

**Cultivo e Caraterização Bioquímica de *Chondracanthus acicularis*:
Adaptação a Parâmetros Ambientais em Condições de Laboratório**

Andreia Vitorino Soares de Sousa

**Cultivo e Caraterização Bioquímica de *Chondracanthus acicularis*:
Adaptação a Parâmetros Ambientais em Condições de Laboratório**

Andreia Vitorino Soares de Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Teresa Margarida Lopes
da Silva Mougá e coorientação da Doutora Clélia Paulete Correia Neves Afonso

2024

Título: Cultivo e Caracterização Bioquímica de *Chondracanthus acicularis*: Adaptação a Parâmetros Ambientais em Condições de Laboratório

Copyright © Andreia Vitorino Soares de Sousa

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A conclusão desta tese de mestrado representa o culminar de um percurso que não seria possível sem o apoio e contributo de muitas pessoas e instituições.

Gostaria de expressar a minha gratidão à Professora Doutora Teresa Mouga, pela orientação, paciência e dedicação ao longo de todo o processo. A sua visão científica e as suas palavras de encorajamento foram essenciais para a realização deste trabalho. À Professora Doutora Clélia Afonso, agradeço a disponibilidade e o contributo valioso, que enriqueceram significativamente esta investigação.

Agradeço também à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e ao MARE – Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, pela oportunidade de desenvolver esta investigação num ambiente de excelência. Reconheço, ainda, o apoio técnico e logístico proporcionado pelo CeteMares – Centro de I&D, Formação e Divulgação do Conhecimento Marítimo que foi imprescindível para a execução das atividades experimentais.

À Marta e ao Leonardo, agradeço todas as formações, as trocas de ideias e o auxílio nos momentos desafiantes.

Aos meus colegas de mestrado e de laboratório, em especial aos que me acompanharam também na licenciatura, Henrique, Joana e Victoria. Este trabalho não teria sido o mesmo sem o espírito de colaboração e amizade que encontrei em cada um de vós.

À minha família, expresso a minha mais profunda gratidão pelo apoio incondicional e pelo incentivo constante ao longo deste percurso. Aos meus amigos, que foram apoio e descontração. Ao meu namorado, Matheus, que esteve sempre ao meu lado, que me ofereceu palavras de conforto e compreensão nos momentos mais exigentes.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, seja através de palavras de encorajamento, sugestões valiosas ou simples gestos de apoio. A todos, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

A macroalga vermelha *Chondracanthus acicularis* destaca-se pela sua relevância ecológica e biotecnológica, sendo uma fonte de compostos bioativos com aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. Estudos sobre o seu cultivo, porém, são muito escassos. Este estudo teve, assim, como objetivo investigar o cultivo laboratorial desta espécie, analisando o impacto de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento, produtividade e composição bioquímica da biomassa. Ensaio de 14 dias foram realizados utilizando três meios de cultura [Von Stosch Enrichment (VSE), Provasoli Enriched Seawater (PES) e Nutribloom Plus (NB)] e três fontes de luz (branca, LED vermelha e LED azul), sob um fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro).

Os resultados indicaram que o meio PES, quando combinado com luz LED vermelha, proporcionou as melhores condições de cultivo, com uma taxa média de crescimento relativo (TCR) de 1,0 % dia⁻¹. Por outro lado, o meio NB e a luz LED azul resultaram em TCR negativa, revelando condições inadequadas para o desenvolvimento da alga. A biomassa cultivada em PES e luz branca também apresentou valores mais elevados de produtividade (39,9 g PS m⁻³ dia⁻¹), reforçando a eficiência destas condições.

As análises bioquímicas mostraram concentrações superiores de ficoeritrina (55,26 µg mL⁻¹) e ficocianina (8,50 µg mL⁻¹) nas condições de luz branca e azul, respectivamente, destacando a influência da luz na síntese de pigmentos. A biomassa cultivada apresentou um teor de matéria orgânica superior (72,94 % PS) em comparação com a biomassa selvagem (69,20 % PS), confirmando a viabilidade do cultivo controlado para maximizar a produção de compostos de interesse biotecnológico.

Conclui-se que o cultivo laboratorial de *C. acicularis* é uma alternativa sustentável à colheita selvagem, promovendo a exploração racional dos recursos naturais marinhos. Este estudo reforça a importância de parâmetros como o meio de cultura e o tipo de luz no desenvolvimento de estratégias de cultivo mais eficientes, contribuindo para o avanço das aplicações biotecnológicas desta espécie.

Palavras – chave: Macroalga vermelha; Taxa de Crescimento; Produtividade; Perfil Bioquímico.

Abstract

The red macroalga *Chondracanthus acicularis* stands out for its ecological and biotechnological relevance, being a source of bioactive compounds with applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. However, studies on its cultivation are very scarce. The aim of this study was therefore to investigate the laboratory cultivation of this species, analyzing the impact of different cultivation conditions on growth, productivity and the biochemical composition of the biomass. Fourteen-day trials were carried out using three culture media [Von Stosch Enrichment (VSE), Provasoli Enriched Seawater (PES) and Nutribloom Plus (NB)] and three light sources (white, red LED and blue LED), under a 12h:12h photoperiod (light:dark).

The results indicated that the PES medium, when combined with red LED light, provided the best cultivation conditions, with an average relative growth rate (RGR) of 1.0 % day⁻¹. On the other hand, NB medium and blue LED light resulted in a negative RGR, revealing unsuitable conditions for the algae's development. The biomass grown in PES and white light also showed higher productivity values (39.9 g dw m⁻³ day⁻¹), reinforcing the efficiency of these conditions.

Biochemical analyses showed higher concentrations of phycoerythrin (55.26 µg mL⁻¹) and phycocyanin (8.50 µg mL⁻¹) in the white and blue light conditions, respectively, highlighting the influence of light on pigment synthesis. The cultivated biomass had a higher organic matter content (72.94 % dw) compared to the wild biomass (69.20 % dw), confirming the viability of controlled cultivation to maximize the production of compounds of biotechnological interest.

It is concluded that laboratory cultivation of *C. acicularis* is a sustainable alternative to wild harvesting, promoting the rational exploitation of natural marine resources. This study reinforces the importance of parameters such as culture medium and type of light in the development of more efficient cultivation strategies, contributing to the advancement of biotechnological applications of this species.

Keywords: Red seaweed; Growth rate; Productivity; Biochemical profile.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice Geral	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas... ..	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução	1
1.1. Aquacultura e biotecnologia de macroalgas... ..	2
1.2. <i>Chondracanthus acicularis</i>	9
1.2.1. Classificação e nomenclatura.....	9
1.2.2. Morfologia e ciclo de vida	11
1.2.3. Distribuição geográfica e sazonalidade.....	12
1.2.4. Cultivos e potenciais aplicações... ..	13
1.3. Objetivos.....	14
2. Metodologia	15
2.1. Amostragem e aclimatização	15
2.2. Métodos de cultivo	16
2.3. Medições de crescimento	18
2.4. Perfil bioquímico.....	18
2.4.1. Determinação de humidade, matéria orgânica e cinza.....	19
2.4.2. Extração e quantificação de pigmentos.....	19
2.4.3. Quantificação de proteína total.....	21
2.5. Colorimetria	22
2.6. Análise XRF da biomassa selvagem	22
2.7. Análise de dados... ..	22
3. Análise e discussão de resultados... ..	23
3.1. Medições de crescimento	23
3.2. Perfil bioquímico.....	26
3.2.1. Quantificação de humidade, matéria orgânica e cinza	26
3.2.2. Quantificação de pigmentos... ..	28
3.2.3. Quantificação de proteína.....	31
3.3. Colorimetria	32

3.4. Análise XRF da biomassa selvagem	36
4. Conclusões... ..	39
5. Bibliografia	40
6. Anexos... ..	47

Índice de Figuras

Figura 1 - Fotografia de exemplar de <i>Chondracanthus acicularis</i> (Roth) Fredericq, 1993, captada: a) no seu ambiente natural, na Praia a Tamargueira, em janeiro de 2024; b) no laboratório, com detalhe na extremidade do talo (Escala: 0,5cm)	9
Figura 2 - Restauro da folha original com o fragmento encontrado da coleção de Simón de Rojas Clemente y Rubio, no Herbário da Universidade de Granada, referente à designação de <i>Chondracanthus acicularis</i> (Vizoso e Cremades, 2016).....	10
Figura 3 - Ciclo de vida haplo-diplóide trifásico isomórfico do género <i>Chondracanthus</i> (Fonte: Bulboa et al., 2019).....	11
Figura 4 - Distribuição geográfica de <i>Chondracanthus acicularis</i> (Fonte: WoRMS, 2024)..	12
Figura 5 - Um dos locais de recolha de <i>Chondracanthus acicularis</i> : Praia da Tamargueira, Figueira da Foz, em janeiro de 2024	15
Figura 6 - Aclimatização de <i>Chondracanthus acicularis</i> às condições laboratoriais, em tabuleiro de 5 litros, com arejamento	16
Figura 7 - Cultivo de <i>Chondracanthus acicularis</i> , em balões de 6 litros, em sala aclimatizada: a) ensaio de nutrientes e b) ensaio de luz.	17
Figura 8 - Taxa de Crescimento Relativo (TCR) para <i>Chondracanthus acicularis</i> , expressa em % dia ⁻¹ , para cada semana de cultivo, nos ensaios de nutrientes com luz branca: A) meio VSE, B) meio Provasoli, C) meio Nutribloom; e nos ensaios de luz com Provasoli: D) LED Vermelho, E) LED Azul. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas na TCR entre os tratamentos, a letra minúscula para primeira semana e a letra maiúscula para a segunda semana (teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05 ou ANOVA, p < 0,05).....	23
Figura 9 - Extratos de <i>Chondracanthus acicularis</i> , pela ordem de ensaio A, B, C, E, D, Selvagem: a) extração com tampão fosfato; b) extração com acetona 90%.....	28

Índice de Tabelas

Tabela I – Resumo dos diferentes ensaios de crescimento de <i>Chondracanthus acicularis</i> realizados.....	17
Tabela II – Auxiliar na preparação dos padrões do protocolo de quantificação de proteínas.....	21
Tabela III – Produtividade, expressa em g PS m ⁻³ dia ⁻¹ , calculada para a primeira e para a segunda semana de ensaio. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na produtividade entre os tratamentos (teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05 ou Tukey HSD, p < 0,05).....	25
Tabela IV – Teor de humidade, matéria orgânica, cinza em cada amostra. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3).....	26
Tabela V – Concentração de pigmentos, expressa em µg mL ⁻¹ , calculada para cada uma das condições de cultivo. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na concentração de cada pigmento entre os tratamentos (teste de ANOVA, p < 0,05).....	29
Tabela VI – Concentração de proteína, expressa em % PS, calculada para cada uma das condições de cultivo. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3).....	32
Tabela VII – Parâmetros de cor de <i>Chondracanthus acicularis</i> ao 1.º, 7.º e 14.º dias de ensaio de nutrientes. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na quantificação de cada parâmetro colorimétrico entre os diferentes meios (NP Tests, p < 0,05).....	33
Tabela VIII – Parâmetros de cor de <i>Chondracanthus acicularis</i> ao 1.º, 7.º e 14.º dias de ensaio de luz. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na quantificação de cada parâmetro colorimétrico entre as diferentes luzes (NP Tests, p < 0,05).....	35
Tabela IX – Resultados da análise XRF da biomassa selvagem de <i>C. acicularis</i> analisada neste trabalho e valor de referência da bibliografia, para a mesma espécie. Resultados expressos em média ± desvio-padrão (n=3).....	38

Lista de Abreviaturas

Abs – Absorvância

BCA – Ácido Bicinconínico

CO₂ – Dióxido de Carbono

dw - dry weight

GeO₂ – Dióxido de Germânio

HCl – Ácido Clorídrico

LED – Diodo Emissor de Luz (Light Emitting Diodes)

NB – NutriBloom

O₂ – Oxigénio

Pc – Peso da cinza

PES – Provasoli's enriched Seawater Medium

PF - Peso fresco

ppm – Partes por milhão (medida de concentração)

PS - Peso seco

Psu – Unidade de Salinidade Prática (Practical Salinity Unit)

R – PC – Ficocianina presente nas Rhodophyta

R – PE – Ficoeritrina presente nas Rhodophyta

VSE – Meio Von Stoch enriquecido

XRF – Fluorescência de Raios X (X-Ray Fluorescence)

α - alfa

β – beta

ι – iota

κ – kappa

λ –comprimento de onda

1. Introdução

Os oceanos são um recurso único que fornecem diversos produtos naturais e a sua biodiversidade foi durante muitos anos, uma fonte de inspiração para os investigadores (Donia & Hamann, 2003). Até meados dos anos 50 do século passado, a dificuldade em chegar às profundidades dos oceanos dificultava, ou impedia mesmo, que determinadas espécies fossem estudadas, mas a partir das décadas de 70 e 80, com acesso a novas tecnologias de mergulho, muitas algas, invertebrados e mesmo vertebrados foram descobertos e estudados. Nos últimos anos, tem havido uma grande preocupação devido ao rápido crescimento populacional, alterações climáticas e degradação ambiental, que fomentam a encontrar novos recursos que possam ajudar a alcançar o equilíbrio entre os seres humanos e a Terra. As algas podem ser um elemento-chave neste equilíbrio (Costa-Lotufo et al., 2009; Zhou et al., 2022).

As algas são organismos que podem ser unicelulares ou pluricelulares, vivendo maioritariamente em ambientes aquáticos (marinhos, de água doce ou de água salobra). As microalgas fazem parte sobretudo do fitoplâncton, vivendo em águas superficiais, permanecendo suspensas na coluna de água e limitadas à zona onde a luz solar penetra. As macroalgas são algas marinhas sobretudo bentónicas, visíveis a olho nu e algumas podem crescer até vários metros de comprimento.

A classificação taxonómica das macroalgas é feita com base no pigmento acessório predominante em cada grupo. As algas verdes (Chlorophyta) contêm principalmente clorofila *b*, as algas castanhas (Phaeophyceae) são caracterizadas pela presença de fucoxantina e as algas vermelhas (Rhodophyta) possuem ficobiliproteínas, com o predomínio da ficoeritrina. Todas possuem clorofila *a* um pigmento fotossintético que permite a absorção e conversão da energia solar, possibilitando a realização da fotossíntese. Como produtores primários, as algas são fundamentais para a produção de oxigénio e compostos orgânicos que alimentam outros seres vivos, desempenhando um papel essencial nas cadeias alimentares de todos os ecossistemas onde habitam (Pereira, 2016). Acredita-se que as macroalgas vermelhas sejam as algas eucarióticas mais antigas, estando presentes tanto em ambientes marinhos quanto em água doce. Elas pertencem ao grupo taxonómico mais diversificado, com cerca de 6500 espécies descritas até ao momento (Nan et al., 2017). As macroalgas vermelhas apresentam uma matriz extracelular composta por uma rede supramolecular complexa, que conecta as células, proporcionando integridade estrutural e desempenhando papéis importantes na comunicação,

desenvolvimento e defesa da alga (Kloareg et al., 2021). As estruturas da matriz extracelular variam de acordo com a espécie e a fase do ciclo de vida. No entanto, um dos componentes principais são frequentemente as galactanas sulfatadas complexas, como o agar, os porfiranos e as carragenanas (FickoBlean et al., 2015). Devido à sua composição polianiónica única, os polissacarídeos sulfatados têm a capacidade de reter água e são frequentemente chamados de ficocolóides. As três carragenanas de maior relevância comercial são a iota (ι), a kappa (κ) e a lambda (λ), designadas, respetivamente, como carragenose 2,4'-dissulfato (G4S-DA2S), carragenose 4'-sulfato (G4S-DA) e carragenana 2,6,2'-trissulfato (G2S-D2S,6S). Enquanto as carragenanas iota e kappa possuem propriedades gelificantes, a primeira mais elástico e a segunda mais quebradiço, a lambda atua como um agente espessante ou viscosificante (van de Velde et al., 2002). As suas propriedades variam conforme as modificações estruturais dos polímeros e essas características físicas são essenciais para a adaptação das algas ao ambiente marinho, ajudando a protegê-las da dessecação e a manter sua flexibilidade face à agitação marinha (Kloareg & Quatrano, 1988).

1.1. Aquacultura e biotecnologia de macroalgas

Tradicionalmente, as algas eram colhidas do ambiente selvagem e utilizadas para alimento, para ração para os animais, como fertilizantes e melhoradores da qualidade do solo. Nas últimas décadas, as algas passaram também a ser uma fonte relevante na obtenção de diversos compostos bioativos. Para além do consumo humano direto, especialmente em países asiáticos, são também importantes na indústria de processamento alimentar, na medicina e na biotecnologia (Pereira et al., 2008).

