

*Avaliação do potencial dos extratos das macroalgas Codium tomentosum e Gracilaria gracilis como bioestimulantes*

**Carolina Andreia dos Santos Ferreira**

*Avaliação do potencial dos extratos das macroalgas Codium tomentosum e Gracilaria gracilis como bioestimulantes*

**Carolina Andreia dos Santos Ferreira**

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

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Clélia Afonso e da Doutora Teresa Mouga

2023

**Título:** Avaliação do potencial dos extratos das macroalgas *Codium tomentosum* e *Gracilaria gracilis* como bioestimulantes

Copyright © Carolina Andreia dos Santos Ferreira

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2023

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 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**

Quando se pensa em agradecer a todas as pessoas, que de uma maneira ou outra, nos apoiaram na montanha-russa que foi este processo, torna-se impraticável, contudo, faço um esforço.

Quero agradecer em primeiro lugar, às minhas orientadoras, Professora Doutora Teresa Mouga e Professora Doutora Clélia Afonso. Obrigada do fundo do coração, pelo apoio, pela confiança que me transmitiram, mas acima de tudo, pela paciência que tiveram comigo (eu sei que é preciso muita). Sem a vossa orientação não estaria aqui hoje.

Um obrigado também a EuroSementes, por ter fornecidos as sementes.

Agradecer à Marta Freitas por nos apoiar nos Cete, mesmo não sabendo nada do que andávamos a tramar, mas em especial por riscar todos os nossos papéis de identificação do material. Posso garantir que as obras de arte são imensas, desde um simples golfinho, a uma ambulância.

Mas em especial, quero agradecer à minha colega de quarto, de viagens, de laboratório, e por aí além, Rute Ramos. Não tenho palavras que cheguem para descrever os nossos domingos a seguir a hora de almoço quando íamos comer um arroz-doce só para consolar a barriguinha.

Agradecer aos meus padrinhos, que por mais longe que estejam, arranjam maneira de estar sempre perto, e de me apoiar em tudo incondicionalmente.

E por último, mas não menos importante, agradecer à minha família, em particular à minha Mãe, porque como o povo português diz e muito bem, Mãe é Mãe, pela paciência, pelos puxões de orelhas, que eu sei que por mais altos e baixos que encontre na vida, a minha Mãe vai estar sempre lá a apoiar-me e ao meu irmão que por muitas ideias mal interpretadas, lá no fundo eu sei que nos entendemos e só queremos o melhor para a vida um do outro.

Não podendo, contudo, esquecer-me de agradecer de alma e coração, aos meus dois bebés de estimação, o senhor biduzinho e o senhor pirata, por me aquecerem os pés nas noites frias de inverno e me tirarem as mantas nas noites quentes de verão, por roubarem a minha comida, porque cada olhar e roncar, daquelas miniaturas de 1 quilo e meio, valem ouro.

## Resumo

As macroalgas são organismos fotossintéticos, muito diversificados. A espécie *Gracilaria gracilis*, bem como o *Codium tomentosum*, são comestíveis e apresentam compostos bioativos de elevado interesse, com diversas aplicações em diferentes áreas (alimentar, cosmética, entre outras).

Embora não sejam atualmente utilizadas de forma ampla na agricultura, as macroalgas são usadas há já muito anos como bioestimulantes de plantas. Recentemente, ressurgiu um novo interesse nas aplicações agrícolas das macroalgas, relacionado com a procura crescente de produtos que não prejudicam o ambiente e que tornam a produção vegetal mais rentável e sustentável.

As macroalgas apresentam na sua constituição, polissacarídeos e hormonas vegetais, (tais como as auxinas, as citocininas, o etileno, as giberelinas e o ácido abscísico), substâncias conhecidas por desempenharem um papel relevante no desenvolvimento e fisiologia das plantas. São também ricas em proteínas, fibras, vitaminas e minerais.

O principal objetivo deste trabalho foi a determinação do potencial bioestimulante de extratos de macroalgas, com especial ênfase no seu efeito sobre a germinação e o crescimento de plantas. Adicionalmente, foi testado o potencial aumento da resistência ao stress térmico e ao stress salino. O efeito bioestimulante foi testado em duas espécies agrícolas: alface (*Lactuca sativa L.*) e tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Foi possível concluir que, na maioria dos ensaios, as sementes expostas aos extratos de macroalgas das espécies testadas (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*) apresentam uma germinação mais acelerada do que o controlo, traduzida por uma percentagem de germinação mais elevada, em cada dia, apresentando, ainda, um desenvolvimento superior das radículas e dos hipocótilos N, bem como uma percentagem de humidade mais elevada. Foi, ainda, possível constatar que as sementes expostas aos extratos de *Gracilaria gracilis* e de *Codium tomentosum* apresentam uma maior resistência ao stress salino e ao stress térmico.

**Palavra-Chave** – Macroalgas vermelhas, Macroalgas verdes, *Gracilaria gracilis*, *Codium tomentosum*, Bioestimulantes, Germinação de sementes, Ensaio de crescimento, Ensaio de stress.

## **Abstract**

Macroalgae are widely known for being photosynthetic organisms. The species *Gracilaria gracilis*, as well as *Codium tomentosum*, are edible and present bioactive compounds of great interest, with various applications in different areas (food, cosmetics, among others).

Although they are not currently widely used in agriculture, macroalgae have been used for many years as plant biostimulants. Recently, a new interest in the agricultural application of these macroalgae has emerged, related to the growing demand for products that do not harm the environment and that make plant production more profitable and sustainable.

Macroalgae have in their constitution polysaccharides and plant hormones (such as auxins, cytokinin's, ethylene, gibberellins, and abscisic acid), substances known to play a relevant role in plant development and physiology. They are also rich in protein, fiber, vitamins, and minerals.

The main objective of this work was to determine the biostimulant potential of macroalgae extracts, with special emphasis on their effect on germination and plant growth. Additionally, the potential increase in resistance to heat and salt stress was tested. The biostimulant effect was tested on two agricultural species: lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.).

It was possible to conclude that, in most trials, seeds exposed to macroalgae extracts of the species tested (*Gracilaria gracilis* or *Codium tomentosum*) show faster germination than the control, as well as a higher hypocotyl and root development and a higher moisture percentage. It was also possible to verify that the seeds exposed to extracts of *Gracilaria gracilis* or *Codium tomentosum* showed greater resistance to salt and heat stress.

**Keywords** – Red seaweed, Green seaweed, *Gracilaria gracilis*, *Codium tomentosum*, Biostimulants, Seed Germination, Growth test, Stress tests.

## Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Tabelas	viii
Índice de Imagens	ix
Lista de Abreviaturas	xiv
Introdução	1
I. <i>Gracilaria gracilis</i>	5
II. <i>Codium tomentosum</i>	7
III. Biofertilizantes e Bioestimulantes	9
IV. Extratos de algas como Bioestimulantes	11
V. Reguladores de crescimento	11
1. Hormonas Vegetais	11
2. Outros reguladores de crescimento	13
VI. Stress salino e de temperatura	14
VII. Ensaio de Germinação	14
Objetivo Principal	16
Material e Métodos	17
I. Recolha da alga, triagem e armazenamento	17
II. Secagem da Biomassa	17
III. Preparação dos extratos e respetivas concentrações	17
IV. Ensaio de Germinação e Crescimento	18
V. Ensaio de Germinação em Papel de Filtro	20
VI. Ensaio de Desinfecção	20
VII. Ensaio de Crescimento	21
VIII. Ensaio de Crescimento em condições de Stress Salino	22
IX. Ensaio de Crescimento em condições de Stress Térmico	23

<b>X.</b>	<b>Análise Estatística</b>	24
	<b>Resultados e Discussão</b>	25
<b>I.</b>	<b>Germinação de sementes de alface em papel de filtro</b>	25
<b>II.</b>	<b>Ensaio de Desinfecção</b>	28
<b>III.</b>	<b>Ensaio de Crescimento</b>	34
<b>IV.</b>	<b>Ensaio de Crescimento em condições de Stress Salino</b>	42
<b>V.</b>	<b>Ensaio de Crescimento em condições de Stress Térmico</b>	54
	<b>Conclusão</b>	58
	<b>Perspetivas Futuras</b>	59
	<b>Bibliografia</b>	60
	<b>Anexos</b>	73

### Índice de Tabelas

Tabela I - Composição química da <i>Gracilaria gracillis</i> cultivada e de populações naturais colhidas na Figueira da Foz: Buarcos (FFBC) e na Lagoa de Óbidos: Bom Sucesso (LOBS)	6
Tabela II - Composição aproximada das algas marinhas e a sua contribuição percentual na ingestão de nutrientes	8

## Índice de Imagens

Figura 1 - Aplicações das macroalgas in Moura, 2020 -----	3
Figura 2 – <i>Gracilaria gracilis</i> , recolhida na Lagoa de Óbidos, a 24 de agosto de 2021.-5	5
Figura 3 – <i>Codium tomentosum</i> , recolhido na praia da Consolação, Peniche, a 24 de maio de 2017. -----	8
Figura 4 – Percentagem de germinação das sementes de alface, na presença de diferentes concentrações de extrato de <i>Codium tomentosum</i> , ao longo de 5 dias. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados -----	25
Figura 5 - Percentagem de germinação de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de extrato de <i>Gracilaria gracilis</i> , ao longo de 5 dias. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	26
Figura 6 - Percentagem de germinação de sementes de alface com ou sem processo de desinfecção, sendo usado extrato comercial (AgroGain) a 0,02%. CT+SE representa o controlo negativo, com sementes desinfetadas, MS+NñEst+SE representa o meio MS com extrato não estéril e sementes desinfetadas, MS+Eest+SE simboliza o meio MS com extrato estéril e sementes desinfetadas e MS+Eaut representa o meio MS com extrato autoclavado e sementes desinfetadas, CT+SñE representa o controlo negativo, com sementes não desinfetadas, MS+EñEst+SñE representa o meio MS com extrato não estéril e sementes não desinfetadas, MS+Eest+SñE representa o meio MS com extrato estéril e sementes sem processo de desinfecção, e MS+Eaut+SñE representa o meio MS com extrato autoclavado e sementes sem processo de desinfecção, n=2, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	28
Figura 7 – Ensaio de desinfecção, em que as sementes de alface não se encontram desinfetadas, ao final do 5º dia, com extrato comercial (Agrogain), em que os fungos se encontram assinalados com seta. -----	29
Figura 8 – Ensaio de desinfecção, em que as sementes de alface se encontram desinfetadas, ao final do 5º dia, com extrato comercial (Agrogain). -----	29
Figura 9 – Ensaio de desinfecção, comparação do comprimento das radículas das sementes de tomate em cm, entre as sementes desinfetadas e sementes não desinfetadas, n=2, sendo as barras de erro representativas do desvio padrão. -----	30

Figura 10 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, do ensaio de desinfecção que decorreu durante 7 dias, com diferentes concentrações de extrato não estéril de extrato comercial de *Kappaphycus alvarezii* (AgroGain), com sementes estéreis, onde EñEst = Extrato não estéril e EAut = Extrato autoclavado. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n = 3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 31

Figura 11 - Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento da radícula de sementes de tomate, em diferentes meios, onde EñEst = Extrato não autoclavado; EAut = Extrato autoclavado, extrato comercial (AgroGain), n=3. ----- 32

Figura 12 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hipocótilos das sementes de tomate, de diferentes meios, onde EñEst = Extrato não autoclavado e EAut = Extrato Autoclavado, extrato comercial (Agrogain), n=3. ----- 33

Figura 13 - Percentagem de humidade das sementes de tomate de diferentes concentrações de extrato comercial de (AgroGain), controlo (EñEst) = controlo que pertence ao ensaio com o extrato não estéril; EñEst = Extrato não estéril (0,02%, 0,2% e 2%); controlo (EAut) = controlo que pertence ao ensaio com o extrato autoclavado; EAut = Extrato Autoclavado, n=3 sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.----- 34

Figura 14 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, com extrato de *Codium tomentosum* a diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 35

Figura 15 - Percentagem de germinação registada nos ensaios de crescimento, com extrato de *Gracilaria gracilis* com diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 37

Figura 16 - Percentagem de germinação das sementes do tomate, durante 7 dias, em diferentes concentrações do extrato da *Gracilaria gracilis*. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 38

Figura 17 - Percentagem de germinação das sementes do tomate, durante 7 dias, em diferentes concentrações do extrato da *Codium tomentosum*. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 39

Figura 18 - Comprimento das radículas de tomate, de plântulas expostas a diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) dos diferentes extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. - 41

Figura 19 - Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hypocótilos de tomate, expostos a diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) dos diferentes extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 41

Figura 20 - Percentagem de humidade, das plântulas de tomate, em diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) de extrato (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*), n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 42

Figura 21 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, durante 7 dias, da concentração do extrato de *Codium tomentosum* (0,2%) com meio MS salino a 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o valor do desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 43

Figura 22 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, durante 7 dias, em extrato de *Gracilaria gracilis* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 44

Figura 23 - Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, da concentração do extrato de *Codium tomentosum* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 44

Figura 24 - Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, da concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 45

Figura 25 - Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de sementes de tomate, expostas a uma concentração do extrato de *Codium tomentosum* de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰ e NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 46

Figura 26 - Média $\pm$ desvio padrão do comprimento dos hipocótilos de tomate, expostas a uma concentração do extrato de <i>Codium tomentosum</i> de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	47
Figura 27 - Média $\pm$ desvio padrão do comprimento das radículas de alface, expostas a uma concentração de extrato da concentração do extrato de <i>Codium tomentosum</i> a 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	48
Figura 28 - Média $\pm$ desvio padrão do comprimento das radículas de sementes de tomate, expostas a uma concentração de extrato de <i>Gracilaria gracilis</i> de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	49
Figura 29 - Média $\pm$ desvio padrão do comprimento dos hipocótilos de tomate, expostas a uma concentração de extrato de <i>Gracilaria gracilis</i> de 0,2%, com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	49
Figura 30 - Plântulas de tomate, expostas ao extrato da <i>G. gracilis</i> no meio MS, germinadas em condições ideais ao final do 7º dia de ensaio de crescimento. -----	50
Figura 31 - Plântulas de tomate pouco desenvolvidas, ao final do 7º dia de indução do stress salino, expostas ao extrato de <i>G. gracilis</i> . -----	50
Figura 32 - Média $\pm$ desvio padrão do comprimento das radículas de alface, expostas a uma concentração de extrato de <i>Gracilaria gracilis</i> de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	51
Figura 33 - Percentagem de humidade das plântulas de tomate da concentração do extrato do <i>Codium tomentosum</i> (0,2%), em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	51
Figura 34 - Percentagem de humidade das plântulas de alface expostas a uma concentração do extrato do <i>Codium tomentosum</i> de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. -----	52

- Figura 35 - Percentagem de humidade das plântulas de tomate da concentração do extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 53
- Figura 36 - Percentagem de humidade das sementes de alface da concentração do extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 53
- Figura 37 - Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, na concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e em extrato de *Codium tomentosum* à 0,2%, à temperatura de 35°C. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo, n=5, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 55
- Figura 38 - Comprimento das radículas de sementes de alface em cm, ao fim de 5 dias de germinação, na concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e de extrato de *Codium tomentosum* de 0,2%, n=5, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 56
- Figura 39 - Percentagem de humidade das sementes de alface, da concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e do *Codium tomentosum* de 0,2%, n=5, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados. ----- 57

## Lista de Abreviaturas

CT – Controlo

g – Gramas

h – Horas

Meio MS – Meio Murashige e Skoog

MS + Aut – Meio Murashige e Skoog com extrato comercial autoclavado

MS + Est – Meio Murashige e Skoog com extrato comercial esterilizado por filtração

MS + NEst – Meio Murashige e Skoog com extrato comercial adicionado posteriormente sem sofrer processo de esterilização

PG – Percentagem de Germinação

IV – Índice de Vigor

°C – Graus Celsius

% - Percentagem

‰ – Permilagem

*C.tomentosum* – *Codium tomentosum*

*G.gracilis* – *Gracilaria gracilis*

## **Introdução**

As algas são organismos fotossintéticos muito diversificados, capazes de produzir compostos orgânicos a partir de substâncias inorgânicas (J. Silva, 2020), sendo responsáveis pela libertação de oxigênio para a atmosfera, tal como as plantas (Lakna, 2017). São vulgarmente utilizadas como alimento, ou incorporadas em rações para animais, como biocombustíveis, como bioindicadores da qualidade ambiental e em biorremediação, como fontes de ficocolóides e como filtros naturais, entre outras aplicações (Pereira, 2008). Estes organismos apresentam, em comparação com as plantas terrestres, uma elevada diversidade morfológica, sendo, no entanto, organismos mais simples. Quanto às suas dimensões, é possível dividir-se as algas, em dois grandes grupos empíricos, sendo estes representativos de organismos microscópicos ou macroscópicos, vulgarmente designadas por microalgas e macroalgas respetivamente (Pereira, 2021).

