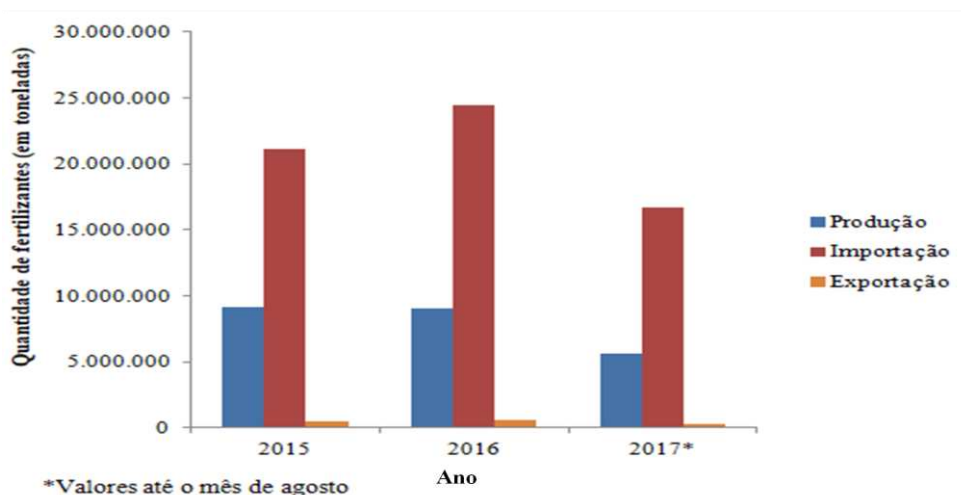
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Impacto econômico do agronegócio no Brasil

O agronegócio, que engloba agropecuária, insumos, agroindústria e serviços relacionados a essa cadeia, é o setor que atualmente representa cerca de 23% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (AGRONEGÓCIO, 2017). Levando-se em conta somente o PIB agropecuário, esse é o que tem menor peso na economia, representando apenas 5,85% do PIB nacional, entretanto ele foi o setor responsável pelo avanço do PIB no primeiro trimestre de 2017 em relação ao trimestre anterior, graças a uma alta de 13,4%, em comparação ao avanço de 1% da indústria e um crescimento nulo no setor de serviços (IBGE, 2017).

Para o país alcançar suas elevadas safras anuais são utilizadas grandes quantidades de fertilizantes, substâncias que fornecem macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento de vegetais, para nutrir uma variedade de culturas (mais de 34 milhões de toneladas em 2016), estando na quarta posição entre os países que mais consomem esse tipo de insumo (IPNI, 2017). Entretanto, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 70% desses fertilizantes têm origem estrangeira, o que influencia diretamente no custo da lavoura e obriga os fazendeiros a incluir a cotação do dólar na conta da produção da safra (BERALDO; FIGUEIREDO, 2016). Assim sendo, se os custos de produção são maiores, isso irá refletir também no preço final dos produtos agrícolas, afetando diretamente o consumidor.

**Figura 1.** Relação entre quantidade de fertilizantes produzidos, importados e exportados pelo Brasil por ano.



Fonte: ANDA (2017).

A Figura 1 mostra a comparação da produção, importação e exportação de fertilizantes no Brasil nos anos de 2015 a 2017 (ANDA, 2017), onde é possível notar uma grande diferença, principalmente entre esses dois últimos parâmetros. Essa superioridade do número de importações sobre o de exportações afeta negativamente a balança comercial, que é um dos fatores que influenciam o crescimento econômico do Brasil, visto que quanto maior o número de importações, mais dinheiro sai do país e menor será o PIB.

## 1.2. Fertilizantes, Biofertilizantes e Bioestimulantes de Plantas

Inicialmente, fertilizantes são definidos pela legislação brasileira como substâncias orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas, que fornecem nutrientes essenciais para o desenvolvimento de vegetais, tendo como função repor os elementos retirados do solo em cada colheita, com a finalidade de manter ou ampliar o seu potencial (BRASIL, 2004). Como as principais deficiências das terras cultiváveis são nitrogênio, fósforo e potássio, os fertilizantes amplamente produzidos e comercializados são, geralmente, produtos compostos pela mistura desses três nutrientes (RODRIGUES *et al.*, 2015). Em geral, esses produtos são classificados em minerais, orgânicos ou organomineral, segundo sua natureza. Na Tabela 1 são apresentadas as subdivisões de cada uma dessas classes.

**Tabela 1.** Classificação de fertilizantes com base em sua natureza segundo a legislação brasileira.

Classificação	Subclasse	Definição
Mineral	Simple	Produto formado, fundamentalmente, por um composto químico, contendo um ou mais nutrientes de plantas.
	Complexo	Produto formado de dois ou mais compostos químicos, resultante da reação química de seus componentes, contendo dois ou mais nutrientes.
	Misto	Produto resultante da mistura física de dois ou mais fertilizantes minerais.
Orgânico	Simple	Produto natural de origem vegetal ou animal, contendo um ou mais nutrientes de plantas.
	Complexo	Produto obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matéria-prima de origem industrial, urbana ou rural, animal ou vegetal, isoladas ou misturadas, podendo ser enriquecido de nutrientes minerais, princípio ativo ou agente capaz de melhorar suas características físicas, químicas ou biológicas.

Misto		Produto de natureza orgânica, resultante da mistura de dois ou mais fertilizantes orgânicos simples, contendo um ou mais nutrientes de plantas.
Organomineral	-	Produto resultante da mistura física ou combinação de fertilizantes minerais e orgânicos.

**Fonte:** BRASIL (2004).

Ao longo do tempo, o uso de fertilizantes minerais (ou químicos) em larga escala resultou numa redução da qualidade dos solos agrícolas, bem como na degradação ambiental através da eutrofização e da poluição por metais pesados (ZHU *et al.*, 2012). Parte do impacto ambiental se deve ao fato das plantas cultivadas, tipicamente, utilizarem menos da metade dos fertilizantes aplicados e o restante, muitas vezes, ser lixiviado para os lençóis subterrâneos de água, fixando-se ao solo ou contribuindo para a poluição do ar (MARSCHNER, 1995). Os fertilizantes nitrogenados estão entre os mais utilizados e são os que causam maior impacto ambiental. Sua produção é responsável por 94% do consumo de energia de toda produção de fertilizantes e o processo mais utilizado, denominado Haber-Bosch, foi desenvolvido há mais de cem anos e consiste em extrair o N<sub>2</sub> da atmosfera, que não é assimilável pelas plantas, e transformá-lo em uma molécula assimilável (amônia), baseando-se na reação  $N_2 + 3H_2 \leftrightarrow 2NH_3$  (KYRIAKOU *et al.*, 2017). Para realizar esse processo são empregados catalisadores à base de ferro na faixa de temperatura de 400-500 °C e a pressões de 130-170 bar e como fonte energética são utilizados dois combustíveis fósseis (gás natural e carvão mineral), cuja queima emite dióxido de carbono, CO<sub>2</sub> (GARAGOUNIS *et al.*, 2014).

O uso desses fertilizantes provoca danos ainda maiores ao meio ambiente que sua produção, pois causa um desequilíbrio no ciclo do nitrogênio ao entrarem em contato com o solo. O aumento da quantidade de NH<sub>4</sub> disponível no solo aumenta também a taxa de desnitrificação realizada por bactérias, principalmente *Pseudomonas*, as quais utilizam carbono orgânico como fonte redutora e, em condições anaeróbias, utilizam os óxidos de nitrogênio como aceptores de elétrons, resultando na produção de N<sub>2</sub> (que fecha o ciclo do nitrogênio), NO e N<sub>2</sub>O (DAVIDSON *et al.* 1991). O óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) é um gás de efeito estufa, porém com potencial 300 vezes superior ao CO<sub>2</sub> (ECYCLE, 2015).

Atualmente, visando tornar a agricultura uma prática mais sustentável e ao mesmo tempo manter sua produtividade, sistemas alternativos para a aplicação de nutrientes no solo vêm sendo pesquisados como forma de substituir ou diminuir o uso dos fertilizantes químicos

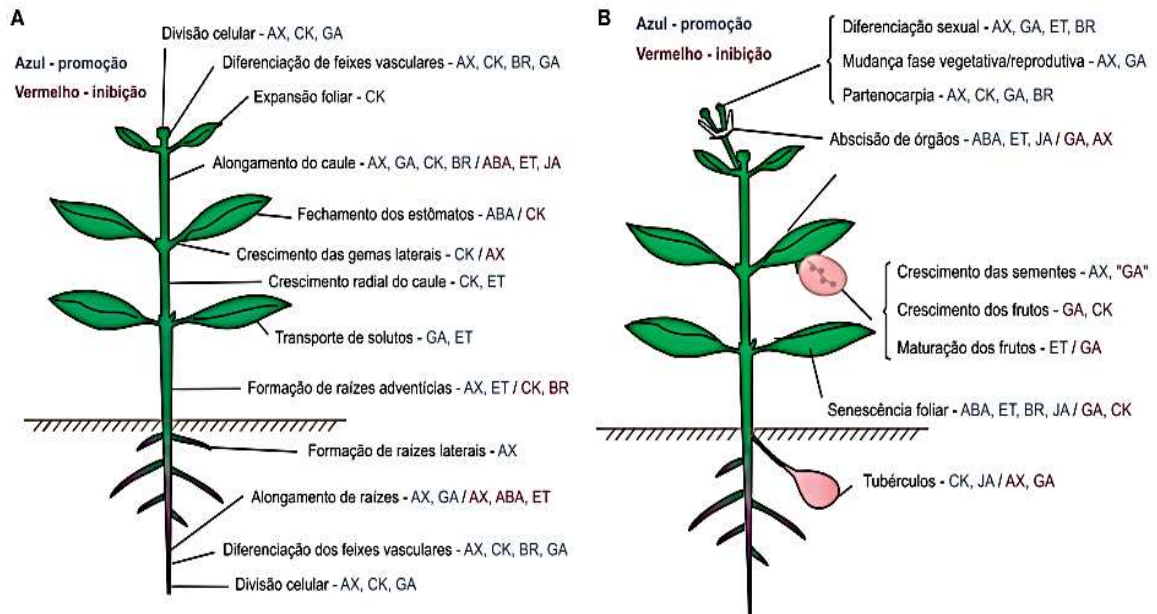
convencionais, como é o caso dos biofertilizantes. Segundo a legislação brasileira, biofertilizantes são produtos que contêm princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante (BRASIL, 2004). Tal definição não é dada de forma global, pois em outros países biofertilizantes podem ser entendidos também como sendo produtos que contêm microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas (BHARDWAJ *et al.*, 2014), o que no Brasil recebe a classificação de produto inoculante. Os principais constituintes dos biofertilizantes, assim como dos fertilizantes minerais, são os macro e micronutrientes, compostos essenciais para o desenvolvimento das plantas. A importância de cada um deles é destacada no Anexo A.

Os biofertilizantes são uma alternativa aos fertilizantes químicos e seu emprego tem aumentado muito, devido ao seu baixo custo, à sua variada composição e especialmente à sua boa concentração de nutrientes (SOUZA; RESENDE, 2003). Outros produtos que estão sendo bastante utilizados são os chamados bioestimulantes, definidos como substâncias naturais oriundas da mistura de dois ou mais biorreguladores vegetais (fitormônios) ou destes com outras substâncias (aminoácidos, nutrientes e vitaminas), que podem ser aplicados diretamente nas plantas ou no tratamento de sementes (KLAHOLD *et al.*, 2006). Muitos desses produtos aumentam a absorção de água e de nutrientes pelas plantas, bem como sua resistência aos estresses hídricos e aos efeitos residuais de herbicidas no solo, além de promoverem o desenvolvimento do sistema radicular (CASTRO; VIEIRA, 2001; VASCONCELOS, 2006). A atuação desses fitormônios é ilustrada na Figura 2, mas deve-se deixar claro que raramente esses hormônios vegetais agem sozinhos, mesmo quando uma resposta no vegetal é atribuída à aplicação de um único regulador vegetal, pois o tecido que recebeu a aplicação contém hormônios endógenos que contribuem para as respostas obtidas (IPNI, 2008).

Para que haja resposta, promoção, inibição ou alteração metabólica do vegetal a um determinado hormônio, este deve estar em quantidade suficiente nas células adequadas, ser reconhecido e capturado por receptores específicos localizados na membrana plasmática de células vegetais e ter seus efeitos amplificados por mensageiros secundários, geralmente um mineral (IPNI, 2006), como mostrado na Figura 3. Por isso, é importante sempre manter na planta, primeiro, o equilíbrio nutricional e depois o hormonal. Sabendo-se disso, vê-se que um

bom modo de potencializar resultados nas plantas é aliar um biofertilizante (fornecedor de nutrientes) com um bioestimulante (fornecedor de fitormônios) em quantidades adequadas.

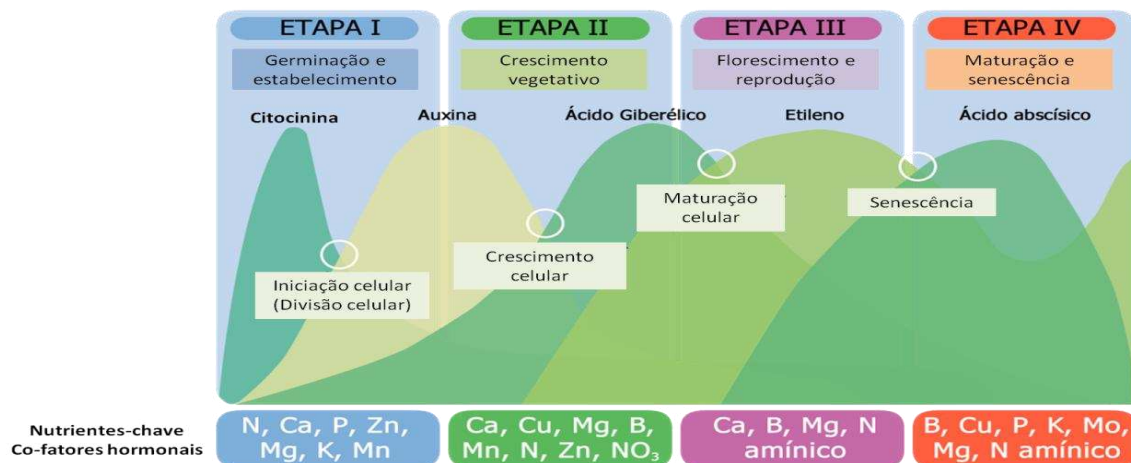
**Figura 2.** Funções dos hormônios vegetais no crescimento vegetativo (A) e no crescimento reprodutivo e na senescência (B).



**Legenda:** AX – auxina; CK – citocinina; GA – giberelina; BR – brassinosteróide; ABA - ácido abscísico; ET – etileno; JA – ácido jasmônico.

**Fonte:** IPNI (2006).

**Figura 3.** Ciclo hormonal das plantas e seus nutrientes-chave em cada etapa do crescimento vegetal.



**Fonte:** Adaptado de fisiologiavegetal.es (2013).

Os testes das respostas das plantas a esses produtos normalmente é feita *in situ*, porém há uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada para a avaliação desses efeitos é a cultura de tecidos vegetais, que permite que esses testes sejam realizados em qualquer época do ano. Nessa técnica são utilizadas condições assépticas e as plantas permanecem em soluções nutritivas que permitem que elas se desenvolvam *in vitro* quando condicionadas em salas com controle de temperatura, luminosidade e fotoperíodo. Tal ferramenta permite não apenas a obtenção de plantas através da germinação de sementes, mas também através de qualquer segmento de tecido ou órgão vegetal (como segmentos foliares, segmentos nodais, raízes, ápices caulinares, entre outros) via organogênese ou embriogênese somática, baseando-se na capacidade das células vegetais expressarem sua totipotência e se organizarem em tecidos ou em plantas completas (KERBAUY, 1997; TORRES *et al.*, 2000). Para o teste dos efeitos de fertilizantes ou estimulantes em determinada planta, esses produtos podem ser suplementados nos meios nutritivos da mesma.

Os meios nutritivos para cultura de tecidos consistem numa mistura de macro e micronutrientes (fornecidos na forma de sais), vitaminas, fontes orgânicas de nitrogênio e carboidratos, podendo ser adicionadas de reguladores de crescimento e/ou agente gelificante, normalmente o ágar (QUISEN; ANGELO, 2008). Para George e Sherrington (1984), no desenvolvimento *in vitro* de muitas espécies, a fotossíntese realizada é baixa, fazendo com que as culturas sejam dependentes do suporte externo de carboidratos, daí a importância da adição de uma fonte de carbono ao meio, geralmente sacarose.

Dentre os fertilizantes naturais, alguns dos mais utilizados, principalmente em culturas familiares, advêm de dejetos animais. Ressalta-se, entretanto, que no Brasil não é permitido o uso desse tipo de adubo no cultivo de hortaliças que são consumidas cruas, isso porque durante o tratamento podem ter ocorrido falhas e estes biofertilizantes ainda poderão conter microrganismos patogênicos capazes de contaminar os alimentos (AMARAL *et al.*, 2004), necessitando-se assim de outras alternativas para esse tipo de cultura, como por exemplo as algas marinhas ou produtos advindos delas, como seus extratos brutos, que têm mostrado efeitos favoráveis sobre culturas no campo (MATYSIAK; KACZMAREK; KRAWCZYK, 2011) e que, por serem ambientalmente benignos e seguros para a saúde, são considerados uma produção agrícola orgânica (KHAN *et al.*, 2009).

### 1.3. Macroalgas marinhas como fontes de biofertilizantes e bioestimulantes de plantas

As macroalgas são organismos multicelulares fotossintéticos avasculares que contam com uma grande diversidade de compostos de interesse comercial em sua constituição, o que faz delas uma excelente fonte de produtos naturais (VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). A água representa cerca de 90% do peso úmido desses organismos, sendo os 10% restantes compostos de carboidratos, proteínas e compostos nitrogenados de baixo peso molecular, minerais, vitaminas, compostos voláteis, pigmentos e lipídios, estes últimos em pequenas quantidades (ITO; HORI, 1989). Além de sua rica composição, essas macroalgas geralmente crescem rapidamente e produzem altos rendimentos de biomassa, atributos que tornam sua exploração comercial atrativa para diversos fins (STADNIK; PAULERT, 2008). Existem milhares de espécies de macroalgas que são classificadas como vermelhas (Rhodophyta), verdes (Chlorophyta) ou pardas (Ochrophyta). Os dois primeiros filos pertencem ao reino Plantae e o último ao reino Chromista (BONNANO; ORLANDO-BONACA, 2017). Esses organismos vêm sendo explorados há bastante tempo como fonte de polissacarídeos e outros produtos bioativos naturais, como ácidos graxos, proteínas, vitaminas e elementos minerais, compostos que possuem aplicações potenciais na medicina, indústria, alimentação e agricultura (PÉREZ, 1997). As algas vermelhas, encontradas na costa do Nordeste brasileiro, são matérias-primas importantes em indústrias de doces e cervejeiras, como a Ambev, que utiliza a carragenana, ficocolóide de macroalgas carragenófitas, no processo de clarificação de suas cervejas. Além disso, a Associação das Maricultoras de Rio do Fogo (AMAR) e a Associação de Produtores de Alga de Flecheiras e Guajiru (APAFG) vêm produzindo cosméticos, como shampoos e sabonetes líquidos, a partir da biomassa de *Gracilaria birdiae*. Essas associações encontram-se no Rio Grande do Norte e no Ceará, respectivamente (FÁBIO, 2013).