O ano de 2022 marcou um período recorde na produção, utilização e comércio de produtos da pesca e da aquacultura. A produção global de algas marinhas alcançou um novo máximo de 37,8 milhões de toneladas (peso fresco) de algas (FAO, 2024). Conforme o cultivo de algas marinhas avança, o conhecimento sobre o seu crescimento também se vai aprimorando, especialmente no que diz respeito à importância dos fatores ambientais. As algas que habitam na zona entremarés ou intertidal são diariamente expostas a grandes variações de humidade, temperatura, salinidade, exposição solar e movimentação da água. Além disso, são consumidas por diversos herbívoros. Dessa forma, as características bioquímicas, estruturais e o ciclo de vida são resultado de adaptação a todos esses aspetos físicos, químicos e biológicos.

Os principais parâmetros ambientais que influenciam o cultivo, impactando o crescimento e o desempenho fisiológico das macroalgas, são os seguintes:

Luz – as macroalgas são organismos fotossintéticos e, portanto, necessitam de uma fonte constante de luz, que no ambiente natural é fornecida pelo sol. Em laboratório, essa luz é produzida por lâmpadas fluorescentes ou luzes frias. Cada macroalga possui um fotoperíodo ideal e uma intensidade luminosa específica para garantir seu crescimento e desenvolvimento. Para ajustar a intensidade luminosa ou irradiância, é necessário medir esse parâmetro utilizando preferencialmente um medidor quântico ou, alternativamente, um fotômetro (Redmond et al., 2014).

As luzes LED têm o potencial de promover o crescimento e aumentar a produtividade das macroalgas marinhas, quando comparadas com a iluminação fluorescente convencional. De facto, sob condições adequadas de luz LED, a taxa de crescimento das algas pode ser aumentada entre 10% e 60% em relação ao cultivo sob luz fluorescente. A qualidade da luz desempenha um papel crucial tanto no crescimento quanto na composição bioquímica das algas, indicando que a utilização de luz artificial pode otimizar a produção e aumentar a concentração de biomoléculas de elevado valor. No entanto, o impacto da luz LED nos processos de biossíntese e nas diferentes espécies de algas marinhas ainda não é completamente compreendido (Kim, Choi & Lee, 2019; Gong, Liu & Zou, 2020). Adicionalmente, os diversos comprimentos de onda da luz variam na sua capacidade de penetração na água. Em geral, a luz vermelha é absorvida mais rapidamente, enquanto as luzes azul e verde conseguem alcançar maiores profundidades (Gong, Liu & Zou, 2020).

Estudo realizados com diferentes fontes de luz, incluindo luz branca e monocromática (vermelha, azul e verde), demonstraram que a combinação de diferentes comprimentos de onda pode influenciar o metabolismo, o crescimento e desencadear respostas ajustadas na composição e estrutura dos pigmentos. Essas experiências, realizadas sob diferentes irradiâncias e por períodos curtos e longos, mostraram que tanto a irradiância quanto a composição espectral têm um impacto significativo na composição dos pigmentos, no metabolismo e no crescimento das algas. A alteração da composição dos pigmentos, através da exposição a diferentes tipos de luz, não só contribui para um melhor entendimento dos processos de aclimação fisiológica e adaptação das algas, como também pode ser benéfica no cultivo de espécies comestíveis. Esta abordagem tem o potencial de melhorar o aspeto e a atratividade das algas, além de otimizar a sua

composição nutricional, especialmente em espécies com grande valor comercial (Algarra, de la Viña & Niell, 1991; Lüning, 1992; Kim, Choi & Lee, 2019; Gong, Liu & Zou, 2020).

Salinidade – refere-se à concentração de sais dissolvidos na água do mar, influenciando diretamente a pressão osmótica das células das macroalgas e o transporte ativo de íons através das suas membranas. Durante o cultivo em laboratório, é essencial monitorizar os níveis de salinidade, uma vez que estes tendem a aumentar devido à evaporação da água. Este processo é influenciado por fatores como a área da superfície do tanque, a temperatura e a humidade relativa. A maioria das culturas de macroalgas desenvolve-se em salinidades entre 34 e 37 ppm. Para ajustá-la, é possível regular a salinidade através da adição de água destilada ou de sais. Esta variável pode ser medida com o auxílio de um refratómetro (Hurd et al., 2014).

Temperatura – parâmetro fundamental durante os cultivos, que pode atuar estimulando ou inibindo as atividades enzimáticas, o que afeta processos como a fotossíntese, a respiração celular e a absorção de nutrientes. Todas as macroalgas possuem uma faixa de temperatura ideal e, por isso, é indispensável um laboratório isolado, equipado com um sistema de refrigeração (ou aquecimento) e circulação de ar condicionado. O controlo da temperatura da água pode ser realizado através de termóstatos ou sistemas de refrigeração de água com alta sensibilidade e uma faixa de temperaturas ajustável. A medição da temperatura da água pode ser feita com recurso a um termómetro (Redmond et al., 2014).

Agitação e pH – o movimento da água nas culturas em laboratório desempenha um papel crucial, pois favorece a absorção de nutrientes, uma vez que facilita a difusão dos mesmos, e melhora as trocas gasosas nas algas, como a absorção de CO₂ através das bolhas de ar. À medida que o carbono é absorvido, o pH da água eleva-se, o que pode levar à redução ou interrupção do processo de fotossíntese. O fornecimento de carbono através da agitação contribui também para manter o pH em níveis ideais (Craigie & Shacklock, 1985).

Nutrientes – são o conjunto de elementos químicos inorgânicos, incluindo as vitaminas, que desempenham funções indispensáveis no metabolismo das macroalgas. O grupo dos minerais pode ser dividido em macronutrientes, como por exemplo, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, e em micronutrientes, tais como cobre, zinco, manganês, ferro, chumbo e cádmio (Peñalver et al., 2024). Em condições de cultivo, os principais nutrientes que limitam o crescimento e desenvolvimento das macroalgas são o

nitrato e o fosfato, devido às suas concentrações habitualmente baixas na água do mar. Além destes, são fundamentais, por exemplo, o ferro, o boro, o manganês, o zinco e o cobalto. Assim, torna-se necessário enriquecer o meio de cultura através da adição de meios específicos para cada alga.

Os meios de cultivo desempenham um papel essencial no fornecimento desses nutrientes, garantindo o crescimento e a adaptação das macroalgas vermelhas em condições laboratoriais. O meio VSE (Von Stosch Enriched) é uma formulação enriquecida derivada do meio f/2, contendo nitrato e fosfato em concentrações balanceadas, além de vitaminas como tiamina, cobalamina e biotina, promovendo o crescimento de espécies exigentes. O meio PES (Provasoli Enriched Seawater) é baseado na água do mar enriquecida com macronutrientes, micronutrientes e vitaminas, sendo amplamente utilizado para macroalgas marinhas por simular as condições naturais do ambiente oceânico. Já o meio NB (Nutribloom®) é uma formulação comercial que contém uma mistura otimizada de nutrientes essenciais, incluindo fontes de azoto e fósforo, além de oligoelementos que contribuem para o metabolismo e a fotossíntese das algas.

Agentes Contaminantes – alguns autores afirmam que as bactérias associadas às algas marinhas desempenham um papel importante, direta ou indiretamente, no desenvolvimento morfológico normal das algas, no seu crescimento, na defesa contra organismos incrustadores e no metabolismo (Goecke et al., 2010). Muitos estudos têm proposto que existe uma relação mutualista na qual a comunidade bacteriana protege as algas hospedeiras contra a “sujidade” biológica secundária, enquanto a superfície hospedeira fornece nutrientes e proteção física às bactérias associadas (Penesyan et al., 2010). Apesar de inúmeros exemplos relatarem vantagens nas relações algas-bactérias, esta interação nem sempre é benéfica, porque as comunidades bacterianas podem comprometer o tecido algal e a capacidade fotossintética das algas (Hollants et al., 2013), podem induzir novas doenças bem como agentes patogénicos que podem comprometer a saúde das algas hospedeiras (Zozaya-Valdes et al., 2015). Por exemplo, as diatomáceas são os contaminantes mais frequentes e problemáticos em culturas de algas marinhas. Podem apresentar-se como células individuais, colónias ou filamentos e, uma vez introduzidas, multiplicam-se rapidamente, podendo dominar o substrato algal. Normalmente, são introduzidas através da água do mar natural ou da biomassa de algas selvagens. Desta forma, deve-se verificar regularmente as culturas ao microscópio para detetar a presença de diatomáceas numa fase inicial. Para controlar estas contaminações, adiciona-se uma solução saturada de dióxido de germânio ao meio de cultura, na proporção

de 1 a 2 mL por litro de água, pois esta solução impede a absorção de sílica, necessária para a formação da frústula, o que inibe a reprodução das diatomáceas e elimina-as eficazmente da cultura (Lewin, 1966).

As algas, incluindo as algas vermelhas, são uma incrível fonte de diversos biocompostos: proteínas, ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), hidratos de carbono (com destaque para as fibras), pigmentos, vitaminas e minerais, entre outros. Associada à presença de todos os compostos mencionados, as algas apresentam uma vasta diversidade de bioatividades: antioxidante, anti-inflamatório, imunestimulante, antimicrobiana e antitumoral contra diferentes tipos de células cancerígenas (Afonso et al., 2021).

Tal como as plantas terrestres, as algas marinhas têm papéis ecológicos semelhantes, mas em ambientes aquáticos, estando na base da cadeia alimentar, sendo fixadores de CO₂ e produtores de O₂ e formando estruturas tridimensionais que servem de abrigo e local de alimentação e reprodução para os organismos marinhos. Também podem servir como bioindicadores da qualidade da água ou efetuar biorremediação por bioabsorção e bioacumulação. Desta forma, a quantidade de minerais que apresentam na sua composição dependente da sua concentração na água onde a alga habita, podendo alguns deles ser tóxicos para os humanos (Neveux et al., 2018; Yu et al., 2016).

As zonas costeiras são ecossistemas dinâmicos e complexos, sujeitos a uma variedade de influências naturais e humanas. A interação entre fatores como correntes oceânicas, marés e atividade antropogénica determina a qualidade ambiental destas áreas e pode impactar significativamente os organismos marinhos que nelas se desenvolvem. No caso da costa oeste de Portugal, a conjugação da forte hidrodinâmica com a intensa atividade pesqueira, náutica e turística torna essencial a avaliação das potenciais fontes de poluição que possam afetar a biodiversidade local, com são exemplo as descargas de efluentes domésticos e urbanos e a contaminação por agricultura e pecuária (Henriques et al., 2017).

A quantificação desses minerais pode ser feita através da realização da análise de espectrometria de fluorescência com raios X, uma técnica analítica para determinação da composição química/elementar de uma amostra, de natureza não destrutiva e com um tempo de medição relativamente baixo (tempo de aquisição de 30 segundos). Esta técnica envolve o bombardeamento das amostras com radiação de alta energia, o que resulta na ionização dos elementos de interesse e na deteção da correspondente emissão de energia

fluorescente, sendo o fóton emitido característico de uma transição entre elétrons específicos de um determinado elemento (Feng et al., 2020).

Relativamente aos pigmentos sabe-se que as clorofilas, pigmentos de cor verde, são encontradas em todos os organismos fotossintéticos eucariontes e nas cianobactérias, mas nas algas vermelhas apenas a clorofila *a* está presente. As clorofilas são amplamente utilizadas como corantes em alimentos, cosméticos e têxteis. Para além dessa aplicação, possuem atividade antioxidante e propriedades que auxiliam no combate à obesidade. (Freitas et al., 2021).

Quanto aos carotenóides podem ser classificados em: Carotenos, pigmentos alaranjados presentes em todos os organismos fotossintéticos, em que os α (alfa) e β (beta) carotenos são os mais abundantes nas algas vermelhas; e Xantofilas, de cor amarela, laranja, vermelha, dourada ou castanha, comuns em algas castanhas e diatomáceas. No Filo Rhodophyta são sobretudo a luteína, a zeaxantina e a violaxantina. Atuam como pigmento auxiliar na fotossíntese e desempenha um papel importante na fotoproteção devido à sua propriedade antioxidante. Estes pigmentos são também utilizados como corantes em alimentos, cosméticos e farmacêuticos (Redmond et al., 2014).

As ficobilinas são pigmentos que conferem cor avermelhada às algas do Filo Rhodophyta, uma característica particular deste grupo. Estes pigmentos são acessórios no processo de fotossíntese, são essenciais para que as algas vermelhas consigam sobreviver e crescer em locais mais profundos, onde só a luz verde e a luz azul conseguem chegar e são os únicos pigmentos solúveis em água. Para além disso, as ficobilinas ajudam a proteger as algas em situações de muita luz e podem servir como reserva de nutrientes, especialmente quando existe falta de nitrogénio e fósforo (Cotas et al., 2020; Freitas et al., 2021). As ficobilinas podem ser classificadas consoante a capacidade de absorção como ficocianina (de cor azulada) e ficoeritrina (de cor rosada), que dão coloração a organismos como as cianobactérias e as algas vermelhas, respetivamente. Algumas ficobiliproteínas são ferramentas valiosas em estudos imunológicos, uma vez que a sua fluorescência, em comprimentos de onda específicos, permite a sua utilização como marcadores (Redmond et al., 2014).

O processo de extração de pigmentos de algas vermelhas é mais eficaz quando combinadas várias técnicas, entre elas a maceração, a extração enzimática, a extração com fluidos supercríticos, a extração assistida por micro-ondas, por ultrassons, por alta pressão ou por congelamento-descongelamento. Fatores importantes que também têm

uma grande influência na eficiência de extração são o tempo de maceração, a homogeneização da amostra e a concentração do tampão. A extração de pigmentos pode ser realizada através de kits vendidos por diversas empresas e laboratórios. Quanto à quantificação dos mesmos, pode ser realizada por espectrofotometria ou cromatografia (Pereira et al., 2020; Fabrowska et al., 2017).

Como já referido anteriormente, o crescimento e o metabolismo das macroalgas são muito influenciados pelo ambiente luminoso em que vivem, estando expostas a qualidades de luz altamente variáveis. Devido à diferença de composição e conteúdo dos pigmentos, as algas têm os seus próprios espectros de absorção, que se centram principalmente na luz azul (400-450 nm) e na luz vermelha (650-700 nm) e, além disso, as algas vermelhas têm o seu pico de absorção único na luz verde (500-550 nm) (Barsanti & Gualtieri, 2022). Essa capacidade de captar energia numa ampla faixa de comprimentos de onda (490-650 nm) permite que as algas vermelhas utilizem a luz de maneira mais eficiente do que outras algas, o que influencia a sua adaptação a ambientes com diferentes condições de luminosidade. Essas adaptações podem surgir até no ciclo de vida da espécie. Segundo Lüning e Dring (1972), a luz azul promove a gametogénese e reprodução de algumas espécies e a cultura de gametófitos sob luz vermelha permite o crescimento vegetativo dos gametófitos.

A ciência que quantifica e descreve fisicamente a percepção humana da cor é a colorimetria. O sistema de cores CIELab é muito utilizado para avaliar a cor de alimentos, pois permite correlacionar os valores dos parâmetros de cor com a percepção visual. A cor é um atributo essencial de qualidade, mas a sua interpretação varia entre os indivíduos, uma vez que cada pessoa utiliza referências diferentes para descrever a mesma cor, o que pode gerar confusão e falhas. Por essa razão, é crucial que a avaliação da cor seja feita de maneira objetiva e precisa. Para lidar com esse desafio, a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) estabeleceu parâmetros que padronizam a medição da cor de produtos, incluindo o campo de visão. Quando organizadas, as cores podem ser descritas em termos de tonalidade, luminosidade e saturação (DrLange, 1994).

1.2. *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq, 1993

1.2.1. Classificação e nomenclatura

A espécie *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq, 1993 (Figura 1a) apresenta a seguinte classificação (Guiry & Gyiry, 2024):

Império: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Gigartinaceae

Género: *Chondracanthus*



Figura 1 – Fotografia de exemplar de *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq, 1993, captada: a) no seu ambiente natural, na Praia a Tamargueira, em janeiro de 2024; b) no laboratório, com detalhe na extremidade do talo (Escala: 0,5cm).

Esta espécie tem os seguintes sinónimos: *Ceramium aciculare* Roth 1806, *Gigartina acicularis* (Roth) J.V.Lamouroux 1813, *Sphaerococcus acicularis* (Roth) C.Agardh 1817 e *Mammillaria acicularis* (Roth) Kuntze 1891 (Guiry & Guiry, 2024).

Vizoso e Cremades (2016) reportaram um registo antigo desta espécie na coleção de Simón de Rojas Clemente y Rubio, que se encontra depositado no Herbário da Universidade de Granada. O interesse por esta pequena coleção reside no facto de espécies preservadas terem sido utilizados por Clemente para registar alguns novos taxa. A Figura 2 apresenta o restauro da folha original (Folha GDA45413) com o fragmento encontrado, onde Clemente usa o nome para um exemplar de *Chondracanthus acicularis*.