As macroalgas marinhas ou, em inglês “seaweeds” são organismos marinhos macroscópicos e pluricelulares, que são parte integrante dos ecossistemas costeiros, desempenhando importantes serviços ecossistémicos para o ambiente marinho costeiro (Sangha et al., 2014). Os serviços ecossistémicos podem ser divididos em quatro categorias: regulação, como por exemplo, dos ciclos geoquímicos; apoio, onde se pode incluir, por exemplo, o habitat; fornecimento, por exemplo, de alimento a outros organismos marinhos; e por último a categoria cultural, onde é possível incluir a investigação científica e as atividades marítimo-turísticas (Ferreira et al., 2021). As macroalgas podem encaixar-se em qualquer uma das 4 categorias mencionadas, uma vez que promovem a filtração da água, sequestro de carbono, como fonte de alimento e de compostos bioativos, servem de abrigo e berçário para o desenvolvimento de peixes e invertebrados, que posteriormente repovoaram os mares (Loos et al., 2019), sendo que ainda podem ser utilizadas para desenvolvimento de estudos a nível científico, e em zonas de recreio turístico.

As macroalgas marinhas são consideradas alternativas sustentáveis aos recursos convencionais de plantas agrícolas, com vantagens que incluem uma elevada taxa de crescimento, o potencial cultivo em água salgada ou salobra, a reduzida ocupação de terra cultivável e a elevada qualidade nutricional da biomassa destinada a alimentação humana ou animal (Øverland et al., 2019).

Existem cerca de 17.000 espécies de macroalgas, classificadas em diferentes grupos, os quais são definidos com base nos pigmentos presentes, podendo pertencer à divisão Chlorophyta, se apresentarem pigmentação verde, à classe Phaeophyceae se apresentarem uma pigmentação castanha e à divisão Rhodophyta se apresentarem pigmentação vermelha (Lobban, C.S. and Wynne, M.J., 1981 citado por Jung et al., 2013).

As macroalgas que pertencem a divisão Chlorophyta apresentam na sua composição os pigmentos acessórios clorofila *b*, xantofilas e carotenoides. A sua tonalidade deve-se à presença predominante de clorofilas *a* e *b*, podendo esta encontrar-se disfarçada pela presença dos carotenos, exibindo assim uma tonalidade alaranjada ou avermelhada (Almeida, A. R., 2007). A tonalidade castanha-esverdeada das Phaeophyceae deve-se à presença predominante da fucoxantina, uma xantofila, existindo ainda clorofila *c* (Bahcevandziev & Pereira, 2021). Já as macroalgas pertencentes à divisão Rhodophyta apresentam na sua constituição um pigmento rosa, solúvel em água, designado ficoeritrina, da classe das ficobilinas. Cerca de 98 % deste grupo de algas é representado por espécies marinhas (Neelesh T., 2016).

A composição química das macroalgas varia de acordo com a espécie em causa, com o habitat, com o clima e com outros fatores ambientais, como por exemplo, a luz, a salinidade, os nutrientes disponíveis e a temperatura (Battacharyya et al., 2015). A maioria das macroalgas produz compostos relevantes para o bem-estar e a saúde humana. A título de exemplo, o consumo de macroalgas aumenta a ingestão de fibras dietéticas e consequentemente reduz a incidência de algumas doenças crónicas (Meinita et al., 2022). A composição química das macroalgas é um fator de interesse relativamente à sua procura a nível comercial, uma vez que as macroalgas são constituídas por água (80-90%), mas quando desidratadas podem conter cerca de 50% de hidratos de carbono, 7-38% de minerais e ainda compostos lipofílicos, tais como ácidos gordos, lípidos e pigmentos (carotenoides) (Santos et al., 2016), ainda que em quantidade reduzida (1-3%). Contêm, ainda, compostos fenólicos e diversas vitaminas. São ainda ricas em proteínas (10 – 47%), apresentando elevadas quantidades de aminoácidos essenciais (Meinita et al., 2022).

A parede celular das macroalgas é constituída por polissacarídeos, predominando a celulose, mas exibindo outros. Destes, o ulvano é característico das algas verdes, as carragenanas e o agar, das algas vermelhas. Já os alginatos, fucoídano e laminarinas são típicos das algas castanhas (Shao & Duan, 2022).

Relativamente, à aplicação das macroalgas é possível enumerar distintas finalidades. As macroalgas são vulgarmente utilizadas na cosmética, na agricultura, na indústria alimentar, bem como na indústria farmacêutica, na produção de biomateriais, de biocombustíveis e em biorremediação (Leandro et al., 2020).

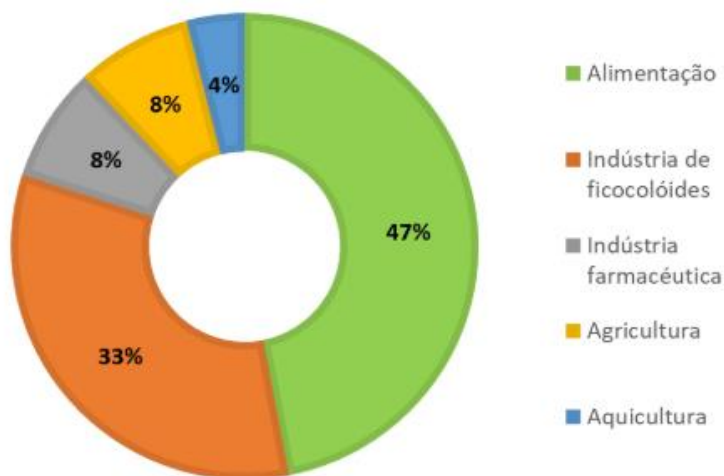


Figura 1 - Aplicações das macroalgas in Moura, 2020.

Como é possível observar na figura 1, destaca-se a utilização das macroalgas na indústria alimentar, a qual utiliza a biomassa algal, como referido, de elevada qualidade nutricional (Filote et al., 2021). A segunda maior aplicação das macroalgas, como é demonstrado na figura, na indústria de ficolóides, como fonte de espessantes, emulsionantes, gelificantes e estabilizantes, destinada a produtos da indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. São usados, por exemplo, o agar para a produção de gelatinas e indústrias de panificação ou os alginatos, usados em gelados, sumos e massas de bolos (Fonseca, 2016). As carragenanas foram usadas inicialmente, por volta de 1930, para a preparação de leite achocolatado (Pereira, 2002). Atualmente são usadas como agentes gelificantes em produtos lácteos (gelados, batidos, mousses instantâneas), entre outras aplicações. Na cosmética, estes ficolóides são usados, por exemplo, na produção de cremes, loções, batons para lábios e desodorizantes (Fonseca, 2016). Já na área da aquicultura, sendo a que apresenta menor aplicação, é relatada a utilização de extratos de algas em rações de peixe (Cardoso, 2019).

Embora apenas 8% das algas produzidas se destinem à utilização agrícola, como biofertilizantes e bioestimulantes, o interesse aumentou nos últimos anos, por serem um recurso mais sustentável e natural, comparativamente aos adubos químicos (Kholssi et al., 2022). De facto, o uso das macroalgas na agricultura é muito antigo, especialmente

como biofertilizantes, já que algumas macroalgas, como por exemplo as *Corallinaceae*, eram vulgarmente usadas para corrigir o pH dos solos ácidos, enquanto contribuíam ao mesmo tempo para a nutrição das culturas (Pereira, 2021).

O efeito bioestimulante poderá ser proporcionado pela presença das fito-hormonas, sendo as mais comuns, as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e o ácido abscísico. As fito-hormonas são responsáveis pelos processos fisiológicos, tais como a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, bem como a adaptação a situações de stress (Sandepogu et al., 2019).

Estas fito-hormonas, e outros fatores de crescimento, que melhoram o desenvolvimento das plantas, também existem nas macroalgas e variam consoante o grupo em que a macroalga pertence. Assim a aplicação agrícola destes compostos é benéfica para as plantas, podendo ainda haver vantagem quando conjugados diferentes extratos de macroalgas (Battacharyya et al., 2015; Tarakhovskaya et al., 2007). Assim, apesar de apresentarem, ainda, pouca aplicação comercial devido não só aos elevados custos de produção e de venda, bem como ao facto de haver a necessidade de utilizar espécies de macroalgas que sejam cultiváveis em aquacultura e a necessidade de perceber se ao recorrer a bioestimulantes algais não existe a transferência de toxinas para os alimentos, relativamente aos adubos químicos, a utilização das macroalgas como bioestimulantes encontra-se em desenvolvimento, uma vez que cada vez mais, se procuram produtos naturais e que causem menor impacto ambiental.

É importante que as espécies de macroalgas utilizadas como biofertilizantes e bioestimulantes sejam cultiváveis em aquacultura, uma vez que ao recorrermos ao sistema Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA), uma técnica que permite a produção de macroalgas em aquacultura (Mildenberger et al., 2022), é possível obter um recurso que a cada dia se torna mais escasso, não havendo a ocupação de terrenos agrícolas necessários para a produção de alimentos essenciais (Kholssi et al., 2022). Uma vez que com a produção de macroalgas, e posteriormente a utilização das biomassas algais em bioestimulantes, é possível obter a produção de alimentos de uma maneira mais nutritiva e mais rápida, permitindo assim melhor aproveitamento dos terrenos agrícolas que atualmente são escassos.

## I. *Gracilaria gracilis*

A espécie *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, L. M. Irvine & Farnham 1995 comumente conhecida por cabelo-de-velha, pertence à divisão Rhodophyta, classe Florideophyceae. É uma alga que apresenta consistência cartilaginosa, sendo vulgarmente utilizada para produção de agar (Pacheco et al., 2021; Irvine & Farnham, 1995; Pereira, 2008). Com uma tonalidade púrpura, a nível morfológico esta alga apresenta ramificações irregulares e abundantes (Figura 2). Comumente, esta alga consegue atingir um comprimento entre 50 e 60 cm, apresentando ainda um tecido medular com grandes células incolores de parede fina e uma estreita zona cortical externa onde se encontram pequenas células vermelhas-escuras, com abundantes cloroplastos (Irvine & Farnham, 1995). Esta espécie fixa-se ao substrato por um disco basal, exhibe eixos cilíndricos e cistocarpos salientes à superfície (Leite, 2017). A *G. gracilis* é habitualmente encontrada junto a rochas e pedras, na zona intertidal e subtidal, especialmente em margens arenosas, uma vez que necessita sempre de areia para o seu desenvolvimento, sendo muito resistente a variações de salinidade (Irvine & Farnham, 1995; Pereira, 2008).



Figura 2 - *Gracilaria gracilis*, recolhida na Lagoa de Óbidos, a 24 de agosto de 2021.

Em Portugal, bem como nos restantes países europeus, esta espécie é considerada comestível, apresentando ainda inúmeras aplicações alimentares devido a presença de compostos de interesse como é o caso da ficoeritrina. É possível, por exemplo, utilizar a *G. gracilis* em alimentos como aditivo alimentar devido a sua atividade antioxidante (Silva-Brito et al., 2021), bem como a incorporação de extratos algais como aditivo para rações funcionais para peixes, como é o caso da adição de extrato de *G. gracilis* em ração de peixe que confere ao peixes uma maior resistência a agentes bacterianos e efeitos

antioxidantes, sendo esta resistência adquirida de uma forma segura quer para o peixe, como para a espécie humana (Afonso et al., 2021).

A *G. gracilis* contém uma vasta variedade de metabolitos, como, por exemplo, os aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, compostos fenólicos e pigmentos (Torres et al., 2019), como é possível observar na tabela I. Neste estudo de Freitas et al. (2021) foram utilizadas, como termo de comparação, biomassa selvagem, de duas localizações distintas, e biomassa cultivada de *G. gracilis*. A biomassa cultivada exibe um perfil nutricional semelhante ao das populações selvagens. Estes resultados permitem considerar a *G. gracilis* como um alimento funcional, ou seja, um alimento que oferece não só benefícios para a saúde, bem como as funções nutricionais básicas, devido ao elevado teor proteico, à presença de hidratos de carbono, bem como o baixo teor em lípidos.

Tabela I - Composição química da *Gracilaria gracilis* cultivada e de populações naturais colhidas na Figueira da Foz: Buarcos (FFBC) e na Lagoa de Óbidos: Bom Sucesso (LOBS) (Freitas et al., 2021).