Há centenas de anos, as macroalgas já eram utilizadas na agricultura em sua forma bruta através de sua aplicação direta como adubos e como agentes condicionadores do solo (HONG *et al.*, 2007). Os benefícios dessa aplicação se dão tanto por conta do fornecimento de nutrientes essenciais providos da degradação da matéria orgânica, quanto pela melhoria da textura do solo e da capacidade de retenção de água pelo mesmo (JANNIN *et al.*, 2013). A busca por métodos que facilitassem o transporte desse material por longas distâncias resultou no desenvolvimento de uma metodologia descrita há cerca de 160 anos por Gardissal (1857), que consiste na compressão dessas macroalgas. Mais recentemente, surgiu uma nova metodologia que se baseia na obtenção de extratos aquosos de macroalgas marinhas. Esse

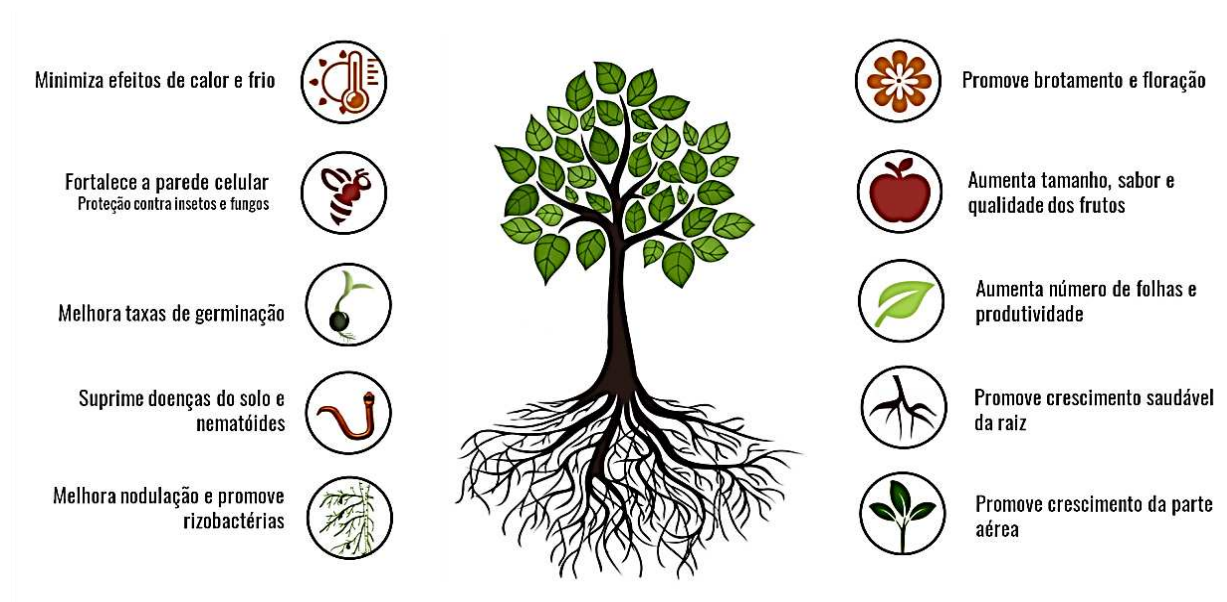
último método além de facilitar o transporte do produto também facilita a sua aplicação no solo, no tratamento de sementes, na imersão de raízes e nas folhas via aspersão. No contexto de uma biorrefinaria, a extração aquosa dos componentes das macroalgas frescas gera um extrato bruto que, ao ser submetido a um processo de *salting out*, resulta na precipitação de pigmentos e na obtenção de um líquido fertilizante, contendo macro e micronutrientes (BAGHEL *et al.*, 2015). Além da extração aquosa, outros métodos são descritos na literatura para a obtenção de extratos de macroalgas, como a extração alcalina (MILTON, 1952) e a moagem a baixas temperaturas (HERVÉ; ROULLIER, 1977).

A composição dos extratos de macroalgas marinhas é bastante complexa e, em função da espécie da macroalga, da época de coleta e do método de extração, os tipos de compostos e suas quantidades podem ser alterados (CARVALHO; CASTRO, 2014). As macroalgas em si, por possuírem diferentes estágios de desenvolvimento em seu ciclo de vida, podem ter uma variabilidade em sua composição química, o que pode refletir na consistência e no desempenho do seu extrato (RAYORATH *et al.*, 2008). Diferentemente dos fertilizantes químicos, extratos derivados de macroalgas são biodegradáveis, não-tóxicos, não-poluentes e não-nocivos para os seres humanos e animais (RATHORE *et al.*, 2009) e, como sua composição contém não apenas nutrientes, mas também fitormônios, eles são considerados tanto fertilizantes naturais como bioestimulantes (KHAN *et al.*, 2009). Esse potencial vem sendo estudado em uma grande diversidade de macroalgas, principalmente nas pardas (Ochrophyta), em especial na espécie *Ascophyllum nodosum* L., que se destaca em quantidade de estudos e de produtos já comercializados (CHATTERJEE *et al.*, 2017).

Deve-se atentar, entretanto, que alguns dos produtos que estão no mercado não são extratos puros de macroalgas marinhas. O fertilizante BioGain Algamino®, por exemplo, é um fertilizante organomineral à base de extrato de macroalgas marinhas, ou seja, ele é uma mistura de um componente orgânico com componentes minerais, não sendo considerado um biofertilizante. Plenno® é um fertilizante mineral que contém cálcio associado com extrato de macroalgas marinhas *Ascophyllum nodosum* e aminoácidos. Há produtos também compostos não apenas pelo extrato de uma única macroalga, mas por uma mistura deles, como é o caso do fertilizante AlgaminoPlant®, que é composto pela mistura de extratos de algumas espécies de macroalgas marinhas do gênero *Sargassum*, *Laminaria*, *Ascophyllum* e *Fucus* (CARVALHO; CASTRO, 2006).

Na literatura foram encontrados relatos de diversos efeitos dos extratos de macroalgas marinhas em plantas (Figura 4), como aumento da porcentagem de germinação de sementes (RAYORATH *et al.*, 2008; KAVIPRIYA *et al.*, 2011), aumento da velocidade de emergência de plântulas (CARVALHO *et al.*, 2013), aumento do número de folhas, massa fresca e massa seca da parte aérea (PINTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; CECATO; MOREIRA, 2013), aumento do crescimento da raiz principal e número de raízes laterais (KAVIPRIYA *et al.*, 2011), aumento da produtividade (SUNARPI *et al.*, 2010; FERNANDES; SILVA, 2011), melhoria da qualidade de frutos e hortaliças (KOO; MAYO, 1994; PINTO *et al.*, 2005; LOLA-LUZ; HENNEQUART; GAFFNEY, 2013), resistência a estresses abióticos (ERVIN; ZHANG; FIKE, 2004; ZHANG; ERVIN, 2004; SPANN; LITTLE, 2011; AZIZ; MAHGOUB; SIAM, 2011) e resistência a estresses bióticos (MANILAL *et al.*, 2009; ALI; RAVIKUMAR; BEULA, 2013).

**Figura 4.** Efeitos do uso de extratos de macroalgas no crescimento de plantas.



**Fonte:** Adaptado de Arioli, Mattner e Winberg (2015).

Os efeitos benéficos da aplicação dos extratos de macroalgas marinhas são resultados de muitos componentes que podem funcionar sinergicamente em concentrações diferentes, porém seu modo de ação ainda permanece desconhecido (PAULERT *et al.*, 2010). Estudos genômicos aliados a ferramentas de bioinformática, entretanto, já revelaram centenas de genes vegetais que respondem aos tratamentos com extratos de macroalgas marinhas (NAIR *et al.*,

2012; JANNIN *et al.*, 2013). No entanto, as respostas das plantas podem variar de acordo com o método, as dosagens e a frequência de aplicação. Essas respostas também podem variar dependendo da espécie e da cultivar da planta selecionada, estação do ano e localização geográfica do cultivo, dentre outros fatores (CARVALHO; CASTRO, 2014). Além das macroalgas pardas, outras espécies que vêm sendo cada vez mais exploradas são as pertencentes ao filo Rhodophyta, as macroalgas vermelhas (CHATTERJEE *et al.*, 2017).

### 1.3.1. Macroalgas vermelhas

O filo Rhodophyta inclui 700 gêneros e entre 4.000 a 6.000 espécies de macroalgas vermelhas, majoritariamente bentônicas. Essas macroalgas são encontradas em maior abundância em águas tropicais quentes, mas também podem ser observadas nas regiões mais frias do planeta, e quase todas são marinhas, sendo apenas 20 gêneros de água doce. Elas possuem pigmentos acessórios azuis e vermelhos, sendo estes últimos dominantes, mascarando a cor da clorofila *a*. Existem cinco classes de macroalgas vermelhas: Cyanidiphyceae, Compsopogonophyceae, Rhodellophyceae, Bangiophyceae e Florideophyceae, sendo essa última a que agrupa a grande maioria das Rhodophyta (RAVEN; EVERT; EICHONNORN, 1996; FRANCESCHINI *et al.*, 2010). O homem vem se utilizando desse tipo de macroalga há pelo menos 2.800 anos, principalmente por se tratarem de uma fonte de ficocolóides que produzem géis termorreversíveis, como o ágar (presentes em gêneros como *Gelidium* e *Gracilaria*) e a carragenana (presentes nos gêneros *Solieria*, *Hypnea* e *Kappaphycus*, por exemplo), compostos com inúmeras aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica (KINCH; BAGITA; BATE, 2003; ZIA; ZUBER; ALI; 2017).

O potencial biofertilizante e bioestimulante dos extratos de Rhodophyta tem sido foco de vários estudos laboratoriais. No mercado, a companhia mexicana Algas y Bioderivados Marinos, S.A. de C.V. (Albamar) já disponibiliza o produto AgroKelp® à base da macroalga vermelha *Macrocystis pyrifera*, biofertilizante indicado para o cultivo de hortaliças (KHAN *et al.*, 2009). Há ainda produtos como Acid Buf®, à base da macroalga vermelha calcária *Lithothamnium calcareum*, e Emerald-RMA® feito à base de macroalgas vermelhas, com espécies não especificadas pelo produtor (CARVALHO; CASTRO, 2006). Selvam e Sivakumar (2014) mostraram os efeitos do extrato de *Hypnea musciformis* no melhoramento dos parâmetros de crescimento, constituições bioquímicas e de pigmentos em plantas de

amendoim. Extratos da mesma espécie também promoveram o aumento da germinação de sementes, de parâmetros de crescimento e rendimento, quantidade de pigmentos, número de ramos, de nódulos radiculares e de constituintes bioquímicos em feijão-preto (SELVAM; SIVAKUMAR, 2016) e o aumento da germinação de sementes, comprimento da parte aérea, número de folhas, flores e frutos em berinjela (REVATHI; ALEXANDER, 2011). A aplicação de extrato de *Hypnea valentine* em cultura de feno-grego apresentou influência sobre esses mesmos parâmetros (MANTRI; CHAUGULE, 2008).

Extratos de *Solieria robusta*, além de serem apontados como fertilizante por influenciarem no crescimento da parte aérea e da raiz e no número de flores em plantas de soja (SULTANA *et al.*, 2011) e no crescimento de plantas de pimentão (SULTANA; ARA; EHTESHAMUL-HAQUE, 2008), também mostraram seu potencial na aplicação de outra vertente importante na agricultura: o controle de pragas. Sultana *et al.* (2011) comprovaram o efeito supressor sobre os fungos *Fusarium solani* (principal fungo envolvido na podridão de raízes), *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* e sobre o nematóide do nó da raiz (*Meloidogyne javanica*).

Há ainda relatos de atividades fertilizantes e estimulantes de macroalgas vermelhas do gênero *Kappaphycus*, principalmente da espécie *K. alvarezzi*, em culturas de arroz (DENI, MANI, 2015; SINGH *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2017), batata, feijão (ZODAPE *et al.*, 2010; PRAMANICK *et al.*, 2014; RAVERKAR *et al.*, 2016; PRAMANICK *et al.*, 2017), quiabo (ZODAPE *et al.*, 2008), trigo (SHAH *et al.*, 2013) e milho (SINGH *et al.*, 2016). Extratos de macroalgas do gênero *Gracilaria* (como a *G. corticata* e a *G. edulis*) também têm sido alvos de estudos sobre seu potencial fertilizante, mostrando efeitos positivos em culturas de arroz (SINGH *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2017), batata, feijão (CHITRA; SREEJA, 2013; PRAMANICK *et al.*, 2014; PRAMANICK *et al.*, 2017), quiabo, tomate (ARUN *et al.*, 2014) e trigo (SHAH *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2016).

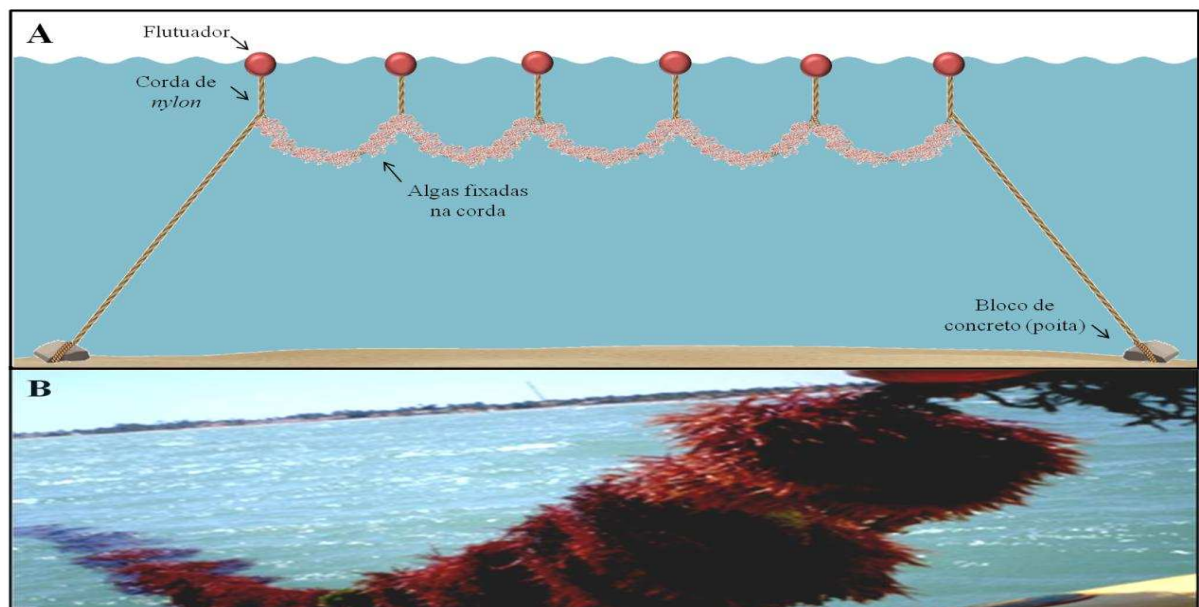
#### 1.3.1.1. *Gracilaria birdiae*

A macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* é uma espécie agarófita que se distribui naturalmente ao longo da costa do Ceará até o Espírito Santo (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002) e que já vem sendo cultivada por meio da técnica de maricultura, denominada *long-line* (Figura 5) nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Esse modelo é

constituído por uma corda principal onde são penduradas ou não cordas secundárias e, para a sua instalação em mar, as extremidades são fixadas através de blocos de concreto (poitas) para evitar ou minimizar danos durante o cultivo (CARVALHO FILHO, 2004). Trata-se de uma das agarófitas mais exploradas economicamente no Brasil, principalmente na região Nordeste, para a extração de seu ficocoloide, o ágar (PLASTINO; URSI; FUJII, 2004).

De acordo com Oliveira (1997), as condições ideais de crescimento da maioria das espécies de macroalgas brasileiras estão numa faixa de temperatura entre 22 e 28 °C e de salinidade entre 28 e 36 ‰, embora algumas espécies tolerem variações mais amplas. Além disso, as algas do gênero *Gracilaria* necessitam de iluminação solar abundante para o seu desenvolvimento. Assim sendo, o Nordeste brasileiro mostra-se um produtor em potencial dessa biomassa, visto que além de condições ambientais favoráveis e espaço disponível para o cultivo, nele verifica-se ainda uma grande disponibilidade de mão-de-obra barata (CARVALHO FILHO, 2004). Um exemplo desse potencial é apresentado por Alves (2016), que com a realização de cultivos de *G. birdiae* em sistemas *long-line* na praia de Flecheiras, município de Trairi-CE, obteve uma taxa de crescimento diário de 5% ao dia para essa macroalga com um ciclo de cultivo de 45 dias.

**Figura 5.** Cultivo de macroalgas marinhas em sistema de maricultura por meio da técnica de *long-line*. Desenho esquemático de uma estrutura de cultivo *long-line* (A) e Maricultura de macroalga a 200 m da costa na praia de Flecheiras, município de Trairi/CE (latitude -3.2159133 e longitude -39.2629757), a uma profundidade média de 5 m (B).



**Fonte:** Elaborado pelo autor (A). Ticiania de Brito Lima (B).

Em sua composição bioquímica (Tabela 2) pode-se observar um elevado conteúdo de compostos inorgânicos (elementos traço, macro e micronutrientes), fibras, carboidratos e proteínas, em contraste com um baixo teor de lipídeos (GOMES *et al.*, 2015). Além disso, Yokoya *et al.* (2010) quantificaram três classes de fitormônios em *G. birdiae*: citocininas ( $229,623 \text{ pmol.g}^{-1}$ ), auxinas ( $924,7 \text{ pmol.g}^{-1}$ ) e ácido abscísico ( $44,44 \text{ pmol.g}^{-1}$ ), sendo essas quantidades relativas ao peso seco da macroalga.