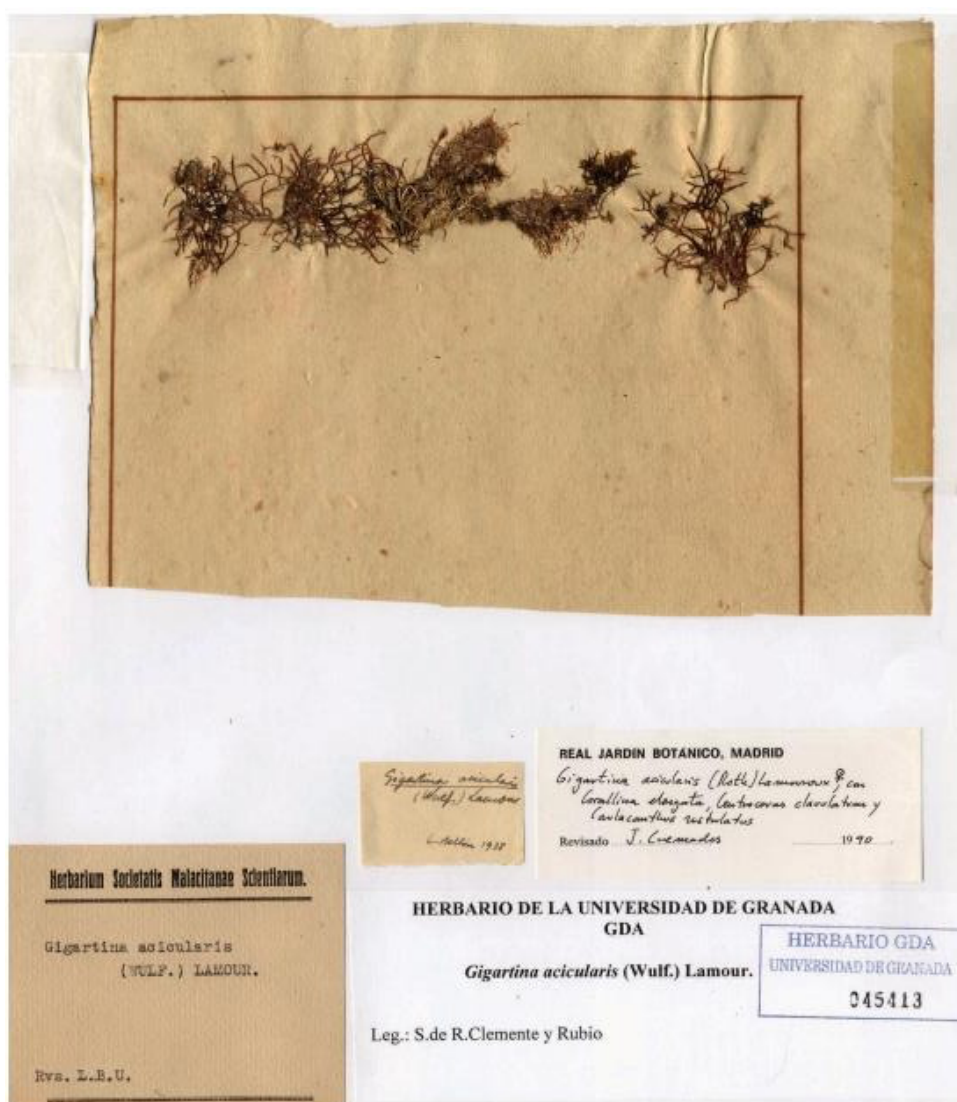


Figura 2 – Restauro da folha original com o fragmento encontrado da coleção de Simón de Rojas Clemente y Rubio, no Herbário da Universidade de Granada, referente à designação de *Chondracanthus acicularis* (Vizoso & Cremades, 2016).

1.2.2. Morfologia e ciclo de vida

É uma alga de cor vermelho-escuro, cartilaginosa-elástica, que se encontra fixa ao substrato por um sistema de rizoides, formando um tapete denso sobre as rochas. Esta espécie tem uma base discoide, normalmente estolonífera e emaranhada, com ramificação irregular e talos laterais curtos e espinhosos e/ou longos e curvos, finos nas extremidades (Figura 1b) (Braune & Guiry, 2011).

O seu ciclo de vida é haplodiploide trifásico isomórfico (Figura 3), exibindo, portanto, três fases morfológicas distintas: gametófito haploide, carposporófito diploide, que se desenvolve a partir do gametófito feminino, e tetrasporófito diploide independente (WoRMS, 2024; Pereira, 2004, p.12). Guiry e Cunningham (1984), descrevem que a gametogénese está confinada a uma janela estreita de temperatura e fotoperíodo: 14 - 18°C inclusive e ausência de luz igual ou superior a 12 h. Esta espécie também se reproduz vegetativamente, através da fragmentação, onde os fragmentos entram em contacto com o substrato para formar discos de fixação secundária que desenvolvem novos indivíduos. Esta estratégia é promissora para a produção comercial devido à sua simplicidade (Bulboa et al., 2020).

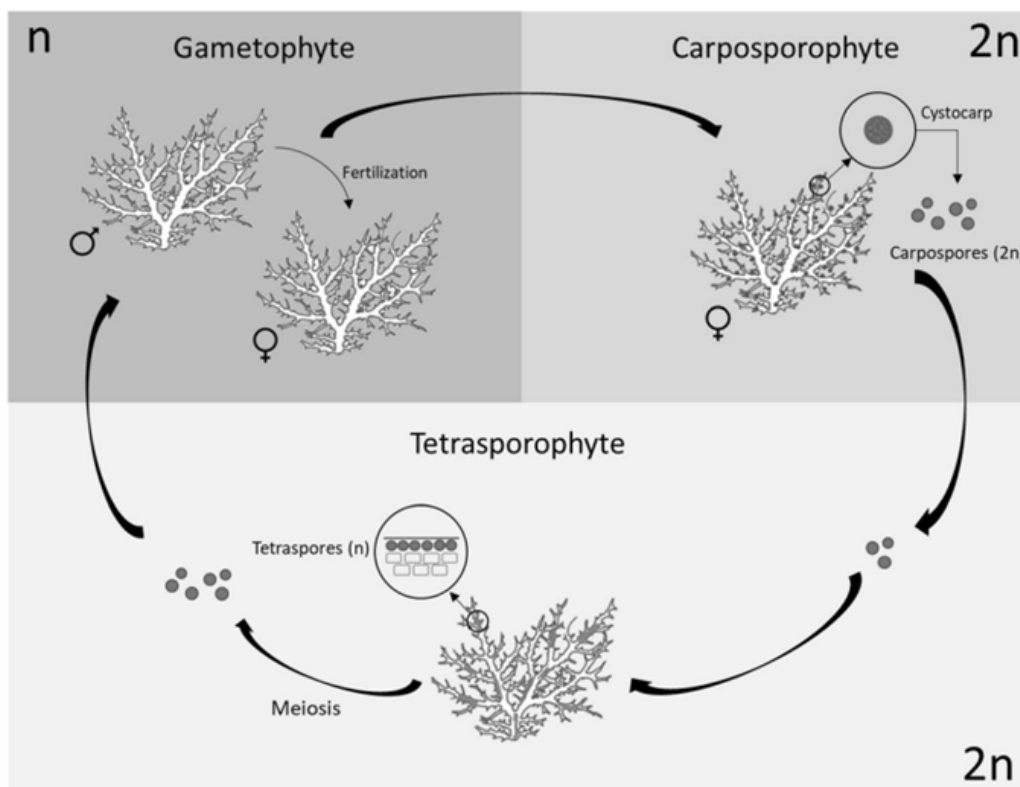


Figura 3 – Ciclo de vida haplodiploide trifásico isomórfico do género *Chondracanthus* (Fonte: Bulboa et al., 2020).

1.2.3. Distribuição geográfica e sazonalidade

Globalmente, a espécie *Chondracanthus acicularis* pode ser encontrada ao longo de toda a costa envolvente pelo Oceano Atlântico (Norte e Sul), Mar Mediterrâneo, Mar Negro, Golfo do México, Mar das Caraíbas e pelo Mar do Norte. Em Portugal, é possível encontrar esta alga no Norte e Centro (com maiores dimensões, até 10 cm de comprimento) e a Sul (com talos mais curtos) (Figura 4) (WoRMS, 2024). Segundo Pereira (2004), é possível encontrar esta alga em todas as estações do ano: em maior quantidade nos meses mais frios e em menor quantidade nos meses mais quentes. A variação espacial desta alga pode estar relacionada com a heterogeneidade do substrato, topografia e sedimentos, e com fenómenos hidrodinâmicos, nomeadamente, a exposição à hidrodinâmica na zona intertidal.

Chondracanthus acicularis foi identificada como uma alga oportunista (Orfanidis et al., 2003), caracterizando-se por um crescimento rápido e ciclos de vida curtos. Esta espécie é comum em áreas com contaminação orgânica, o que sugere a ocorrência de impactos ambientais (Portugal et al., 2016).

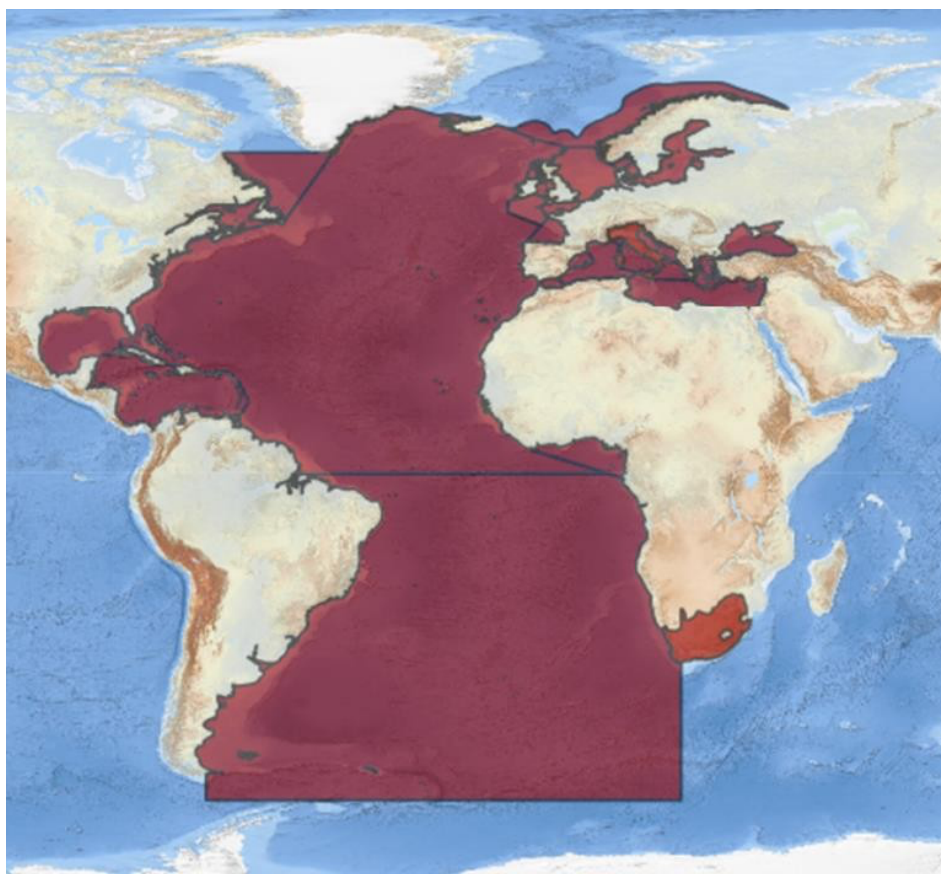


Figura 4 – Distribuição geográfica de *Chondracanthus acicularis* (Fonte: WoRMS, 2024).

1.2.4. Cultivos e potenciais aplicações

A maior parte da produção mundial de *Chondracanthus acicularis* ocorre no sul de França, em Espanha, Portugal e Marrocos (Lembi & Waaland, 1989). A procura por algas vermelhas carragenófitas, que se destacam pela qualidade das carragenanas que produzem, tende a aumentar (Guiry, 1984). Embora as algas da família Gigartinaceae possuam um grande potencial, estão ameaçadas devido ao método de colheita e aos riscos de sobre-exploração resultantes da crescente procura (El Omari et al., 2007). De facto, os apanhadores utilizam uma vasta gama de ferramentas cortantes que frequentemente danificam o sistema de fixação das algas, como os rizoides, órgãos cruciais para a regeneração das plantas. Além disso, o aumento da recolha das algas tem sido significativo, com grandes quantidades podendo escapar ao controle, em algumas regiões. Para garantir a sustentabilidade da colheita selvagem das Gigartinaceae, foram implementadas medidas no âmbito do plano de gestão das algas vermelhas. O estudo de El Mouttaqui et al. (2022) envolve um acompanhamento científico que apoia as práticas de exploração desses recursos. No entanto, a informação sobre esta espécie é escassa na literatura científica.

Sabe-se que espécies do género *Chondracanthus* requerem fotoperíodos específicos para cada fase do ciclo de vida. Por exemplo, as fases de esporulação e estabelecimento de *Chondracanthus chamissoi* necessitam de um fotoperíodo de luz curto (8 horas de luz e 16 horas de escuridão) ou neutro (12 horas de luz e 12 horas de escuridão), com baixa irradiância de 30 a 40 $\mu\text{mol fotões m}^{-3} \text{ s}^{-1}$. Já a fase de incubação requer um fotoperíodo de luz longo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) com uma irradiância moderada de 40 a 60 $\mu\text{mol fotões m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Redmond et al., 2014).

Em 1976, Perrone e Felicini estudaram a formação de novas porções de talo em cultivo e concluíram que o crescimento depende das condições nutritivas do meio e da intensidade da luz. Um estudo de Bodian et al. (2013) revela o potencial *in vitro* de *C. acicularis* para a micropropagação, recorrendo a dois métodos: cultura de tecidos a partir de bases discoides, que regeneram o talo, e a utilização de protoplastos. Sabe-se que o género *Chondracanthus* também apresenta reprodução vegetativa, que ocorre quando fragmentos do talo se separam, flutuam no mar e, ao encontrar um substrato adequado, formam discos de fixação secundários, que originam novos talos. É frequente observar estes fragmentos a flutuar na zona intertidal ao longo de todo o ano, tendo sido comprovado que não existem diferenças significativas na capacidade de regeneração entre os

gametófitos e tetrasporófitos (Macchiavello et al., 2003; Sáez et al., 2008).

Um estudo relacionado com a indústria agrícola revela que polissacarídeos extraídos de algas marinhas, incluindo a espécie em estudo, podem funcionar como bioestimulantes de plantas na fase de germinação de sementes de tomateiro. Outro estudo, na área farmacêutica, aponta para a potencialidade das algas vermelhas como fonte de nutracêuticos antioxidantes, devido ao seu conteúdo de polifenóis e sulfatos (Mzilbra et al., 2021; Jiménez-Escrig et al., 2012).

Para além de *C. acicularis* ser uma fonte de compostos bioativos valiosos, com estruturas variáveis e propriedades únicas, o valor comercial desta espécie está maioritariamente ligado à indústria de ficocolóides, designadamente de carragenanas, pois é uma das espécies com maior concentração destes compostos (até 61% do peso seco). As carragenanas são biopolímeros composto por uma mistura variável de galactanas sulfatadas, com propriedades espessantes, gelificantes e estabilizadoras, usada em formulações alimentares, farmacêuticas e cosméticas (Pereira et al., 2004).

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é investigar o cultivo de *Chondracanthus acicularis* em condições laboratoriais, analisando os efeitos de diferentes parâmetros ambientais no seu crescimento, produtividade e composição bioquímica, em comparação com a biomassa selvagem. Para efetuar esta avaliação, foram desenvolvidos os ensaios seguintes:

1. Ensaio de crescimento: Avaliação da taxa de crescimento relativo (TCR) e da produtividade da alga sob diferentes condições de cultivo, utilizando três meios de cultura (VSE, PES e NB) e três fontes de luz (branca, LED vermelha e LED azul), ao longo de 14 dias.
2. Análise de cor: Determinação objetiva dos parâmetros colorimétricos (luminosidade, saturação e tonalidade) da biomassa através do sistema CIELab, correlacionando os resultados com as condições de cultivo aplicadas.
3. Análise bioquímica: Caracterização do perfil bioquímico da biomassa cultivada, incluindo a quantificação de pigmentos (ficoeritrina, ficocianina, clorofila a e carotenoides), proteínas, matéria orgânica e cinzas, e comparação à biomassa selvagem.

2. Metodologia

2.1. Amostragem e aclimatização

A biomassa de *Chondracanthus acicularis* utilizada neste estudo foi colhida, durante a maré baixa, nos seguintes locais da costa portuguesa:

- Praia dos Barcos, no Baleal (39°22'35"N, 9°20'24"W), nos dias 30/10/2023, 28/11/2023 e 25/01/2024.
- Praia do Porto Batel, na Atouguia da Baleia (39°19'09"N, 9°21'21"W), no dia 27/11/2023.
- Praia da Tamargueira, na Figueira da Foz (40°09'58"N, 08°53'01"W), no dia 26/01/2024 (Figura 5).