Parâmetros	Média ± Desvio padrão		
	Viveiro	FFBC	LOBS
Humidade (% peso fresco)	82,04 ± 1,14	77,81 ± 1,59	72,93 ± 1,71
Matéria Orgânica (% peso seco)	75,66 ± 0,33	81,04 ± 2,58	72,85 ± 3,69
Cinzas (% peso seco)	24,34 ± 0,33	18,96 ± 2,58	27,15 ± 3,69
Proteína Total (% peso seco)	21,58 ± 0,10	11,80 ± 0,36	14,20 ± 0,98
Conteúdo Lipídico (% peso seco)	1,21 ± 0,02	1,38 ± 0,05	1,40 ± 0,31
Carboidratos (% peso seco)	38,35 ± 0,74	40,72 ± 2,69	44,12 ± 5,32
Vitamina C (mg g <sup>-1</sup> peso seco)	0,306 ± 0,04	0,18 ± 0,21	0,27 ± 0,38
Ficocolóides (% peso seco)	18,51 ± 8,10	20,11 ± 3,76	17,62 ± 2,77

Quanto à atividade bioestimulante, o trabalho de Pacheco et al. (2021) demonstrou que o agar extraído de *G. gracilis* promove a germinação de sementes agrícolas, nomeadamente de couve (*Brassica oleracea L.*). É, pois, uma espécie que merece ser mais investigada no contexto dos bioestimulantes uma vez a presença de agar e ácido urónico nesta espécie mostrou ser um fator decisivo que afeta o crescimento das plantas. Já o trabalho desenvolvido por Pudoli et al., (2022) demonstrou, ainda, que embora a biomassa da *G. gracilis* seja utilizada para produção de agar, é possível recorrer aos resíduos

obtidos após extração do agar, uma vez que estes são ricos em proteínas (13,7%), hidratos de carbono (63,2%), lípidos (1,7%) e minerais (21,7%). É, por isso, possível obter produtos com um alto valor nutricional, minimizando assim os resíduos obtidos. Estes produtos obtidos através da utilização dos resíduos da biomassa podem ser aplicados como bioestimulantes, maioritariamente na forma líquida.

Atualmente, existem diversos estudos que revelam a importância da *G. gracilis*, não só em distintas aplicações, como na área farmacêutica, alimentar, mas em particular na área agrícola, uma vez que esta espécie apresenta uma elevada influência no desenvolvimento das raízes das plantas, do crescimento das culturas, bem como o aumento do rendimento das culturas (Antón E et al., 2021; Becker et al., 2021; Hector-Ardisana et al., 2020).

## **II. *Codium tomentosum***

O *Codium tomentosum* Stackhouse 1797 pertence à divisão Chlorophyta, classe Ulvophyceae e tem nome vulgar chorão-do-mar. É habitualmente encontrado em abundância na costa europeia. É uma alga verde-escura que atinge no máximo 30 cm de comprimento, com uma fronde que apresenta uma consistência esponjosa com ramificações dicotómicas, de secção cilíndrica (Stackhouse, 1797). As frondes apresentam pelos incolores que apenas são visíveis quando estas se encontram submersas em água (Pereira, 2021). Esta espécie pode ser encontrada em zonas subtidais rochosas e em poças-de-maré, onde existe exposição à ondulação (Rey et al., 2020). Em Portugal, bem como noutros países europeus, a alga é considerada comestível, apresentando inúmeras aplicações biotecnológicas, devido às suas bioatividades, como é o caso das capacidades antioxidantes e antimicrobianas, permitindo, assim, por exemplo, a produção de revestimentos naturais que retardam a oxidação de fruta fatiada (Augusto et al., 2022), aplicações na biotecnologia farmacêutica e em produtos cosméticos, mas também como biofertilizante (Crivelare, A., 2021).



Figura 3 - *Codium tomentosum*, recolhido na praia da Consolação, Peniche, a 24 de maio de 2017.

Na tabela II, apresenta-se o perfil nutricional da espécie *C. tomentosum*. O *C. tomentosum* destaca-se por apresentar maior teor de lípidos em comparação com as outras algas comestíveis analisadas, apresentando ainda um elevado conteúdo fenólico total (Jard et al., 2013; Rodrigues et al., 2015), sendo ainda possível salientar níveis de cinza elevados, havendo por isso a possibilidade de inserir esta espécie de macroalga na dieta humana (Rodrigues et al., 2015).

Tabela III - Composição de *Codium tomentosum*, adaptada de Rodrigues et al., (2015)

	<i>C.tomentosum</i>
% Humidade (g/100g peso seco)	9,0 ± 0,2
% Proteínas totais (g/100g peso seco)	18,88 ± 0,1
% Açúcares (g/100g peso seco)	32,8
% Lípidos (g/100g peso seco)	3,6 ± 0,2
Conteúdo fenólico total	920 ± 84
% Matéria orgânica (g/100g peso seco)	55,0 ± 0,7
% Cinza (g/100g peso seco)	35,99 ± 0,48

### **III. Biofertilizantes e Bioestimulantes**

Os biofertilizantes, tendo por base o Decreto-Lei nº 103/2015, de 15 de junho, são produtos cujos princípios ativos são compostos por microrganismos vivos, que não são prejudiciais para as plantas, animais, nem para o ser humano, sendo que a sua utilização promove o desenvolvimento das plantas, ao favorecer a nutrição das mesmas, sem alteração na diversidade biológica do solo, nem do ambiente (Vasconcelos & Chaves, 2020).

Quando aplicados, por exemplo, no solo, melhoram não só as suas propriedades físicas, mas também as químicas e, principalmente, as biológicas (Iqbal, et al., 2021) permitindo substituir a utilização recorrente de adubos químicos, reduzindo assim os impactos a nível ambiental e fornecendo uma ampla gama de produtos, para o desenvolvimento de plantas, produzidas em sistemas de agricultura biológica (Colla & Rouphael, 2020).

Quando procedemos à comparação dos biofertilizantes com os adubos químicos são notórias algumas vantagens, uma vez que os biofertilizantes reforçam a concentração de nutrientes presentes no solo, pelo aumento do teor em matéria orgânica (carbono, azoto e fósforo). O azoto, em particular, é necessário para a síntese celular de enzimas, proteínas, clorofila e, conseqüentemente, é necessário para o crescimento das plantas. Quando o fornecimento de azoto é irregular, existe um crescimento lento das plantas, contudo, os biofertilizantes permitem a fixação do azoto nas raízes das plantas, com mais eficiência do que os adubos químicos (Saeed et al., 2015). Por outro lado, após o uso de biofertilizantes, os terrenos conseguem reter melhor a humidade, devido à presença de polímeros, como os ficocolóides, que retêm a humidade nos solos, especialmente nos arenosos, desempenhando um papel de superabsorvente adicional (Sukriti et al., 2017). Os biofertilizantes são, ainda, considerados mais ecológicos em comparação com os adubos químicos, uma vez que não promovem a salinização dos solos, não contaminam os cursos de água, como é o caso do fosforo e do azoto que entram nas bacias hidrográficas e são transportados para os sistemas marinhos costeiros, resultando assim inúmeros impactos negativos na saúde humana, bem como no ambiente, perda de habitat e de biodiversidade (Bouwman et al., 2009), mas principalmente, não libertam para a atmosfera gases tóxicos (Kumar et al., 2022). É importante, porém, salientar que a utilização dos biofertilizantes torna-se uma técnica mais dispendiosa do que o uso de compostos fertilizantes químicos. Apesar disso, é menos poluente, mais eficiente,

produzindo plantas de melhor qualidade nutricional, mais robustas e com maior resistência a pragas em comparação com as plantas produzidas usando os adubos químicos (Saeed et al., 2015).

Atualmente, algumas espécies de macroalgas crescem excessivamente, sejam elas nativas ou espécies invasoras, surgindo florescimentos sobretudo em zonas litorais, devido ao aumento da temperatura da água do mar e à elevada concentração de nutrientes. Este fenómeno provoca não só um impacto a nível ambiental, como um impacto no bem-estar das populações de zonas costeiras. Contudo, estas macroalgas podem ser utilizadas em diferentes áreas, nomeadamente como biofertilizantes, permitindo, assim, que de um resíduo, se tornem num produto (Pardilhó et al., 2021). Exemplos disso são o “sargaço” ou “limo” colhido desde há séculos em Portugal e usado na agricultura, sobretudo perto da orla marítima (Devault et al., 2021). Exemplo de algumas macroalgas oportunistas que se encontram em crescimento excessivo e que podem ser utilizadas para bioestimulantes, são as *Ulva* spp. (Han et al., 2021). Já a *Saccorhiza polyschides*, espécie anual e oportunista, cuja biomassa se acumula na praia no final do verão (Gaspar et al., 2017), um estudo realizado por Pardilhó et al., (2022) demonstrou que a sua biomassa apresenta um elevado teor de hidratos de carbono - cerca de 70% - bem como uma fração mineral elevada que potencia a retenção de água e a absorção de nutrientes do solo por parte das plantas. Este estudo mostrou ainda que ao recorrer a este bioestimulante houve um maior crescimento das partes aéreas e radiculares das plântulas da couve e de chervilha (*Brassica oleracea* e *Pastinaca sativa*, respetivamente), cerca de 42%, em comparação com o controlo.

O conceito de Economia Circular é um conceito estratégico que assenta na redução, reutilização, reciclagem e recuperação dos desperdícios (Kirchherr et al., 2017). Assim, os biofertilizantes podem enquadrar-se neste conceito uma vez que, ao produzir biofertilizantes, o agricultor consegue aproveitar os desperdícios decorrentes da sua produção agrícola, ou seja, desperdícios resultantes da quinta, da horta, bem como do jardim. Relativamente às macroalgas, é possível utilizar resíduos algais, e algas provenientes de florescimentos e transformar esta biomassa em combustíveis, em biomateriais, ou em adubos biológicos (Martinho, Paula e Jacquinet, 2020).

#### **IV. Extratos de algas como Bioestimulantes**

Os bioestimulantes são produtos utilizados com o intuito de melhorarem as condições fisiológicas e nutricionais das plantas. Não sendo ainda consensual a definição de bioestimulante, a primeira definição desta palavra terá sido cunhada em 1997 por Zhang e Schmidt numa página de internet, de uma publicação inteiramente dedicada à manutenção de relva (Rouphael & Colla, 2020). Atualmente a definição de bioestimulante consiste num produto biológico, que tem como objetivo melhorar as características fisiológicas e nutricionais das plantas. É, pois, designado bioestimulante uma substância capaz de induzir uma melhor atividade metabólica nas plantas, promovendo o seu desenvolvimento e resistência contra pragas, doenças e fatores abióticos (Vasconcelos, F., C & Chaves, G., H., 2020). Entre estes, os bioestimulantes produzidos com base em biomassa algal são amplamente conhecidos como substâncias com a função de atenuar o stress abiótico (temperatura, irradiação, entre outros) e aumentar a produtividade das plantas (Boukhari et al., 2020). De facto, os bioestimulantes agrícolas com base em macroalgas são capazes de influenciar a fotossíntese, a respiração, a síntese de ácidos nucleicos e a absorção de iões, entre outros importantes efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas (Crouch & van Staden, 1993; Craigie, 2011; Sharma et al., 2014). Assim, os bioestimulantes tendem a aumentar a disponibilidade de nutrientes, a capacidade de retenção de água e, a concentração de antioxidantes, assim como promover o metabolismo e aumentar a produção de clorofila (Zhang et al., 2003; Khan et al., 2009).

As macroalgas são usadas comumente como bioestimulantes porque apresentam fitohormonas, também conhecidas por hormonas vegetais, entre outros promotores de crescimento. Quando aplicados nas plantas, conseguem influenciar as principais vias do metabolismo das plantas, tais como o anabolismo e o catabolismo (Melo et al., 2020).

#### **V. Reguladores de crescimento**

##### **1. Hormonas Vegetais**

As hormonas vegetais são substâncias orgânicas produzidas nas células, tecidos e órgãos vegetais e que operam como agentes reguladores, ou seja, estas substâncias promovem a indução de modificações quer fisiológicas, quer anatómicas, nos seus respetivos locais de ação (Xu et al., 2018), sendo eficazes habitualmente em baixas concentrações.

Em comparação com as hormonas animais, as hormonas vegetais são, na maioria, sintetizadas por células não especializadas, uma vez que atuam sobre células-alvo com recetores específicos, localizados nas membranas ou no citoplasma (Cheng et al., 2020).

As hormonas vegetais principais dividem-se em categorias, sendo as principais as auxinas, as citocininas, o etileno, as giberelinas e o ácido abscísico. Estas desempenham papéis relevantes no desenvolvimento e fisiologia das plantas, uma vez que promovem o amadurecimento dos frutos e a queda das folhas, aceleram a germinação e a floração, promovem a resistência a stress, e consequentemente, aumentam o rendimento das culturas (Shi et al., 2017). Alguns tipos de hormonas são passíveis de se encontrar não só em plantas terrestres, como também nas algas, em bactérias e em fungos associados as plantas (Lee et al., 2019).

As auxinas (como por exemplo, o ácido indol-acético) encontram-se envolvidas em vários mecanismos fisiológicos, tais como, a formação de raízes adventícias, o crescimento celular, a promoção do desenvolvimento das flores, o desenvolvimento dos frutos e, apresentam, ainda, um papel relevante no que toca ao retardamento da abscisão foliar. Em contrapartida, quando utilizadas em concentrações elevadas podem induzir ao alongamento excessivo do hipocótilo ou, ainda, induzir à inibição do alongamento das raízes. As auxinas sintéticas são vulgarmente utilizadas como herbicidas, uma vez que apresentam uma similaridade estrutural com as auxinas naturais das plantas (Correia, 2014; P. Santos, 2016). As giberelinas (GAs) promovem o alongamento do hipocótilo, a germinação das sementes e o desenvolvimento das flores, assim como o desenvolvimento dos frutos (Correia, 2014; Schwechheimer, 2012). As citocininas estimulam o processo de divisão celular, e são responsáveis por retardar a abscisão foliar, e a queda das flores e dos frutos (Correia, 2014; Nunes et al., 2020). O ácido abscísico é um dos responsáveis pela perda tardia das folhas, ramos, flores e frutos, promovendo a acumulação de substâncias de reservas, induzindo a dormência das sementes e potenciando o alongamento dos hipocótilos. Relativamente ao etileno, este é responsável por estimular o amadurecimento dos frutos, retardar a queda das folhas, das flores e consequentemente dos frutos. Promove, ainda, o envelhecimento de partes da planta que se encontrem danificadas e a germinação das sementes. Contudo, impede o crescimento das raízes e dos hipocótilos (Correia, 2014). De salientar, no entanto, que as fitohormonas atuam de forma conjunta em vários processos distintos, sendo muitas vezes mais importante o balanço entre os diversos compostos, do que as suas concentrações absolutas.

É ainda possível salientar que, além da presença de fitohormonas, os extratos algais, apresentam na sua composição outras substâncias bioativas que interferem no desenvolvimento e crescimento das plantas, tais como os ácidos gordos, minerais, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, lípidos, vitaminas (Tarakhovskaya et al., 2007). É possível encontrar todas estas substâncias nas macroalgas ou não, uma vez que depende da extração utilizada, da época do ano, bem como da espécie em causa. Estima-se que 76% do peso seco das macroalgas seja constituído por polissacarídeos, tais como os alginatos, laminaria e fucoídano, sendo estes compostos considerados bioestimulantes (Ali et al., 2021).

O tipo e concentração das diferentes fitohormonas e outras substâncias bioestimulantes varia nos diversos taxa de macroalgas. Na divisão Chlorophyta é possível encontrar auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e ácido jasmónico, já na divisão Rhodophyta é possível encontrar citocininas, auxinas, ácido jasmónico e poliaminas (Tarakhovskaya et al., 2007). Nas Phaeophyceae é possível encontrar auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico (Sunarpi et al., 2021).