**Tabela 2.** Composição centesimal da macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* úmida.

Componente	Porcentagem (%)
Umidade	$88,83 \pm 0,54$
Cinzas	$4,568 \pm 0,429$
Proteínas	$1,119 \pm 0,030$
Lipídeos	$0,135 \pm 0,004$
Fibras	$3,513 \pm 0,089$
Carboidratos	$1,837 \pm 0,577$

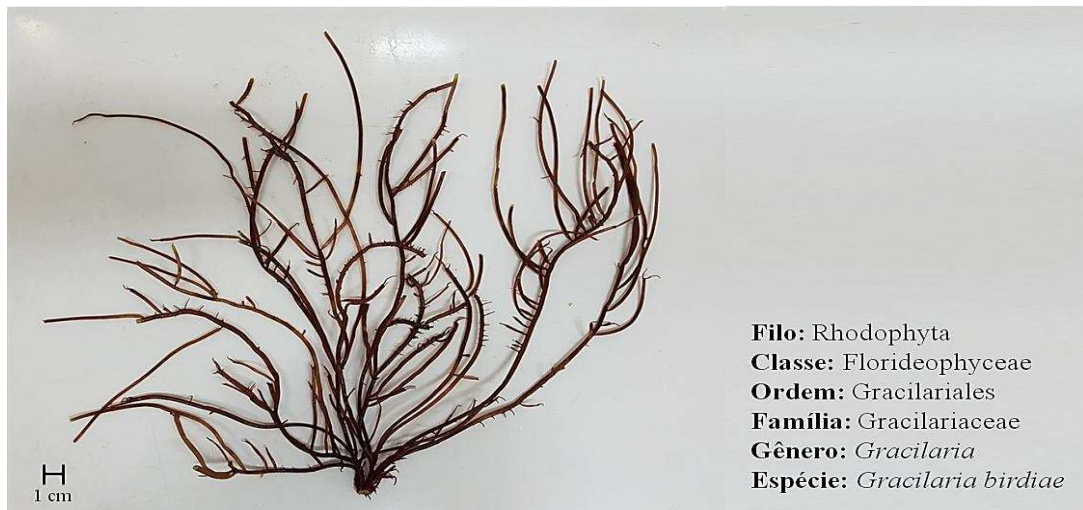
**Fonte:** Gomes *et al.* (2015).

Quanto às propriedades biológicas das biomoléculas de *G. birdiae*, foram descritas atividades: antioxidante (SILVA, 2009; SOUZA *et al.*, 2012; GUARATINI *et al.*, 2012), anticoagulante, inibitória de células de adenocarcinoma de colo de útero e de carcinoma de pâncreas humano (OLIVEIRA, 2014) e protetora contra danos gastrointestinais (SILVA *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2014). Ela também é apontada como uma boa fonte proteica para frangos de corte, por melhorarem a carcaça e o desempenho zootécnico dos mesmos (VASCONCELOS; ARRUDA, 2014) e seu extrato aquoso mostrou atividade contra os fungos *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (SILVA, 2009). Não há, até o momento, nenhum registro do uso de seu extrato aquoso como biofertilizante ou bioestimulante em culturas agrícolas, apesar de sua boa composição nutricional e hormonal já caracterizada.

Visto a abundância dessa espécie no litoral brasileiro, seu potencial de cultivo no mar do Nordeste brasileiro, sua caracterização bioquímica e os estudos dos efeitos de extratos de outras espécies desse gênero, como a *G. corticata* (CHITRA; SREEJA, 2013) e a *G. edulis* (SHAH *et al.*, 2013; ARUN *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2017) como fertilizantes e estimulantes de plantas, a *G. birdiae* (Figura 6) foi considerada um bom material para estudo e uma promissora biomassa para a produção de um

fertilizante de origem nacional e *eco-friendly*. Um produto com tal característica tem a vantagem de não oferecer riscos à saúde humana ao ser aplicado em espécies agrícolas comestíveis, incluindo hortaliças que são consumidas cruas, como é o caso da alface, principal hortaliça folhosa comercializada e consumida pela população brasileira (UDSEN, 2016).

**Figura 6.** Macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* coletada na praia de Flecheiras, município de Trairí, Ceará.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

#### 1.4. Consumo e cultivo de alface no Brasil

A alface (*Lactuca sativa*) é uma planta pertencente à família Asteraceae cultivada e consumida em todo o território brasileiro, além de ser comumente cultivada em hortas domésticas (COSTA; SALA, 2005). Sua classificação se dá com base em sua morfologia e, no Brasil, são cultivados cinco diferentes tipos de alface: lisa, americana, crespa, crespa roxa e romana (HENZ; SUINAGA, 2009). Na Figura 7 são apresentadas algumas características de cada um desses tipos de alface.

A alface lisa era o grande foco da alfacultura do Brasil até o final dos anos 90, quando foi adotada a alface crespa tanto pelo mercado do alficultor como pelo consumidor e essa vem liderando o mercado nacional nos últimos dez anos. Além disso, devido à demanda de mercado pela alface do tipo americana graças ao aumento do número de redes *fast foods*, somada à demanda e preferência do consumidor da classe média alta que já

conhecia esse produto através de viagens ao exterior, o consumo dessa alface passou de 9% em 1995, para mais de 34% em 2010 e ocupa atualmente o segundo lugar entre os tipos mais consumidos dessa hortaliça no país. Observa-se ainda uma tendência positiva para o segmento de alfaces crocantes, pois essas têm demonstrado ser uma grande revolução para o setor por esse visar dar sustentabilidade ao cultivo de alface no período de verão, uma vez que as plantas desse segmento apresentam uma maior resistência ao calor se comparadas às demais (SALA; COSTA, 2012).

**Figura 7.** Ranking dos tipos de alface mais consumidos no Brasil com algumas das suas características morfológicas, sensoriais e nutricionais.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A alface além de ser cultivada em solo também é uma das espécies mais cultivadas em sistemas hidropônicos. Esses sistemas protegidos além de possibilitarem o cultivo da espécie em todas as épocas do ano (OTTO *et al.*, 2001) também possibilitam ciclos de produção mais curtos (45-60 dias) e geram produtos de fácil aceitação no mercado (LOPES *et al.*, 2003). Apesar de agradar ao consumidor, Luz *et al.* (2006) apontam que muitos agricultores tradicionais sentem insegurança em mudar do sistema de produção convencional para o hidropônico. Esses sistemas consistem basicamente na substituição do solo por uma solução aquosa que contém todos os nutrientes indispensáveis aos vegetais (FURLANI *et al.*, 1999), instalados preferencialmente em ambientes sob proteção contra insetos, como estufas.

Cada vez mais se vem aumentando a preferência do consumidor por produtos agrícolas desenvolvidos em culturas orgânicas, ou seja, sem a influência de produtos químicos

que possam prejudicar a saúde humana e o meio ambiente. Para aumentar o desempenho de plantas nesse tipo de cultivo só podem ser utilizados, portanto, biofertilizantes ou bioestimulantes, e não a versão sintética desses produtos. Considerando-se, então, a relevância da busca por novos insumos para agricultura orgânica, assim como a importância econômica da alface no Brasil e também suas particularidades quanto ao impedimento do uso de determinados fertilizantes orgânicos em seu cultivo, essa espécie mostra-se bastante interessante para a realização de testes de insumos biofertilizantes ou bioestimulantes, como extratos de macroalgas marinhas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou a obtenção de um extrato aquoso a partir da macroalga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* com potencial bioestimulante e/ou biofertilizante no cultivo de alface.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Obter o extrato aquoso da macroalga marinha *Gracilaria birdiae*.
- Caracterizar bioquimicamente o extrato aquoso obtido.
- Determinar os efeitos da aplicação do extrato obtido na germinação de sementes de alface americana e alface crespa em condições ótimas e condições de estresse por temperatura.
- Determinar os efeitos da suplementação do meio nutritivo com o extrato de *G. birdiae* sobre o desenvolvimento de mudas de alface americana *in vitro*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Macroalga marinha

Exemplares da macroalga *Gracilaria birdiae* foram obtidos de uma maricultura, mantida pela Associação de Produtores de Alga de Flecheiras e Guajiru (APAFG), em estruturas *long-line* localizadas na região costeira da praia de Flecheiras, município de Trairi/CE (latitude -3.2159133 e longitude -39.2629757), distante 200 m da costa a uma profundidade média de 5 m (Figura 8). As macroalgas foram transportadas em sacos plásticos ao Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), onde foram estocadas em freezer a -18 °C até seu uso.

**Figura 8.** Localização do banco natural de algas na praia de Flecheiras, município de Trairi/CE (latitude -3.2159133 e longitude -39.2629757).



**Fonte:** Google Maps.

#### 3.2. Obtenção do extrato aquoso de *Gracilaria birdiae* (EB-Gb)

As macroalgas foram descongeladas à temperatura ambiente e lavadas com água corrente e água destilada para a remoção de areia, epífitas e/ou organismos incrustantes. O material devidamente limpo e pesado foi processado em um liquidificador industrial de 5L juntamente com água destilada na proporção 1:1 (m/v). O processado foi filtrado em tecido de nylon de malha fina para a retirada de resíduos maiores e centrifugado por 10 minutos a 2500 xg à temperatura ambiente (KUDA; IKEMORI, 2009). O resíduo foi descartado e o volume do sobrenadante (extrato bruto) foi aferido e denominado EB-Gb. Parte desse volume foi utilizada para sua caracterização bioquímica e o restante foi liofilizado para sua melhor conservação e posterior utilização.

### 3.3. Caracterização bioquímica do EB-Gb

#### 3.3.1. Proteínas solúveis

Para essa análise utilizou-se o método de Bradford (1976). A curva padrão do reagente de Bradford, composto por Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,01% (m/v), etanol 95% a 5% (v/v) e ácido fosfórico 85% a 10% (v/v) foi determinada utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

#### 3.3.2. Carboidratos

A dosagem de carboidratos totais foi feita pelo método de Dubois *et al.* (1956) aprimorado por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), sem a necessidade da utilização de fenol. A curva padrão foi determinada utilizando galactose como padrão.

#### 3.3.3. Umidade

Baseando-se nos métodos de análise descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), foi utilizado o método de gravimetria para a determinação da umidade do extrato. Em três cadinhos secos em estufa até peso constante, foram adicionados 10 mL de extrato e pesados novamente. Os cadinhos foram deixados em banho-maria a 80 °C por 4 horas para que o excesso de água fosse eliminado. Em seguida, eles foram levados à estufa a 105 °C por 1 hora, deixados 30 minutos esfriando em um dessecador e, por fim, pesados. Esse processo foi repetido até a obtenção de pesos constantes. O cálculo da porcentagem de umidade foi feito utilizando a Equação 01:

$$Umidade (\%) = 1 - \left( \frac{P_{\text{cadinho+amostra seca}} - P_{\text{cadinho}}}{P_{\text{cadinho+amostra úmida}} - P_{\text{cadinho}}} \right) \times 100 \quad (01)$$

#### 3.3.4. Lipídios

Foi utilizado o método de delipidação com solvente orgânico descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Nos três cadinhos contendo o extrato seco obtido na etapa anterior, adicionou-se éter de petróleo, o qual foi removido e renovado a cada 1 hora. Passando-se 3 horas, o excesso de éter foi retirado da amostra e deixou-se que o restante evaporasse

completamente. Todos esses procedimentos foram realizados em capela de exaustão. Terminada a delipidação, os cadinhos com as amostras foram levados à estufa a 105 °C, esfriados em um dessecador e pesados, repetindo-se o processo até peso constante. O cálculo da massa lipídica se deu pela subtração da massa seca inicial da massa seca delipidada (descontando-se sempre a massa dos cadinhos).

### 3.3.5. Resíduos minerais

Utilizou-se o método de incineração descrito por Goldin (1987). Os cadinhos contendo o extrato seco delipidado foram colocados em uma mufla a 550 °C por 3 horas para a obtenção das cinzas. Passado esse tempo, o equipamento foi desligado e as amostras permaneceram *overnight* em seu interior, até que o mesmo atingisse a temperatura ambiente. A quantidade de resíduos minerais foi calculada utilizando a Equação 02:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{P_{\text{cadinho+cinzas}} - P_{\text{cadinho}}}{P_{\text{cadinho+amostra inicial}} - P_{\text{cadinho}}} \times 100 \quad (02)$$

Uma amostra do extrato liofilizado foi enviada ao Laboratório de Estudos em Química Aplicada (LEQA) para que fosse realizada a análise dessa por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-PES) visando a quantificação dos seguintes elementos minerais: N, K, P, S, Mg, Mn, Ca, Na, Fe, Cu, Zn, B, Mo, Ni, Si, Co e Se.

## 3.4. Teste qualitativo da presença de auxina e citocinina

Esse teste se baseou no ensaio realizado por Skoog e Miller (1957). Com o auxílio de um cortador de cortiça, foram obtidos explantes foliares circulares de plantas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* (fumo). Os discos foram inoculados em meios de cultura Murashige e Skoog (MS), cuja composição é descrita na Tabela 3, contendo 3% de sacarose, 0,7% de ágar e as seguintes suplementações:

- Controle Negativo (CN): MS sem regulador de crescimento.
- Controle Positivo Para Citocinina (CPC): MS com 1 µM BAP (6-benzilaminopurina).
- Controle Positivo Para Auxina (CPA): MS com 4 µM ANA (ácido naftalenoacético).

- Controle Positivo Para Auxina e Citocinina (CPCA): MS com 4  $\mu\text{M}$  ANA e 1  $\mu\text{M}$  BAP\*.
- EB-Gb 1,0: MS com 1,0  $\text{g.L}^{-1}$  de EB-Gb.

\*O balanço hormonal utilizado baseou-se no balanço descrito por Yokoya et al. (2010) para a alga marinha em questão.

**Tabela 3.** Composição do meio nutritivo Murashige e Skoog (MS) utilizado em cultivo de plantas *in vitro*.

Macronutrientes	Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
Micronutrientes	Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
KI	0,83
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,2
Vitaminas e Compostos Orgânicos	Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
Inositol	100
Tiamina HI	0,1
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2

**Fonte:** Murashige e Skoog (1962).

A inoculação dos explantes foi feita com a face adaxial voltada para o meio de cultura. Para cada tratamento utilizaram-se quatro frascos do tipo *baby-food* com meio de cultura, cada um contendo quatro discos foliares. Os frascos permaneceram em sala de cultura de

tecidos com condições controladas de temperatura ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), luminosidade ( $35\text{ }\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo (16:8 horas de luz/escuro) por quatro semanas.

### **3.5. Obtenção e desinfestação superficial das sementes de alface**

Sementes de alface das variedades *Rafaela* (americana) e *Grand rapidis* TBR (crespa) da marca Feltrin foram obtidas comercialmente. Elas foram desinfestadas utilizando-se o protocolo descrito por Hunter e Burritt (2002). As sementes foram submersas em etanol 70% durante 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo, onde permaneceram sob agitação orbital por 15 minutos. Após a esterilização, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril e colocadas em placa de Petri com papel de filtro estéril para retirar o excesso de água.

### **3.6. Efeito do EB-Gb na germinação de sementes de alface**

#### *I) Teste preliminar*

Baseando-se no protocolo utilizado por Baratto *et al.* (2008), sementes de alface crespa foram dispostas em Placas de Petri estéreis contendo um disco de papel de filtro e, em seguida, o papel foi embebido com 1,5 mL de água destilada estéril (controle) ou de EB-Gb nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0  $\text{g.L}^{-1}$ , concentrações obtidas a partir da solubilização do extrato liofilizado. A esterilização do extrato foi feita utilizando dois filtros de seringa diferentes: na primeira filtração utilizou-se um filtro de poro de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  e na segunda um filtro de poro  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ . Utilizaram-se quatro placas com 25 sementes/placa para cada tratamento, as quais permaneceram durante sete dias em câmara de germinação do tipo B.O.D. a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , temperatura ótima descrita pelo produtor das sementes, com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro.

#### *II) Otimização do teste*

Seguindo o mesmo protocolo do teste anterior, sementes de alface americana e crespa foram dispostas em placas de Petri estéreis contendo um disco de papel de filtro e, em seguida, o papel foi embebido com 1,5 mL de água destilada estéril (controle) ou de EB-Gb nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 ou  $0,4\text{ g.L}^{-1}$  esterilizado com filtros de seringa. Esse teste

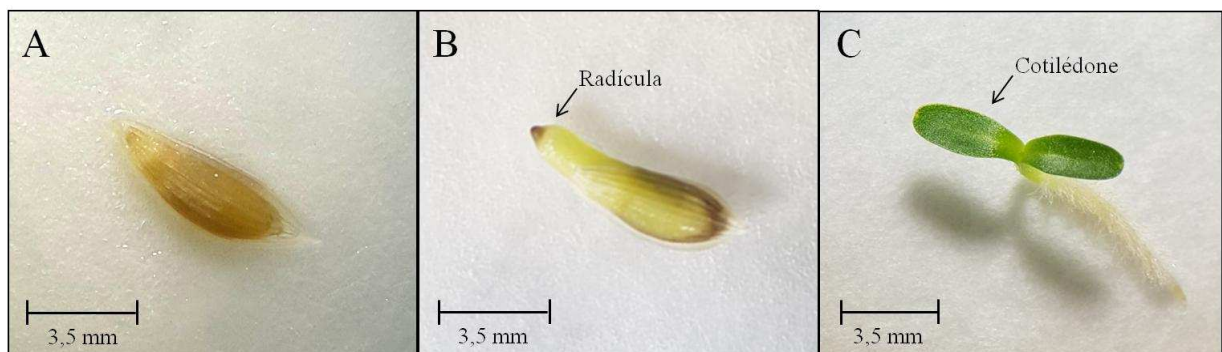
foi conduzido durante sete dias em ambientes com duas condições distintas de temperatura, ambas com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro, sendo utilizadas cinco placas com 20 sementes por tratamento em cada um deles:

- 1) Condição ótima – Câmara de germinação do tipo B.O.D. ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).
- 2) Condição de estresse\* – Sala de Cultura de Tecidos ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

\*A temperatura de estresse para a espécie em questão.

Para ambos os testes, as análises foram realizadas diariamente para se observar as etapas de germinação da semente de alface (Figura 9), na qual o início da germinação foi considerado como sendo o momento da exposição da radícula (Figura 9-B).

**Figura 9.** Etapas da germinação de semente de alface americana cv. *Rafaela*.



**Legenda:** A - Semente recém-inoculada; B - Exposição da radícula; C - Separação dos cotilédones.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Após sete dias de experimento, foram calculados os parâmetros de germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e índice de sincronização da germinação (ISG), utilizando-se as equações citadas por Labouriau e Valadares (1976) e apontadas nos itens 3.6.1 a 3.6.4.

### 3.6.1. Germinabilidade

Esse valor indica a porcentagem de sementes germinadas no ensaio. Ele é calculado utilizando a Equação 03:

$$\%G = \frac{Ng}{N} \times 100 \quad (03)$$

onde N é o número de sementes utilizadas no ensaio e Ng é o número de sementes germinadas.

### 3.6.2. Tempo Médio de Germinação

Refere-se ao tempo que as sementes demoram desde a semeadura até o início de sua germinação. Ele é calculado através da Equação 04:

$$TMG = \frac{(\sum ni \cdot ti)}{\sum ni} \quad (04)$$

onde ni é o número de sementes germinadas por dia e ti é tempo de incubação.