A biomassa foi transportada para o laboratório em caixas escuras e isotérmicas. No laboratório, a biomassa foi cuidadosamente lavada com água do mar filtrada e depois limpa, removendo epífitas, detritos e partes necróticas. Parte da biomassa foi congelada para caracterização da alga selvagem e a restante foi aclimatizada às condições laboratoriais em tabuleiros abertos de 5 L, exposta a luz artificial ($20 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, luz branca fria, OSRAM Lumilux Skywhite) e a água salgada (35 ± 2 psu), a temperatura constante (20 ± 1 °C), a qual foi constantemente arejada (Figura 6) (Freitas et al., 2021). A biomassa aclimatizada durante 4 a 7 dias foi posteriormente preparada para os ensaios descritos na Secção 2.2.

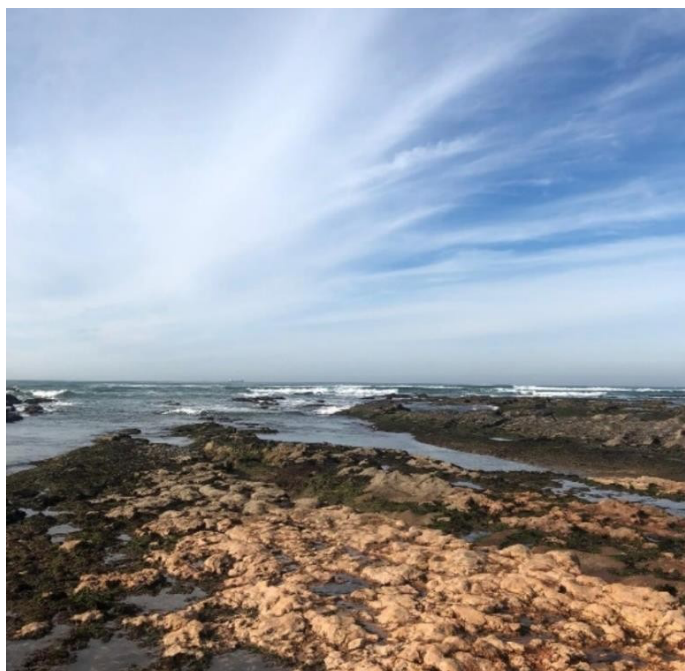


Figura 5 – Um dos locais de recolha de *Chondracanthus acicularis*: Praia da Tamargueira, Figueira da Foz, em janeiro de 2024.

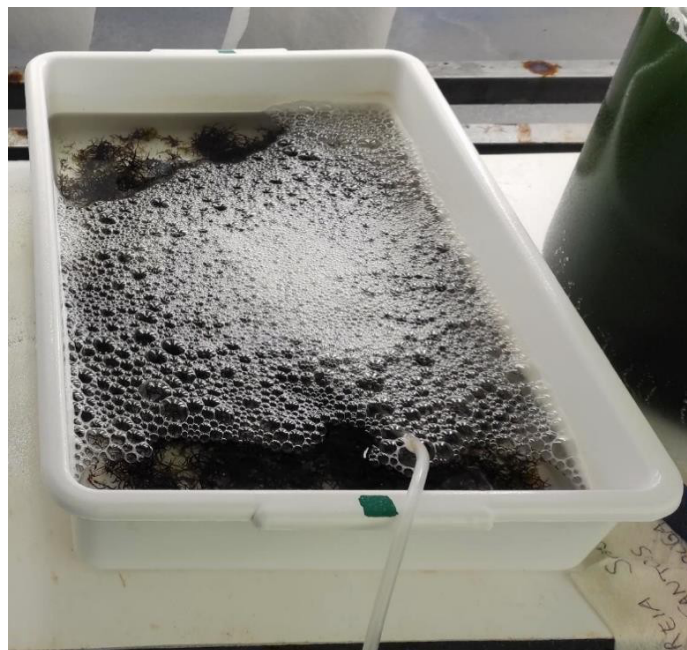


Figura 6 – Aclimatização de *Chondracanthus acicularis* às condições laboratoriais, em tabuleiro de 5 litros, com arejamento.

2.2. Métodos de cultivo

Para cada ensaio, foram pesados 24 g de alga, e a alga foi colocada em balões de fundo plano de 6L (densidade de 4 g L^{-1}), com diferentes meios de cultivo, e colocada numa sala com temperatura regulada a $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram efetuados diferentes ensaios, conforme resumido na Tabela I. Cada ensaio foi efetuado em triplicado ($n = 3$), e todos os balões foram colocados sob um fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro), luz branca fria ($20 \pm 1 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e arejamento constante (Figura 7a). Todos os ensaios tiveram a duração de 14 dias, com renovação de meio ao sétimo dia.

O ensaio de nutrientes testou o crescimento da alga na presença de três meios de cultura diferentes, sendo eles: Meio Von Stosch Enriched Modificado (VSE, ver em Anexo 1) (Redmond et al., 2014), indicado para cultivo de macroalgas (especialmente algas vermelhas e para o isolamento de esporos, sendo utilizado 10 mL de meio por cada litro de água do mar filtrada; Meio Provasoli Enriched Seawater (PES, ver em Anexo 2) (Redmond et al., 2014) colocando 10 mL de meio para cada litro de água salgada, este meio é várias vezes usado no cultivo de macroalgas vermelhas e castanhas; e meio de cultura comercial Nutribloom plus® (NB, ver em Anexo 3) (Necton, Portugal), numa concentração de 1 mL por cada litro de água salgada (Figura 7a); este meio é preparado para microalgas, mas com bons resultados registados para o crescimento de macroalgas castanhas (Mouga, et

al., 2024). A todos os meios foi adicionado dióxido de germânio (GeO_2 , 1 mL L^{-1}) para prevenir a proliferação de diatomáceas epífitas. Após seleção do melhor meio para o crescimento de *C. acicularis*, fez-se o ensaio de luz onde foi testado o crescimento da alga quando submetida a luz LED vermelha ($63.43 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ luz LED vermelha) e luz LED Azul ($63.29 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ luz LED azul), sob o mesmo fotoperíodo, densidade, temperatura e arejamento (Figura 7b).

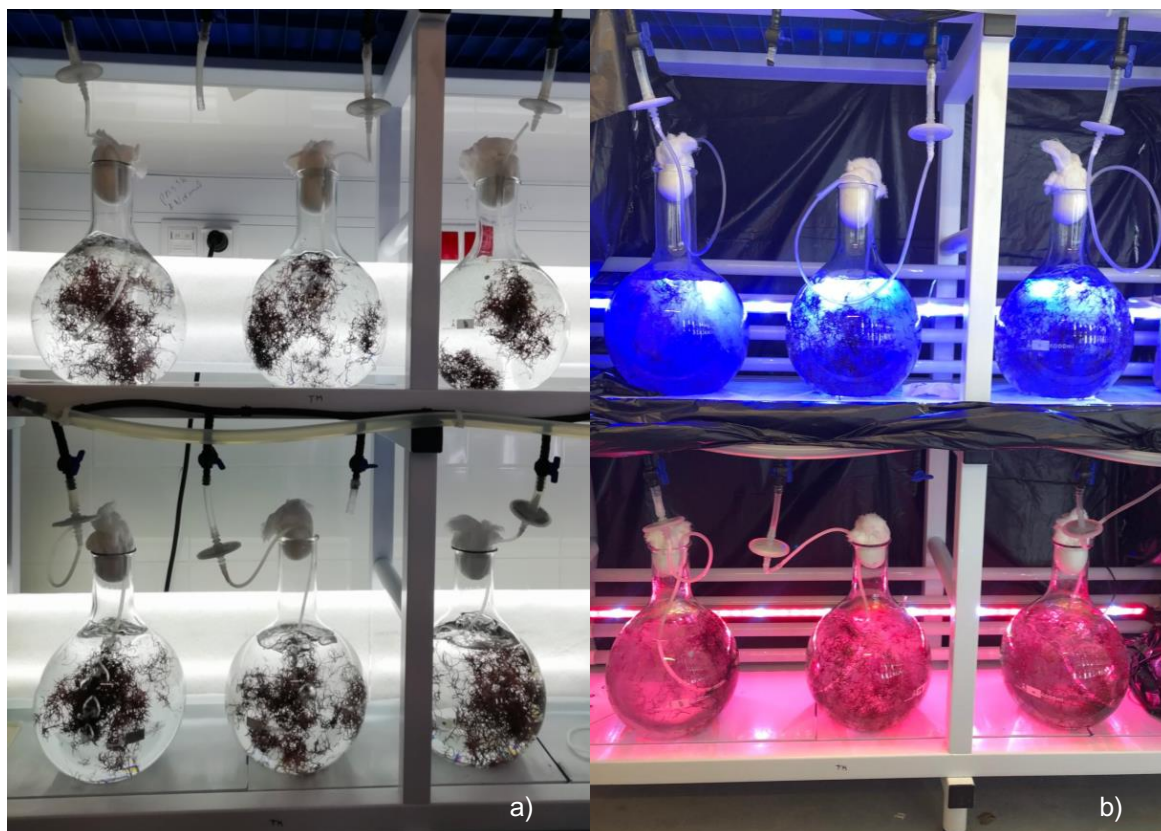


Figura 7 - Cultivo de *Chondracanthus acicularis*, em balões de 6 litros, em sala acimatizada: a) ensaio de nutrientes e b) ensaio de luz.

Tabela I – Resumo dos diferentes ensaios de crescimento de *Chondracanthus acicularis* realizados.

Ensaio	Meio de Cultivo	Fonte de Luz
A	Von Stosch Enrichment	Branca Fria
B	Provasoli Enriched Seawater	Branca Fria
C	Nutribloom plus	Branca Fria
D	Provasoli Enriched Seawater	LED Vermelha
E	Provasoli Enriched Seawater	LED Azul

2.3. Medições de crescimento

O peso da biomassa foi registado no início, no meio e no final de cada ensaio, numa balança analítica (Sartorius, TE124S – 120g x 0,0001g), sendo removido cuidadosamente o excesso de água com toalhas de papel antes de cada pesagem.

A Taxa de Crescimento Relativo (TCR) mede a velocidade com que um organismo ou cultura cresce em relação ao seu tamanho inicial, durante um determinado período de tempo. O valor da TCR foi calculado utilizando a seguinte equação (Patarra et al., 2017):

$$\text{TCR (\% pf dia}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(\text{pf}) - \ln(\text{pi})}{t} \times 100$$

Sendo *pi* o peso inicial, *pf* o peso final, expressos em gramas, e *t* o tempo de duração do ensaio, expresso em dias.

A produtividade diz respeito à quantidade total de biomassa ou produto gerado por unidade de volume (ou área), em um determinado período de tempo, e é crucial para avaliar a capacidade de um sistema de produção em gerar rendimento económico ou biológico. Esta foi calculada segundo a equação descrita por Patarra et al. (2017):

$$\text{Produtividade (g ps m}^{-3}\text{ dia}^{-1}\text{)} = 0,289 \times \left(\frac{\text{Pf} - \text{Pi}}{t} \right) \left(\frac{1}{0,006} \right)$$

Sendo *pf* o peso fresco final, *pi* o peso fresco inicial, expressos em gramas, *t* o tempo de duração do ensaio, expresso em dias, 0,289 é a proporção entre peso seco e peso fresco (média de 42 amostras) e 0,006 m³ é o volume de um balão volumétrico de 6L.

2.4. Perfil bioquímico

A biomassa resultante de cada ensaio e a biomassa selvagem foram analisadas com o objetivo de construir um perfil nutricional simples desta espécie e compreender as diferenças decorrentes do cultivo. A biomassa foi utilizada fresca para análise da matéria orgânica, cinzas e teor de pigmentos. A restante biomassa foi seca a 25 °C durante 48 h (FD115 Binder, Tuttlingen, Alemanha) e depois moída até obter fragmentos de aproximadamente 5 mm para análise das proteínas (método do ácido bicinonínico BCA),

colorimetria (modelo CIELab) e XRF (análise elementar). Todas as avaliações bioquímicas foram efetuadas em triplicado.

2.4.1. Determinação da humidade, matéria orgânica e cinza

Para determinar o teor de humidade e de cinzas, pesou-se 1 g de biomassa fresca para um cadinho tarado. Os cadinhos foram colocados numa estufa (FD115, Binder, Alemanha) a 105 °C durante 48 horas. Foram então colocados num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente e pesados novamente. A seguinte equação foi utilizada para calcular a percentagem de humidade presente nas algas frescas (AOAC, 2016):

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{p_f - p_s}{p_f} \times 100$$

Em que p_f é o peso da amostra fresca e p_s é o peso da amostra seca, expresso em gramas.

A mesma biomassa foi colocada numa mufla (B170, Nabertherm, Alemanha) e submetida a aquecimento, uma rampa de aquecimento de 4 horas e um patamar de 5 horas, a 525 °C. Os cadinhos foram então retirados e colocados num exsiccador até arrefecerem e apresentarem um peso estável. Posteriormente, os cadinhos foram pesados e a percentagem de cinzas e a percentagem de matéria orgânica, por peso seco, foram calculadas de acordo com as seguintes fórmulas (AOAC, 2016):

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{p_c}{p_s} \times 100$$

$$\text{Matéria Orgânica (\%)} = \frac{p_s - p_c}{p_s} \times 100$$

Em que p_s é o peso da amostra seca e p_c é o peso das cinzas, expresso em gramas.

2.4.2. Extração e quantificação de pigmentos

Para quantificar a ficoeritrina e a ficocianina nas amostras, pesou-se 1 g de alga fresca, congelada anteriormente a -20 °C. O solvente e o almofariz também foram colocados a essa temperatura antes do início do procedimento, de modo a preservar os

pigmentos sensíveis ao aumento da temperatura. Foi adicionado Tampão Fosfato 0,1 M pH 7,0 às amostras congeladas numa proporção de 1/20 (biomassa/solvente). A biomassa foi macerada durante 10 minutos num almofariz frio, mantido em gelo. Após a maceração, a mistura foi transferida para um gobelé, em gelo, e as amostras foram agitadas durante 30 minutos no escuro. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12500 g (Eppendorf, 5810R, Alemanha), a 4 °C, durante 20 minutos e a fração líquida foi recolhida. Finalmente, a absorvância foi lida entre 280 e 900 nm fazendo uma leitura de varrimento num espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, EUA).

As seguintes equações foram utilizadas para calcular a concentração de R-ficoeritrina (R-PE) e R-ficocianina (R-PC) presentes nas amostras (Beattie et al., 2018; Beer & Eshel, 1985):

$$\text{Concentração de R - PE } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = [(\text{Abs}565 - \text{Abs}592) - (\text{Abs}455 - \text{Abs}592) \times 0.2] \times 0,12$$

$$\text{Concentração de R - PC } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = [(\text{Abs}618 - \text{Abs}645) - (\text{Abs}592 - \text{Abs}645) \times 0.51] \times 0,15$$

Para a quantificação de clorofila a e de carotenoides nas amostras, pesou-se 1 g de alga fresca congeladas. Adicionou-se acetona a 90% às amostras congeladas numa proporção de 1/20 (biomassa/solvente). Cada amostra foi macerada manualmente durante 10 minutos num almofariz. Após a maceração, as amostras foram agitadas durante 30 minutos no escuro. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 8000 g (Eppendorf, 5810R, Alemanha), à temperatura ambiente, durante 20 minutos e a fração líquida foi recolhida. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância, com varrimento entre 280 e 900 nm fazendo uma leitura de varrimento em espectrofotómetro (Epoch 2, BioTek, EUA).

As seguintes equações foram utilizadas para calcular a concentração de clorofila a e de carotenoides totais (Kirk & Allen, 1965; Osório et al., 2020):

$$\begin{aligned} \text{Chl a } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= -0,3319 \times (\text{Abs}630 - \text{Abs}750) - 1,7465 \times (\text{Abs}647 - \text{Abs}750) \\ &+ 11,9442 \times (\text{Abs}664 - \text{Abs}750) - 1,4306 \times (\text{Abs}691 - \text{Abs}750) \end{aligned}$$

$$\text{Carotenoides Totais } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{Abs}480 + 0,114 \times \text{Abs}663 - 0,638 \times \text{Abs}645$$

2.4.3. Quantificação da proteína total

Para a quantificação de proteína foi utilizado o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, EUA) (Martin et al., 2015). O ensaio do ácido bicinonínico (BCA) é um método colorimétrico geralmente utilizado para estimar a concentração de proteínas numa amostra. Neste ensaio, os níveis de proteína são medidos através da criação de um cromóforo púrpura, $\text{Cu}^{+1}(\text{BCA})_2$ ($\lambda_{\text{máx}} = 562 \text{ nm}$) (Smith et al., 1985).

Para a preparação dos padrões, prepararam-se nove eppendorfs de acordo com a Tabela II. Preparou-se a solução de reagente de trabalho numa proporção de 50:1 com os reagentes A e B do kit. A ampola fornece 1 mL de solução padrão de albumina (BSA) a $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Para a preparação das amostras, adicionou-se, num eppendorf, 0,5 mL de solução HCl 0,1 M e 10 mg de alga seca e moída. Agitou-se no vórtex e incubou-se num banho a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight. Centrifugou-se a 179 g, por 10 minutos, e recolheu-se o sobrenadante para um tubo novo. Pipetou-se $25 \text{ }\mu\text{L}$ de solução padrão/amostra para um poço e adicionou-se $200 \text{ }\mu\text{L}$ de reagente de trabalho. Misturou-se a placa num agitador de placas por 30 segundos e incubou-se a placa coberta (protegida da luz) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 minutos. De seguida, arrefeceu-se a placa à temperatura ambiente e leu-se a absorvância a um comprimento de onda de 562 nm, num leitor de microplacas (Synergy H1, Biotek, USA).