## **2. Outros reguladores de crescimento**

Relativamente, às macroalgas em estudo salienta-se que a *Gracilaria gracilis* apresenta na sua constituição agar, um ficocolóides que pode induzir as células vegetais a produzir ácido indol acético (IAA), ou seja, induzir a produção de auxinas. Esta espécie de macroalga apresenta, ainda, ácido urónico que apresenta um papel na germinação das sementes (Pacheco et al., 2021; Passos et al., 2021), bem como giberelinas e citocininas (Tsaniya et al., 2021).

Relativamente ao *Codium tomentosum* apresenta na sua constituição ulvano, um ficocolóide que pode regular o desenvolvimento das plantas a nível de germinação das sementes (Bedoux et al., 2014). O género *Codium* exhibe também citoquininas, giberelinas e auxinas (Lok et al., 2018).

É ainda reconhecido que os extratos algais apresentam na sua composição outros reguladores de crescimento como é o caso dos oligossacarídeos que são conhecidos por estarem presentes em processos de indução e crescimento das raízes nas plantas. Quanto aos polissacáridos presentes nos extratos algais, quando presentes em concentrações adequadas, permitem não só uma germinação das sementes mais rápida, como também a obtenção de uma biomassa vegetal mais rica em nutrientes (Mzibra et al., 2021).

Finalmente, as poliaminas são um grupo de compostos que atuam como reguladores de crescimento nas plantas, contudo não são classificadas como hormonas vegetais, mas apresentam um papel relevante no crescimento das plantas (Crouch & van Staden, 1993; Sharma et al., 2014).

## **VI. Stress salino e de temperatura**

Atualmente, é comum que as plantas presenciem momentos de stress abiótico durante o seu desenvolvimento e crescimento, uma vez que com as alterações climáticas, existe maior propensão a escassez de água, ao aumento da salinidade nos solos devido a falta de água potável, bem como pela necessidade de cultivar terrenos perto das zonas costeiras, variações na temperatura, sendo possível amenizar estes efeitos prejudiciais para o desenvolvimento das plantas com os extratos algais (Van Oosten et al., 2017). No decorrer deste estudo será testado se os extratos algais conseguem proteger as sementes de alface e tomate do stress salino e do stress térmico. No que toca ao stress salino, estudos efetuados em alface demonstram que em média, concentrações de NaCl superiores a 3% reduzem o desenvolvimento e crescimento da planta (Leyva et al., 2011), relativamente ao tomate, estudos comprovam que está planta apresenta redução de desenvolvimento e crescimento quando a concentração de salinidade ultrapassa os 4% (W. Wang et al., 2021). No que toca à temperatura, estudos realizados comprovam que, para a alface, a temperatura ideal para o seu desenvolvimento varia entre 16°C e os 20°C (W. Q. Wang et al., 2015), já a temperatura ideal para o desenvolvimento do tomate é de 15°C a 25°C (Bahcevandziev & Pereira, 2021).

## **VII. Ensaio de Germinação**

O processo de germinação inicia-se com a quebra de dormência de sementes, que se encontra associada ao balanço entre as giberelinas e o ácido abscísico (ABA), uma vez que ambos são intervenientes principais no que toca à regulação da dormência e à germinação. O ácido abscísico induz a dormência de sementes e gomos, ao passo que a giberelina induz a germinação de sementes e quebra da dormência dos gomos (Tuan et al., 2018).

A germinação consiste na sucessão de etapas que ocorrem desde o processo de hidratação das sementes até a formação de uma radícula, podendo assim dizer-se que o processo de germinação ocorre por fases, durante as quais ocorre em primeiro lugar a reativação do metabolismo da semente. De seguida, ocorre a indução do crescimento do

embrião com o auxílio das citocininas e, numa última fase, mas não menos importante, existe efetivamente o crescimento, dando assim origem ao aparecimento da radícula com o auxílio das auxinas (Wolny et al., 2018).

## **Objetivo Principal**

O principal objetivo deste trabalho foi a determinação do potencial bioestimulante de extratos aquosos de macroalgas, com especial enfoque para o estudo do efeito na germinação e crescimento, bem como no eventual aumento de resistência a stress térmico e salino. O efeito bioestimulante foi testado em duas espécies agrícolas: alface (*Lactuca sativa L.*) e tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Testaram-se duas espécies de macroalgas distintas, colhidas no seu ambiente natural, sendo estas a *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) e o *Codium tomentosum* (Chlorophyta).

Efetuaram-se ensaios de germinação para determinar:

- a) Efeito bioestimulante dos extratos de 2 espécies de macroalgas;
- b) As concentrações ideais dos extratos aquosos das macroalgas.

Adicionalmente, efetuaram-se ensaios de crescimento e germinação para determinar:

- a) Efeito do stress salino
- b) Efeito do stress térmico

## **Material e Métodos**

### **I. Recolha da alga, triagem e armazenamento**

A biomassa de *Codium tomentosum* foi recolhida em substrato rochoso, na praia dos Pescadores, no Baleal (39°37'11" N, 9°33'85" W), Peniche, Portugal, no dia 13 de outubro de 2021, por volta das 8 h e 45 minutos, durante a maré baixa. A biomassa foi cortada pela base e não arrancada permitindo assim que os espécimes selvagens de *C. tomentosum* voltem a crescer de novo. A biomassa recolhida foi rapidamente transportada para o laboratório, em sacos de plástico, onde se procedeu à lavagem das algas, com água salgada, no intuito de remover os organismos epífitos, organismos aderentes e detritos. A biomassa de *C. tomentosum* foi, de seguida, armazenada a -20°C até à sua utilização.

Relativamente à *Gracilaria gracilis*, a biomassa foi colhida na Lagoa de Óbidos, Braço do Bom Sucesso (39°24'1"N, 9°13'11"W), Óbidos, Portugal, no dia 19 de novembro de 2021, por volta das 10 h, durante a maré baixa. A biomassa fresca foi armazenada em sacos escuros, numa caixa térmica, e transportada rapidamente para o laboratório. Procedeu-se a um choque osmótico com água doce com o intuito de libertar os organismos aderentes, neste caso, anémonas que se encontravam em grande abundância, organismos epífitos e outros detritos. De seguida, lavou-se a biomassa com água salgada e armazenou-se a -20°C até à sua utilização.

### **II. Secagem da Biomassa**

A biomassa algal foi colocada numa estufa ventilada (Modelo FD 115 Binder, Tuttlingen, Alemanha) entre os 25° e os 30°C, em tabuleiro de plástico, tendo o cuidado de remover o excesso de água e periodicamente inverter as algas, permitindo assim uma secagem uniforme e completa, durante cerca de 48 h. A biomassa seca foi moída utilizando um moinho de café (GVX212 Krups, Solingen, Alemanha) para a obtenção de um pó fino e uniforme, com granulometria inferior ou igual a 0,20 mm.

### **III. Preparação dos extratos e respetivas concentrações**

Com o intuito de utilizar macroalgas como bioestimulantes, foi necessário inicialmente proceder à preparação de extratos de algas. Estes são normalmente produzidos com utilização de solventes como é o caso do hexano, do etanol ou da água. O etanol é em geral considerado um solvente pouco poluente, além de ser de baixo custo e de fácil utilização (Martins, 2019). No extrato etanólico obtêm-se compostos da solúveis em álcool, como é o caso dos lípidos, taninos e alcaloides (Cardoso, 2018). Para

a realização deste trabalho, porém, foi utilizada água como solvente, uma vez que a extração aquosa, para além de ser considerada “verde“ (ecológica) e económica, permite obter um extrato algal de elevado rendimento (Martinez, 2015). Além disso, as fitohormonas, na sua maioria, são solúveis em água (Iqbal et al., 2022).

O extrato aquoso foi produzido adicionando água ultrapura à biomassa algal previamente triturada, à temperatura ambiente, obtendo-se assim o extrato que foi utilizado logo de seguida ou congelado, para efeitos de conservação.

Para a preparação dos extratos procedeu-se à pesagem de 10g de alga seca triturada (*Codium tomentosum* ou *Gracilaria gracilis*) a qual foi colocada num gobelet de 250 mL. Adicionou-se água ultrapura até o volume final atingir os 50 mL, deixando-se a biomassa reidratar por 30 minutos. De seguida, filtrou-se o extrato através de várias camadas de gaze, obtendo-se assim um extrato líquido, que foi armazenado a -20°C. A biomassa recolhida na gaze foi seca em estufa ventilada a 25°C, durante 48 horas, e armazenada num local seco à temperatura ambiente, visando ser utilizada para realizar análises posteriores (Wang, W., 1989).

Os extratos aquosos de algas marinhas (SE) foram diluídos nas concentrações de 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% e 5%, sendo estas concentrações selecionadas com base em pesquisas prévias (Silva et al., 2021; Neto et al., 2020; Sandepogu et al., 2019; Santos et al., 2021; Ternus et al., 2021). Os extratos diluídos foram armazenados a 4°C até à sua utilização.

#### **IV. Ensaios de Germinação e Crescimento**

Os ensaios de germinação foram realizados para determinar a ação bioestimulante dos extratos de macroalgas sobre o processo germinativo de sementes de plantas agrícolas, como é o caso da alface e do tomate. Estes ensaios de germinação permitiram determinar se os extratos algais aplicados às sementes, melhoraram a germinação comparativamente com o controlo, permitindo assim perceber se estamos efetivamente perante potenciais bioestimulantes (Hoyle et al., 2015). Os testes de germinação foram efetuados usando extrato aquoso da *G. gracilis* e o extrato aquoso do *C. tomentosum* usando diferentes concentrações, com o intuito de comparar qual dos extratos apresenta um efeito mais notório sobre a percentagem de germinação, bem como o tempo que é necessário para a ocorrência da germinação.

Para todos os ensaios de germinação e de crescimento realizados foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa L.*) da variedade alface “maravilha verão canastra” e/ou tomate (*Solanum lycopersicum L.*) da variedade tomate “rio grande”, fornecidas pela empresa EuroSementes, Lda., Portugal.

Em todos os ensaios, procedeu-se à seleção das sementes, tendo sido descartadas todas as sementes que apresentavam danos visíveis, tonalidades escuras ou indícios de contaminação microbiana. Teve-se o cuidado de contar sempre sementes em excesso, como margem de segurança, caso durante o processo houvesse perda ou danos nas sementes. Quando necessário procedeu-se à autoclavagem do material a ser usado (placas de Petri, pinças, e água ultrapura), mas também dos meios de cultivo utilizados, a 121°C por 15 minutos. O controlo foi feito com água ultrapura. Estas soluções foram sempre armazenadas a -20°C até à sua utilização (W. Wang, 1989).

Antes da realização dos ensaios, as sementes foram previamente desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 4% durante 1 minuto e de seguida lavadas, com uma passagem, em água ultrapura por 20 segundos, com o intuito de evitar as contaminações microbianas de superfície (Sauer, D.B. & Burroughs, R., 1986). As sementes foram sempre colocadas em placas de Petri, seladas e incubadas numa câmara climática (Aralab, Fitoclima D1200PLH, Rio de Mouro, Portugal) previamente programada a uma temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidade de 90%, fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro, em que a intensidade luminosa foi de  $44,40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Kaya-Altop et al., 2023).

Os ensaios de germinação com alface tiveram a duração de 5 dias, e os ensaios com o tomate tiveram a duração de 7 dias (Govinden-Soulangue & Levantard, 2008). Em todos os ensaios, ao fim do tempo indicado, foram atingidos valores de 100% de germinação, nas condições otimizadas, refletindo a elevada qualidade das sementes utilizadas. Durante a realização dos ensaios foi registado diariamente o número de sementes germinadas em cada caixa de Petri. Uma vez atingidos valores de 100%, os ensaios de germinação foram interrompidos. Os ensaios foram sempre realizados em triplicado.

## V. Ensaio de Germinação em Papel de Filtro

Os ensaios de germinação de sementes, em papel de filtro foram realizados visando determinar quais as concentrações de bioestimulante mais favoráveis para a maximização da percentagem de germinação das sementes, sendo importante determinar o número de dias necessários para atingir um determinado valor.

No primeiro ensaio de germinação, foram testadas sementes de alface. Para cada extrato algal, utilizaram-se 3 réplicas de 25 sementes, as quais foram imersas durante 2 horas, sem processo de desinfecção, à temperatura ambiente, nos extratos algais em diversas concentrações, previamente preparadas (0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% e 5%). De seguida, as sementes foram colocadas em placas de Petri (com 200 mm de diâmetro), com duas camadas de papel de filtro. O papel de filtro foi humedecido com água ultrapura até se encontrar uniformemente molhado, tendo o cuidado de não humedecer o papel em demasia. As sementes foram distribuídas uniformemente nas placas de Petri, as quais foram seladas com Parafilm®, evitando assim a desidratação.

Procedeu-se ao cálculo da percentagem de germinação (PG), para cada um dos cinco dias do ensaio, empregando a seguinte fórmula (Seng & Cheong, 2020) :

$$PG = \frac{S_g}{T_s} \times 100 \% \quad (1)$$

onde  $S_g$  representa o número de sementes germinadas e  $T_s$  representa o número total de sementes utilizadas na germinação.

## VI. Ensaio de Desinfecção

Após determinar as concentrações mais favoráveis, que maximizam a percentagem de germinação em alface procedeu-se a ensaios de desinfecção que, como o próprio nome indica, nos permitiram perceber qual o melhor método de desinfecção a utilizar para as sementes e para os extratos algais, sem comprometer a viabilidade das sementes. Foi feito um ensaio usando sementes desinfetadas com hipoclorito de sódio (4%), durante 1 minuto e enxaguamento durante 20 segundos, como referido, usando como controlo sementes não desinfetadas, para verificar a ocorrência de contaminações e a viabilidade das sementes após a desinfecção.

Pretendia-se também averiguar qual o melhor extrato a utilizar, procedendo-se assim à preparação de três extratos algais diferentes. Para evitar consumir extrato, o qual estava disponível em quantidades reduzidas, recorreu-se a um extrato algal comercial (Agrogain), a 0,02%, uma vez que é um extrato algal comercial abundante. Para a desinfecção das sementes procedeu-se como mencionado anteriormente, usando hipoclorito de sódio.

Relativamente à preparação do meio MS seguiram-se as instruções do fabricante (Duchefa Biochemie) acrescentando 1% de agar (VWR Chemicals). Para perceber qual o meio que apresentava menores níveis de contaminação, procedemos de 3 maneiras alternativas:

1. Ao meio MS autoclavado e arrefecido a cerca de 45°C, foi adicionado extrato algal comercial (Agrogain) a 0,02%, esterilizado com uma seringa estéril de 0.20 µm (Dorsan).
2. Ao meio MS autoclavado e arrefecido a cerca de 45°C, foi adicionado extrato algal comercial (Agrogain) a 0,02%, o qual não sofreu nenhum processo de esterilização;
3. Ao meio MS foi adicionado o extrato algal comercial (Agrogain) a 0,02%, seguindo-se a autoclavagem.

## **VII. Ensaios de Crescimento**

Para cada concentração de extrato algal, foram preparados triplicados com 8 sementes cada, para as duas espécies hortícolas, as quais foram selecionadas e imersas numa solução de extrato algal (0,02%, 0,2% e 2%) ou no controlo (água ultrapura), durante 12 horas, à temperatura ambiente. Havendo ainda a utilização de outro método em que as sementes foram imersas durante 12 horas em água ultrapura e a solução de extrato algal (0,02%, 0,2% e 2%) foi adicionada ao meio MS e no controlo (água ultrapura). As três réplicas foram posteriormente colocadas em caixas de Petri, com meio MS previamente preparado de acordo com o indicado no ponto 6, sendo as sementes distribuídas uniformemente em cada placa de Petri. As placas, foram posteriormente seladas e colocadas na câmara climática.