### 3.6.3. Velocidade Média de Germinação

Essa velocidade é determinada pelo inverso do tempo médio de germinação, como mostrado na Equação 05:

$$VMG = \frac{1}{TMG} \quad (05)$$

### 3.6.4. Índice de Sincronização da Germinação

Esse índice indica de forma inversamente proporcional o grau de sincronia da germinação, ou seja, quanto maior seu valor menor a sincronia. Ele é determinado pela Equação 06:

$$ISG = -\sum fi \cdot \log_2 fi \quad (06)$$

onde fi é a frequência relativa da germinação, calculada através da Equação 07:

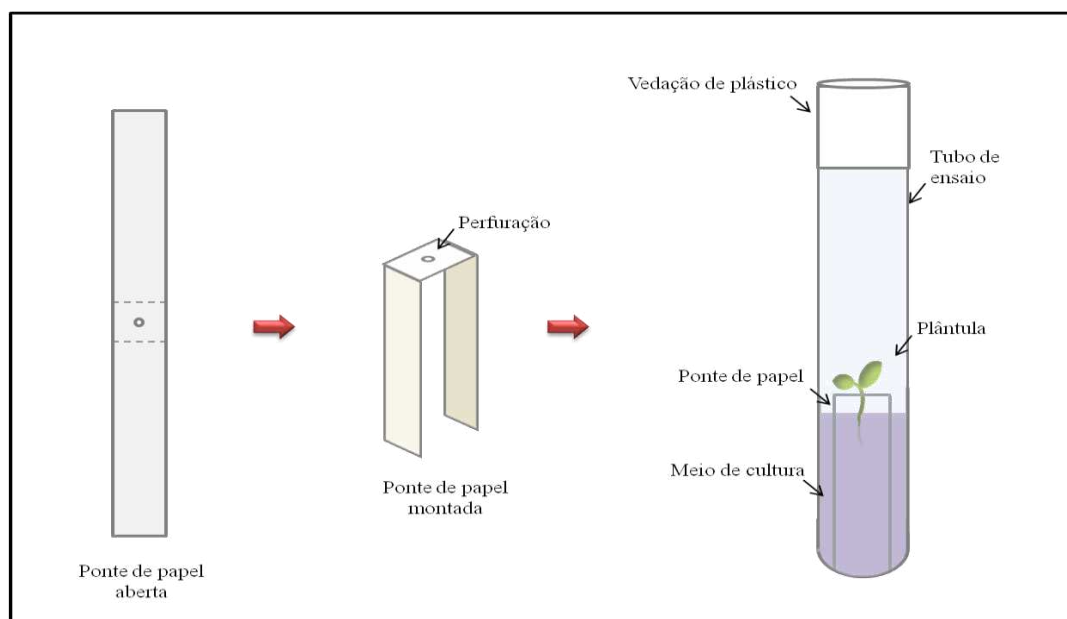
$$fi = \frac{ni}{N} \quad (07)$$

onde  $ni$  é o número de sementes germinadas por dia e  $N$  é o número total de sementes germinadas.

### 3.7. Obtenção de mudas *in vitro* de alface americana

Oitenta plântulas obtidas a partir da germinação de sementes em condições ótimas (B.O.D. a 20 °C) com água, utilizando-se o protocolo descrito no item 3.6, foram transferidas para tubos de ensaio contendo pontes de papel de filtro com uma perfuração central, como ilustrado na Figura 10, e 15 mL de meio de cultura líquido Murashige e Skoog (MS) com 3% de sacarose. Elas permaneceram nesse meio por duas semanas em sala de cultura de tecidos com condições controladas de temperatura (25 °C ± 2), luminosidade (35  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo (16:8 horas de luz/escuro). Nesse tempo, ocorreu o enraizamento das plântulas e o surgimento das primeiras folhas verdadeiras.

**Figura 10.** Ilustração do sistema de cultivo de plantas de alface em meio líquido *in vitro*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.8. Efeito de EB-Gb no desenvolvimento de mudas de alface americana

Das mudas obtidas na etapa anterior (Figura 11) foram selecionadas 60 que possuíam um perfil mais similar quanto ao número de folhas, tamanho da parte aérea e desenvolvimento radicular. Essas plantas foram transferidas para novos meios, no mesmo sistema de cultivo ilustrado na Figura 10, com quatro tratamentos diferentes:

- Controle: Meio MS sem adição de EB-Gb
- EB-Gb 0,5: Meio MS com 0,5 g.L<sup>-1</sup> de EB-Gb
- EB-Gb 0,75: Meio MS com 0,75 g.L<sup>-1</sup> de EB-Gb
- EB-Gb 1,0: Meio MS com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de EB-Gb

Foram utilizadas 15 plantas para cada tratamento, as quais foram deixadas por quatro semanas em sala de cultura de tecidos nas condições descritas anteriormente e o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram realizadas avaliações semanais quanto ao comprimento da parte aérea e, ao final do experimento, além desse parâmetro foram determinados: número de folhas, comprimento da maior folha, comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e massa fresca da parte aérea e das raízes e porcentagem de biomassa seca (%BS) da parte aérea e das raízes utilizando a Equação 8:

$$\%BS = \frac{\text{massa liofilizada}}{\text{massa fresca}} \times 100 \quad (08)$$

**Figura 11.** Desenvolvimento de mudas de alface americana em meio líquido *in vitro*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### **3.9. Análises estatísticas**

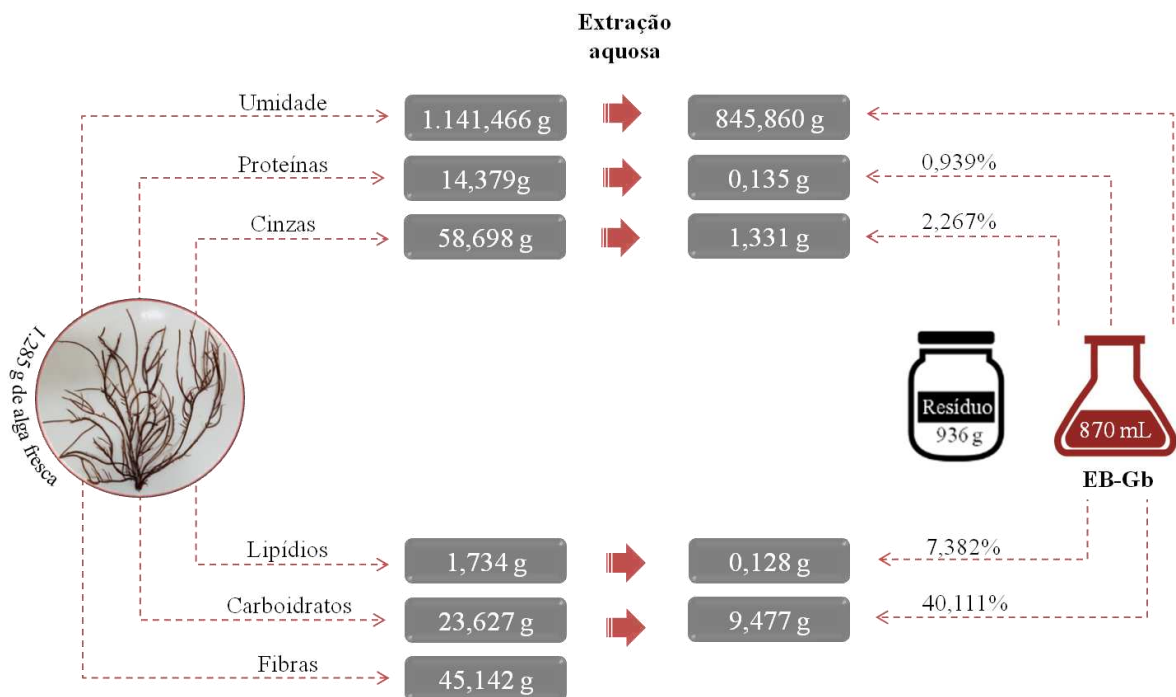
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa BioEstat®. Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização bioquímica e rendimento do EB-Gb

O método utilizado para a extração dos componentes da macroalga úmida possibilitou a obtenção de 0,135g de proteínas, 1,331 g de resíduos minerais, 0,128 g de lipídeos e 9,477 g de carboidratos a partir de 1,285 kg de biomassa fresca. O volume de extrato restante após os ensaios de caracterização bioquímica foi liofilizado e recuperaram-se cerca de 41,22% da massa seca total obtida na extração. Em relação à composição centesimal da *Gracilaria birdiae* descrita por Gomes *et al.* (2015), foi observado um baixo rendimento da extração, uma vez que os teores de proteínas, resíduos minerais, lipídios e carboidratos corresponderam a 0,939; 2,267; 7,382 e 40,111%, respectivamente (Figura 12).

**Figura 12.** Composição bioquímica e rendimento do extrato EB-Gb da macroalga marinha *G. birdiae*.



No presente trabalho, utilizou-se uma proporção 1:1 (m/v) de macroalga fresca e água destilada na etapa de processamento, o que gerou um processado muito denso que não permitia uma agitação eficiente em agitador magnético. Assim sendo, o aumento do volume de solvente e a adição de uma etapa de agitação e/ou aquecimento poderiam ter contribuído para um maior rendimento da extração. O aumento de solvente tornaria o processo de liofilização mais longo, entretanto considerando o fato de que, segundo Crouch e Van Staden

(1993), extratos de macroalgas marinhas são bioativos a concentrações baixas (diluídos a 1:1000 ou mais), esse processo poderia ser substituído por um outro método de conservação. Kumar e Sahoo (2011) utilizaram a proporção 1:1 (m/v) de macroalga fresca *Sargassum wightii* e água destilada para a obtenção do extrato bruto dessa macroalga, entretanto realizaram uma etapa de cozimento da alga durante uma hora em banho-maria, etapa de extração não utilizada neste trabalho. Kuda e Ikemori (2009) obtiveram extratos de diferentes macroalgas marinhas, contendo polissacarídeos e minerais, a partir de uma extração com água destilada na proporção 1:4 (m/v), mesma proporção utilizada por Rivero *et al.* (2003). Eles realizaram ainda uma etapa de agitação a 120 rpm por 30 minutos, o que provavelmente contribuiu para um melhor rendimento das extrações. Os valores dos rendimentos obtidos nesses trabalhos não são apresentados pelos autores.

Dos compostos quantificados no extrato, os que se mostraram presentes em maiores quantidades foram carboidratos e resíduos minerais, respectivamente. Chatterjee *et al.* (2017) apontam que os carboidratos presentes nos extratos de macroalgas marinhas utilizados na agricultura são importantes por apresentarem boas propriedades de retenção de umidade, além de melhorarem a aeração e a estrutura do solo, especialmente os argilosos, por proporcionarem a ele uma maior agregação, que afeta diretamente sua temperatura, aeração e taxas de infiltração, melhorando o ambiente físico da cultura, ou seja, a fertilidade desse solo (FALCHINI; SPARVOLI; TOMASELLI, 1996). O alginato, carboidrato presente nas macroalgas pardas, e diversos polissacarídeos sulfatados, como a carragenana presente em algumas macroalgas vermelhas, caracterizaram-se por estimularem o crescimento radicular tanto direta quanto indiretamente em associação com microrganismos (GONZÁLEZ *et al.*, 2013), desencadearem mecanismos de defesa da planta (SUBRAMANIAN *et al.*, 2011) e induzirem genes envolvidos na defesa relacionada à patogênese (VERA *et al.*, 2011). Até o momento, entretanto, não há relatos sobre esses efeitos de polissacarídeos de macroalgas agarófitas.

Quanto aos resíduos minerais, esses são os componentes de maior interesse quando se trata de fertilizantes. O resultado da quantificação dos minerais no EB-Gb é apresentado na Tabela 4. A técnica utilizada não permite uma quantificação precisa de N e S, portanto esses valores não foram apresentados. Além disso, ocorreram problemas com a detecção de Na, K e P, não se tendo obtido resultados satisfatórios em sua quantificação e sendo necessária a repetição dessa análise. Os elementos presentes em maior concentração foram o Ca (3441,49 mg.kg<sup>-1</sup>) e o Mg (3291,75 mg.kg<sup>-1</sup>), elementos envolvidos na síntese de parede celular,

respiração, fotossíntese e síntese de ácidos nucleicos nas plantas. Ressalta-se também que o Mg faz parte da estrutura da molécula de clorofila (MARSCHNER, 1995). Também foi possível quantificar B, Cu, Fe, Mn e Zn no EB-Gb, elementos envolvidos no alongamento da célula, síntese de ácidos nucleicos, respostas a hormônios, integridade estrutural da parede celular, respiração, fotossíntese e composição de biomoléculas (MARSCHNER, 1995). Além disso, são nutrientes-chave como co-fatores hormonais em todas as fases de desenvolvimento da planta, ou seja, germinação, estabelecimento, crescimento, florescimento, reprodução, maturação e senescência (STOLLER, J.; LECLERE, S.; LIPTAY, 2005). Os elementos Co, Se, Mo e Ni apresentaram-se abaixo do limite de detecção do equipamento. Os resultados obtidos corroboram os de Khan *et al.* (2009), que relatam que extratos de macroalgas marinhas comumente possuem em sua composição macronutrientes, como K, P e Ca, e micronutrientes, como Fe, Cu, Zn, B, Mn, Co e Mo.

**Tabela 4.** Concentração de minerais ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) no extrato liofilizado de *G. birdiae* (EB-Gb).

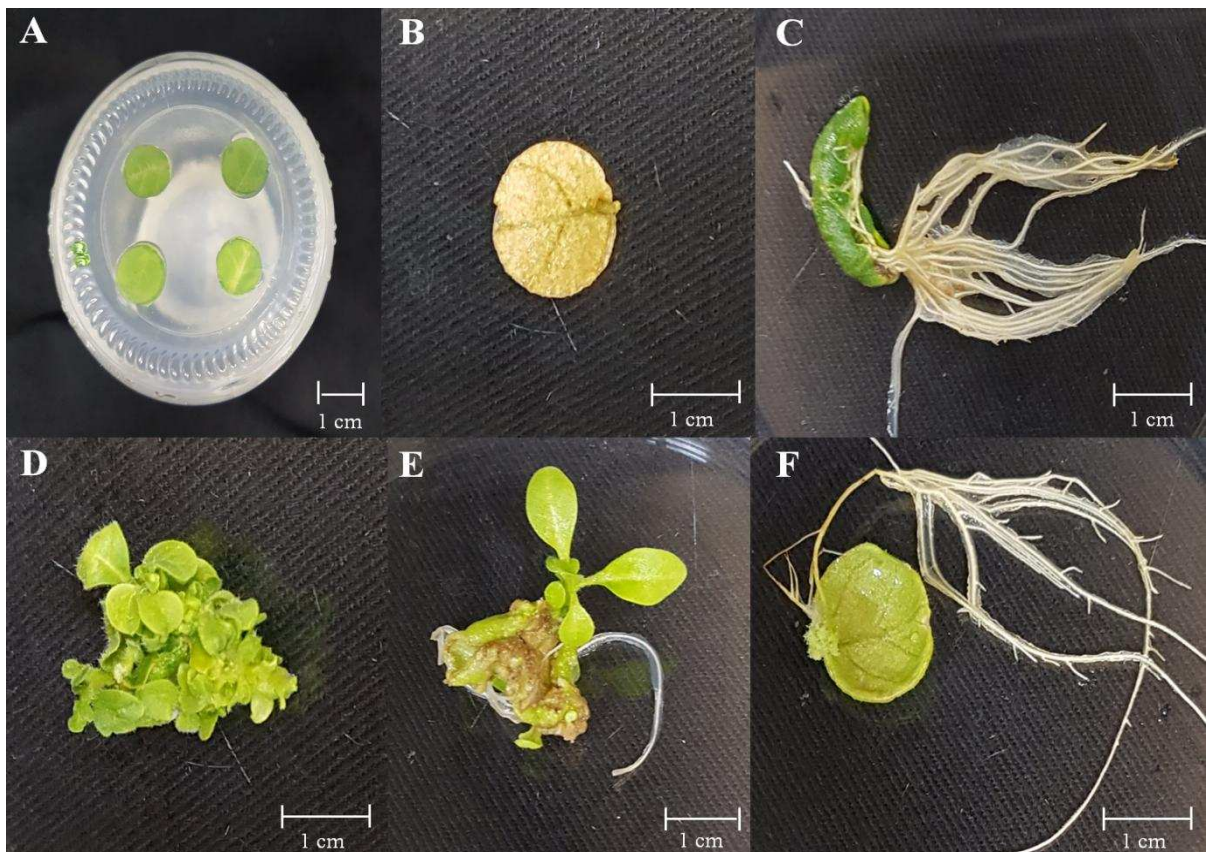
Elemento	Linha de Emissão	Concentração ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )
B	249,677	176,59 $\pm$ 20,76
Ca	317,933	3441,49 $\pm$ 209,22
Co	228,616	<0,001
Cu	324,752	26,68 $\pm$ 1,32
Fe	259,939	99,07 $\pm$ 3,65
Mg	279,77	3291,75 $\pm$ 322,23
Mn	259,372	84,25 $\pm$ 7,69
Mo	281,616	<0,012
Ni	231,604	<0,013
Se	196,026	<0,036
Zn	202,548	698,38 $\pm$ 63,27

#### 4.2. Teste qualitativo da presença de auxinas e citocininas no EB-Gb

Os resultados referentes ao desenvolvimento de explantes foliares de fumo visando avaliar a presença de auxinas e citocininas no EB-Gb estão mostrados na Figura 13. Os segmentos foliares submetidos ao tratamento CN não sofreram alterações, exceto quanto à

perda de coloração (clorose) e a ocorrência de leves oxidações (Figura 13-B). Um resultado esperado, visto que os explantes utilizados não se tratavam de tecidos meristemáticos, sendo necessária uma indução de competência celular através do uso de reguladores de crescimento. Os explantes que estavam em meio CPC desenvolveram brotos via organogênese direta (Figura 13-C), ou seja, sem passar antes por um estágio de calo (massa de células desenvolvidas desordenadamente), resultado coerente com a presença de citocinina. Os que se encontravam em meio CPA apresentaram expansão tecidual e desenvolveram raízes via organogênese direta (Figura 13-D). Os segmentos foliares em meio CPCA desenvolveram brotos e raízes por organogênese indireta (Figura 13-E), ou seja, ocorreu formação de calos e, a partir deles, desenvolveram-se essas estruturas.

**Figura 13.** Desenvolvimento de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* em meio MS contendo fitormônios e extrato de *G.birdiae* (EB-Gb) após quatro semanas.

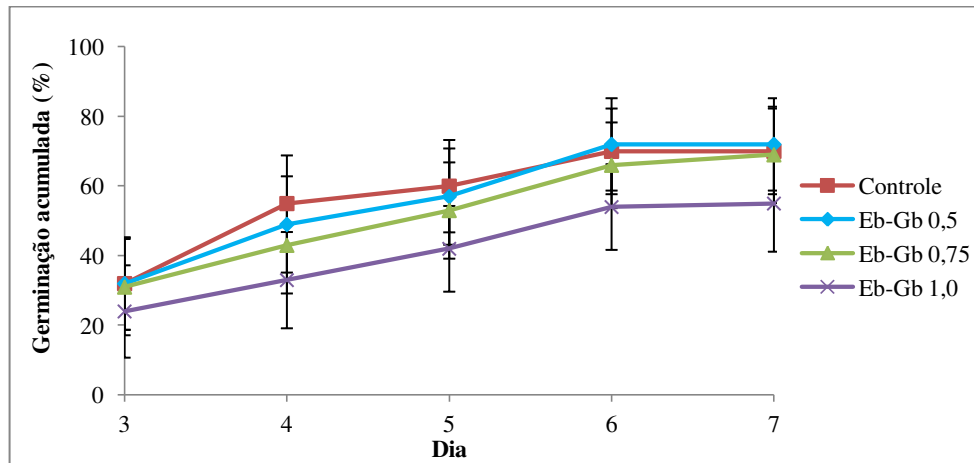


**Legenda:** Explantes foliares recém-inoculados (A); Meio MS<sub>0</sub> (B); Meio MS + 4μM ANA (C); Meio MS + 1μM BAP (D); Meio MS + 4μM ANA + 1μM BAP (E) e meio MS + 1 g.L<sup>-1</sup> de EB-Gb (F).