Tabela II – Auxiliar na preparação dos padrões do protocolo de quantificação de proteína.

Eppendorf	Volume de H2O Mili-Q (μL)	Volume de BSA (μL)	Concentração final de BSA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
A	0	300 de ampola	2000
B	125	375 de ampola	1500
C	325	325 de ampola	1000
D	175	175 de diluição B	750
E	325	325 de diluição C	500
F	325	325 de diluição E	250
G	325	325 de diluição F	125
H	400	100 de diluição G	25
I	400	0	0 = branco

2.5. Colorimetria

A determinação da cor foi efetuada com um colorímetro Konica Minolta CR-400 Chroma Meter (Minolta Camera Co., Japão), conforme descrito por Cermeño et al. (2019), em amostras frescas no início e no fim de cada ensaio e a cada renovação de meio, pressionando cuidadosamente toda a superfície do sensor na alga, previamente seca com toalhas de papel. Todas as medições foram efetuadas em triplicado. Os resultados foram expressos com referência ao modelo de laboratório CIE, em que L^* representa a luminosidade (o mais escuro em $L^* = 0$, e o mais brilhante em $L^* = 100$), a^* representa o eixo vermelho – verde (valores positivos – valores negativos, respetivamente) e b^* representa o eixo do amarelo – azul (valores positivos – valores negativos, respetivamente). O medidor de croma foi calibrado com base na escala de cores CIELab, com o auxílio de um azulejo branco.

2.6. Análise XRF da biomassa selvagem

Foi utilizado um analisador de fluorescência de raios X portátil (S1 Titan série 600, Bruker, Illinois, EUA), equipado com uma fonte de raios X, para a análise elementar da amostra de alga selvagem. A amostra foi seca, a 60 °C, por 48 horas, numa estufa ventilada (Binder, FD23, Alemanha), finamente moída (espessura de aproximadamente 5 mm) e homogeneizada. Uma porção representativa da amostra foi colocada num copo de polietileno, tapado com uma fina película transparente de prolene (416-B01, Prolene 4.0µm, Bruker), posicionado centralmente acima da janela do detetor (superfície ativa de 20 mm²) do analisador XRF. A leitura foi realizada em triplicado.

2.7. Análise de dados

A análise de variância (ANOVA) de uma via foi efetuada para todos os tratamentos, após validação da normalidade e homogeneidade das variâncias. Sempre que esta validação não foi efetuada, foi aplicado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, teste Tukey HSD (Honestly Significant Difference) ou NP Tests (Neyman-Pearson Tests). Todas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os cálculos foram efetuados com o programa SPSS Statistics 29 (IBM Corporation, New York, EUA).

3. Análise e discussão de resultados

3.1. Medições de crescimento

A recolha de biomassa foi realizada em diferentes locais e em diferentes datas porque o estado de crescimento da alga era reduzido (frondes muito pequenas para serem recolhidas). Par cada ensaio foi recolhida apenas a quantidade de alga fresca necessária ao mesmo e, assim que esse terminou, foi feita uma nova recolha de biomassa para um novo ensaio. As diferenças de local e mês do ano da recolha podem influenciar o estado de saúde e o ciclo de vida da alga que, por sua vez, podem ter condicionado o crescimento da mesma durante os ensaios.

Os cinco tratamentos mostraram diferentes graus de crescimento de *Chondracanthus acicularis*, quando submetida a diferentes meios de cultivo e diferentes comprimentos de onda (Figura 8).

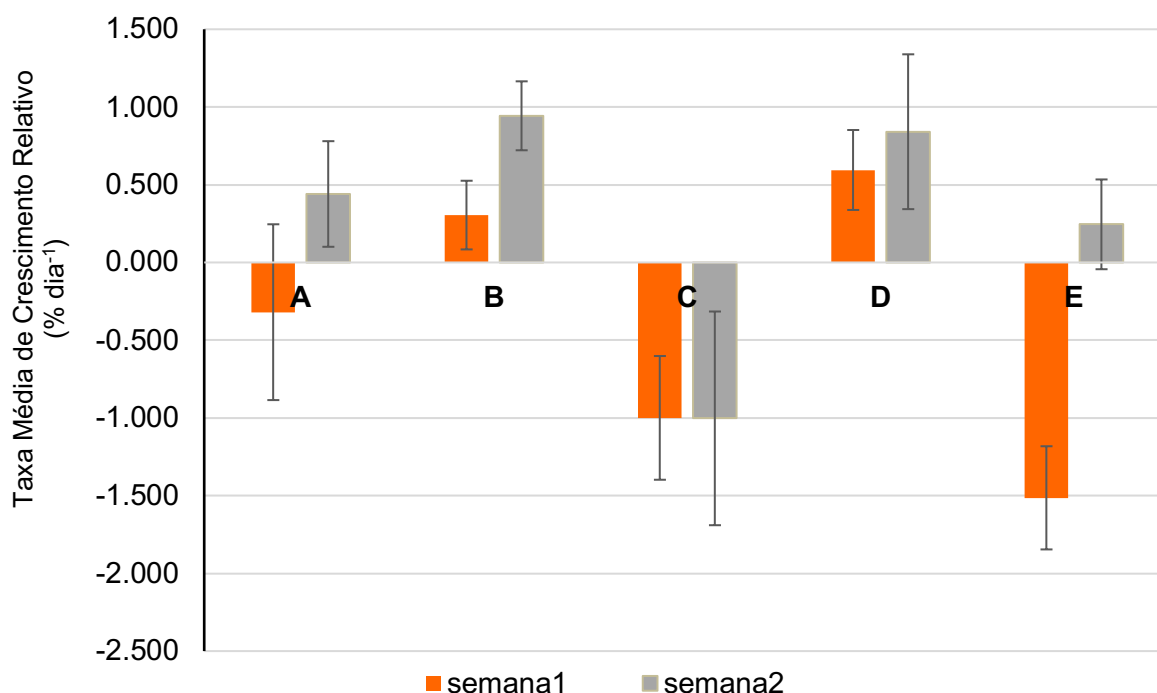


Figura 8 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) para *Chondracanthus acicularis*, expressa em % dia⁻¹, para cada semana de cultivo, nos ensaios de nutrientes com luz branca: A) meio VSE, B) meio Provasoli, C) meio Nutribloom; e nos ensaios de luz com Provasoli: D) LED Vermelho, E) LED Azul. Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n = 3). As letras acima das barras indicam diferenças significativas na TCR entre os tratamentos, a letra minúscula para primeira semana e a letra maiúscula para a segunda semana (teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05 ou ANOVA, p < 0,05).

Observa-se uma taxa de crescimento relativo de *C. acicularis* positiva nos ensaios A, B e D, ao fim de duas semanas. Isto significa que esta alga cresceu quando cultivada nas seguintes condições: com luz branca e em meio VSE (A), com luz branca e em meio PES (B) e com luz LED vermelha e em meio PES (D).

Por outro lado, observa-se uma taxa de crescimento negativa nos ensaios C e E, o que indica que o meio NB (C) e a luz LED azul (E) não são propícios ao crescimento desta espécie. Um valor negativo na taxa de crescimento significa uma redução na concentração de alga, indicando que não está a haver crescimento. O balanço final traduz-se na ausência crescimento ou até mesmo na morte dos organismos, com o passar do tempo.

Existem diferenças estatisticamente significativas na taxa média de crescimento quando comparados os três meios em estudo. Confirma-se que o meio PES demonstrou os melhores resultados, quando combinado com luz Branca e com luz LED vermelha. O meio NB mostrou o pior desempenho para o cultivo de *C. acicularis* e o meio VSE demonstrou uma condição inicial desfavorável, mas com recuperação evidente na segunda semana.

Existem, também, diferenças estatisticamente significativas entre os efeitos das três luzes (branca, vermelha e azul) sobre a taxa média de crescimento relativo de *C. acicularis*. Valida-se que a luz branca é a melhor condição de cultivo para esta alga, seguindo-se luz LED vermelha e por fim a luz LED azul, quando combinadas com o meio PES.

O cálculo da produtividade permite comparar a quantidade total de biomassa gerado por unidade de volume, nas diferentes condições de cultivo em estudo. A Tabela III podem ser analisados os valores de produtividade para a primeira e para a segunda semana de ensaio.

Na análise estatística deste parâmetro, o teste de homogeneidade de variâncias de Levene e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk apresentaram um valor de $p > 0,05$, validando a homogeneidade de médias e a normalidade dos dados para todos os casos, respetivamente. A partir da análise estatística ANOVA unidirecional, seguida do teste Tukey HSD, é possível perceber que as variáveis independentes, meio e luz, têm um impacto significativo na produtividade. Cada nível de significância é expresso com diferentes letras para um grau de confiança de 95%.

Tabela III – Produtividade, expressa em g PS m⁻³ dia⁻¹, calculada para a primeira e para a segunda semana de ensaio. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na produtividade entre os tratamentos, para cada semana (teste de Kruskal-Wallis, p < 0,05 ou Tukey HSD, p < 0,05).

Amostra	Produtividade na primeira semana (g m⁻³ dia⁻¹)	Produtividade na segunda semana (g m⁻³ dia⁻¹)
A	- 12,225 ± 21,852 ^{a b}	18,190 ± 14,196 ^{a b}
B	12,398 ± 9,032 ^a	39,987 ± 9,810 ^a
C	- 38,429 ± 14,704 ^b	- 36,017 ± 24,354 ^b
D	24,421 ± 10,669 ^a	36,920 ± 22,176 ^a
E	- 57,479 ± 11,992 ^b	9,190 ± 10,560 ^{a b}

A amostra A, cultivada em meio VSE, com luz branca, e a amostra E, cultivada com meio PES e luz LED azul, passaram de uma produtividade negativa para positiva (de - 12,225 ± 21,852 para 18,190 ± 14,196 e de - 57,479 ± 11,992 para 9,190 ± 10,560 g PS m⁻³ dia⁻¹, respetivamente), o que se pode justificar com a necessidade de adaptação, mais prolongada, da alga às condições de cultivo.

A amostra B, cultivada em meio PES, com luz branca, e a amostra D, cultivada em meio PES, com luz LED vermelha, mostraram uma produtividade crescente e consistente no decorrer do ensaio (de 12,398 ± 9,032 para 39,987 ± 9,810 e de 24,421 ± 10,669 para 36,920 ± 22,176 g PS m⁻³ dia⁻¹, respetivamente), que permite concluir que estas condições de cultivo são favoráveis ao crescimento de *C. acicularis*.

O contrário acontece com a amostra cultivada em meio NB, com luz branca (amostra C), que apresenta valores de produtividade negativos nas duas semanas (de - 38,429 ± 14,704 para - 36,017 ± 24,354 g PS m⁻³ dia⁻¹), concluindo que o meio em causa não favorece o crescimento desta espécie. Isto pode ser justificado pela elevada concentração de nitrato no meio NB, que é cerca de dez vezes superior à dos outros meios. Esse excesso sugere que a alga atingiu o limite de saturação para esse nutriente, tornando-o potencialmente tóxico para o seu metabolismo.

Existem diferenças estatisticamente significativas na produtividade quando comparadas as condições B e D com as condições de cultivo C e E, separadamente. Pode-se, assim, concluir que a condição de cultivo usada na amostra B e C demonstraram exibir valores significativamente superiores quando comparadas com as demais. Desta forma,

pode concluir-se que o meio PES conjugado com a luz branca ou com luz LED vermelha são condições promissoras ao cultivo desta espécie. É também de referir que a condição de cultivo usada na amostra C demonstra ser estatisticamente inferior às demais, concluindo que o meio NB não é favorável ao cultivo de *C. acicularis*. Ainda assim, os valores de crescimento do presente estudo são inferiores ao estudo de López-Campos et al. (2022), que registou valores máximos de $4.68\% \text{ day}^{-1}$ para a espécie *C. teedei*, mas semelhantes ao estudo de Silva (2009) quando o cultivo decorreu em condições semelhantes de luz e temperatura. Estas variações no crescimento podem dever-se à espécie e ao estado fisiológico da alga (López-Campos et al., 2022; Silva, 2009; Valero et al., 2017). Para melhor compreensão das comparações realizadas, note-se que López-Campos et al. (2022) realizou o estudo com a macroalga *C. teedei*, cultivada a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, com arejamento constante, salinidade de 34 ppm, com um fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro) e uma irradiância de $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, utilizando meio Provasoli e Silva (2009) realizou o estudo com *Chondracanthus acicularis*, cultivada a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, com arejamento constante, salinidade de 34 ppm, com um fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro) e uma irradiância de $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, utilizando meio Von Stoch's Enrichment.

3.2. Perfil bioquímico

3.2.1. Quantificação de humidade, matéria orgânica e cinza

A Tabela IV apresenta o perfil bioquímico das amostras cultivadas em laboratório e da amostra selvagem de *Chondracanthus acicularis* proveniente da costa portuguesa. Os valores apresentados foram submetidos a análise estatística e nunca cumpriram a normalidade nem a homogeneidade dos dados. Para além disso, após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros.

Em relação ao teor de humidade, o valor obtido para a amostra selvagem, $70,533 \pm 1,590\%$ de peso fresco, foi menor que o observado para a amostra cultivada com PES, em luz vermelha LED (amostra D), $73,899 \pm 0,519\%$ de peso fresco e foi maior que o observado para a amostra cultivada com NB, em luz branca (amostra C), $68,936 \pm 1,654\%$ de peso fresco. Verifica-se uma diferença de valores quando comparados com os valores publicados para *C. teedei*, com valores próximos de 87% de peso fresco, valores superiores aos obtidos (Bastos et al., 2012).

Tabela IV – Teor de humidade, matéria orgânica, cinza em cada amostra. Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n = 3).

Amostra	Humidade (% PF)	Matéria Orgânica (% PS)	Cinza (% PS)
A	71,920 \pm 1,336	72,096 \pm 1,460	27,904 \pm 1,460
B	70,620 \pm 1,377	72,944 \pm 0,661	27,056 \pm 0,661
C	68,936 \pm 1,654	72,363 \pm 0,923	27,637 \pm 0,923
D	73,899 \pm 0,519	70,130 \pm 1,478	29,870 \pm 1,478
E	70,897 \pm 3,444	71,850 \pm 0,630	28,150 \pm 0,630
Selvagem	70,533 \pm 1,590	69,200 \pm 1,339	30,800 \pm 1,339

No que diz respeito à matéria orgânica, os valores variaram entre 70,130 \pm 1,478% e 72,944 \pm 0,661 % de peso seco, correspondente às amostras D e B, respetivamente. Obteve-se um valor ligeiramente inferior para a amostra selvagem, 69,200 \pm 1,339 % de peso seco. Como expectável, o teor de cinza seguiu um padrão inverso ao observado na matéria orgânica. Isto é, a amostra que apresentou um maior teor de matéria orgânica revelou uma menor percentagem de cinza por peso seco e a amostra que apresentou um menor teor de matéria orgânica revelou uma maior percentagem de cinza por peso seco. Assim, o valor menor de cinza verifica-se na amostra B e o maior na amostra Selvagem (27,056 \pm 0,661 % e 30,800 \pm 1,339 % de peso seco, respetivamente). Esta variação no teor de cinzas pode ser atribuída a diferenças na absorção de minerais dos meios de crescimento e das condições ambientais (Bulboa et al., 2020).

Quanto ao teor de matéria orgânica, verifica-se uma semelhança de valores quando comparados com estudos publicados para macroalgas vermelhas, como *Gracilaria gracilis*, com valores próximos de 75 % de peso seco, valores ligeiramente superiores aos obtidos (Freitas et al., 2021). No que diz respeito ao teor de cinza, resultados semelhantes foram reportados para *Chondracanthus teedei*, onde se verificam valores próximos de 28 % de peso seco (Bastos et al., 2012).

3.2.2. Quantificação de pigmentos

Ao analisar os extratos, observam-se diferenças claras quando foram usados solventes distintos. Assim, o extrato obtido com água e tampão fosfato (Figura 9a) apresentou uma coloração avermelhada, indicando uma alta concentração de ficobilinas, pigmentos solúveis característicos das macroalgas vermelhas. Este extrato também possuía uma consistência mais espessa, provavelmente devido à presença de polissacarídeos, como por exemplo carragenanas. Por outro lado, os extratos preparados com acetona a 90% (Figura 9b) exibiram uma coloração verde intensa, sugerindo uma elevada concentração de clorofila a e carotenoides. Este resultado é consistente com a capacidade da acetona de extrair eficientemente esses pigmentos lipossolúveis.