O ensaio de crescimento durou 7 dias para o tomate e 5 dias para a alface, exceto em situações onde a germinação completa (100%) ocorreu mais cedo. A percentagem de germinação foi calculada com base na fórmula (1).

## VIII. Ensaios de Crescimento em condições de Stress Salino

Procedeu-se a realização de um ensaio de indução de stress salino uma vez que com o decorrer do tempo, tem-se notado um decréscimo na água potável, e de água de rega. Assim, é importante testar o aumento da resistência das plantas agrícolas a água salobra e a solos com níveis de sal sucessivamente mais elevados.

Para este ensaio do foram preparadas soluções salinas com diferentes concentrações (5‰, 15‰, 25‰ e 35‰) (Gonçalves, A., 2006; Amaro, C., 2016). A estas soluções foi adicionado meio MS que se encontrava previamente preparado, antes deste passar pelo processo de autoclavagem, após o que foi autoclavado e deixou-se solidificar o meio, sendo o mesmo armazenado a 4°C.

As sementes de alface e de tomate, foram embebidas nos respetivos extratos algais de cada espécie de alga marinha (0,2% para *G. gracilis* ou *C. tomentosum*) durante 12h, e foram uniformemente distribuídas por cada placa de Petri (10 sementes em cada placa), sendo seladas e colocadas em câmara climática.

Para os ensaios de stress, o controlo foi feito com água ultrapura, sendo os ensaios realizados com 6 réplicas cada. Nestes ensaios os parâmetros de crescimento avaliados foram as seguintes:

- a) Percentagem de germinação (fórmula 1);
- b) Comprimento do hipocótilo (medido desde a base até ao ápice), medido em centímetros com o auxílio de uma régua;
- c) Comprimento da radícula (medido em centímetros desde a base ao ápice radicular);
- d) Peso fresco em gramas da semente germinada inteira, usando para isso uma balança analítica (Sartorius, TE1245, Alemanha);
- e) Humidade, com o intuito de detetar diferenças devidas à utilização de bioestimulantes; pesaram-se e numeraram-se os cadinhos correspondentes ao número de amostras, registou-se o peso com o cadinho vazio.

Distribuíram-se as sementes germinadas por cada cadinho e secaram-se numa estufa com circulação (Binder FD115, Alemanha), a 105°C durante 48h. De seguida, transferiram-se os cadinhos para um exsiccador e deixou-se a arrefecer por 24h. Posteriormente pesou-se e, ao valor obtido, subtraiu-se o peso do cadinho vazio.

Para o cálculo da percentagem de humidade, utilizou-se a seguinte fórmula (AOAC,2017):

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100 \%, (2)$$

onde  $W_f$  representa o peso da amostra fresca, em gramas, e  $W_d$  representa o peso da amostra seca, em gramas, sendo esta percentagem calculada segundo as normas AOAC.

Relativamente ao cálculo do índice de vigor, utilizou-se a seguinte fórmula (Konappa et al., 2020):

$$\text{Índice de vigor (IV)} = (Cr + Cc) \times PG, (3)$$

onde  $Cr$  representa o comprimento da radícula, em centímetros, e  $Cc$  representa o comprimento do hipocótilo, em centímetros.

## **IX. Ensaios de Crescimento em condições de Stress Térmico**

Recorreu-se, ainda, a um ensaio de indução de stress térmico uma vez que com o aumento do efeito de estufa, a temperatura global tem vindo a aumentar substancialmente, prevendo-se que a temperatura média possa ultrapassar a gama de temperaturas de germinação e crescimento das plantas agrícolas. Foi utilizada a temperatura de 35°C (W. Q. Wang et al., 2015) (Bahcevandziev & Pereira, 2021). Ao proceder a este ensaio conseguimos perceber se o facto de usarmos bioestimulantes algais aumenta a resistência das plantas agrícolas ao stress térmico.

Procedeu-se aos ensaios de germinação conforme descrito anteriormente (ponto 8), tendo sido adicionados ao meio MS, 0,2% de extrato de *G. gracilis* ou de *C. tomentosum*. As sementes de tomate e alface foram embebidas em água ultrapura durante 12 horas, distribuídas uniformemente pelas placas de Petri (10 sementes em cada placa), seladas e colocadas em câmara climática a 35°C.

Foram analisados os mesmos parâmetros de germinação e crescimento do ensaio anterior, descritas no ponto 8.

## **X. Análise Estatística**

A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada sempre que foram validados os pressupostos da normalidade e homogeneidade das variâncias. Sempre que esta validação não foi obtida, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todas as diferenças foram consideradas significativas no valor de  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Todos os ensaios e análises foram realizados em triplicado ( $n = 3$ ), exceto nos ensaios de indução de stress, onde foram realizadas 6 réplicas ( $n = 6$ ). Todas as avaliações estatísticas foram realizadas em SPSS Statistic 28, (IBM Corporation, New York, USA).

## Resultados e Discussão

### I. Germinação de sementes de alface em papel de filtro

Na realização do primeiro ensaio de germinação de sementes o objetivo principal foi determinar quais as concentrações ideais de extrato algal, que permitissem a maximização da percentagem de germinação da espécie em estudo, que neste caso, foi a alface.

Verifica-se que, para todas as concentrações de extrato de *Codium tomentosum*, se observa uma germinação próxima de 100% ( $\geq 99\%$ ) ao fim de 5 dias, ao contrário do que se verifica no controlo, que tem uma percentagem de germinação de 94%. Existem diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e todas as concentrações ( $p < 0,05$ ). Mais, verifica-se que a germinação é sempre mais rápida, efeito mais notório no primeiro dia de ensaios, nas sementes germinadas em todas as concentrações de extrato de *Codium tomentosum* do que no controlo (figura 4), com exceção da concentração de 5%.

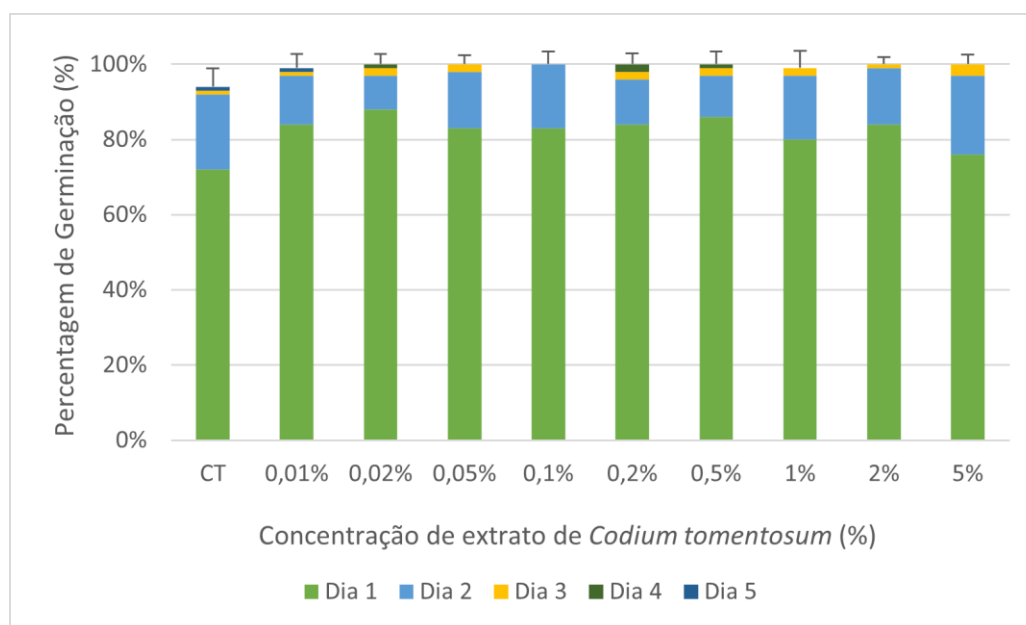


Figura 4 – Percentagem de germinação das sementes de alface, na presença de diferentes concentrações de extrato de *Codium tomentosum*, ao longo de 5 dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo,  $n=3$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

É possível observar na figura 4, que ao fim do primeiro dia, as concentrações com uma maior percentagem de germinação total e as concentrações que exibem maior percentagem de germinação, relativamente ao controlo (CT), são as 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2% e 2%. Assim, de entre estas selecionaram-se 3 concentrações de extratos algais para os ensaios seguintes: 0,02%, 0,2% e 2%.

Resultados obtidos com sementes de feijão mungo (*Vigna radiata*), relatados por Castellanos-Barriga et al., (2017), indicam que a utilização de *Ulva lactuca* permitiu obter uma elevada percentagem de germinação. Reforçando esta ideia, encontram-se os resultados documentados por Mzibra et al., (2021) onde os polissacarídeos extraídos de *Codium tomentosum*, aplicados numa concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, permitiram uma germinação de tomate melhorada, uma vez que, segundo os autores, houve o aumento de vários metabolitos benéficos para a germinação, nomeadamente oligossacarídeos, como é o caso da sacarose e ainda dos monossacarídeos glicose e frutose.

No que toca ao ensaio de germinação na presença de extrato algal de *Gracilaria gracilis* (Figura 5), verifica-se, para todos os extratos aquosos testados, uma germinação de 100%, o que não se verifica no controlo, que apresenta uma percentagem de germinação de 98%, ao fim dos 5 dias de ensaio. É possível verificar que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparadas todas as concentrações de extrato, com o controlo, sendo ainda possível salientar que se verifica sempre uma germinação mais rápida no primeiro dia das sementes na presença de extrato, do que as sementes do controlo (figura 5). Assim, procedeu-se ao mesmo método de seleção, mencionado acima, utilizado para as concentrações de *G. gracilis*, as seguintes concentrações de extrato aquoso: 0,02%, 0,2% e 2%.

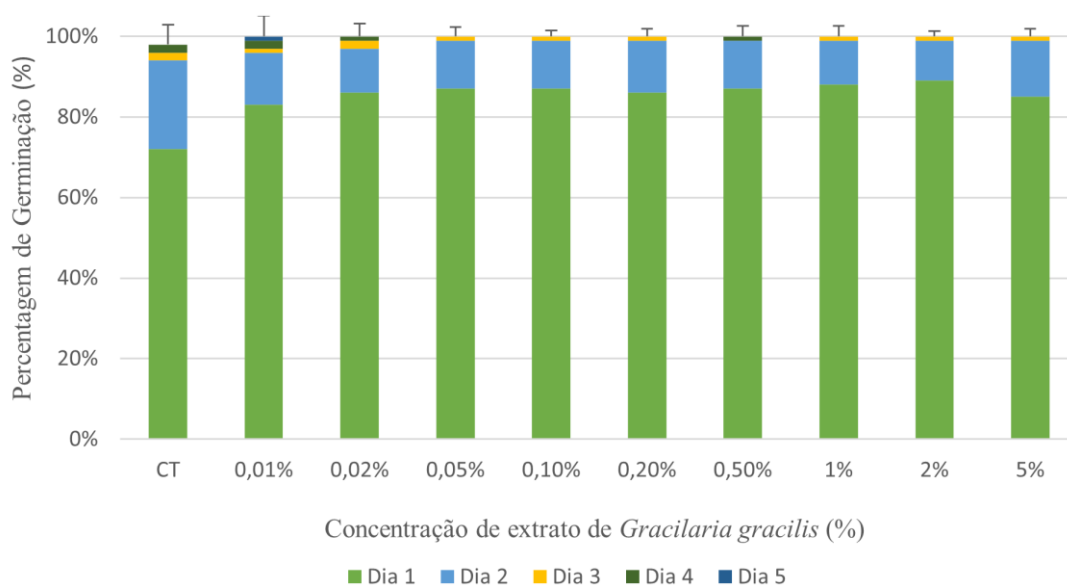


Figura 5 – Percentagem de germinação de sementes de alfaca expostas a diferentes concentrações de extrato de *Gracilaria gracilis*, ao longo de 5 dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo,  $n=3$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Segundo di Filippo-Herrera et al., (2019), o extrato de *Gracilaria parvispora* quando usada em concentrações de 0,25% e 0,5%, apresenta efeito bioestimulante nos feijões mungo (*Vigna radiata*). Embora não seja a mesma espécie de macroalga, esta pertence ao mesmo género que a *G. gracilis* pelo que é possível constatar que os resultados obtidos são consistentes com os obtidos por estes autores, em concentrações semelhantes. Sendo ainda estes resultados reforçados por Pacheco et al., (2021), uma vez que estes autores obtiveram um efeito positivo no crescimento de couve (*Brassica oleracea*), quando recorreram ao agar extraído da *Gracilaria gracilis*. Estes autores fizeram a quantificação dos polissacarídeos e do ácido urónico, tendo detetado que a estrutura química do agar era um fator decisivo, afetando de maneira direta a atividade bioestimulante em plantas.

Segundo o estudo citado por Hallmann, (2019) o extrato de *Gracilaria gracilis* apresenta na sua constituição auxinas, citocininas e giberelinas, pelo que é expectável que obtivesse melhor percentagem de germinação que o controlo. Contudo, há que ter em atenção que pode dever-se ao facto de haver diferentes concentrações das fito-hormonas no extrato, bem com diferentes concentrações de outras substâncias bioestimulantes, tais como vitaminas e minerais. Contudo, para ser possível saber a que se deve o efeito bioestimulante observado, seria necessário proceder a realização de análises químicas, com o intuito de perceber não só a concentração de cada fito-hormona, como também a interação entre as mesmas.

## II. Ensaios de Desinfecção

Este ensaio visou testar diferentes métodos de desinfecção dos meios e das sementes, que permitissem otimizar as condições dos ensaios. Assim, realizou-se um ensaio com sementes de alface, desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 4% e com sementes que não sofreram qualquer processo de desinfecção. Foi possível observar, no decorrer do ensaio, que a germinação das sementes desinfetadas não foi afetada negativamente pelo agente desinfetante, como é possível observar na figura 6.