Quando em meio EB-Gb, os explantes apresentaram expansão tecidual e desenvolveram raízes via organogênese direta (Figura 13-F), resultado similar ao controle CPA. Com a análise dos explantes desenvolvidos nos meios de cultura utilizados como controles negativo e positivo foi possível observar resultados que se assemelham aos obtidos por Skoog e Miller (1957), estudo no qual esse experimento se baseou. Além disso, o resultado sugeriu a presença de auxina no EB-Gb corroborando os resultados de Yokoya *et al.* (2010), que demonstraram em seu estudo que as auxinas são os hormônios presentes em maior quantidade na macroalga vermelha *G. birdiae*, o que justificaria ainda o fato da extração ter possibilitado a obtenção desse hormônio e não dos demais. Ressalta-se ainda o fato das macroalgas não apresentarem diferenciação tecidual, o que sugere uma composição bioquímica similar em todas as suas células. Graças a isso, o método de extração através do processamento desses organismos pode ser suficiente para a obtenção desses fitormônios e também de outros compostos. Entretanto, considerando-se a composição complexa do EB-Gb seria necessário um estudo quantitativo para confirmar que os resultados desse ensaio foram de fato devido à presença do fitormônio.

#### **4.3. Efeito do EB-Gb na germinação de sementes de alface**

No teste preliminar, a germinação acumulada de sementes de alface na presença do EB-Gb está mostrada na Figura 14. Os tratamentos controle, EB-Gb 0,5 e EB-Gb 0,75 apresentaram uma porcentagem de germinação similar ao final dos sete dias de experimento (70, 72 e 69%, respectivamente), enquanto o tratamento com EB-Gb 1,0 apresentou apenas 55%. O perfil da curva de germinação das sementes em água mostrou a falta de uniformidade desse processo, observada pela distribuição heterogênea da germinação no decorrer do tempo, e a conseqüente velocidade reduzida dessa germinação, isso devido à dormência já descrita para diferentes linhagens de alface *Grand rapids* (BEWLEY; BLACK, 1994). Os tratamentos com o extrato EB-Gb não influenciaram no tempo médio e na velocidade média de germinação, mas nas concentrações 0,5 e 0,75 g.L<sup>-1</sup> o índice de sincronização da mesma foi influenciado negativamente (Tabela 5).

**Figura 14.** Germinação acumulada de sementes de alface crespa na presença de extrato de *G. birdiae* (EB-Gb).**Tabela 5.** Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em dia<sup>-1</sup> e índice de sincronização de germinação (ISG) de sementes de alface crespa cv. *Grand rapids* na presença de diferentes concentrações de extrato de *G. birdiae* (EB-Gb).

Parâmetro	Água	EB-Gb 0,5	EB-Gb 0,75	EB-Gb 1,0
%G	70,00 ± 12,3094	72,00 ± 13,2660	69,00 ± 13,8297	55,00 ± 13,8297
TMG (dias)	3,9003 ± 0,0862	4,0835 ± 0,0559	4,2005 ± 0,1377	4,2113 ± 0,1378
VMG (dias <sup>-1</sup> )	0,2565 ± 0,0056	0,2449 ± 0,0034	0,2383 ± 0,0077	0,2376 ± 0,0077
ISG	1,6960 ± 0,0661	1,7812 ± 0,1602	1,9622 ± 0,1323	1,6886 ± 0,0414

Hernández-Herrera *et al.* (2014) também obtiveram um padrão decrescente da porcentagem de germinação de sementes de tomate conforme a concentração dos extratos de *Ulva lactuca* e *Padina gymnospora* aumentava, aumento que também causou um atraso nesse processo. Arun *et al.* (2014), em ensaios de germinação com sementes de quiabo, realizaram aplicações de extratos de *Gracilaria edulis* e *Chaetomorpha linum* nas concentrações 20, 40, 60, 80 e 100% (v/v) e obtiveram resultados positivos até as concentrações 60 e 80% (v/v), respectivamente, mas com o aumento delas obtiveram, repentinamente, uma taxa zero de germinação. Hernández-Herrera *et al.* (2016) atribuíram parcialmente o efeito negativo da aplicação de altas concentrações de extratos de macroalgas (no caso, 4 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>) aos minerais, como Na, K, Ca e P, presentes nesses extratos, que podem influenciar o potencial osmótico. Com base no resultado obtido no presente estudo e no que se tem descrito na literatura, realizou-se um novo teste de germinação com concentrações mais baixas do EB-Gb.

Diante dos resultados obtidos no teste preliminar, um novo delineamento experimental foi executado para as sementes de alface crespa e americana em condições ótimas e de estresse, onde os resultados estão apresentados nas Tabelas 6 e 7. Para a alface americana nas condições ótimas, não foram observadas diferenças quanto à germinabilidade, tempo médio e velocidade de germinação entre os tratamentos. A sincronização, entretanto, foi prejudicada nos tratamentos EB-Gb 0,2 e EB-Gb 0,4 e melhorada no EB-Gb 0,1. Estudos utilizando extratos de outras gracilarias também não obtiveram diferença na porcentagem de germinação de sementes em condições ideais de temperatura, como foi o caso de Balakrishnan *et al.* (2007), que utilizaram extrato de *G. corticata* em *Cyamopsis tetragonolobu*, e Demir *et al.* (2006), que utilizaram extrato de *G. gracilis* em tomate, pimentão e berinjela. Haber *et al.* (2006), utilizando extrato de *A. nodosum* em sementes de cenoura também só observaram diferença na sincronização da germinação, que no caso foi prejudicada. No teste em condições ótimas com sementes de alface crespa (Tabela 6), o tempo e a velocidade de germinação não foram afetados. A porcentagem de germinação foi prejudicada nos tratamentos EB-Gb 0,2 e Eb-Gb 0,3, enquanto que o índice de sincronização foi prejudicado nos tratamentos EB-Gb 0,1 e EB-Gb 0,4 e melhorado no EB-Gb 0,2.

**Tabela 6.** Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em dia<sup>-1</sup> e índice de sincronização de germinação (ISG) com sementes de alface americana e crespa em condições ótimas de temperatura (20 °C).

Alface Americana					
	Água	EB-Gb 0,1	EB-Gb 0,2	EB-Gb 0,3	EB-Gb 0,4
<b>%G</b>	91,33 ± 6,3508	92,67 ± 10,7860	89,00 ± 14,9332	92,6667 ± 6,4291	95,67 ± 26,9506
<b>TMG</b>	2,6073 ± 0,5749	2,3765 ± 0,0803	2,8716 ± 0,2613	2,7113 ± 0,5818	2,7644 ± 0,1783
<b>VMG</b>	0,3951 ± 0,0786	0,4211 ± 0,0143	0,3501 ± 0,0314	0,3809 ± 0,0854	0,3627 ± 0,0229
<b>ISG</b>	1,2787 ± 0,7125	1,0677 ± 0,2105	1,4223 ± 0,2849	1,2554 ± 0,6531	1,4873 ± 0,3365
Alface Crespa					
	Água	EB-Gb 0,1	EB-Gb 0,2	EB-Gb 0,3	EB-Gb 0,4
<b>%G</b>	65,33 ± 10,0664	60,00 ± 4,0000	53,33 ± 20,5264	49,33 ± 15,1438	62,67 ± 8,3267
<b>TMG</b>	4,1458 ± 0,3083	4,6149 ± 0,2302	4,1857 ± 0,4504	4,8028 ± 0,2416	4,3973 ± 0,2772
<b>VMG</b>	0,2421 ± 0,0173	0,2170 ± 0,0111	0,2409 ± 0,0276	0,2086 ± 0,0107	0,2280 ± 0,0139
<b>ISG</b>	1,5913 ± 0,1697	1,8909 ± 0,0958	1,4497 ± 0,4763	1,6206 ± 0,1560	1,7304 ± 0,1909

Em condições de estresse (Tabela 7), pode-se observar que a germinação das sementes de alface crespa foi mais afetada que a das sementes de alface americana (que mantiveram cerca de 40-50% de germinabilidade), isso por essa variedade ser mais suscetível ao calor, como é apontado pelo próprio fabricante das sementes utilizadas no ensaio. No teste com alface americana, mais uma vez só observou-se diferença na sincronização. Da mesma forma que em condições ótimas, esse parâmetro foi afetado negativamente no tratamento EB-Gb 0,4. No teste com a alface crespa, o tratamento com a maior concentração de extrato (EB-Gb 0,4) proporcionou a maior porcentagem de germinação, com um aumento de 55,5% em relação ao controle. As sementes submetidas ao tratamento EB-Gb 0,2 e EB-Gb 0,4 foram as mais prejudicadas quanto à sincronização da germinação, enquanto que aquelas submetidas aos tratamentos EB-Gb 0,1 e EB-Gb 0,3 apresentaram as germinações mais sincronizadas.

Inderjit *et al.* (2006) apontam que as alterações no padrão de germinação podem resultar de diversos efeitos causados em nível primário, como a permeabilidade de membranas, a transcrição e tradução de DNA, o funcionamento de mensageiros secundários, a respiração, a conformação de enzimas e receptores, o padrão osmótico ou mesmo a combinação desses fatores. As auxinas presentes em bioestimulantes aplicados em sementes podem aumentar a permeabilidade do tegumento, permitindo maior hidratação e diminuindo a resistência desse tegumento (LARCHER; PRADO, 2000). Levando-se em conta que o extrato EB-Gb possui esse fitormônio em sua composição, além de possuir grande quantidade de carboidratos que são excelentes retentores de umidade, como já citado anteriormente, esses componentes podem ser os responsáveis pelas respostas positivas encontradas nesse ensaio quando combinados com um padrão osmótico não prejudicado pelos minerais também presentes no extrato.

**Tabela 7.** Germinabilidade (%G) em %, tempo médio (TMG) em dia, velocidade média (VMG) em dia<sup>-1</sup> e índice de sincronização de germinação (ISG) com sementes de alface americana e crespa em condições de estresse por temperatura (28 °C).

Alface Americana					
	Água	EB-Gb 0,1	EB-Gb 0,2	EB-Gb 0,3	EB-Gb 0,4
<b>%G</b>	45,00 ± 10,8012	51,25 ± 7,5000	38,75 ± 17,9699	40,00 ± 16,8325	45,00 ± 7,0711
<b>TMG</b>	3,7301 ± 0,5154	3,6610 ± 0,2822	3,8242 ± 0,5540	3,6236 ± 0,2439	3,9500 ± 0,3317
<b>VMG</b>	0,2721 ± 0,0391	0,2744 ± 0,0226	0,2664 ± 0,0448	0,2769 ± 0,0186	0,2546 ± 0,0223
<b>ISG</b>	1,0425 ± 0,7548	1,1144 ± 0,4492	1,2694 ± 0,6697	1,1145 ± 0,3541	1,4296 ± 0,3893

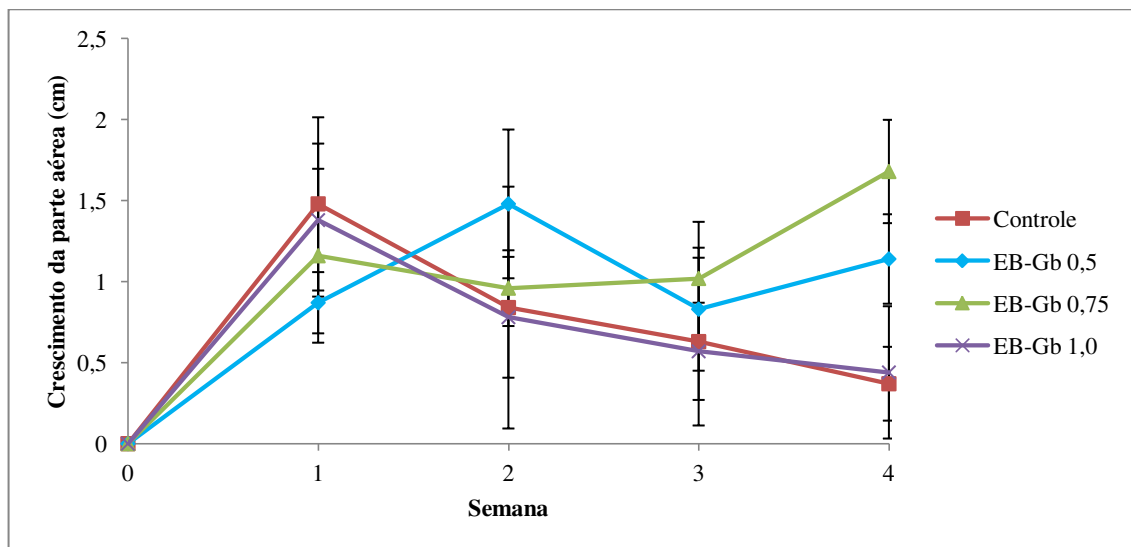
Alface Crespa					
	Água	EB-Gb 0,1	EB-Gb 0,2	EB-Gb 0,3	EB-Gb 0,4
<b>%G</b>	22,50 ± 11,9024	23,75 ± 14,4614	20,00 ± 7,0711	18,75 ± 10,3078	35,00 ± 10,8012
<b>TMG</b>	3,7619 ± 0,3159	3,6319 ± 0,1310	4,1667 ± 0,6804	3,8083 ± 0,4969	3,7702 ± 0,1026
<b>VMG</b>	0,2673 ± 0,0236	0,2756 ± 0,0102	0,2450 ± 0,0401	0,2657 ± 0,0322	0,2654 ± 0,0072
<b>ISG</b>	1,1488 ± 0,4115	0,3208 ± 0,1529	1,3066 ± 0,4311	0,0306 ± 0,0204	1,3596 ± 0,0958

#### 4.4. Efeito do EB-Gb no desenvolvimento de mudas *in vitro* de alface americana

##### 4.4.1. Parte aérea

O efeito de diferentes concentrações do EB-Gb sobre o perfil de crescimento da parte aérea da alface americana está mostrado na Figura 15. Durante o decorrer das quatro semanas do experimento foi possível observar que o tratamento com maior concentração de extrato EB-Gb (1,0 g.L<sup>-1</sup>) apresentou um perfil de crescimento da parte aérea bastante similar ao controle, cerca de 1,40 cm, apresentando um único pico de crescimento na primeira semana e valores decrescentes no decorrer do tempo.

**Figura 15.** Crescimento médio, por semana, da parte aérea (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb). Valores não cumulativos.



As plantas desenvolvidas sob efeito de EB-Gb 0,5 apresentaram um retardo no desenvolvimento da parte aérea, apresentando o menor valor de crescimento na primeira semana (0,80 cm) se comparado aos demais tratamentos, um primeiro pico na segunda

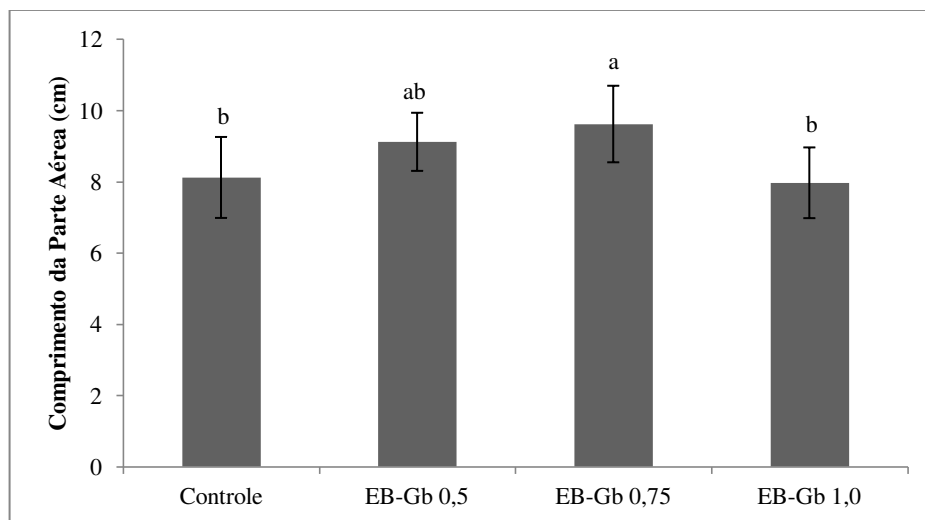
semana (1,48 cm) e um segundo pico na quarta semana (1,14 cm). O tratamento EB-Gb 0,75 apresentou um pico na primeira e outro na quarta semana e, diferentemente de todos os outros, houve pouca flutuação no crescimento médio semanal da primeira à terceira semana (1,16, 0,96 e 1,02 cm, respectivamente).

Após trinta dias, foi possível observar um aumento de 18,47% no comprimento da parte aérea das mudas cultivadas em meio com EB-Gb 0,75 em relação às cultivadas em meio MS<sub>0</sub> (Figura 16). Esse valor foi superior ao obtido por Kumar e Sahoo (2011) com a aplicação de extrato de *Sargassum wightii* em cultura de trigo (6,7%) e ao obtido por Pramanick *et al.* (2014) com extrato de *Gracilaria* sp. em cultura de feijão (9,06%). O resultado foi similar ao obtido por Rathore *et al.* (2008) com a aplicação de extrato da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* em cultura de soja (16,77%) e por Selvam e Sivakumar (2013) com extrato de *Ulva reticulata* em cultura de feijão preto (18,75%). Outros resultados similares foram por descritos Pramanick *et al.* (2014) para plantas de feijão com a aplicação de extratos de *Gracilaria* sp. (15,33%) e de *Kappaphycus* sp. (15,42%), esse último também apresentando resultados parecidos em plantas de batata (17,57%). Aplicações de extratos de *Kappaphycus* sp. e *Gracilaria* sp. geraram resultados superiores (28,99% e 27,64%, respectivamente) ao obtido no presente trabalho quanto aplicados em arroz (PRAMANICK *et al.*, 2014), assim como os extratos de *K.alvarezii*, *S.robusta* e *S.wightii* em quiabo (31,77%), pimentão (31,72%) e feijão (30,66%), respectivamente (ZODAPE *et al.*, 2008; SULTANA; ARA; EHTESHAMUL-HAQUE, 2008; VIJAYANAND; RAMYA; RATHINAVEL, 2014). Neste trabalho, foi observado um aumento do tamanho da parte aérea com a aplicação de EB-Gb conforme o aumento da concentração desse extrato no meio, mesmo que não tenha havido diferença significativa entre o controle e o tratamento EB-Gb 0,5. Houve, entretanto, o decréscimo quando comparamos o tratamento EB-Gb 0,75 e EB-Gb 1,0, que também foi observado em outros trabalhos (KALAIIVANAN; CHANDRASEKARAN.; VENKATESALU, 2012; SELVAM; SIVAKUMAR, 2013; VIJAYANAND; RAMYA; RATHINAVEL, 2014).