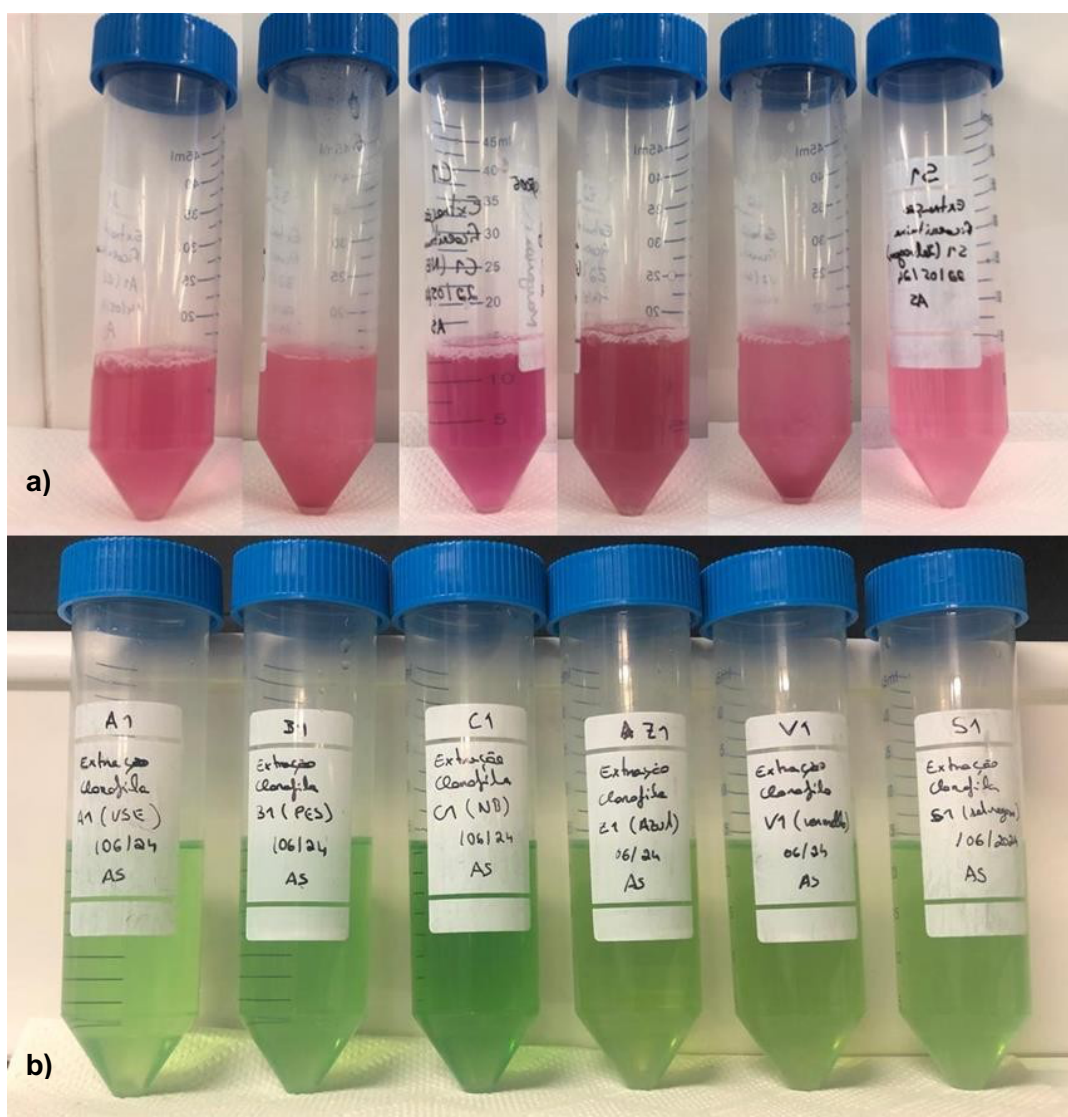


Figura 9 - Extratos de *Chondracanthus acicularis*, pela ordem de ensaio A, B, C, E, D, Selvagem: a) extração com tampão fosfato; b) extração com acetona 90%.

Os valores obtidos na quantificação de pigmentos (ficoeritrina, ficocianina, clorofila a e carotenoides) das diferentes amostras estão apresentados na Tabela V.

Na análise estatística deste parâmetro, o teste de homogeneidade de variâncias de Levene e o teste de normalidade de Shapiro-Wilk apresentaram um valor de $p > 0,05$, validando a homogeneidade de médias e a normalidade dos dados para todos os casos, respetivamente. A partir da análise estatística ANOVA unidirecional, seguida do teste Tukey HSD, é possível perceber que as variáveis independentes, meio e luz, têm um impacto significativo na concentração dos diferentes pigmentos, com exceção dos carotenoides.

Tabela V - Concentração de pigmentos, expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$, calculada para cada uma das condições de cultivo. Valores apresentados em média \pm desvio padrão ($n = 3$). As letras indicam diferenças significativas na concentração de cada pigmento entre os tratamentos (teste de ANOVA, $p < 0,05$).

Amostra	Concentração Ficoeritrina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Ficocianina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Clorofila a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
A	54,144 \pm 4,308 ^a	6,866 \pm 0,566 ^{a b}	7,976 \pm 1,257 ^{a b}	0,083 \pm 0,025
B	52,019 \pm 2,504 ^a	5,159 \pm 0,279 ^{b c}	6,722 \pm 0,641 ^b	0,078 \pm 0,009
C	55,263 \pm 5,395 ^a	6,993 \pm 1,301 ^{a b}	10,240 \pm 0,984 ^a	0,129 \pm 0,016
D	35,795 \pm 2,946 ^b	6,453 \pm 0,168 ^{a b}	5,937 \pm 0,266 ^b	0,092 \pm 0,009
E	53,462 \pm 4,902 ^a	8,505 \pm 0,700 ^a	6,637 \pm 0,436 ^b	0,090 \pm 0,005
Selvagem	30,455 \pm 3,580 ^b	3,774 \pm 0,325 ^c	6,664 \pm 0,573 ^b	0,098 \pm 0,009

Fazendo uma análise detalhada para cada pigmento, com base nas condições de cultivo das diferentes amostras, pode-se verificar que, quanto à ficoeritrina, a amostra C apresenta a maior concentração deste pigmento (55,263 \pm 5,395 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras A, B e E também apresentam valores elevados (54,144 \pm 4,308; 52,019 \pm 2,504 e 53,462 \pm 4,902 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente), mas sem diferenças estatisticamente significativas entre estas amostras e a amostra C. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Freitas e seus colegas (2022) para amostras selvagens das algas vermelhas *Chondrus crispus* e *Sphaerococcus coronopifolius*, sendo que estas últimas foram colhidas em praias próximas daquelas onde foram recolhidas as algas deste estudo (Freitas et al., 2022).

Estes resultados indicam que a luz branca, independentemente do meio, e a luz LED azul podem ser fatores importantes para a síntese de ficoeritrina. A amostra D (meio PES com luz LED vermelha) apresenta uma concentração mais reduzida ($35,795 \pm 2,946 \mu\text{g mL}^{-1}$), evidenciando que a luz vermelha pode ser menos eficiente na síntese de ficoeritrina, valor estatisticamente significativo quando comparado com os restantes tratamentos, mas não significativo quando comparado com a amostra selvagem. Esta conclusão não vai de encontro ao descrito por Vasquez et al. (2016), que diz que a luz vermelha estimula a acumulação de ficobiliproteínas, onde se inclui a ficoeritrina. As amostras cultivadas apresentam concentrações de ficoeritrina muito superiores à amostra selvagem, evidenciando que as condições de cultivo otimizadas (meio e luz) podem maximizar a produção deste pigmento de interesse biotecnológico (Kang et al., 2020). A ficoeritrina possui várias aplicações em indústrias como a alimentar, farmacêutica e biotecnológica, sendo empregue como corante natural, marcador fluorescente e agente antioxidante (Dumay et al., 2015). Os processos de purificação da ficoeritrina incluem técnicas como precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de troca iónica e exclusão molecular. No entanto, este pigmento é sensível à luz e à temperatura, o que pode levar à sua degradação. Para aumentar a estabilidade da ficoeritrina, são usados métodos como a liofilização e a adição de agentes estabilizantes (Lopes, 2022).

No que se refere à ficocianina, a amostra E (meio PES com luz LED azul) apresenta a maior concentração de ficocianina ($8,505 \pm 0,700 \mu\text{g mL}^{-1}$), reforçando que a luz LED azul favorecem a produção deste pigmento (Vasquez et al., 2016). As amostras A, C e D apresentam valores ligeiramente menores ($6,866 \pm 0,566$; $6,993 \pm 1,301$ e $6,453 \pm 0,168 \mu\text{g mL}^{-1}$), mas sem diferenças estatisticamente significativas entre elas e em relação à amostra E. A amostra B (meio PES com luz branca) apresenta a menor concentração ($5,159 \pm 0,279 \mu\text{g mL}^{-1}$). Este valor é estatisticamente significativo quando comparado com as amostras A, C e D, mas não significativo quando comparado com as amostras B e Selvagem. Os valores registados neste trabalho são, de novo semelhantes aos verificados por Freitas et al. (2022).

Relativamente à clorofila *a*, a amostra C (meio NB sob luz branca) apresentou a maior concentração de clorofila ($10,240 \pm 0,984 \mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, atribuir ao meio NB a capacidade de favorecer a produção desse pigmento pode ser um equívoco. Considerando que a condição C não promoveu o crescimento significativo da alga, é plausível concluir que a elevada concentração de clorofila está associada a um mecanismo de sobrevivência do organismo, que intensifica a produção desse pigmento essencial para

sua manutenção em condições adversas. A amostra A apresenta uma concentração ligeiramente menor ($7,976 \pm 1,257 \mu\text{g mL}^{-1}$) mas sem diferenças estatisticamente significativas em relação à amostra C. As amostras B, D, E e Selvagem apresentam valores menores, apenas estatisticamente significativos quando comparados com a amostra C. Estes resultados demonstram que a disponibilidade de nutrientes, especialmente de azoto, e a luz são fatores fundamentais na concentração de pigmentos (Parjikolaei et al., 2013).

Finalmente, todas as amostras apresentam valores semelhantes de carotenoides (entre $0,078 \pm 0,009$ e $0,129 \pm 0,016 \mu\text{g mL}^{-1}$), não existindo diferenças estatisticamente significativas na concentração deste pigmento entre as diferentes condições. Este estudo evidencia também que os carotenoides são os pigmentos menos abundantes nesta espécie. As diferenças não significativas e a evidência concluídas estão de acordo com o estudo de Godínez-Ortega et al. (2007), no qual foi cultivada a macroalga *Halymenia floresii*, a 18 °C, com arejamento constante, salinidade de 33 psu, com um fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro) e uma irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando meio Provasoli.

3.2.3. Quantificação de proteína

Após a leitura da absorvância das amostras, a um comprimento de onda de 562 nm, obteve-se uma reta com a seguinte equação:

$$y = 0,0013x + 0,2434 \quad (R^2 = 0,9984)$$

Com os valores de absorvância obtidos na leitura e com a equação da reta, foi calculada a quantidade de proteína em cada amostra (Tabela VI). Sabendo que as algas vermelhas apresentam um teor de proteína entre 10 e 30 % de peso seco (Khairy & El-Shafay, 2013) e foram obtidos valores muito inferiores (entre 1,313 e 2,357 % PS), não foi realizada análise estatística para este parâmetro.

Os valores obtidos podem refletir erros de extração de proteína, tais como, insuficiência no método de extração, degradação de proteínas e/ou perda de biomassa durante o processo. Podem também estar relacionados com erros na quantificação através de erros na leitura por espectrofotometria e/ou até mesmo com erros de operador no decorrer do protocolo. O kit de Pierce utilizado é indicado para este tipo de análise, mas pode ser necessário otimizar a quantidade de biomassa utilizada no procedimento.

Tabela VI – Concentração de proteína, expressa em % PS, calculada para cada uma das condições de cultivo. Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n = 3).

Amostra	Proteína (% PS)
A	1,818 \pm 0,305
B	2,357 \pm 0,169
C	1,713 \pm 0,172
D	1,345 \pm 0,145
E	1,313 \pm 0,092
Selvagem	2,122 \pm 0,210

3.3. Colorimetria

Na análise estatística dos parâmetros **L***, **a***, **b***, **C*** e **°h** foram realizadas duas comparações: uma entre os diferentes meios e outra entre as diferentes luzes, no início, a meio e no fim do cultivo.

Para a comparação entre os diferentes meios (Tabela VII), o teste de normalidade de Shapiro-Wilk apresentou um valor de $p < 0,05$ para as variáveis **C*** e **°h**, não validando a normalidade dos dados para estes casos. O teste de homogeneidade de variâncias de Levene apresentou um valor de $p < 0,05$, não validando a homogeneidade de médias para todos os casos. A partir da análise por testes não paramétricos NP Tests é possível perceber que as variáveis **L***, **a***, **C*** e **°h** apresentam diferenças estatisticamente significativas na colorimetria.

Tabela VII – Parâmetros de cor de *Chondracanthus acicularis* ao 1.º, 7.º e 14.º dias de ensaio de nutrientes. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na quantificação de cada parâmetro colorimétrico entre as diferentes luzes (NP Tests, p < 0,05).

		Parâmetros de cor				
Meio / Dia		L*	a*	b*	c*	°h
VSE	1	15,613 ± 0,000 ^a	7,233 ± 0,000	4,807 ± 0,000	8,723 ± 0,000	33,637 ± 0,000
	7	13,306 ± 0,966	6,460 ± 0,343 ^b	4,389 ± 0,624	7,803 ± 0,600 ^b	82,607 ± 0,539 ^a
	14	13,443 ± 0,227	6,646 ± 0,576 ^b	4,182 ± 0,575	7,862 ± 0,794 ^b	82,493 ± 0,869 ^a
PES	1	15,613 ± 0,000 ^a	7,233 ± 0,000	4,807 ± 0,000	8,723 ± 0,000	33,637 ± 0,000 ^b
	7	12,959 ± 0,269 ^b	6,717 ± 0,729 ^b	4,204 ± 0,551	7,935 ± 0,886 ^b	82,626 ± 0,812 ^a
	14	12,624 ± 0,526 ^b	6,522 ± 0,714 ^b	3,923 ± 0,705	7,622 ± 0,927 ^b	82,900 ± 0,853 ^a
NB	1	13,853 ± 0,000	8,197 ± 0,000 ^a	5,173 ± 0,000	9,696 ± 0,000 ^a	32,280 ± 0,000 ^c
	7	12,674 ± 0,173 ^b	7,621 ± 0,500 ^a	4,774 ± 0,313	9,002 ± 0,586	83,629 ± 0,400 ^a
	14	12,753 ± 1,177 ^b	6,944 ± 0,606 ^b	4,686 ± 0,630	8,426 ± 0,744 ^b	83,019 ± 0,657 ^a

L*: luminosidade; a*: eixo vermelho-verde; b*: eixo amarelo-azul; C*: saturação da cor; °h: tonalidade da cor.

A luminosidade (L*) reflete a quantidade de luz que a amostra reflete, e valores mais elevados indicam maior claridade. O meio NB demonstrou maior estabilidade, enquanto o VSE e o PES apresentaram reduções significativas no dia 7. Esta flutuação inicial pode estar associada ao metabolismo inicial das algas, possivelmente ligado a alterações na densidade celular ou degradação de compostos fotossintéticos sob diferentes concentrações de nutrientes. As reduções observadas na luminosidade podem indicar degradação de pigmentos, uma vez que são determinantes na cor das algas vermelhas.

O parâmetro a* reflete a intensidade do componente vermelho, essencial para identificar a saúde, que se verifica com os valores estáveis deste parâmetro e o b*, que reflete a intensidade do componente amarelo, é menos expressivo o que comprova a saúde da alga. A recuperação dos valores de a* e b* no dia 14 sugere que as condições iniciais dos meios podem provocar algum stress na alga (talvez devido a diferenças na disponibilidade de nutrientes), mas estas parecem adaptar-se com o tempo.

O parâmetro C^* representa a saturação ou pureza da cor e quando comparados os valores das amostras cultivadas com diferentes meios não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas.

A tonalidade (h°) é altamente estável nas três condições e o aumento deste parâmetro pode refletir uma maior proporção de pigmentos como as ficoeritrinas, responsáveis pela tonalidade avermelhada. Alguns produtos cosméticos e farmacêuticos que utilizam algas vermelhas podem beneficiar do uso destes meios, que asseguram tonalidades consistentes ao longo do cultivo (Lopes, 2022).

Os nutrientes, a qualidade da água, o stress ambiental, o conteúdo de humidade e a composição de pigmentos são fatores que influenciam a produção de pigmentos e a cor das algas. Meios de cultivo ricos em nitratos e fosfatos podem afetar a síntese de pigmentos, alterando os valores de a^* e b^* . A humidade também influencia a reflexão da luz, quanto maior a humidade menor o valor de L^* . A composição de pigmentos afeta diretamente a luminosidade (Murton & Crowhurst, 2020). A qualidade da água, incluindo fatores como o pH, a salinidade e a presença de poluentes, influencia diretamente a saúde das algas, afetando a produção e o equilíbrio dos seus pigmentos, além de modificar a forma como a luz é refletida pela sua superfície. Alterações nestes parâmetros podem comprometer o metabolismo das algas, levando a mudanças na sua coloração. Além disso, condições adversas, como temperaturas extremamente altas ou baixas, podem desencadear uma resposta de defesa nas algas, resultando no aumento da produção de determinados pigmentos, o que altera significativamente a sua cor (Murton & Crowhurst, 2020).