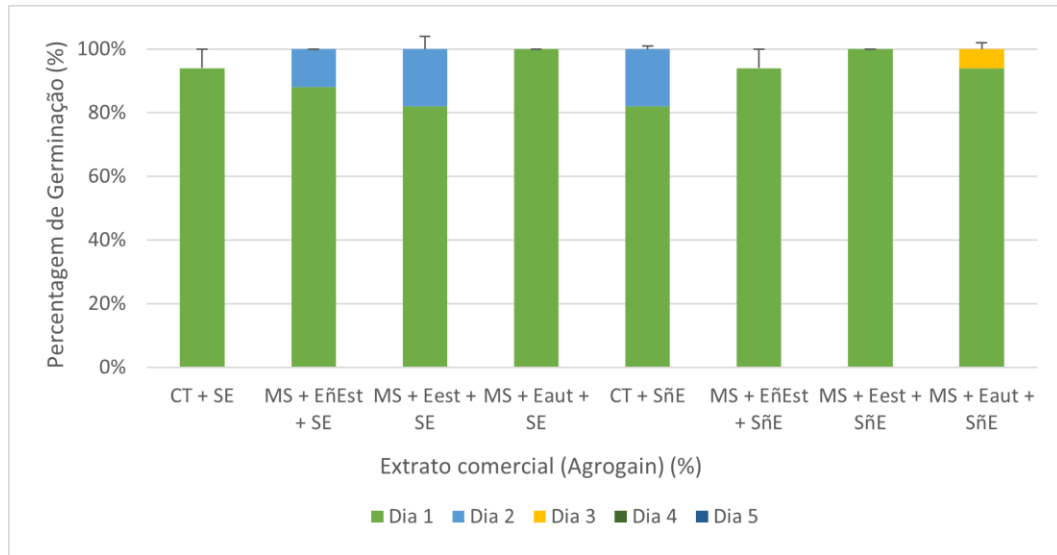


Figura 6 – Percentagem de germinação de sementes de alface com ou sem processo de desinfecção, sendo usado extrato comercial (AgroGain) a 0,02%. CT+SE representa o controlo negativo, com sementes desinfetadas, MS+NñEst+SE representa o meio MS com extrato não estéril e sementes desinfetadas, MS+Eest+SE simboliza o meio MS com extrato estéril e sementes desinfetadas e MS+Eaut representa o meio MS com extrato autoclavado e sementes desinfetadas, CT+SñE representa o controlo negativo, com sementes não desinfetadas, MS+EñEst+SñE representa o meio MS com extrato não estéril e sementes não desinfetadas, MS+Eest+SñE representa o meio MS com extrato estéril e sementes sem processo de desinfecção, e MS+Eaut+SñE representa o meio MS com extrato autoclavado e sementes sem processo de desinfecção, n=2, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Este resultado está de acordo com o estudo realizado por Dick et al., (2014), uma vez que estes autores confirmam que a desinfecção de sementes de tomate com hipoclorito de sódio permite uma percentagem de germinação mais elevada em comparação a sementes não tratadas, uma vez que a casca da semente é oxidada, tornando assim a semente mais permeável à absorção de água, bem como uma germinação mais uniforme. Ainda corroborando os resultados obtidos, o estudo realizado por Ahmadi et al., (2012) demonstra que a desinfecção das sementes de espinho de cristo (*Ziziphus spina [christi]*) com hipoclorito de sódio a 4% durante 20 minutos apresenta uma percentagem de germinação mais elevada em comparação com os outros tratamentos (peróxido de hidrogénio e cloreto de mercúrio, em diferentes concentrações).

Nas sementes de alface desinfetadas não ocorreu aparecimento de contaminantes microbianos nas placas de Petri (figura 8), ao contrário das sementes não desinfetadas que sofreram algumas contaminações, como se pode constatar na figura 7. Era expectável o resultado obtido, uma vez que segundo o estudo realizado por Escamilla et al., (2019) é possível verificar que as sementes de soja (*Glycine max L.*), após o processo de desinfecção com hipoclorito de sódio, apresentaram um efeito significativamente superior na diminuição da incidência de fungos, contrariamente às sementes não tratadas que apresentaram uma incidência de fungos de 58,7%.



Figura 7 – Ensaio de Desinfecção, em que as sementes de alface não se encontram desinfetadas, ao final do 5º dia, com extrato comercial (Agrogain), em que os fungos se encontram assinalados com seta.



Figura 8 - Ensaio de Desinfecção, em que as sementes de alface se encontram desinfetadas, ao final do 5º dia, com extrato comercial (Agrogain).

Procedeu-se de seguida à medição do comprimento das radículas das plântulas de alface sendo possível observar que as sementes desinfetadas apresentam uma média de comprimento de radícula maior do que as sementes não estéreis (figura 9). Este resultado está em consonância com o estudo realizado por Yildiz & Ekiz, (2014) onde as sementes de sanfeno (*Onobrychis viciifolia L.*) foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio, com diferentes concentrações (1, 2, 3, 4 e 5%). Após este processo foi possível verificar que as sementes apresentavam um maior desenvolvimento, não só na percentagem de germinação, como também no desenvolvimento das plântulas em meio MS. Contudo, não havendo a possibilidade de realizar a análise estatística, devido a existência de apenas duas réplicas, não podemos averiguar se as diferenças seriam significativas.

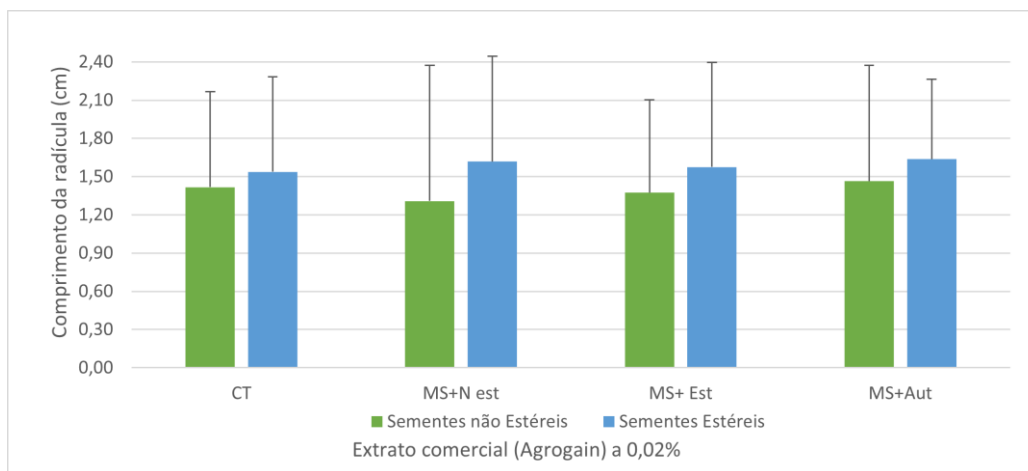


Figura 9 - Ensaio de desinfecção, comparação do comprimento das radículas das sementes de tomate em cm, entre as sementes desinfetadas e sementes não desinfetadas, n=2, sendo as barras de erro representativas do desvio padrão.

Com base nos resultados obtidos, decidiu-se, para os ensaios futuros, utilizar o procedimento de desinfecção de sementes, para evitar o aparecimento de contaminações, e uma vez que apresentaram melhores percentagens de germinação, bem como um crescimento de radícula mais elevado, não tendo ocorrido alterações no processo de germinação, nem no desenvolvimento das sementes quando submetidas ao processo de desinfecção.

Quanto ao impacto da utilização do extrato autoclavado ou extrato não estéril, na germinação das sementes de tomate, conforme se pode observar na figura 10, notou-se a autoclavagem do meio MS com extrato induziu uma diminuição na capacidade bioestimulante, notando-se, por isso, uma diferença estatisticamente significativa, ( $p < 0,05$ ), em comparação com o extrato não estéril. Ou seja, é perceptível até um declínio na germinação em comparação ao controlo.

Quando se procedeu à comparação das percentagens de germinação em extrato autoclavado e em extrato não estéril, com o controlo verifica-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 2% (extrato não estéril ou extrato autoclavado). As restantes concentrações de ambos os extratos não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (figura 10).

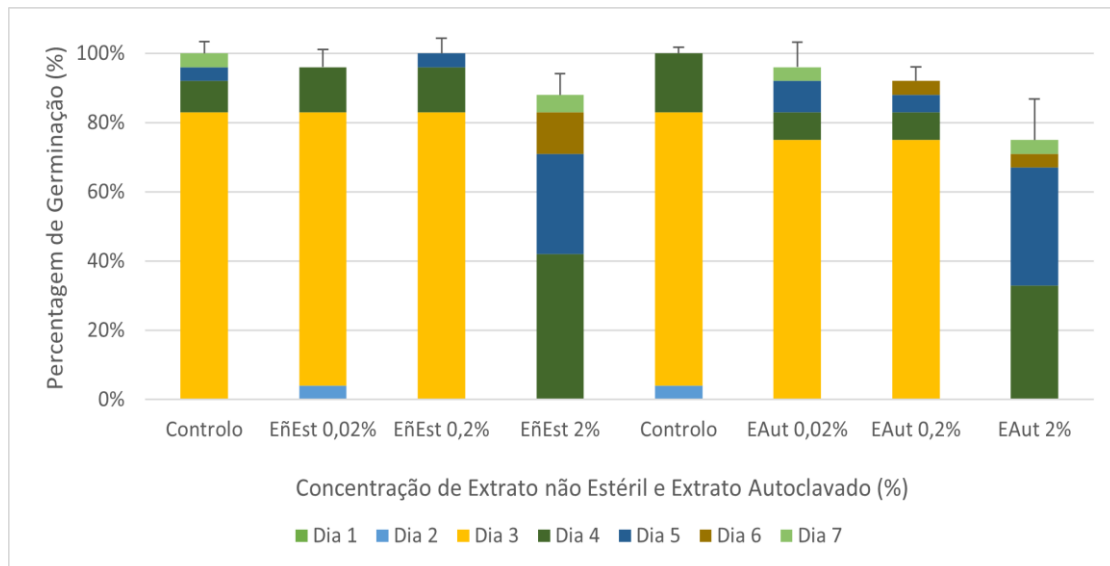


Figura 10 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, do ensaio de desinfecção que decorreu durante 7 dias, com diferentes concentrações de extrato não estéril de extrato comercial de *Kappaphycus alvarezii* (AgroGain), com sementes estéreis, onde EñEst = Extrato não estéril e EAut = Extrato autoclavado. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo,  $n = 3$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Com base nos resultados, podemos verificar, que o meio autoclavado não será o mais indicado uma vez que resulta num decréscimo da percentagem de germinação. De facto, o processo de autoclavagem pode causar a desnaturação/desintegração dos compostos relevantes que conferem ao extrato a capacidade bioestimulante (Michalak & Chojnacka, 2014), como é o caso das fito-hormonas que, por serem moléculas sensíveis, devido à elevada pressão e temperatura podem degradar significativamente (Stirk et al., 2004). De facto, segundo um estudo realizado por (Rohela et al., 2018) verificou que existe degradação de fito-hormonas presentes na amoreira (*Morus*), em particular das auxinas, quando o processo de autoclavagem excede os 22 minutos.

Verificou-se, posteriormente, que o comprimento das radículas, bem como o comprimento da parte aérea da plântula, está em linha com os resultados obtidos de percentagem de germinação, corroborando a decisão de prosseguir com o extrato não estéril. Pela figura 11, é possível observar que o extrato autoclavado apresenta em média, radículas de dimensões mais pequenas ( $3 \pm 1,5$  cm). Contudo não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações de 0,02% e 0,2% (extrato não estéril ou extrato autoclavado) em comparação com o controlo. Já comparando o controlo com a concentração de 2% (extrato não estéril ou extrato autoclavado) é possível detetar diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Contudo, o estudo realizado por (Hernández-Herrera et al., 2014) demonstra que o extrato de *Ulva lactuca* (1%)

autoclavado apresenta resultados que indicam que este promove o desenvolvimento da radícula de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) em comparação com o controlo.

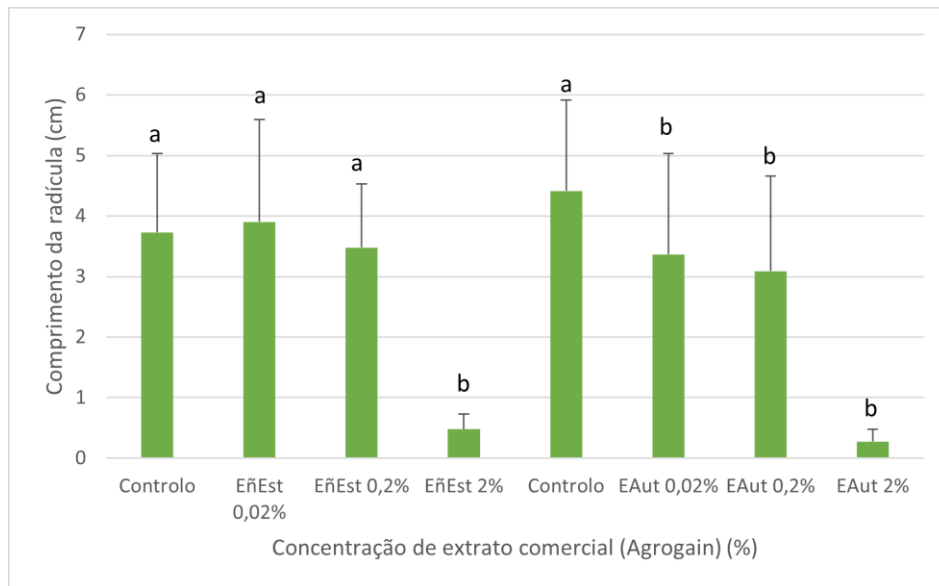


Figura 11 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento da radícula de sementes de tomate, em diferentes meios, onde EñEst = Extrato não autoclavado; EAut = Extrato autoclavado, extrato comercial de *Kappaphycus alvarezii* (AgroGain), n=3

Os elevados valores de desvio padrão indicam, no entanto, a necessidade de proceder a realização de ensaios com maior número de amostras. Uma vez que estamos a lidar com plantas, que apresentam variações de acordo com a estação do ano, estado fisiológico, e das condições de ensaios utilizadas, são expectáveis variações, que podem ser significativas (Wójcik-Gront et al., 2022)(figura 11).

É possível observar na figura 12, relativamente ao comprimento dos hipocótilos, que estes apresentam comprimentos médios menos elevados do que os controlos. Este resultado contraria o estudo realizado por Mzibra et al., (2018), uma vez que, recorrendo à utilização de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  de polissacarídeos de *Codium tomentosum* na irrigação da planta de tomateiro, estes autores verificaram que houve um desenvolvimento maior do hipocótilo das plantas em comparação com o controlo. Estes resultados dever-se-ão à menor concentração de polissacarídeos presentes no extrato algal em estudo, uma vez que no estudo realizado por Mzibra et al., (2018) foram utilizados apenas polissacarídeos de *Codium tomentosum* e não extrato algal bruto. Comparando entre os diferentes extratos, contudo, existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 0,2% e 2%, para o extrato não estéril ou extrato autoclavado. É ainda possível verificar que o valor máximo, em média, obtido para o comprimento dos

hipocótilos neste ensaio é de cerca de  $2 \pm 0,86$  cm, podendo isto dever-se ao facto de haver baixa concentração de polissacarídeos e de fito-hormonas. Contudo, apenas análises químicas posteriores poderão comprovar esta hipótese.

Relativamente à concentração de 2% (extrato não autoclavado ou autoclavado) não foi possível medir a parte aérea das plântulas. Isto deve-se ao facto de, apesar de as sementes terem germinado, não formaram hipocótilos, registando-se apenas a formação da radícula (figura 12). Tal pode ser justificado pelo facto de a iniciação e desenvolvimento dos hipocótilos e do enraizamento necessitar de uma baixa concentração de compostos bioativos, havendo um declínio quando estão em contacto com concentrações elevadas (Kumar et al., 2012). De facto, as hormonas que frequentemente promovem processos fisiológicos em baixas concentrações e inibem quando se encontram em elevadas concentrações, devido a presença de um desequilíbrio no meio envolvente, levando a um desequilíbrio na pressão osmótica (Anisimov et al., 2013). Assim, a concentração de 2% parece mostrar-se, já, inibitória do desenvolvimento das plantas.