Muitos autores sugerem que os compostos responsáveis pelas respostas de aceleração e melhoramento do desenvolvimento das plantas são os fitormônios presentes nos extratos de macroalgas marinhas, como auxinas ou citocininas, ou seja, a aplicação de hormônios exógenos. Khan *et al.* (2009), entretanto, demonstrou que a aplicação de extrato da macroalga marinha *A. nodosum* induziu a atividade de citocinina endógena em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana*, porém o mecanismo envolvido nessa resposta não está claro. Jannin *et*

al. (2013), em estudos utilizando *microarrays* e análises fisiológicas, observaram que os primeiros eventos ocorridos em plantas de colza (*Brassica napus*) após a aplicação de extrato de *A. nodosum* foram o incremento no número de cloroplastos por célula e na concentração da citocinina iP (isopenteniladenina), além da melhoria da expressão de genes que codificam transportadores de nitrato e enxofre na raiz. Esses foram efeitos preliminares da mudança global do metabolismo da planta. As vias metabólicas mais afetadas por esse tratamento foram: metabolismo geral da célula, metabolismo do carbono e fotossíntese, resposta a estresse e metabolismo do nitrogênio e enxofre. O melhoramento de N, C e S nas plantas pode explicar o aumento do crescimento de plantas tratadas com o extrato de macroalga.

**Figura 16.** Comprimento médio da parte aérea (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb) após 30 dias. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).

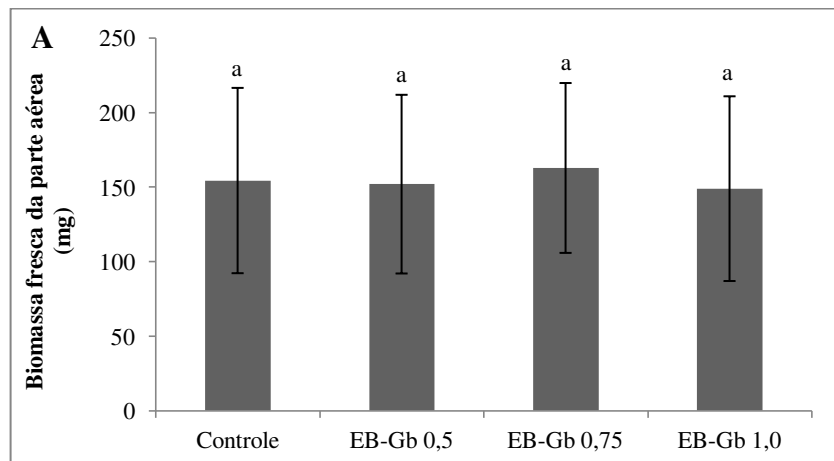


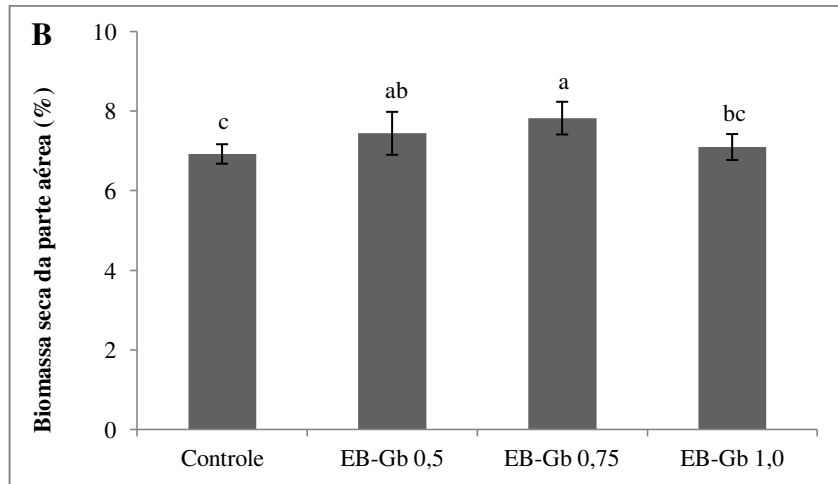
No decorrer do experimento, houve um problema na refrigeração da sala de cultura de tecidos onde as plantas foram armazenadas. O aquecimento do ambiente resultou na condensação de água na parede dos tubos que continham as mudas e isso fez com que ocorresse a murcha de algumas delas, o que explica o grande desvio padrão na massa fresca das plantas (Figura 17A). Essa variabilidade considerável pode ter afetado o resultado de forma que não foi observada diferença significativa nesse parâmetro. É necessária, entretanto, a repetição desse ensaio para certificar-se que o EB-Gb de fato não tem efeito sobre a massa fresca dessas plantas ou se o resultado obtido simplesmente foi decorrente do problema ocorrido durante o experimento, visto que há registros na literatura que mostram efeitos muito

promissores da aplicação de extratos de macroalgas sobre o aumento da massa fresca de plantas. Selvam e Sivakumar (2014), por exemplo, obtiveram um incremento de 44,71% de massa fresca em plantas de amendoim com a aplicação de extrato de *H. musciformis*. Pinto *et al.* (2010) testaram duas diferentes doses e dois métodos de aplicação de extrato de *A. nodosum* em alface crespa e não observou diferença estatística na menor dose testada, mas a maior incrementou esse valor em mais de 100%.

No parâmetro de porcentagem de biomassa seca, obteve-se diferença significativa nos tratamentos EB-Gb 0,5 e EB-Gb 0,75 em relação ao controle (Figura 17-B), com um aumento máximo de 13% observado nessa segunda concentração. Visto que, segundo o estudo de Jannin *et al.* (2013), a assimilação e a síntese de alguns nutrientes são melhoradas em plantas tratadas com extratos de macroalgas marinhas, uma explicação para esse incremento de biomassa seca pode ser esse acúmulo de minerais na planta. Esse aumento nutricional é bastante interessante em plantas de alface americana, levando-se em conta que seu teor nutricional é bastante reduzido, correspondendo a 0,63% de sua massa fresca (OHSE *et al.*, 2009). O resultado obtido foi similar ao descrito por Mugnai *et al.* (2008), que obtiveram um incremento de biomassa seca de 10,31% em mudas de videira com a aplicação de extrato de macroalgas Fucales, e foi menor que o obtido por Spinelli *et al.* (2010), que descreveram um aumento de 27% nesse parâmetro em plantas de morango com a aplicação de um extrato derivado da macroalga *A. nodosum*. Vale ressaltar, entretanto, que nesse segundo estudo foi utilizado um extrato comercial suplementado com minerais, o que potencializou o resultado.

**Figura 17.** Biomassas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb) *in vitro*. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).





#### 4.4.2. Folhas

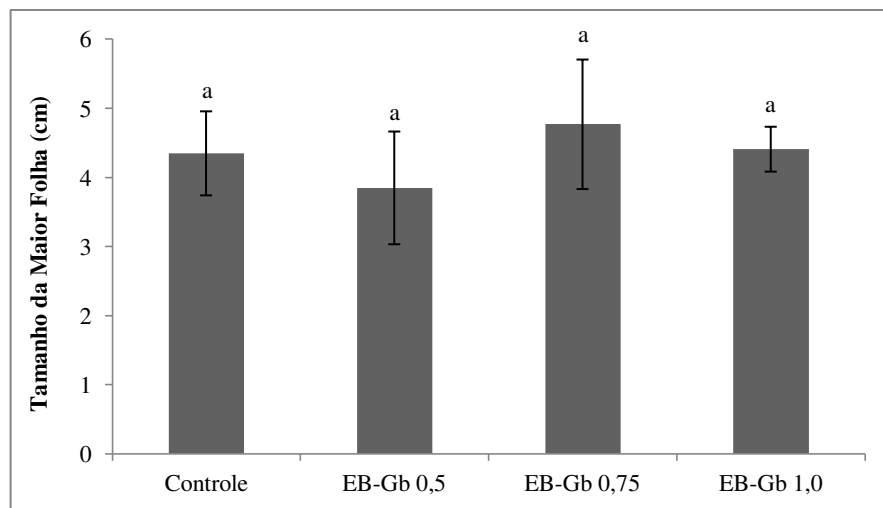
O comprimento médio da maior folha das plantas de alface cultivadas em meio suplementado com EB-Gb *in vitro* está mostrado na Figura 18. Dentre todos os tratamentos, nenhum apresentou diferença significativa quanto ao tamanho da maior folha (cerca de 0,45 cm) e apenas o EB-Gb 0,75 apresentou diferença significativa quanto ao número de folhas em relação ao controle, com um aumento de 17,36% (Figuras 19 e 20). Esse resultado foi similar ao obtido por Cecato e Moreira (2013) com a aplicação de extrato de macroalgas dos gêneros *Sargassum* e *Laminaria* em alface crespa cv. *Vera* (16,63%) e ao obtido por Rayorath *et al.* (2011) com a aplicação de extrato de *A. nodosum* em mudas de *A. thaliana* (20%).

Limberger e Gheller (2013) utilizaram em seus ensaios fertilizantes organominerais à base de extrato de macroalgas marinhas em cultura de alface crespa e não obtiveram resultados significativos quanto ao número de folhas, o que mostra que nas condições testadas o extrato EB-Gb, preparado simplesmente através da extração aquosa de *G. birdiae*, mostrou-se vantajoso em relação a esse parâmetro frente a tais produtos comerciais mais elaborados e conseqüentemente, de maior custo de produção. Souza *et al.* (2010) também não obtiveram diferenças significativas na aplicação de extrato de macroalgas do gênero *Lithothamnium* em mudas de maracujazeiro doce. Já Guimarães *et al.* (2012), utilizando outro extrato comercial enriquecido com aminoácidos, obteve um aumento de 37,7% em cultura de mamoeiro.

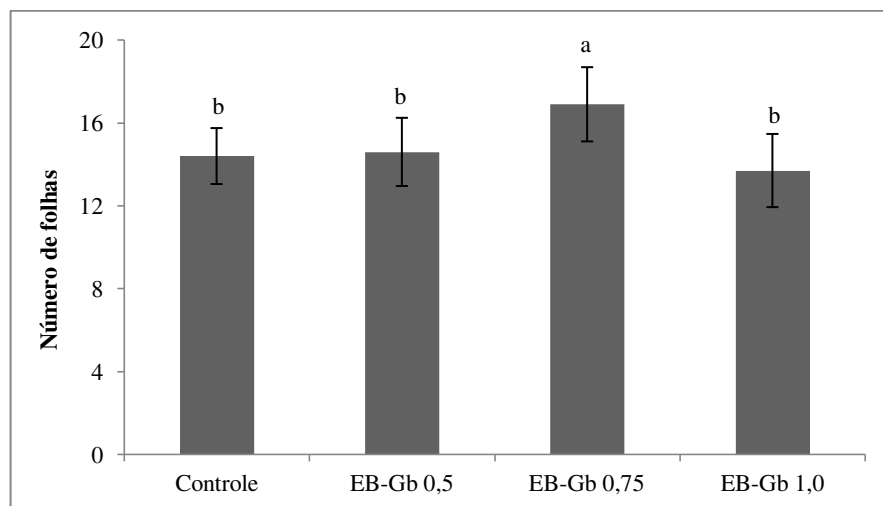
No sistema de produção da alface, o maior número de folhas proporciona maior taxa de fotossíntese e por conseqüência maior será o tamanho e volume da planta (LIMBERGER; GHELLER, 2013). Nas condições em que as plantas foram cultivadas nesse estudo, tal benefício não pode ser explorado, visto que em plantas *in vitro*, principalmente em meio

contendo fontes externas de carboidrato, as taxas fotossintéticas são muito baixas ou até mesmo nulas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Se for pensado em condições *ex vitro*, o resultado do aumento do número de folhas poderia potencializar o resultado já obtido quanto ao tamanho da parte aérea (descrito no item 4.4.1).

**Figura 18.** Tamanho médio da maior folha (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G.birdiae* (EB-Gb) *in vitro*. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19.** Número médio de folhas em mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb) *in vitro*. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Aspecto visual de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido sob o tratamento controle (A) e com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb) a  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  (B).

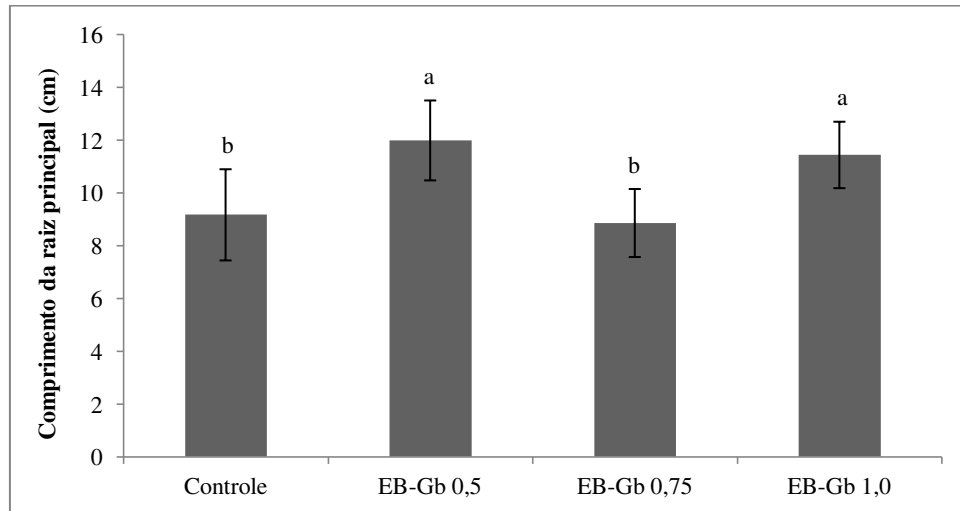


#### 4.4.3. Raízes

O comprimento médio da raiz principal de mudas de alface americana cultivadas na presença de EB-Gb está apresentado na Figura 21. Quanto ao comprimento da raiz principal, observou-se uma diferença significativa nos tratamentos EB-Gb 0,5 (12,0 cm) e EB-Gb 1,0 (11,45 cm) em relação ao controle (9,18 cm), com aumentos de 30,71% e 24,73%, respectivamente. O resultado máximo desse ensaio superou o máximo obtido por Ramya, Vijayanand e Rathinavel (2015) com a aplicação do extrato da macroalga parda *Stoechospermum marginatum* em cultura de berinjela, onde obtiveram um incremento de 24,49% no comprimento da raiz principal. Também foi superior ao resultado obtido por Cecato e Moreira (2013) com a aplicação de extrato de macroalgas dos gêneros *Sargassum* e *Laminaria* em alface crespa cv. *Vera* (13,29%) e por Rayorath *et al.* (2011) com a aplicação de um tipo de extrato de *A. nodosum* em *A. thaliana* (16,9%). Nesse último estudo, a aplicação de outro extrato advindo da mesma espécie de macroalga resultou em um acréscimo no comprimento da raiz de 34%, valor similar ao obtido no presente estudo. Marafon e Simonetti (2016) não obtiveram resultados significativos nesse parâmetro com o uso de extrato de *A. nodosum* em plantas de soja, enquanto que Balakrishnan *et al.* (2007) alcançaram incrementos de 43,29%, 50,5% e 91,55% com a aplicação de extratos de *Padina*

*tetrastromatica*, *Ulva lactuca* e *Gracilaria corticata*, respectivamente, em plantas de *Cyamopsis tetragonolobu*.

**Figura 21.** Comprimento médio da raiz principal (cm) de mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb). Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).

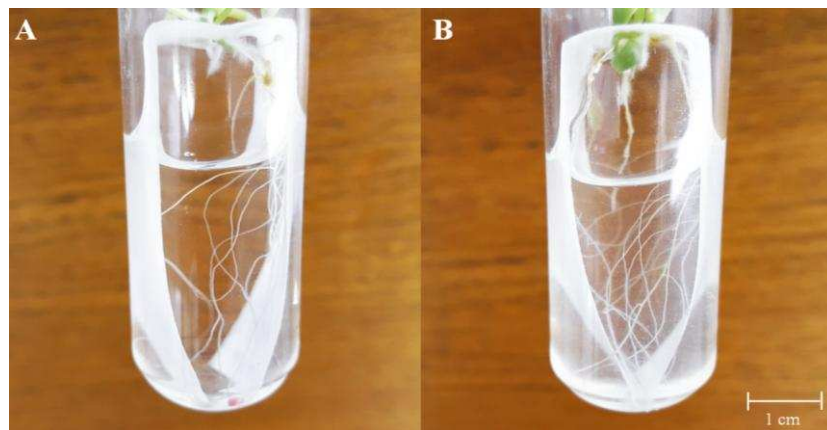


No que diz respeito ao número de raízes laterais, o tratamento EB-Gb 0,75 foi o único que diferiu de maneira significativa do controle, com um aumento de 28,26% (Figuras 22 e 23). Esse foi o único tratamento que não diferiu do controle no parâmetro de comprimento da raiz principal, o que indica que ele foi mais eficiente na promoção do crescimento lateral dessas raízes que do longitudinal. Rayorath *et al.* (2011) observaram que a aplicação de uma auxina exógena (ácido indolacético) em determinadas concentrações em meio de cultura incrementa o número de raízes laterais ao mesmo tempo que suprime o crescimento da raiz principal em *Arabidopsis*, o que poderia explicar o ocorrido no tratamento EB-Gb 0,75, considerando-se que o extrato possui auxina em sua composição. Bai, Christi e Kala (2011) realizaram ensaios em mudas de feijão com aplicação de extrato da macroalga parda *Padina pavonia* e obtiveram um aumento de 24,56% no número de raízes laterais dessas plantas.