Com base nos resultados obtidos em relação à humidade, observa-se que a amostra A (cultivada com meio VSE) apresenta um conteúdo de humidade mais elevado. De acordo com Murton & Crowhurst (2020), espera-se que, para um maior nível de humidade, o valor de L^* seja o mais baixo. No entanto, este comportamento não foi confirmado nos resultados, já que o valor de L^* na amostra A não segue a tendência esperada.

Para a comparação entre as diferentes luzes (Tabela VIII), o teste de normalidade de Shapiro-Wilk apresentou um valor de $p > 0,05$, validando a normalidade dos dados para todos os casos. O teste de homogeneidade de variâncias de Levene apresentou um valor de $p < 0,05$, não validando a normalidade dos dados para estes casos. A partir da análise por testes não paramétricos, NP Tests é possível perceber que as variáveis L^* , a^* e h°

apresentam diferenças estatisticamente significativas na colorimetria. Cada nível de significância é expresso com diferentes letras para um grau de confiança de 95%.

Tabela VIII – Parâmetros de cor de *Chondracanthus acicularis* ao 1.º, 7.º e 14.º dias de ensaio de luz. Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas na quantificação de cada parâmetro colorimétrico entre as diferentes luzes (NP Tests, p < 0,05).

Luz / Dia		Parâmetros de cor				
		L*	a*	b*	c*	°h
Branca	1	13,853 ± 0,000	8,197 ± 0,000 ^a	5,173 ± 0,000	9,696 ± 0,000	32,280 ± 0,000 ^c
	7	12,674 ± 0,172 ^b	7,621 ± 0,500	4,774 ± 0,313	9,002 ± 0,586	83,629 ± 0,400 ^a
	14	12,753 ± 1,177 ^b	6,944 ± 0,606 ^b	4,686 ± 0,630	8,426 ± 0,744	83,019 ± 0,657 ^a
Azul	1	15,210 ± 0,000 ^a	7,500 ± 0,000	4,137 ± 0,000	8,567 ± 0,000	28,760 ± 0,000 ^d
	7	13,398 ± 0,255	7,271 ± 0,775 ^b	4,707 ± 0,726	8,761 ± 0,731	32,938 ± 4,592
	14	12,631 ± 1,128 ^b	8,048 ± 0,351 ^a	3,950 ± 0,376	8,972 ± 0,477	26,148 ± 1,392 ^c
Vermelha	1	15,210 ± 0,000 ^a	7,500 ± 0,000	4,137 ± 0,000	8,567 ± 0,000	28,760 ± 0,000 ^d
	7	13,192 ± 0,532 ^b	7,092 ± 0,122 ^b	4,806 ± 0,463	8,606 ± 0,263	33,732 ± 2,983 ^b
	14	13,708 ± 1,102	6,773 ± 0,528 ^b	4,579 ± 0,952	8,210 ± 0,996	33,472 ± 3,942 ^b

L*: luminosidade; a*: eixo vermelho-verde; b*: eixo amarelo-azul; C*: saturação da cor; °h: tonalidade da cor.

Analisando as variações ao longo do decorrer do ensaio, verifica-se que existem diferenças significativas para os parâmetros de cor L*, a* e °h. Verifica-se que o espectro de luz afeta diretamente a percepção e qualidade de cor em *C. acicularis*, o que pode ter implicações em estudos ecológicos ou aplicações industriais, como cultivo controlado ou processamento de algas para consumo.

No ensaio cultivado com luz branca, o parâmetro L* apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado o primeiro dia com o sétimo e o último dia de ensaio. Os valores do parâmetro a* diminuíram com o tempo, o que comprova que a alga não estava em plena saúde. A saturação da cor (C*) e o eixo amarelo-azul (b*) sugerem que a luz branca mantém um balanço entre pigmentos verdes e vermelhos. Os

valores de ρ_h aumentam gradualmente, o que sugere uma mudança nas proporções relativas de pigmentos (por exemplo, aumento de ficobiliproteínas ou redução de clorofila).

No ensaio cultivado com luz LED azul, o parâmetro L^* apresenta uma diminuição significativa, o que pode verificar uma degradação de pigmentos. Quanto aos valores do parâmetro a^* , verifica-se um aumento no decorrer do ensaio, o que confirma a saúde da alga no decorrer do ensaio. Os parâmetros b^* e C^* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas e os seus valores também comprovam a saúde do organismo. A tonalidade da cor da alga cultivada nesta condição apresenta um aumento no sétimo dia, mas uma diminuição significativamente no último dia de ensaio.

No ensaio cultivado com luz LED vermelha, verifica-se o mesmo comportamento que no ensaio analisado anteriormente nos parâmetros L^* , b^* e C^* . Quanto aos valores do parâmetro a^* , verifica-se um decréscimo no decorrer do ensaio, o que indica que a alga estava mais saudável no início do que no fim do mesmo. O parâmetro ρ_h aumenta no sétimo dia e diminui de forma não significativa no final do ensaio.

Para além de todos os fatores mencionados acima, a intensidade da luz também influencia a cor, uma vez que é alterada a composição de pigmentos nas algas. Uma intensidade de luz maior pode aumentar os pigmentos vermelhos e reduzir a luminosidade (L^*) (Murton & Crowhurst, 2020). Analisando o parâmetro Luz, com base nos resultados obtidos em relação à humidade, observa-se que a amostra D (cultivada com luz LED vermelha) apresenta um conteúdo de humidade mais elevado. De acordo com Murton & Crowhurst (2020), espera-se que, para um maior nível de humidade, o valor de L^* seja o mais baixo. No entanto, este comportamento não foi confirmado nos resultados, já que o valor de L^* na amostra A não segue a tendência esperada.

3.4. Análise XRF da biomassa selvagem

A Tabela IX apresenta os resultados da análise de Fluorescência de Raios X (XRF) da biomassa selvagem de *Chondracanthus acicularis*, indicando as concentrações de diferentes elementos químicos, em mg Kg^{-1} , e comparando alguns valores com dados do estudo de Akkad et al. (2024).

Os elementos mais abundantes são o Enxofre, $27,629 \pm 0,115 \times 10^3 \text{ mg Kg}^{-1}$, o Cloro, $19,163 \pm 0,299 \times 10^3 \text{ mg Kg}^{-1}$ e o Potássio, $9,859 \pm 0,060 \times 10^3 \text{ mg Kg}^{-1}$. Podendo

os dois últimos estar associados à regulação osmótica e a funções metabólicas, respetivamente (Yücepete et al., 2024). Os elementos Magnésio, Manganês Titânio, Níquel e Cádmio apresentaram concentrações não significativas. Estes valores podem ser consequência da existência de erros grandes na determinação de elementos pequenos, aquando do uso desta técnica.

As discrepâncias entre os valores obtidos e os valores de referência podem estar associadas a variações ambientais, decorrentes das distintas localidades de colheita da biomassa, e/ou a divergências nas metodologias utilizadas para a quantificação dos elementos químicos.

É importante destacar que a contaminação por metais pesados encontrada nas macroalgas está diretamente relacionada com a poluição ambiental e com os níveis de atividade industrial nos locais onde as amostras foram recolhidas (War Naw et al. 2020). Os elementos Cádmio, Vanádio, Crómio, Selênio, Molibdénio, Mercúrio e Chumbo apresentaram valores abaixo do nível de deteção ou em concentrações não significativas, o que é positivo do ponto de vista da toxicidade e segurança ambiental, uma vez que são metais pesados (Chakraborty et al., 2014). As praias onde foi recolhida a biomassa utilizada neste estudo estão sujeitas a diversas fontes potenciais de poluição, incluindo a atividade pesqueira e náutica, que pode resultar no derrame de combustíveis e outros resíduos, e a afluência turística, que pode contribuir para o descarte inadequado de lixo. Além disso, descargas de efluentes urbanos e industriais, escoamento de produtos agrícolas e o transporte de poluentes pelas correntes e marés podem afetar a qualidade da biomassa algal.

A composição mineral das macroalgas vermelhas, incluindo as da ordem Gigartinales, pode apresentar variações consideráveis dependendo das condições ambientais. Elementos como a intensidade luminosa, a temperatura, a salinidade, a disponibilidade de nutrientes e a poluição da água têm influência na concentração de minerais presentes nas algas. A luz afeta a fotossíntese e a absorção de magnésio, essencial para a clorofila. Temperaturas mais altas podem aumentar a taxa metabólica, modificando a absorção de cálcio e potássio. A salinidade influencia a osmose e a regulação iónica, alterando as concentrações de sódio, potássio e cloro. A disponibilidade de nutrientes, como nitratos e fosfatos, favorece a absorção de minerais essenciais para o crescimento (N, P, K, Mg, Ca, Fe, S, Cl). A poluição, com metais pesados e outros contaminantes, pode levar à acumulação de elementos tóxicos (Yücepete et al., 2024).

Tabela IX - Resultados da análise XRF da biomassa selvagem de *C. acicularis* analisada neste trabalho e valor de referência da bibliografia, para a mesma espécie. Resultados expressos em média \pm desvio-padrão (n=3).

Nome Elemento	Símbolo	Concentração Obtida (mg Kg⁻¹)	Concentração Referência (mg Kg⁻¹)	Referência
Enxofre	S	27,629 \pm 0,115 x 10 ³	-	-
Cloro	Cl	19,163 \pm 0,299 x 10 ³	-	-
Magnésio *	Mg	1,872 \pm 1,566 x 10 ³	-	-
Potássio	K	9,859 \pm 0,060 x 10 ³	-	-
Cálcio	Ca	8,162 \pm 0,033 x 10 ³	-	-
Silício	Si	6,724 \pm 0,170 x 10 ³	-	-
Alumínio	Al	2,089 \pm 0,378 x 10 ³	7,35 \pm 0,02 x 10 ²	Aknaf et al., 2024
Fosforo	P	8,87 \pm 0,45 x 10 ²	-	-
Bromo	Br	7,29 \pm 0,05 x 10 ²	-	-
Ferro	Fe	4,87 \pm 0,14 x 10 ²	-	-
Bário	Ba	1,78 \pm 0,90 x 10 ²	-	-
Estrôncio	Sr	1,11 \pm 0,03 x 10 ²	1,07 \pm 0,01 x 10 ²	Aknaf et al., 2024
Manganês *	Mn	29,00 \pm 10,00	80,2 \pm 0,003 x 10 ²	Aknaf et al., 2024
Zinco	Zn	26,00 \pm 2,00	45,00 \pm 0,30	Aknaf et al., 2024
Cobre	Cu	20,00 \pm 2,00	6,00 \pm 1,40	Aknaf et al., 2024
Rubídio	Rb	17,00 \pm 3,00	16,30 \pm 2,90	Aknaf et al., 2024
Arsênio	As	14,00 \pm 2,00	11,40 \pm 2,60	Aknaf et al., 2024
Titânio *	Ti	14,00 \pm 2,00	23,30 \pm 0,20	Aknaf et al., 2024
Níquel *	Ni	5,00 \pm 2,00	3,50 \pm 1,60	Aknaf et al., 2024
Cádmio *	Cd	0 \pm 14,00	-	-
Vanádio **	V	-	4,00 \pm 1,20	Aknaf et al., 2024
Crômio **	Cr	-	1,20 \pm 0,40	Aknaf et al., 2024
Selênio **	Se	-	-	-
Molibdênio**	Mo	-	-	-
Mercúrio **	Hg	-	-	-
Chumbo **	Pb	-	-	-

* Não significativo (ruído); ** Não detetado.

4. Conclusões

Este estudo avaliou o cultivo laboratorial da macroalga vermelha *Chondracanthus acicularis*, explorando como diferentes meios de cultura e fontes de luz influenciam o crescimento, produtividade e composição bioquímica da biomassa. Os resultados evidenciaram que o meio PES, combinado com luz branca e a luz LED vermelha, proporcionaram as melhores condições para o desenvolvimento da espécie, atingindo uma taxa média de crescimento relativo de 1,0 % dia⁻¹ e produtividade de 36,9 g PS m⁻³ dia⁻¹. A luz branca associada ao meio PES também demonstrou um elevado potencial, com produtividade de 39,9 g PS m⁻³ dia⁻¹. Em contraste, o meio NB e a luz LED azul resultaram em taxas negativas de crescimento, sublinhando a inadequação dessas condições para o cultivo desta macroalga.

As análises bioquímicas mostraram que as diferentes condições de cultivo influenciam significativamente a concentração de pigmentos. A luz branca favoreceu a produção de ficoeritrina (55,26 µg mL⁻¹), enquanto a luz LED azul promoveu a síntese de ficocianina (8,50 µg mL⁻¹). Por outro lado, a biomassa cultivada em laboratório apresentou maior teor de matéria orgânica (até 72,94 % PS) em comparação com a biomassa selvagem (69,20 % PS). Estes resultados indicam o potencial das condições laboratoriais para maximizar a produção de compostos relevantes para a biotecnologia. Os dados bioquímicos reforçam a aplicabilidade desta espécie em setores como a indústria farmacêutica, alimentar e cosmética, sendo especialmente promissora para a obtenção de pigmentos naturais e bioativos. Além disso, a abordagem laboratorial realizada oferece uma alternativa sustentável à colheita selvagem, promovendo práticas de aquacultura que minimizam os impactos ambientais e garantem um fornecimento consistente de biomassa de alta qualidade.

A utilização de diferentes meios de cultura e fontes de luz neste trabalho contribuiu significativamente para o avanço do conhecimento sobre o cultivo de *C. acicularis*. A compreensão das respostas da espécie às variáveis estudadas apoia o desenvolvimento de técnicas de cultivo mais eficientes e proporciona insights valiosos para o estudo continuado desta espécie.

Este trabalho conclui que o cultivo laboratorial de *C. acicularis* é uma estratégia viável e promissora para atender à crescente procura por biocompostos marinhos. Estudos futuros devem explorar o scale-up dos cultivos, a integração com outros sistemas de aquacultura e a avaliação do impacto de fatores ambientais adicionais na produtividade e qualidade da biomassa.

5. Bibliografia

- Afonso, C., Correia, A.P., Freitas, M.V., Baptista, T., Neves, M. & Mouga, T. (2021). Seasonal changes in the nutritional composition of *Agarophyton vermiculophyllum* (Rhodophyta, Gracilariales) from the center of Portugal. *Foods* 10, 1145
- Aknaf, A., Ahsan, U., Baghour, M., Rahhou, A., Imperl, J., Petrova, P. & Kolar, M. (2024). Minerals and trace element compositions of some seaweeds from the Marchica lagoon, North-East Mediterranean coast of Morocco. *Marine pollution bulletin*, 206, 116795.
- Algarra, P., de la Viña, G., & Niell, J. (1991). Effects of light quality and irradiance level interactions on short-term pigment response of the red alga *Corallina elongata*. *Marine Ecology Progress Series*, 74(1), 27–32. <http://www.jstor.org/stable/24825839>
- AOAC (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 20th ed.; Latimer, G.W., Jr., Ed.; Association of Official Analytical Chemists: Rockville, MD, USA; ISBN 0935584870.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2022). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003187707>
- Bastos, E., Felix, M., Rover, T., Horta, P.A., Hayashi, L. & Oliveira, E.C. (2012). Caracterização nutricional das macroalgas *Chondracanthus teedei* (Gigartinales, Rhodophyta) e *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) do sul do Brasil.
- Beattie, S. W., Morançais, M., Déléris, P., Fleurence, J., & Dumay, J. (2018). Extraction of phycocyanin and phycoerythrin pigments. In B. Charrier, T. Wichard, & C. R. K. Reddy (Eds.), *Protocols for Macroalgae Research* (pp. 249–265).
- Beer, S., & Eshel, A. (1985). Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Marine and Freshwater Research*, 36(6), 785.
- Bodian, M. Y., Lafontaine, N., Matard, M., Mussio, I., & Rusig, A. M. (2013). Evaluation of the in vitro methods for micropropagation of *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq (Gigartinales, Rhodophyta): tissue culture and production of protoplasts. *Journal of Applied Phycology*, 25(6), 1835–1845.
- Braune, W., & Guiry, M.D. (2011). *Seaweeds: a colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans*. p.601
- Bulboa Contador, C., Massad, I. P., Contreras-Porcia, L., Zapata, J., Castañeda, F., Ramírez, M. E., & Gil-Kodaka, P. (2020). Concise review of genus *Chondracanthus* (Rhodophyta: Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-019-01956-w
- Cermeño, M., Felix, M., Connolly, A., Brennan, E., Coffey, B., Ryan, E., & FitzGerald, R. J. (2018). Role of carbohydrate conjugation on the emulsification and antioxidant properties of intact and hydrolyzed whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids*.
- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Singh, G., & Maity, J. P. (2014). Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.003>