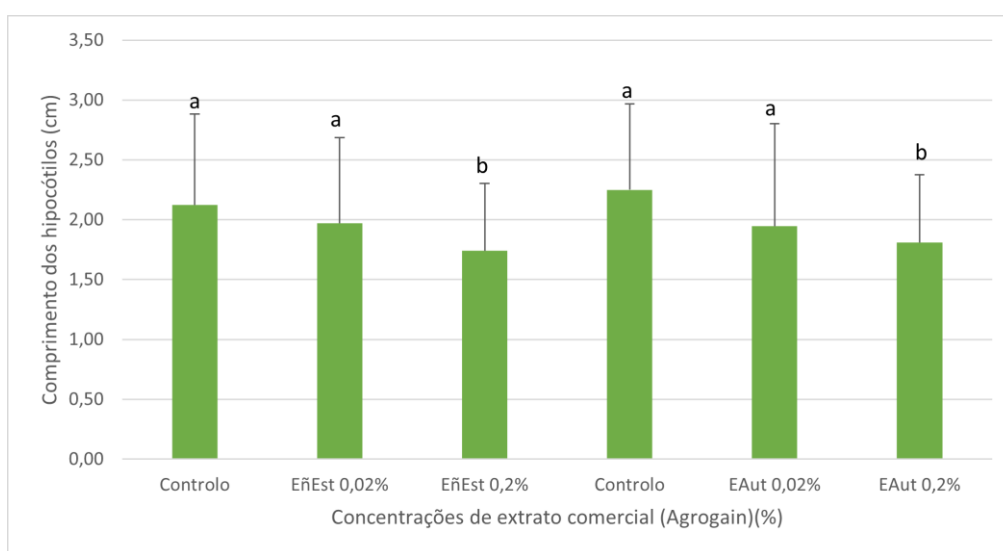


Figura 12 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hipocótilos das sementes de tomate, de diferentes meios, onde EñEst = Extrato não autoclavado e EAut = Extrato Autoclavado, extrato comercial (AgroGain),  $n=3$ .

No que toca ao cálculo do teor de humidade (figura 13), não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre os resultados obtidos para os extratos algais em comparação com o controlo, sendo possível afirmar que os valores da humidade variam entre os 70% e os 96%.

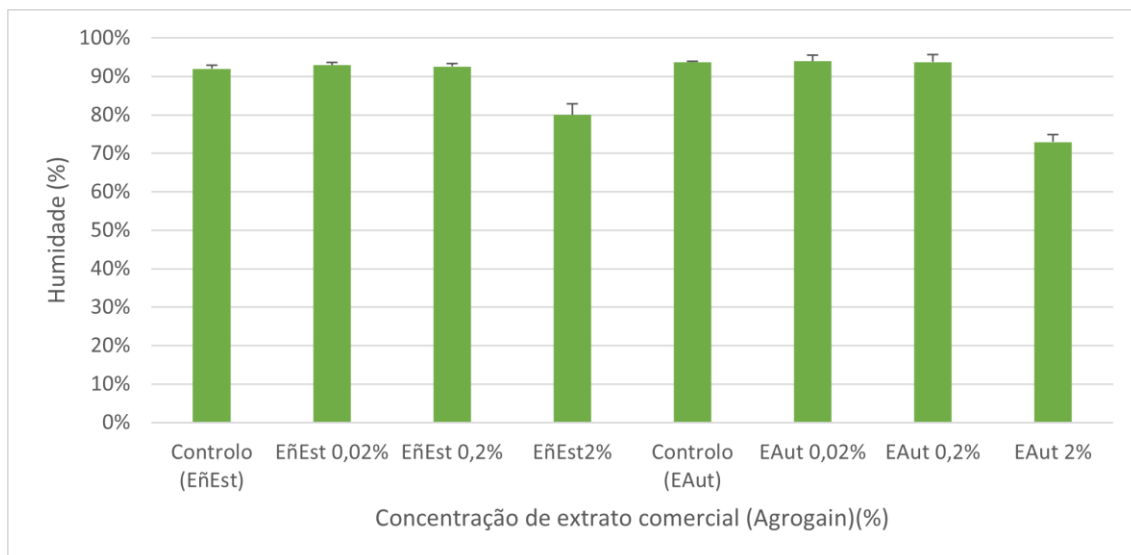


Figura 13 - Percentagem de humidade das sementes de tomate de diferentes concentrações de extrato comercial de (AgroGain), controlo (EñEst) = controlo que pertence ao ensaio com o extrato não estéril; EñEst = Extrato não estéril (0,02%, 0,2% e 2%); controlo (EAut) = controlo que pertence ao ensaio com o extrato autoclavado; EAut = Extrato Autoclavado, n=3 sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Quanto ao cálculo do índice de vigor (IV), foi possível observar que, para o meio com extrato algal sem esterilização (EñEst), a concentração que apresenta um valor mais elevado é a de 0,02%. De facto, o índice de vigor do controlo é de 5,95 e o índice de vigor do extrato a 0,02% é de 6,14. Nota-se, ainda, que devido ao facto de a concentração mais elevada (2%) não apresentar hipocótilos, esta é a concentração que apresenta um menor índice de vigor (0,55).

Relativamente ao extrato algal autoclavado (EAut), foi possível detetar um maior índice de vigor no controlo (6,66) quando em comparação com a concentração de 0,02% que apresenta um índice de vigor de 5,65. Salienta-se, também, que devido à falta da presença de hipocótilos na concentração de 2%, esta apresenta um índice de vigor muito baixo, de 0,37.

Com base na análise da percentagem de germinação, no comprimento das radículas, no comprimento dos hipocótilos, na humidade e no índice de vigor é possível concluir que as sementes desinfetadas e o extrato não esterilizado são os mais benéficos.

### III. Ensaios de Crescimento

Estes ensaios visaram constatar a eficiência da imersão das sementes diretamente no extrato, por oposição à embebição das sementes em água e dissolução do extrato no meio de cultivo MS relativamente à germinação, ao comprimento da raiz e do hipocótilo, bem como da humidade. Para o efeito foram usadas sementes de tomate.

No ensaio de crescimento em que as sementes foram embebidas no extrato é possível perceber que, no primeiro dia não houve germinação, sendo o terceiro dia de ensaio aquele que apresenta maior percentagem de germinação, seguido do segundo dia e do quarto dia. Nenhuma concentração de extrato atingiu os 100% de germinação, verificando-se que o extrato que obteve melhores resultados, em média, com 92% de germinação, foi o extrato com concentração de 0,02%, e aquele que obteve menor percentagem de germinação foi o extrato a 2%, com apenas 88% (figura 14).

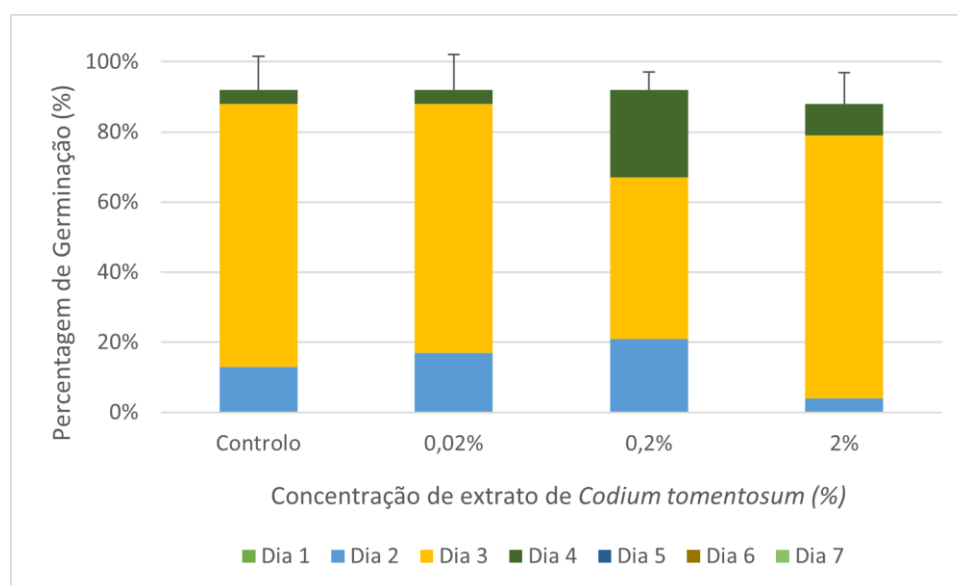


Figura 14 – Percentagem de germinação das sementes de tomate, com extrato de *Codium tomentosum* a diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=3

Em comparação com o controlo não se verificam resultados dispares, uma vez que o controlo atingiu também, em média, os 92% de percentagem de germinação. Contudo, é possível notar que o extrato 0,02%, e sobretudo o de 0,2%, apresentam uma germinação ligeiramente mais rápida no segundo dia de ensaio (figura 14).

Em consonância com o estudo realizado por Soad M., (2015), seria expectável que as sementes expostas ao extrato de *Codium tomentosum* apresentassem uma percentagem de germinação mais elevada, uma vez que neste estudo, ao utilizarem sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) imersas em extrato de *C. tomentosum* (20%), durante 12 horas, se obtiveram valores de percentagem de germinação entre os 97 e 98%. Sendo o resultado reforçado pelo estudo realizado por Hernández-Herrera et al., (2014), que utilizou extrato algal de *Ulva lactuca*, com uma concentração de 0,2% verificaram uma percentagem de germinação mais elevada em comparação com o controlo, bem como uma germinação mais rápida nas sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). O *C. tomentosum* é

reconhecido por apresentar na sua composição citocininas e auxinas (Lok et al., 2018). Como mencionado anteriormente, estas fito-hormonas auxiliam no crescimento e desenvolvimento das plantas. Por essa razão seria expectável que houvesse melhores resultados quando em comparação com o controlo. Contudo, tal pode justificar-se devido à estrutura das fito-hormonas presentes nas macroalgas quando em comparação com as plantas (Tarakhovskaya et al., 2007). Apenas seria possível averiguar se o facto de não obter melhores resultados se deve a presença destas substâncias bioativas, recorrendo a análises químicas.

Relativamente à percentagem de germinação das sementes de tomate expostas ao extrato de *Gracilaria gracilis*, é possível verificar que ao final do sexto dia não se registou uma percentagem de germinação mais elevada, em comparação ao controlo. Em nenhuma concentração se obteve uma percentagem de germinação de 100%. Para a concentração de extrato de 0,02% atingiram-se 96% de percentagem de germinação, para a concentração de extrato de 0,2% atingiram-se os 92% e para a concentração de extrato de 2% atingiram-se os 88% de percentagem de germinação. Em comparação com o controlo não se registam resultados muito dispares (não existem diferenças estatisticamente significativas), uma vez que o controlo atingiu os 92% de taxa de germinação (figura 15). Sendo este resultado corroborado pelo estudo realizado por Shamy et al., (2020) que verificaram que ao expor sementes de pimenta (*Capsicum annuum L.*) ao extrato de *Gracilaria edulis*, numa concentração de 8%, durante 24h, foi possível obterem uma germinação mais rápida, bem como uma percentagem de germinação mais elevada em comparação com o controlo. Ou seja, é possível salientar que as fito-hormonas presentes na *G. gracilis*, tais como, auxinas e citocininas (Tsaniya et al., 2021) apresentam uma estrutura idêntica à das plantas e por essa razão obtiveram melhores resultados no crescimento da planta (Tarakhovskaya et al., 2007) quando em comparação com o controlo. Contudo, não sendo possível averiguar se o efeito obtido depende exclusivamente deste aspeto ou de outros compostos bioativos como é o caso do ácido urónico, uma vez que para isso seria necessário proceder a análises químicas.

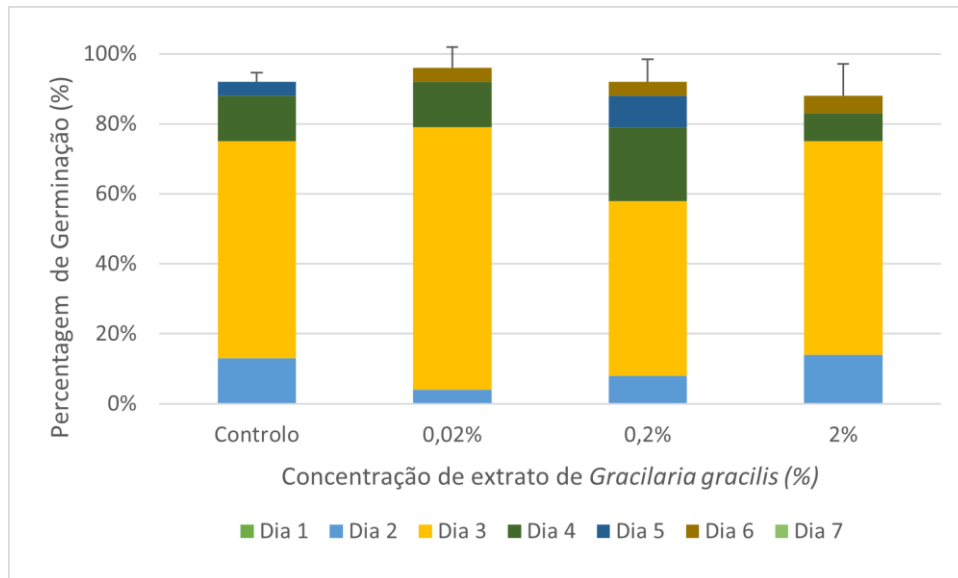


Figura 15 -Porcentagem de germinação registada nos ensaios de crescimento, com extrato de *Gracilaria gracilis* com diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=3.

Para ambos os extratos (*Codium tomentosum* ou *Gracilaria gracilis*) é possível verificar que a concentração de extrato que apresenta uma percentagem de germinação mais elevada quando as sementes são embebidas nos extratos, é a de 0,02%, uma vez que, como mencionado anteriormente, quando em elevada concentração os bioestimulantes algais apresentam uma redução na percentagem de germinação, bem como na alteração do desenvolvimento da plântula (raízes, hipocótilos e humidade).

Relativamente às sementes de tomate, que foram embebidas em água ultrapura e o extrato foi incorporado no meio (figura 16), foram obtidas percentagens de germinação máximas de 96% para as sementes com extrato a 0,2%. Em comparação com o controlo, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ), para os extratos de *Gracilaria gracilis* (nas concentrações de 0,02% ou 0,2%). Já para o extrato da *G. gracilis* a 2% existem diferenças estatisticamente significativas relativamente à percentagem de germinação das sementes de tomate, no controlo.