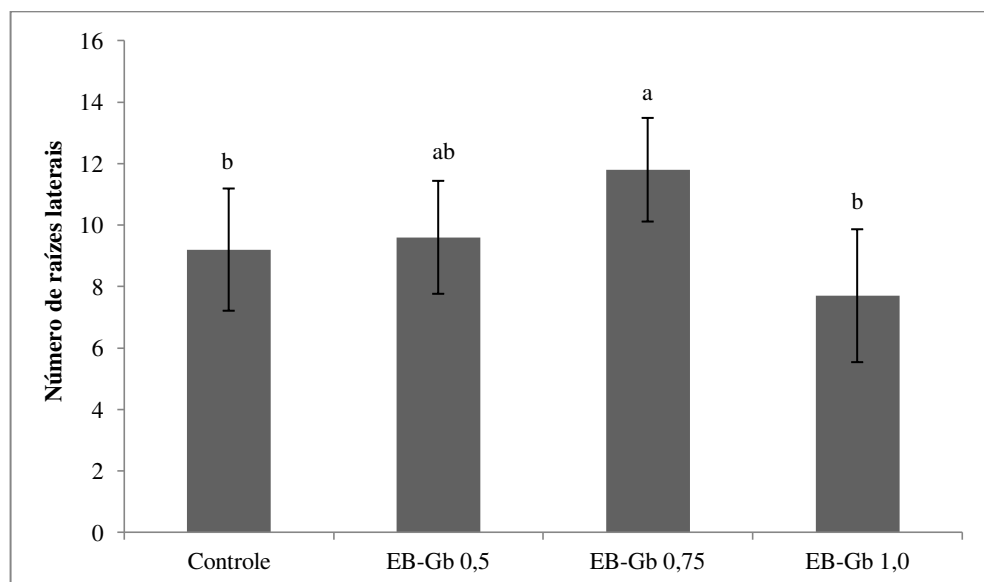
Resultados positivos quanto à estrutura radicular são de grande importância, uma vez que se pode correlacioná-lo com a capacidade das raízes absorverem água e os principais nutrientes disponíveis no solo ou em meios nutritivos. Dessa forma, quanto maior o tamanho, o volume e o número estruturas do sistema radicular, maior será seu potencial de absorção de nutrientes (CECATO; MOREIRA, 2013). Apesar das diferenças quanto ao comprimento e ao

número de raízes, não se observou diferença significativa quanto à massa fresca e à porcentagem de biomassa seca dessas raízes. Binsfeld *et al.* (2014) apontam como os principais responsáveis pelo desenvolvimento radicular em bioestimulantes são as auxinas e as citocininas, por promoverem o alongamento e a divisão celular, respectivamente. Considerando-se, então, que há auxina no extrato EB-Gb e que segundo Khan *et al.* (2009) e Jannin *et al.* (2013) os extratos de macroalgas marinhas promovem a síntese de citocinina, é compreensível o resultado obtido nesse ensaio.

**Figura 22.** Aspecto visual de raízes de mudas de alface americana cultivada *in vitro* em meio líquido (A) e suplementado com de *G. birdiae* (EB-Gb) a  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$  (B) quatro semanas após a aplicação do extrato.



**Figura 23.** Número médio de raízes laterais em mudas de alface americana cultivadas em meio de cultura líquido suplementado com extrato de *G. birdiae* (EB-Gb). Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).



#### 4.4.4. Considerações finais

Todos os resultados obtidos no teste de desenvolvimento com mudas de alface americana são apresentados resumidamente na Tabela 7. Dos nove parâmetros avaliados, o EB-Gb mostrou efeitos significativos em cinco deles, o que mostra que esse produto pode ser utilizado como um insumo agrícola bastante interessante para cultura em questão. As raízes apresentaram as maiores respostas ao tratamento com o extrato de *G. birdiae*, assim como já se tem descrito na literatura para outros extratos de algas marinhas. A maior concentração testada (1,0 g.L<sup>-1</sup>) obteve o menor desempenho quando comparada às demais e os valores máximos de quatro dos cinco parâmetros influenciados pelo EB-Gb se deram quando utilizada a concentração intermediária (0,75 g.L<sup>-1</sup>). Tendo essa concentração como ótima, um próximo passo para esse trabalho será a realização de um teste comparativo entre o EB-Gb e alguns fertilizantes comerciais, de modo a avaliar se sua performance é suficiente para competir no mercado com produtos já bem estabelecidos. Pretende-se ainda, buscar métodos para otimizar a extração a partir da *G. birdiae* para que se possa alcançar um maior rendimento de extração sem, no entanto, aumentar muito os gastos com esse processo, visto que altos rendimentos somados a um baixo custo de produção tornariam o EB-Gb mais atrativo para a indústria.

**Tabela 8.** Resumo dos efeitos do extrato de *G. birdiae* (EB-Gb) sobre mudas de alface americana quando suplementado em meio de nutritivo líquido.

Parâmetro		Aumento observado em relação ao controle		
		EB-GB 0,5	EB-GB 0,75	EB-GB 1,0
Parte aérea	Comprimento	NS	18,47%	NS
	Massa Fresca	NS	NS	NS
	Porcentagem de Massa Seca	7,49%	13,00%	NS
Folhas	Comprimento da maior folha	NS	NS	NS
	Número	NS	17,36%	NS
Raízes	Comprimento da raiz principal	30,71%	NS	24,73%
	Número de raízes laterais	NS	28,26%	NS
	Massa Fresca	NS	NS	NS
	Porcentagem de Massa Seca	NS	NS	NS

\*NS: Não significativo

## 5. CONCLUSÃO

O extrato aquoso obtido de *Gracilaria birdiae* apresentando composição bioquímica constituída principalmente de carboidratos e minerais melhorou a sincronização da germinação de sementes de alface americana e crespa, aumentou a germinabilidade de sementes de alface crespa em condições de estresse por temperatura e apresentou potencial biofertilizante e bioestimulante de plantas, uma vez que promoveu o crescimento da parte aérea e da raiz principal, número de folhas e de raízes laterais e porcentagem de biomassa seca da parte aérea em mudas de alface americana cv. *Rafaela in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRONEGÓCIO. Na contramão da crise, agronegócio deve puxar PIB brasileiro, 2017. Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/agronegocio/agricultura/na-contramao-da-crise-agronegocio-deve-puxar-pib-brasileiro-120108yf1mom1oaf8vua57y9f>>. Acesso em: 09 jul. 2017.

ALBALASMEH, A.A., BERHE, A.A., GHEZZEHEI, T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 253-261, 2013.

ALI, M.Y.S.; RAVIKUMAR, S.; BEULA, J.M. Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Beijing, v. 3, n. 3, p. 196-201, 2013.

ALVES, A.W.S. **Técnicas de maricultura da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* na praia de Flecheiras, Trairi/CE: Efeito de parâmetros ambientais e climáticos sobre a produção de biomassa e extração de ágar**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

AMARAL, C.M.C.; AMARAL, L.A.; JÚNIOR, J.L.; NASCIMENTO, A.A.; FERREIRA, D.S.; MACHADO, M.R.F. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Revista Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1897-1902, Brasil, 2004.

ANDA. **Principais indicadores do setor de fertilizante**. 2017. Disponível em: <[www.anda.org.br/](http://www.anda.org.br/)>. Acesso em: 20 set. 2017.

ARIOLI, T.; MATTNER, S.W.; WINBERG, P.C. Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. **J Appl Phycol**, v. 27, p. 2007-2015, 2015.

ARUN, D.; GAYATHRI, P.K.; CHANDRAN, M.; YUVARAJ, D. Studies on effect of seaweed extracts on crop plants and microbes. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 9, p. 4235-4240, 2014.

AZIZ, N.G.A.; MAHGOUB, M.H.; SIAM, H.S. Growth, flowering and chemical constituents performance of *Amaranthus tricolor* plants as influenced by seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract application under salt stress conditions. **Journal of Applied Sciences Research**, Ma'am, v. 7, n. 11, p. 1472-1484, 2011.

BAGHEL, R.S.; TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; NEORI, A.; CHENNUR, R.R.; LALI, A.M.; JHA, B. Biorefining of marine macroalgal biomass for production of biofuel and commodity chemicals. **Green Chem.**, v. 17, n. 4, p. 2436-2443, 2015.

BAI, N.R.; CHRISTI, R.M.; KALA, T.C. Effect of seaweed concentrate of *Padina pavonia* on the growth and yield of a pulse crop. **Plant archives**, v. 11, n. 1, 2011.

BALAKRISHNAN, C.P.; KUMAR, V.; MOHAN, V.R.; ATHIPERUMALSAMI, A.T. Study on the effect of crude seaweed extracts on seedling growth and biochemical parameters in *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. **Plant Archives**, v. 7, n. 2, 563-567, 2007.

BARATTO, L.; LANG, K.L.; VANZ, D.C.; REGINATTO, F.H.; OLIVEIRA, J.B.; FALKENBERG, M. Investigation of the allelopathic and antimicrobial activities of *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtained in hydroponic and traditional cultivars. **Rev. bras. farmacogn**, v. 18, n. 4, 2008.

BERALDO, J.B.L.; FIGUEIREDO, M.G. Formação do preço de fertilizantes em Mato Grosso. **Revista de Política Agrícola** (MAPA), n. 3, p. 16-20, 2016.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2. ed. New York: **Plenum Press**, 445 p, 1994.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M.W.; SAHOO, R.K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microb Cell Fact**, 13: 66, 2014.

BINSFELD, J.A.; BARBIERI, A.P.P.; HUTH, C.; CABRERA, I.C.; HENNING, L.M.M. Uso de bioativador, bioestimulante e complexo de nutrientes em sementes de soja. **Pesq. Agropec. Trop.**, v.44, n. 1, p. 88-94, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.7, n.72, p. 248-254, 1956.

BRASIL. Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jan. 2004. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm)>. Acesso em: 10 set. 2017.

BRITO, T.V.; NETO, J.P.; PRUDÊNCIO, R.S.; BATISTA, J.A.; JÚNIOR, J.S.; SILVA, R.O.; FRANCO, A.X.; ARAGÃO, K.S.; SOARES, P.M.; SOUZA, M.H.; CHAES, L.S.; FREITAS, A.L.; MEDEIROS, J.V.; BARBOSA, A.L. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1161-1170, 2014.

BONNANO, G.; ORLANDO-BONACA, M. Trace elements in Mediterranean seagrasses and macroalgae. A review. **Sci Total Environ**, 2017.

CARVALHO FILHO, J. Algas - Uma alternativa para comunidade pesqueira. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 84, p. 53-56, 2004.

CARVALHO, M.E.A.; CASTRO, P.R.C. Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. **Boletim**, n. 32, Série Produtor Rural, USP/ESALQ/DIBD, Piracicaba, 46 p, 2006.

CARVALHO, M.E.A.; CASTRO, P.R.C.; NOVENBRE, A.D.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Seaweed extract improves the vigor and provides the rapid emergence of dry bean seeds. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, Dubai, v. 13, p. 1104-1107, 2013.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. Guaíba: **Agropecuária**, 132p, 2001.

CECATO, A.; MOREIRA, G.C. Aplicação de extrato de algas em alface. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 6, n. 2, p. 89-96, 2013.

CHATTERJEE, A.; SINGH, S.; AGRAWAL, C.; YADAV, S.; RAI, R.; RAI, L.C. **Role of Algae as a Biofertilizer**: Recent Progress in Biotechnology. Ed. 1. India: Elsevier, 336p, 2017.

CHITRA, G., SREEJA, P.S. A comparative study on the effect of seaweed liquid fertilizers on the growth and yield of *Vigna radiata* (L.). **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 12, n. 2, p. 359-362, 2013.

COSTA, C.O.; SALA, F.C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, 2005.

CROUCH, I.J.; VAN STADEN, J. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. **Plant Growth Regul**, v. 13, p. 21-29, 1993.

DAVIDSON, A. E. VITOUSEK, P.M.; MATSON, P.A.; RILEY, R.; GARCÍA-MÉNDEZ, G.; MAASS, J.M. Soil emissions of nitric oxide in a seasonally dry tropical forest of México. **Journal of geophysical**, v. 96, n. D8, p. 15439-15445, 1991.

DEMIR, N.; DURAL, B.; YILDIRIM, K. Seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1130-1133, 2006.

DEVI, N.L., MANI, S. Effect of seaweed saps *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria* on growth, yield and quality of rice. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 19, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

ECYCLE. O uso de fertilizantes é um problema sem solução na agricultura? 2015. Disponível em: <<http://www.ecycle.com.br/component/content/article/35/1329-como-o-que-uso-fertilizantes-agricultura-emissoes-desequilibrio-efeito-estufa-problema-aquecimento-global-contaminacao-meio-ambiente.html>>. Acesso em: 10 set. 2017.

ERVIN, E.H.; ZHANG, X.; FIKE, J.H. Ultraviolet-b radiation damage on Kentucky bluegrass II: Hormone supplement effects. **HortScience**, Alexandria, v. 39, p. 1471-1474, 2004.

FÁBIO, A.C. Algas vermelhas do Nordeste são usadas na produção de cerveja e doces. 2013. Disponível em: <<https://economia.uol.com.br/agronegocio/noticias/redacao/2013/09/27/usadas-na-producao-de-cerveja-algas-sao-cultivadas-no-nordeste-brasileiro.htm#fotoNav=2>>. Acesso em: 04 dez. 2017.

FALCHINI, L.; SPARVOLI, E.; TOMASELLI, L. Effect of Nostoc (cyanobacteria) inoculation on the structure and stability of clay soils. **Biol. Fert. Soils**, v. 23, p. 246-252, 1996.

FERNADES, A.L.T.; SILVA, R.O. Avaliação do extrato de algas (*Ascophyllum nodosum*) no desenvolvimento vegetativo e produtivo do cafeeiro irrigado por gotejamento e cultivado em condições de cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 147-157, 2011.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; HAMLAOUI, S.; PRADO, J.F. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Ed 1. Artmad: Porto Alegre, 332p, 2010.

FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIN, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas, Instituto Agrônômico. Boletim técnico, n. 180, 52 p, 1999.

GARAGOUNIS, I.; KYRIAKOU, V.; SKODRA, A.; VASILEIOU, E.; STOUKIDES, M. Electrochemical Synthesis of Ammonia in Solid Electrolyte Cells. **Front. Energy Res.**, v. 2, p. 1-10, 2014.

GARDISSAL, C.D. A method of treating and preparing seaweeds or marine plants for manure. **British Patent** vol. XXIX, January–June, 1857.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

GOLDIN, A. Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils. **Commun. Soil Sci. Plant. Anal.**, v. 18, p. 1111-1116, 1987.

GOMES, J.S.; MARINHO, D.; NETO, J.C.A.; TEXEIRA, D.I.A.; MOURA, M.F.V. **Composição centesimal da alga *Gracilaria birdiae* (Gracilariales Rhodophyta) adquirida na praia de Pitangui-RN**. Apresentado no 1º Simpósio Nordestino de Química, 2015. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/sinequi/2015/trabalhos/100/6559-19596.html>>. Acesso em: 09 jul. 2017.

GONZÁLEZ, A.; CASTRO, J.; VERA, J.; MOENNE, A. Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. **J Plant Growth Regul**, v. 32, p. 443-448, 2013.

GUARATINI, T.; LOPES, N.P.; MARINHO-SORIANO, E.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 4, p. 724-729, 2012.

GUIMARÃES, I.P.; BENEDITO, C.P.; CARDOSO, E.A.; PEREIRA, F.E.C.B.; OLIVEIRA, D.M. Avaliação do efeito do uso do extrato de alga (raiza®) no desenvolvimento de mudas de mamão. **Enciclopédia biosfera**, v. 8, n. 15, p. 312-320, 2012.

HABER, L.L.; MOREIRA, G.C.; TONIN, F.B.; GOTO, R.; VALENTE, M.C. Alelopatia do extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum* na germinação de cenoura e tomate. In: **XLVI Congresso Brasileiro De Olericultura**, Goiânia, 2461-2464, 2006.

HENZ, G.P.; SUINAGA, F. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Comunicado técnico (EMBRAPA)**, nº75, 2009.

HERNÁNDEZ-HERRERA, R.M.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; RUIZ-LÓPEZ, M.A.; NORRIE, J.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). **J Appl Phycol**, v. 26, p. 619–628, 2014.

HERNÁNDEZ-HERRERA, R.M.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; ZAÑUDO-HERNÁNDEZ, J.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. Activity of seaweed extracts and polysaccharide-enriched extracts from *Ulva lactuca* and *Padina gymnospora* as growth promoters of tomato and mung bean plants. **J Appl Phycol**, v. 28, p. 2549–2560, 2016.

HERVÉ, R.A.; ROULLIER, D.L. Method and apparatus for communiting (sic) marine algae and the resulting product. **U.S. Patent** 4,023,734, 1977.

HONG, D.D.; HIEN, H.M.; SON, P.N. Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. **J Appl Phycol**, v. 19, p. 817-826, 2007.

HUNTER, D. C.; BURRITT, D. J. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 2, p. 215-220, 2004.

IBGE. **Indicadores IBGE: Contas Nacionais Trimestrais (Janeiro/março 2017)**. 2017. Disponível em: < ftp://ftp.ibge.gov.br/ >. Acesso em: 09 jul. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

IPNI. **Consumo aparente de fertilizantes e matérias-primas**. 2017. Disponível em: <http://brasil.ipni.net/>. Acesso em: 20 set. 2017.

IPNI. Simpósio discute como utilizar insumos e recursos para otimizar a produtividade do milho. **Informações agronômicas**, n. 122, 2008.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. **Food Reviews International**, v. 5, n. 1, 1989.

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; ETIENNE, P.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; SAN FRANCISCO, S.; BAIGORRI, R.; CRUZ, F.; HOUDUSSE, F.; GARCIA-MINA, J.; YVIN, J.; OURRY, A. *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. **J Plant Growth Regul**, v. 32, p. 31-52, 2013.

KALAIVANAN, C.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Effect of seaweed liquid extract of *Caulerpa scalpelliformis* on growth and biochemical constituents of black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). **Phykos**, v. 42, n.2, p. 46-53, 2012.

KAVIPRIYA, R.; DHANALAKSHMI, P.K.; JAYASHREE, S.; THANGARAJU, N. Seaweed extract as a biostimulant for legume crop, green gram. **Journal of Ecobiotechnology**, Vidyanagar, v. 3, n. 8, p. 16-19, 2011.

KHAN, W.; RAYIRATH, U.P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M.N.; RAYORATH, P.; HODGES, D.M.; CRITCHLEY, A.T.; CRAIGIE, J.S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 4, 386-399, 2009.

KINCH, J.; BAGITA, J.; BATE, M. Exploring the potential for seaweed farming in Milne Bay Province, Papua New Guinea. **SPC Fish Newsl**, v. 104, p. 25-31, 2003.

- KLAHOLD, C. A.; GUIMARÃES, V. F.; ECHER, M. M.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R. L.; BECKER, A. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 179-185, 2006.
- KOO, R.C.J.; MAYO, S. Effects of seaweed sprays in citrus fruit production. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Science**, Tampa, v. 107, p. 82-85, 1994.
- KUDA, T.; IKEMORE, T. Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. **Food Chemistry**, v. 112, p. 575–581, 2009.
- KUMAR, G.; SAHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 251-255, 2011.
- KYRIAKOU, V.; GARAGOUNIS, I.; VASILEIOU, E.; VOURROS, A.; STOUKIDES, M. Progress in the electrochemical synthesis of ammonia. **Catalysis Today**, v. 286, p. 2-13, 2017.
- LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.
- LARCHER, W.; PRADO, C.H.D.A. **Ecofisiologia vegetal**, p. 341-418, 2000.
- LOLA-LUZ, T.; HENNEQUART, F.; GAFFNEY, M.T. Enhancement of phenolic and flavonoid compounds in cabbage (*Brassica oleracea*) following application of commercial seaweed extracts of the brown seaweed (*Ascophyllum nodosum*). **Agricultural and Food Science**, Jokioinen, v. 22, p. 288-295, 2013.
- LOPES, M.C.; FREIER, M.; MATTE, J.C.; GÄRTNER, M.; FRANZENER, G.; NOGAROLLI, E.L.; SEVIGNANI, A. Acúmulo de nutrientes por cultivares de alface em cultivo hidropônico no inverno. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 211-215, 2003.
- LUZ, J.M.Q.; GUIMARÃES, S.T.M.R.; KORNDÖRFER, G.H. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 295-300, 2006.