- Costa-Lotufo, L. V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. & Epifanio, D. A. (2009). Marine Organisms as a Source of New Pharmaceuticals: History and Perspectives. *Química Nova*, 32 (3), pp. 703-716.
- Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A. M. M., & Pereira, L. (2020). A Comprehensive Review of the Nutraceutical and Therapeutic Applications of Red Seaweeds (Rhodophyta). *Life*, 10(3), 19. <https://doi.org/10.3390/life10030019>
- Craigie, J.S., & Shacklock, P.F., (1985). Culture of Irish Moss. in Boghen A.D. (ed) *Coldwater Aquaculture in Atlantic Canada. Second Edition. The Canadian Institute for research on Regional Development. Moncton.* pp. 241-270.
- Donia, M. & Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectious Diseases*, 3, pp. 338-348.
- DrLange (1994). Colour review. DrLange application report no. 8e. DrLange, USA.
- Dumay, J., Morançais, M., Nguyen, H. P., & Fleurence, J. (2015). Extraction and Purification of R-phycoerythrin from Marine Red Algae. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1308, 109–117. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_5
- El Mouttaqui, S., Bekkali, M., Ouazzani, K. C., Baali, A., Zidane, H., Bourhim, N., & Rezzoum, N. E. (2022). The effect of physico-chemical parameters and nutrients on the bioecology of *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq at three sites in the Moroccan Atlantic Ocean. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 26(4).
- El Omari, F., Mouradi, A., Bennaser, L., Bennis, M., Blail, H., Mouradi, A. & Givernaud, T. (2007). Analyse de la croissance de *Gymnogongrus patens* Agardh de la côte atlantique marocaine. *Afrique Science.*, 03: 413-433.
- Fabrowska, J., Messyasz, B., Szyling, J., Walkowiak, J., & Łęska, B. (2017). Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycological Research*, 66(1), 52–57. doi:10.1111/pre.12191
- FAO. (2024). In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0690en>
- Feng, X., Zhang, H., & Yu, P. (2020). X-ray fluorescence application in food, feed, and agricultural science: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–11. doi:10.1080/10408398.2020.177667
- Ficko-Blean, E., Hervé, C., & Michel, G. (2015). Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae. *Perspect. Phycol.* 2, 51–64. <https://doi.org/10.1127/pip/2015/0028>.
- Freitas, M. V., Inácio, L. G., Martins, M., Afonso, C., Pereira, L., & Mougá, T. (2022). Primary composition and pigments of 11 red seaweed species from the center of Portugal. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9), 1168.
- Freitas, M.V., Mougá, T., Correia, A.P., Afonso, C. & Baptista, T. (2021). New Insights on the Sporulation, Germination, and Nutritional Profile of *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) Grown under Controlled Conditions. *J. Mar. Sci. Eng.* 9(6), 562.

- Godínez-Ortega, J. L., Snoeijs, P., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y., & Pedersén, M. (2007). Growth and pigment composition in the red alga *Halymenia floresii* cultured under different light qualities. *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 253–260. doi:10.1007/s10811-007-9241-0
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine ecology progress series*, 409, 267-299.
- Gong, J., Liu, Z., & Zou, D. (2020). Growth and photosynthetic characteristics of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) cultured under fluorescent light and different LED light. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-020-02151-y
- Guiry, M. D., & Cunningham, E. M. (1984). Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of north-eastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta: Gigartinales). *Phycologia*, 23(3), 357–367.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2024). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, acedido em (12/09/2024), disponível em www.algaebase.org
- Guiry, M.D. (1984). Photoperiodic and temperature responses in the growth and tetrasporogenesis of *Gigartina acicularis* (Rhodophyta) from Ireland. *Helgolander Meeresun.*, 38: 335-347.
- Henriques, B., Lopes, C. B., Figueira, P., Rocha, L. S., Duarte, A. C., Vale, C., Pardal, M. A., & Pereira, E. (2017). Bioaccumulation of Hg, Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate. *Chemosphere*, 171, 208–222.
- Hollants, J., Leliaert, F., De Clerck, O., & Willems, A. (2013). What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 1-16.
- Hurd, C. L., Harrison, P. J., Bischof, K., & Lobban, C. S., (2014). *Seaweed Ecology and Physiology* (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2012). Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1123-1132.
- Kang, L.-K., Huang, Y.-J., Lim, W.-T., Hsu, P.-H., & Hwang, P.-A. (2020). Growth, pigment content, antioxidant activity, and phytoene desaturase gene expression in *Caulerpa lentillifera* grown under different combinations of blue and red light-emitting diodes. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-020-02082-8
- Khairy, H. M., & El-Shafay, S. M. (2013). Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia*, 55(2), 435–452. <https://doi.org/10.5697/oc.55-2.435>
- Kim, J.-H., Choi, S.-J., & Lee, S. (2019). Effects of temperature and light on photosynthesis and growth of red alga *Pyropia dentata* (Bangiales, Rhodophyta) in a conchocelis phase. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.02.058
- Kirk, J. T. O., & Allen, R. L. (1965). Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein

- synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21(6).
- Kloareg, B., & Quatrano, R., (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* 26, 259–315.
- Kloareg, B., Badis, Y., Cock, J.M., & Michel, G., (2021). Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: a macroalgal perspective. *Genes* 12, 1059. <https://doi.org/10.3390/genes12071059>.
- Lembi, C.A., & Waaland, J.R. (1989). *Algae and human affairs*, viii, 590 pp. *J Mar Biol Assoc UK.*, 69: 742-742. <https://doi.org/10.1017/S0025315400031210>
- Lewin, J. (1966). Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6:1-12.
- Lopes, F. L. D. S. (2022). R-ficoeritrina da macroalga *Solieria filiformis*: fluorescência in vivo e otimização da extração.
- López-Campos, M., Pérez-Lloréns, J. L., Barrena, F., Pérez-González, C. M., & Hernández, I. (2022). Culture of *Gracilaria gracilis* and *Chondracanthus teedei* from Vegetative Fragments in the Field and Carpospores in Laboratory. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(8), 1041.
- Lüning, K. & Dring, M. J. (1972). Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina*. *Planta* 104: 252–256.
- Lüning, K. (1992) Day and night kinetics of growth rate in green brown and red seaweeds. *J Phycol* 28:794–80
- Macchiavello, J., Bulboa, C., Edding, M. (2003) Vegetative propagation and spore-based recruitment in the carragenophyte *Chondracanthus chamissoi* (Gigartinales, Rhodophyta) in northern Chile. *PhycolRes* 51:45–50
- Martin, I., Cabán-Hernández, K., Figueroa-Santiago, O., & Espino, A. M. (2015). *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein inhibits TLR4 activation and suppresses the inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 194(8), 3924–3936.
- Mouga, T, Abreu, M, Freitas, M.V., Santos, P.M., & Pombo, A. (2024) *Halopteris scoparia*: A promising seaweed candidate for Integrated Multi-Trophic Aquaculture; *Journal of Applied Phycology* (in press)
- Murton, D. K., & Crowhurst, S. J. (2020). Cross correlation of CIELAB color reflectance data from archive photographs and line-scan images of sediment. *Quaternary Research*, 93, 267–283. [doi:10.1017/qua.2019.59](https://doi.org/10.1017/qua.2019.59)
- Mzibra, A., Aasfar, A., Benhima, R., Khouloud, M., Boulif, R., Douira, A., Bamouh, A., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Biostimulants Derived from Moroccan Seaweeds: Seed Germination Metabolomics and Growth Promotion of Tomato Plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(1), 353–370. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10104-5>

- Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Fang, K., Gong, C., & Xie, S. (2017). Origin and evolutionary history of freshwater Rhodophyta: further insights based on phylogenomic evidence. *Scientific reports*, 7(1), 2934.
- Neveux, N., Bolton, J. J., Bruhn, A., Roberts, D. A., & Ras, M. (2018). The Bioremediation Potential of Seaweeds: Recycling Nitrogen, Phosphorus, and Other Waste Products. *Blue Biotechnology*, 217–239.
- Orfanidis, S., Panayotidis, P., & Stamatis, N. (2003). An insight to the ecological evaluation index (EEI). *Ecol Indic* 3:27–33
- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., C. Alves, R. & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. *Separations*, 7(2), 33.
- Parjokolaei, B. R., Kloster, L., Bruhn, A., & Bo, M. (2013). Effect of light quality and nitrogen availability on the biomass production and pigment content of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Chem Eng J*, 32.
- Patarra, R.F., Carreiro, A.S., Lloveras, A.A., Abreu, M.H., Buschmann, A.H. & Neto, A.I. (2017). Effects of light, temperature and stocking density on *Halopteris scoparia* growth. *J. Appl. Phycol.* 29, 405–411.
- Peñalver, R., Lorenzo, J. M., & Nieto, G. (2024). Bioaccessibility, digestibility and nutritional properties of algae and *Cyanophyceae* as basis of their potential as functional food ingredients. *Applied Food Research*, 4(1), 100404.
- Penesyan, A., Kjelleberg, S., & Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Marine drugs*, 8(3), 438-459.
- Pereira, L. (2004). Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa: aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos. Coimbra.
- Pereira, L. (2016). *Edible Seaweeds of the World* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19970>
- Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I., (2008) Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions, *European Journal of Phycology*, 43:1, 107-118.
- Pereira, T., Barroso, S., Mendes, S., Amaral, R. A., Dias, J. R., Baptista, T., Saraiva, J. A., Alves, N. M., & Gil, M. M. (2020). Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. *Food Chemistry*, 321, 126688. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126688>
- Perrone, C., & Felicini, G. P. (1976). Les bourgeons adventifs de *Gigartina acicularis* (Wulf.) Lamour. (Rhodophyta, Gigartinales) en culture. *Phycologia*, 15(1), 45–50. doi:10.2216/i0031-8884-15-1-45.1
- Portugal, A. B., Carvalho, F. L., de Macedo Carneiro, P. B., Rossi, S., & de Oliveira Soares, M. (2016). Increased anthropogenic pressure decreases species richness in tropical intertidal reefs. *Mar Environ Res* 120:44–54

- Redmond, S., Green, L., Yarish, C., Kim, J., & Neefus, C. (2014). New England seaweed culture handbook: nursery systems. Connecticut Sea Grant CTSG-14(01), 92.
- Sáez, F., Macchiavello, J., Fonck, E., Bulboa, C. (2008) The role of the secondary attachment disc in the vegetative propagation of *Chondracanthus chamissoi* (Gigartinales; Rhodophyta). *Aquat Bot* 89:63–65
- Silva, B. (2009). Estudos do cultivo de algas vermelhas e castanhas em laboratório para aplicação em sistemas de Aquacultura Integrada Multitrófica. Tese de Mestrado, Universidade do Porto. <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/16147>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Valero, M., Guillemín, M. L., Destombe, C., Jacquemin, B., Gachon, C. M., Badis, Y., Buschmann, A.H., Camus, C, & Faugeton, S. (2017). Perspectives on domestication research for sustainable seaweed aquaculture. *Perspectives in Phycology*, 4(1), 33-46.
- Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 73–92. doi:10.1016/S0924-2244(02)00066-3
- Vasquez, Y., Swink, N., Winburn, S., Terrien, T., & Ryan, T. (2016). Red, White, or Blue: Which color is right for you? *Algae Growth under Different Colors of Light*. *Journal of Introductory Biology Investigations*, 5.
- Vizoso, M. T., & Cremades, J. (2016). Typification of algae described by Simón de Rojas Clemente y Rubio deposited at the Herbarium of the University of Granada (Spain). *Phytotaxa*, 275(1), 45. doi:10.11646/phytotaxa.275.1.5
- War Naw, S., Darli Kyaw Zaw, N., Siti Aminah, N., Amin Alamsjah, M., Novi Kristanti, A., Nege, A. S., & Thanda Aung, H. (2020). Bioactivities, heavy metal contents and toxicity effect of macroalgae from two sites in Madura, Indonesia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(8), 528-537. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2020.09.007>
- WoRMS Editorial Board (2024). World Register of Marine Species. Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2024-09-12. doi:10.14284/170
- Yu, Z., Robinson, S. M. C., Xia, J., Sun, H., & Hu, C. (2016). Growth, bioaccumulation and fodder potentials of the seaweed *Sargassum hemiphyllum* grown in oyster and fish farms of South China. *Aquaculture*, 464, 459–468.
- Yüçetepe, A., Kirkin, C., Mertdinç, Z., Ayar, EN, Soylukan, C., Dikici, E., Özçelik, B., & Okudan, E. Ş. (2024). Composição química e perfis nutricionais de nove espécies de macroalgas vermelhas. *Produção, Processamento e Nutrição de Alimentos*, 6 (1), Artigo 84. <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00258-0>
- Zhou, L., Li, K., Duan, X., Hill, D., Barrow, C., Dunshea, F., Martin, G. & Suleria, H. (2022). Bioactive compounds in microalgae and their potential health benefits. *Food Bioscience*, 49. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.101932

Zozaya-Valdes, E., Egan, S., & Thomas, T., (2015). A comprehensive analysis of the microbial communities of healthy and diseased marine macroalgae and the detection of known and potential bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 146.

6. Anexos

Anexo 1 – Composição do Meio Von Stosch Enriched Modificado (VSE)

Modified Von Stosch Enrichment (VSE) for use with red algae			
*It is convenient to prepare a stock solution of each salt in distilled deionized water using the table below. Then add 1 ml of each solution, 1-6, to 1 L of sterilized seawater. It is suggested to combine solutions 3 and 4 just prior to this addition to the sterilized seawater. Salts and vitamins solutions should be sterile filtered after their preparation—see notes on next page.			
Solution Components			
Ingredients			
<u>Solution 1: Nitrogen</u>	Quantity (grams)	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	1L	2L	3L
Ammonium chloride (NH ₄ Cl)	26.75 g	53.49 g	80.24 g
<u>Solution 2: Phosphate</u>	Quantity (grams)	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	1L	2L	3L
Sodium phosphate, dibasic, 12-hydrate, crystal (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	0.4 g	0.8 g	1.2 g
<u>Solution 3: Iron*</u> (Combine with 4 immediately prior to addition to seawater)	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water			
Ferrous sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)			
<u>Solution 4: EDTA*</u> (Combine with 3 immediately prior to addition to seawater)	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water			
Disodium ethylenediamine tetra acetate (Na ₂ EDTA)			
<u>Solution 5: Manganese</u>			
Deionized water	1L	2L	3L
Manganese chloride . 4H ₂ O (MnCl ₂)	0.0198 g	0.0396 g	0.0594 g
<u>Solution 6: Vitamins*</u> (Store in freezer)	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	1L	2L	3L
Thiamine	0.2 g	0.4 g	0.6 g
Biotin	0.001 g	0.002 g	0.003 g
Vitamin B ₁₂	0.002 g	0.004 g	0.006 g

Anexo 2 – Composição do Meio Provasoli Enriched Seawater (PES)

PROVASOLI ENRICHED SEAWATER MEDIA (PES)			
To the base solution (I), add the following amounts of prepared solutions II, III, & IV			
Enrichment Stock Solution	Quantity (ml) 1000 (final)	X2 (ml) 2000 (final)	X3 (ml) 3000 (final)
Solution I: Base Solution	599 (final)	1198 (final)	1797 (final)
Solution II: Fe (as EDTA complex; 1:1molar)	200	400	600
Solution III: P II metals	200	400	600
Solution IV: Vitamins Vitamin B ₁₂ , Biotin	1	2	3
*Adjust pH of final solution to 7.8 using HCl			
Solutions I, II, III & IV			
Ingredients			
<u>Solution I: Base Solution</u>	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	599	1198	1797
Tris Buffer	4 g	8 g	12 g
NaNO ₃	2.8 g	5.6 g	8.4 g
Na ₂ glycerophosphate	0.4 g	0.8 g	1.2 g
Thiamine-HCl (Vit. B ₁)	0.004 g	0.008 g	0.012 g
<u>Solution II: Fe (as EDTA complex; 1:1 molar)</u>	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	1L (total)	2L (total)	3L (total)
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0.700 g	1.4 g	2.1 g
Na ₂ EDTA	0.600 g	1.2 g	1.8 g
<u>Solution III: P II metals</u>	Quantity	Quantity (X2)	Quantity (X3)
Deionized water	1L (total)	2L (total)	3L (total)
Na ₂ EDTA (Disodium ethylenediamine tetraacetate)	1 g	2 g	3 g
H ₃ BO ₃ (Boric Acid)	1.140 g	2.28 g	3.42 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O (Ferric Chloride)	0.049 g	0.098 g	0.147 g
MnSO ₄ · H ₂ O (Manganese sulfate monohydrate)	0.130 g	0.26 g	0.39 g
CoSO ₄ · 7H ₂ O (Cobaltous sulfate heptahydrate)	0.005 g	0.01 g	0.015 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Zinc sulfate, 7-hydrate)	0.022 g	0.044 g	0.066 g
<u>Solution IV: Vitamins</u>	Quantity		
Deionized water	25 mL (total)		
Vitamin B ₁₂	0.002 g		
Biotin	0.001 g		

Anexo 3 – Composição do Meio Nutribloom plus (NB)