MANILAL, A.; SUJITH, S.; KIRAN, G.S.; SELVIN, J.; SHAKIR, C.; GANDHIMATHI, R.; PANIKKAR, M.V.N. Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 67-73, 2009.

MANTRI, V.A., CHAUGULE, B.B. In-situ and ex-situ evaluation of seaweed liquid fertilizers on seed germination, early growth and chlorophyll content of *Trigonella foenum graecum* Linn. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 78, n. 2, p. 158-163, 2008.

MARAFON, F.; SIMONETTI, A.P.M.M. Formas de aplicação e dosagens do extrato de algas na cultura da soja. In: **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia**. Foz do Iguaçu, PR. Rafain Palace Hotel & Convention Center. 2016.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995, 889p.

MATYSIAK, K.; KACZMAREK, S.; KRAWCZYK, R. Influence of seaweed extracts and mixture of humic and fulvic acids on germination and growth of *Zea mays* L. **Acta Scientiarum Polonorum**, v. 10, n. 1, p. 33-45, 2011.

MILTON, R.F. Improvements in or relating to horticultural and agricultural fertilizers. **Patent Office London**, No. 664:989, 1952.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAIR P.; KANDASAMY, S.; ZHANG, J.; JI, X.; KIRBY, C.; BENKEL, B.; HODGES, M.D.; CRITHLEY, A.T.; HILTZ, D.; PRITHIVIRAJ, B. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 643-665, 2012.

OHSE, S.; RAMOS, D.M.R.; CARVALHO, S.M.; FETT, R.; OLIVEIRA, J.L.B. Composição centesimal e teor de nitrato em cinco cultivares de alface produzidas sob cultivo hidropônico. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 407-414, 2009.

OLIVEIRA, E.C. Macroalgas Marinhas de Valor Comercial: Técnicas de cultivo. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro. v. 7, n. 42, p. 42-45. 1997.

OLIVEIRA, L.C.B.P. **Propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga comestível *Gracilaria birdiae***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

OTTO, R.F.; REGHIN, M.Y.; SÁ, G.D. Utilização do ‘não tecido’ de polipropileno como proteção da cultura de alface durante o inverno de Ponta Grossa - PR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 49-52, 2001.

PÂMELA ANDRESSA LIMBERGER, P.A.; GHELLER, J.A. Efeito da aplicação foliar de extrato de algas, aminoácidos e nutrientes via foliar na produtividade e qualidade de alface crespa. **Cultivando o saber**, v. 6, n. 2, p. 14-21, 2013.

PAULERT, R., EBBINGHAUS, C.; URLASS, C.; MOERSCHBACHER, B.M. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. **Plant Pathology**, v. 59, p. 634-642, 2010.

PÉREZ, R. Ces algues qui nous entourent. In: Arbault S, Barbaroux O, Phliponeau P, Rouxel C, editors. **Aquaculture**. Plouzané (France): Editions IFREMER, p. 65-178, 1997.

PINTO, P.A.C.; SANTOS, N.G.N.; GERMINO, G.F.S.; DEON, T.D.; SILVA, A.J. Eficiência agrônômica de extratos concentrados de algas marinhas na produção da alface em neossolo flúvico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S3980-S3986, 2010.

PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatocyst conceptacles. **Phycologia**, v. 41, p. 389-396, 2002.

PLASTINO, E.M.; URSI, S.; FUJII, M.T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (*Gracilaria*, Rhodophyta). **Phycol. Res.**, v. 52, p. 45-52, 2004.

PRAMANICK, B.; BRAHMACHARI, K.; GHOSH, A.; ZODAPE, S.T. Effect of seaweed saps on growth and yield improvement of transplanted rice in old alluvial soil of west bengal. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 53-58, 2014.

PRAMANICK, B.; BRAHMACHARI, K.; MAHAPATRA, B.S.; GHOSH, A.; GHOSH, D.; KAR, S. Growth, yield and quality improvement of potato tubers through the application of seaweed sap derived from the marine alga *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-8, 2017.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. Manual de procedimentos de laboratório de cultura de tecidos vegetais da Embrapa Amazônia Ocidental. **Documentos (EMBRAPA)**, n. 61, 46p, 2008.

RAMYA, S.S.; VIJAYANAND, N.; RATHINAVEL, S. Foliar application of liquid biofertilizer of brown alga *Stoechospermum marginatum* on growth, biochemical and yield of *Solanum melongena*. **Int J Recycl Org Waste Agricult**, v. 4, p. 167-173, 2015.

RATHORE, S.S.; CHAUDHARY, D.R.; BORICHA, G.N.; GHOSH, A.; BHATTA, B.P.; ZODAPE, S.T.; PATOLIA, J.S. 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.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHONNORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1996.

RAVERKAR, K.P.; PAREEK, N.; CHANDRA, R.; CHAUHAN, S.; ZODAPE, S.T.; GHOSH, A. Impact of foliar application of seaweed saps on yield, nodulation and nutritional quality in green gram (*Vigna radiata* L). **Legume Research**, v. 39, n. 2, p. 315-318, 2016.

RAYORATH, P.; KHAN, W.; PALANISAMY, R.; MACKINNON, S.L.; STEFANOVA, R.; HANKINS, S.D.; CRITCHLEY, A.T. PRITHIVIRAJ, B. Extracts of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* induce gibberellic acid (GA3)-independent amylase activity in barley. **Journal of Plant Growth Regulation**, Secaucus, v. 27, p. 370-379, 2008.

RAYORATH, P.; MUNDAYA, M.N.; FARID, A.; KHAN, W.; PALANISAMY, R.; HANKINS, S.D.; CRITCHLEY, L.T.; PRITHIVIRAJ, B. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **J Appl Phycol**, 20 (4), p. 423-429, 2008.

REVATHI, S., ALEXANDER, N.C. Effect of the seaweed *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux on the growth and productivity of *Solanum melongena* L. **Proceedings of the International Conference on Green Technology and Environmental Conservation**, GTEC-2011, art. no. 6167650, p. 266-271, 2011.

RIVERO, F.; FALLARERO, A.; CASTAÑEDA, O.; DAJAS, F.; MANTA, E.; ARECES, F.; MANCINI FILHO, J.; VIDAL, A. Antioxidant activity *in vivo* and *in vitro* of *Halimeda incassata* aqueous extracts. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 256-263, 2003.

RODRIGUES, R.B.; OZORIO, L.M.; PINTO, C.L.B.; BRANDÃO, L.E.T. Opção de troca de produto na indústria de fertilizantes. **Revista de Administração**, v. 50, n. 2, p. 129, 2015.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. **Hortic. Bras.** v. 30, n.2, 2012.

SELVAM, G.G.; SIVAKUMAR, K. Influence of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth and yield of *Arachis hypogea* L. and their elemental composition using SEM-Energy Dispersive Spectroscopic analysis. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 18-22, 2014.

SELVAM, G.G.; SIVAKUMAR, K. Micromorphological study of *Vigna mungo* L. using Seaweed liquid fertilizer from *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux. **Indian Journal of Geo-Marine Science**, v. 45, n. 9, p. 1199-1207, 2016.

SELVAN, G.G.; SIVAKUMAR, K. Effect of spray from seaweed liquid fertilizer of *Ulva reticulata* (Forsk.) on *Vigna mungo* L. and their elemental composition using SEM - energy dispersive spectroscopic analysis. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 119-125, 2013.

SHAH, M.T.; ZODAPE, S.T.; CHAUDHARY, D.R.; ESWARAN, K.; CHIKARA, J. Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36 n. 2, p. 192-200, 2013.

SHARMA, L.; BANERJEE, M.; MALIK, G.C.; GOPALAKRISHNAN, V.A.K.; ZODAPE, S.T.; GHOSH, A. Sustainable agro-technology for enhancement of rice production in the red and lateritic soils using seaweed based biostimulants. **Journal of Cleaner Production**, v. 149, p. 968-975, 2017.

SILVA, C.P.; GARCIA, K.G.V.; SILVA, R.M.; OLIVEIRA, L.A.A.; TOSTA, M.S. Desenvolvimento inicial de mudas de couve-folha em função do uso de extrato de alga (*Ascophyllum nodosum*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 7-11, 2012a.

SILVA, P.M. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, R.O.; SANTANA, A.P.M.; CARVALHO, N.S.; BEZERRA, T.S.; OLIVEIRA, C.B.; DAMASCENO, S.R.B.; CHAVES, L.S.; FREITAS, A.L.P.; SOARES, P.M.G.; SOUZA, M.H.L.P.; BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.R.. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine Drugs**, v. 10, n.12, p. 2618-2633, 2012b.

SINGH, S.; SINGH, M.K.; PAL, S.K.; TRIVEDI, K.; YESURAJ, D.; SINGH, C.S.; VIJAY ANAND, K.G.; CHANDRAMOHAN, M.; PATIDAR, R.; KUBAVAT, D.; ZODAPE, S.T.; ARUP GHOSH. Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 2099–2112, 2016.

SINGH, S.K.; THAKUR, R.; SINGH, M.K.; SINGH, C.S.; PAL, S.K. Effect of fertilizer level and seaweed sap on productivity and profitability of rice (*Oryza sativa*). **Indian Journal of Agronomy**, v. 60, n. 3, p. 420-425, 2015.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v.11, p.118-131, 1957.

SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; TEIXEIRA, J.A.; COIMBRA, M.A.; VICENTE, A.A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.

SOUZA, H.A.; MENDONÇA, V.; RAMOS, J.D.; FERREIRA, E.A.; ALENCAR, R.D. Doses de Lithothamnium e Diferentes substratos na produção de mudas de maracujazeiro doce. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 4, p. 24-30, 2007.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. Manual de Horticultura orgânica. Viçosa: **Aprenda Fácil**, 2003. 564 p.

SPANN, T.M.; LITTLE, H.A. Applications of a commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* increases drought tolerance in container-grown ‘Hamlin’ sweet orange nursery trees. **Hortscience**, Alexandria, v. 46, n. 4, p. 577-582, 2011.

SPINELLI, F.; FIORI, G.; NOFERINI, M.; SPROCATTI, M.; COSTA, G. A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 263-269, 2010.

STADNIK, M.J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. In: **XI Congresso Brasileiro de Ficologia**. Rio de Janeiro, RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro. p. 267-279, 2008.

STOLLER, J.; LECLERE, S.; LIPTAY, A. Methods for improving growth and crop productivity of plants by adjusting plant hormone levels, ratios and/or co-factors. **U.S. Patent**, 20050197253, 2005.

SUBRAMANIAN, S.; SANGHA, J.S.; GRAY, B.A.; SINGH, R.P.; HILTZ, D.; CRITCHLEY, A.T.; PRITHIVIRAJ, B. Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Eur J Plant Pathol**, v. 131, p. 237-248, 2011.

SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Suppression of Root Rotting Fungi and Root Knot Nematode of Chili by Seaweed and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 7-8, p. 390-395, 2008.

SULTANA, V.; BALOCH, G.N.; AMBREEN; ARA, J.; TARIQ, M.R.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Comparative efficacy of a red alga *Solieria robusta*, chemical fertilizers and pesticides in managing the root diseases and growth of soybean. **Pak. J. Bot**, v. 43, n. 1, p. 1-6, 2011.

SUNARPI; JUPRI, A.; KURNIANINGSIH, R.; JULISANIAH, N.I.; NIKMATULLAH, A. Effect of seaweed extracts on growth and yield of rice plants. **Nusantara Bioscience**, Surakarta, v. 2, p. 73-77, 2010.

UDSEN, S. **O mercado de folhosas: números e tendências**. Folhosas Seminário Nacional, Campinas, 2016. Disponível em: <[www.abcsem.com.br/](http://www.abcsem.com.br/)>. Acesso em: 20 set. 2017.

VASCONCELOS, A. C. F. **Uso de Bioestimulantes nas culturas de milho e soja**. 112 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2006.

VASCONCELOS, B.M.F.; ARRUDA, A.M.V. Uso de gracilaria no desempenho de frango de corte. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 20, ed. 269, Art. 1797, 2014.

VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydr Res**, v. 339, p. 2309-13, 2004.

VERA, J.; CASTRO, J.; GONZALEZ, A.; MOENNE, A. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Mar Drugs**, v. 9, p. 2514–2525, 2011.

VIJAYANAND, N.; RAMYA, S.S.; RATHINAVEL, S. Potential of liquid extracts of *Sargassum wightii* on growth, biochemical and yield parameters of cluster bean plant. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 150-155, 2014.

YOKOYA, N.S.; STIRK, W.A.; STADEN, J.V.; NOVÁK, O.; TUREČKOVÁ, V.; PĚNČÍK, A.; STRNAD, M. Endogenous cytokinins, auxins, and abscisic acid in red algae from Brazil. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 6, p. 1202, 2010.

ZHANG, X.; ERVIN, E.H. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1737-1745, 2004.

ZHU, H.; SUN, L.F.; ZHANG, Y.F.; ZHANG, X.L.; QIAO, J.J. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7. **Bioresour. Technol.**, v. 111, p. 410–416, 2012.

ZIA, K.M.; ZUBER, M.; ALI, M. **Algae based polymers, blends, and composites: chemistry, biotechnology and materials science**. Ed 1. Elsevier: EUA, 2017.

ZODAPE, S.T.; KAWARKHE, V.J.; PATOLIA, J.S.; WARADE, A.D. Effect of liquid seaweed fertilizer on yield and quality of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 12, p. 1115–1117, 2008.

ZODAPE, S.T.; MUKHOPADHYAY, S.; ESWARAN, K.; REDDY, M.P.; CHIKARA, J. Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L.) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 69, n. 6, p. 468–471, 2010.

**ANEXO A.** Importância dos macro e micronutrientes e sintomas relacionados à sua deficiência.

Macronutrientes	Importância	Deficiência
Nitrogênio (N)	Constituinte de muitos compostos da planta, incluindo todas as proteínas e ácidos nucleicos.	Inibição do crescimento da planta. Clorose nas folhas velhas. Queda das folhas. Acúmulo de antocianina nos vacúolos (produz coloração púrpura).
Fósforo (P)	Componente de açúcares-fosfato (glicose 6P, Frutose 6P, etc), fosfolipídios de membranas, ácidos nucleicos e nucleotídeos usados como fonte de energia (ATP).	Coloração verde-escura de folhas mais velhas associada ao aparecimento da cor púrpura, devido ao acúmulo de antocianina.
Potássio (K)	Executa importante papel na regulação do potencial osmótico de células de plantas. É também requerido para a ativação de muitas enzimas da respiração e da fotossíntese.	Clorose marginal, que se desenvolve como necrose a partir do ápice, inicialmente nas folhas maduras.
Enxofre (S)	Constituinte de compostos da planta (acetil-CoA, glutationa, etc) e das proteínas (encontrado nos aminoácidos cisteína e metionina).	Redução do crescimento da planta. Clorose inicialmente nas folhas jovens. Acúmulo de antocianina.
Cálcio (Ca)	Síntese de novas paredes celulares. Requerido para o funcionamento normal da membrana plasmática. Tem sido implicado como mensageiro secundário para várias respostas de planta relacionadas com o ambiente e sinais hormonais.	Necrose de regiões meristemáticas (como ápices de raízes e da parte aérea).
Magnésio (Mg)	Ativação de enzimas da respiração, da fotossíntese e da síntese de ácidos nucleicos. É também parte da estrutura da molécula de clorofila (pigmento associado à fotossíntese).	Clorose internervural, que ocorre primeiro nas folhas velhas.
Micronutrientes	Importância	Deficiência
Ferro (Fe)	Componente de proteínas envolvidas na transferência de elétrons, como os citocromos e os centros Fe-S.	Clorose internervural, que ocorre primeiro nas folhas mais novas.
Cobre (Cu)	Está associado a algumas enzimas envolvidas nas reações redoxes. O principal exemplo é o complexo citocromo oxidase da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (respiração). Outro exemplo é a plastocianina, a qual está envolvida na transferência de elétrons durante as reações de luz da fotossíntese.	Produção de folhas verde-escuras, que podem conter manchas necróticas. Queda prematura das folhas.
Zinco (Zn)	Co-fator de enzimas como desidrogenase alcoólica, anidrase carbônica, superóxido dismutase, etc. Pode ser requerido para biossíntese de clorofila em algumas espécies. Há evidências de que pode ser requerido para a biossíntese do triptofano, o qual é um dos precursores da auxina natural, ácido indol-3-acético (AIA).	Redução no crescimento internodal.
Manganês (Mn)	Co-fator de enzimas como descarboxilases e desidrogenases envolvidas no ciclo de Krebs (respiração). Participação na reação da fotossíntese na qual o O <sub>2</sub> é produzido a partir da água (H <sub>2</sub> O).	Clorose internervural associada com pequenas manchas necróticas

Molibdênio (Mo)	Componente de algumas enzimas, incluindo a reductase do nitrato e a nitrogenase, enzimas envolvidas na redução de nitrato para nitrito ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) e de nitrogênio atmosférico para amônio ( $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$ ), respectivamente.	Pode aparecer como deficiência de nitrogênio se a fonte de N for o nitrato ou se a planta depende da fixação biológica de $\text{N}_2$ .
Boro (B)	Evidências sugerem que ele executa papéis importantes no alongamento da célula, na síntese de ácidos nucleicos, nas respostas a hormônios e na integridade estrutural da parede celular.	Necrose de folhas jovens e gemas terminais. Perda da dominância apical. Estruturas como frutos e tubérculos podem exibir necroses ou anormalidades relacionadas com a degradação de tecidos internos.
Cloro (Cl)	Requerido na etapa da fotossíntese em que $\text{O}_2$ é produzido (foto-oxidação da $\text{H}_2\text{O}$ ).	Não tem sido verificada em plantas no campo. Ao contrário, em ambientes salinos as plantas podem acumular cloreto nas folhas em níveis tóxicos, produzindo a necrose de tecidos foliares.
Sódio (Na)	A maioria das espécies que utiliza as rotas C4 e CAM de fixação de carbono requerem íons sódio para a regeneração do fosfoenolpiruvato. Estimula o crescimento por meio de uma maior expansão celular, além de poder parcialmente substituir o potássio como um soluto osmoticamente ativo.	As plantas exibem clorose e necrose ou deixam de florescer.
Níquel (Ni)	Co-fator da enzima urease.	Acúmulo de uréia nas folhas, o que pode causar necrose no ápice.
Silício (Si)	Algumas espécies acumulam silício em seus tecidos e apresentam melhoria no seu crescimento e na fertilidade. Ele também forma complexos com polifenóis e serve como alternativa à lignina no reforço de paredes celulares. Pode aliviar a toxicidade de muitos metais pesados.	Suscetividade ao acamamento e à infecção fúngica.

**Fonte:** Marschner (1995).