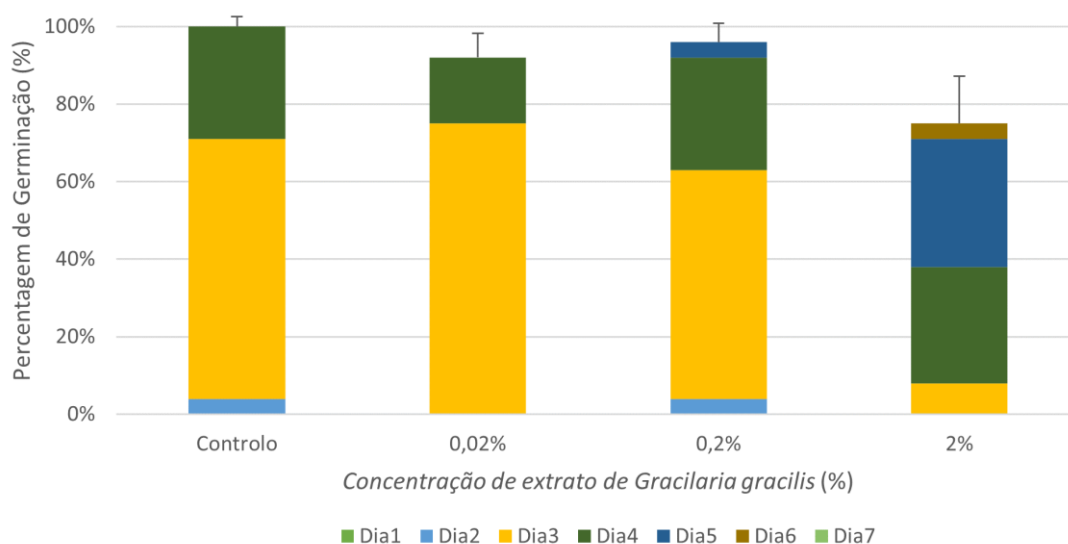


Figura 16 - Percentagem de germinação das sementes do tomate, durante 7 dias, em diferentes concentrações do extrato da *Gracilaria gracilis*. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

É, ainda, possível verificar que as sementes expostas ao extrato de *G. gracilis* não apresentam uma germinação mais rápida na concentração de 0,02% e, além disso, na concentração de 2% existe uma germinação muito mais lenta, uma vez que esta só se inicia no terceiro, quarto, quinto e sexto dias de ensaio contrariamente ao controlo e demais concentrações de *G. gracilis* em que as sementes começam a germinar mais cedo (figura 16). Este resultado é corroborado pelo estudo realizado por Fayzi et al., (2020), onde, com recurso a um extrato de *Jania rubens* (10%) verificou-se uma germinação mais rápida, bem como um maior comprimento e peso das plântulas. Sendo observado nas sementes de milho (*Zea mays L.*) expostas ao extrato de *J. rubens* uma eficácia em torno de 50%, em comparação com o controlo, ou seja, quando em contacto com o extrato algal a semente de milho tem uma percentagem de germinação em torno de 50% superior ao controlo.

No que se refere às sementes germinadas na presença do extrato de *Codium tomentosum*, (figura 17), em comparação com o controlo, verificam-se percentagens de germinação significativamente mais elevadas ( $p < 0,05$ ), nos extratos de *C. tomentosum* a 0,02% e 0,2%, ao contrário do que sucede com o extrato com a concentração de 2% ( $p > 0,05$ ). É possível ainda verificar que só se inicia a germinação ao terceiro dia de ensaio, verificando-se que a concentração de extrato algal de 0,02% é a que apresenta uma percentagem de germinação mais elevada ao quinto dia de ensaio (96%). Ainda

relativamente às concentrações de extrato algal é possível perceber que a de 0,02% é a que exibe uma percentagem de germinação mais elevada (96%) no final do ensaio. Seria expectável que a concentração de 0,02% apresentasse uma percentagem de germinação mais elevada, de acordo com o estudo realizado por Ghaderiardakani et al., (2019), verificou-se que ao utilizarem extrato de *Ulva intestinalis* na semente de erva-estrelada (*Arabidopsis thaliana*) era perceptível um aumento na percentagem de germinação, bem como no desenvolvimento radicular se a concentração do extrato fosse inferior a 0,1%. Quando a concentração do extrato algal foi superior a 0,1% observou-se uma inibição da germinação, bem como do desenvolvimento radicular, que se deveu a concentrações muito elevadas do extrato algal de *Ulva intestinalis* que exerceram um efeito inibitório do desenvolvimento e do crescimento radicular.

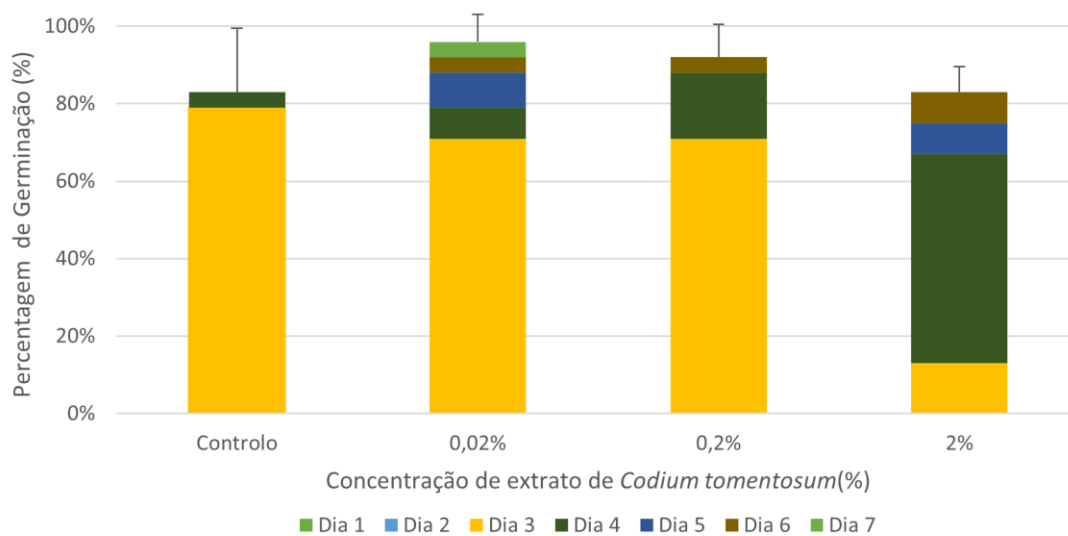


Figura 17 – Percentagem de germinação das sementes do tomate, durante 7 dias, em diferentes concentrações do extrato da *Codium tomentosum*. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Quando se procede à comparação entre as sementes de tomate embebidas em extrato e as sementes embebidas em água e colocadas no meio MS com extrato algal, é possível observar, tanto para o extrato de *Gracilaria gracilis* como de *Codium tomentosum*, uma germinação mais rápida e em maior percentagem do que o controlo quando as sementes são embebidas em extrato, facto que já não acontece para as sementes embebidas em água ultrapura (figura 16 e 17). Assim, os restantes ensaios foram feitos recorrendo a embebição das sementes (alface ou tomate) em extrato (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*).

O resultado anterior é consistente com os resultados obtidos por Punitha et al., (2022) que procederam também à embebição das sementes de *Vigna radiata* no extrato algal

tendo obtido melhores resultados com este método do que com as sementes expostas ao extrato incorporado no meio MS.

Neste ensaio, houve, ainda, a medição do comprimento da radícula e dos hipocótilos, bem como a avaliação da humidade. Foi possível verificar que, para o comprimento das radículas das plântulas expostas ao extrato de *G. gracilis* (0,2%), em comparação com o controlo, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Já para as restantes concentrações do extrato de *G. gracilis* (0,02% ou 2%) existem diferenças estatisticamente significativas, com as radículas a exibirem comprimentos significativamente maior e menor do que os do controlo, respetivamente. Quanto ao comprimento das radículas de plântulas colocadas em extrato de *C. tomentosum*, as concentrações 0,02% e 0,2%, em comparação com o controlo, apresentam comprimento significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ), enquanto a concentração de 2% não apresenta diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

É perceptível pela figura 18, que ambos os extratos (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*) induzem um maior comprimento médio das radículas de tomate, do que os controlos, exceto para a concentração de 2% da *G. gracilis* que apresenta radículas em média mais pequenas que o controlo. Este valor, porém, era expectável, uma vez que se relaciona com a menor percentagem de germinação relativamente ao controlo. Este resultado é corroborado pelo estudo realizado por Vinoth et al., (2012) que, ao recorrerem a extrato líquido de *Gracilaria edulis*, verificou um desempenho relevante no alongamento e enraizamento de rebentos de tomate, utilizando para tal efeito concentrações de 30% e 50% suplementadas em meio MS, sendo os resultados ainda atestados pelo estudo realizado por Chanthini et al., (2019) em que utilizaram extrato algal de *Ulva lactuca* e verificaram que as sementes de tomate expostas ao extrato algal exibiam comprimentos mais elevados de radículas em comparação com o controlo, devendo-se este resultado ao facto de haver na composição do extrato algal de *Ulva lactuca* presença de fito-hormonas, bem como de minerais como magnésio, cálcio e sódio e de substâncias bioativas. De facto, análises bioquímicas efetuadas pelos autores, detetaram uma maior concentração

de ácido ascórbico nas plântulas, bem como um aumento de fenóis, os quais poderão ser responsáveis pelo efeito bioestimulante.

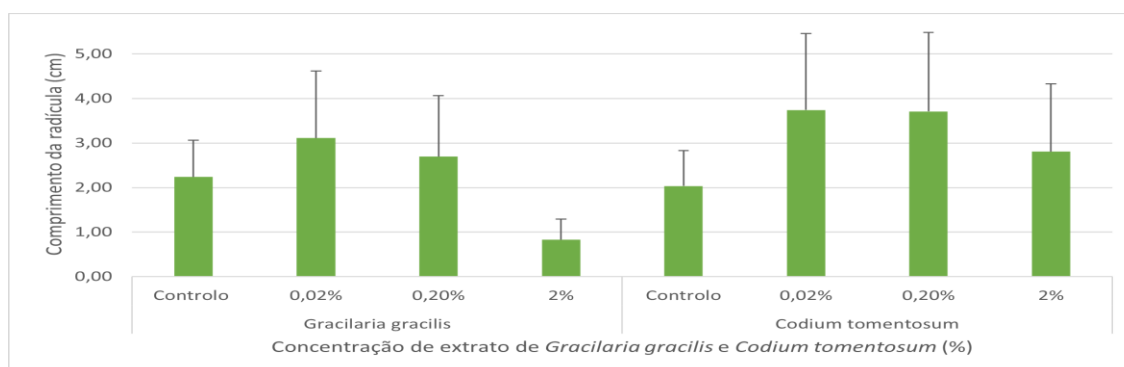


Figura 18 - Comprimento das radículas de tomate, de plântulas expostas a diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) dos diferentes extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), n=3, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Relativamente ao comprimento dos hipocótilos de tomate, é possível verificar que em média, as sementes expostas às concentrações 0,02% e 0,2% de ambos os extratos (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*) apresentam um comprimento do hipocótilo superior ao controlo, contudo a concentração de 2% (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*) apresenta em média, comprimento dos hipocótilos inferior ao controlo, à semelhança do que se verificou para o comprimento das radículas (figura 19).

Quanto a este parâmetro, apenas a concentração de 2% de extrato algal apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), ou seja, comprimento significativamente menor do hipocótilo, relativamente ao controlo.

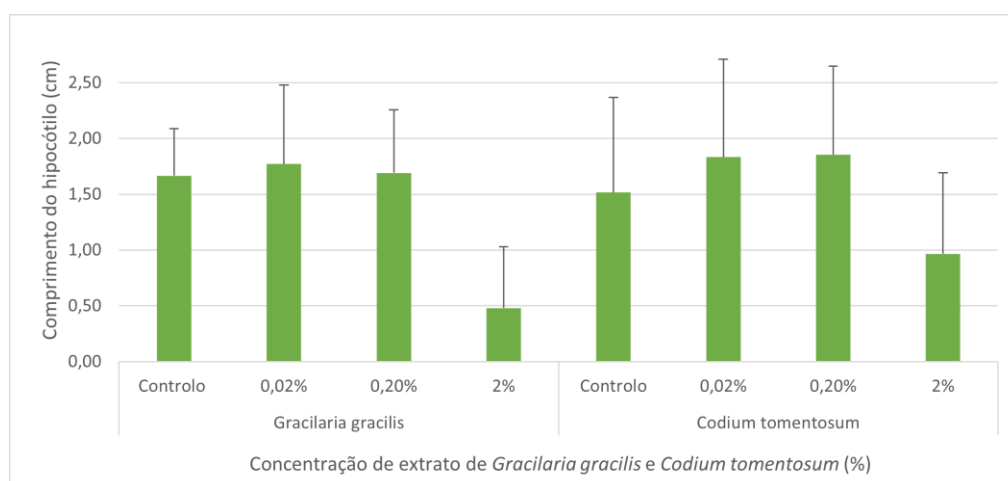


Figura 19 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hipocótilos de tomate, expostos a diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) dos diferentes extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), n=3.

No que toca à humidade (%), verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) para nenhuma das concentrações de ambos os extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), exceto para o extrato de *Gracilaria gracilis* a 2%, que exibe uma percentagem de humidade significativamente menor. A percentagem de humidade mais alta, de 93%, verifica-se para *Codium tomentosum* a 0,2% e a mais baixa, de 84%, para o extrato de *Gracilaria gracilis* a 2%. Esta última apresenta, assim, maior produção de biomassa (figura 20).

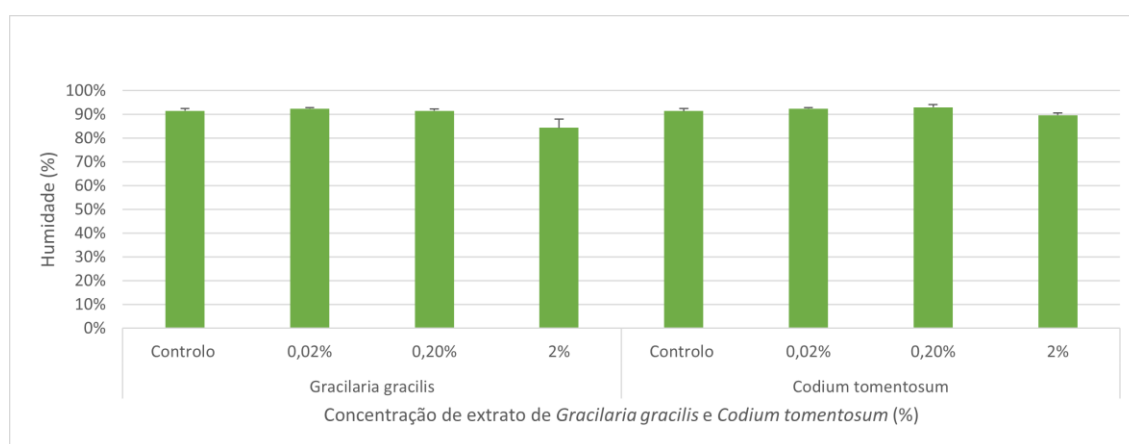


Figura 20 - Percentagem de humidade, das plântulas de tomate, em diferentes concentrações (0,02%, 0,2% e 2%) de extrato (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*),  $n=3$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

No final do ensaio de crescimento podemos afirmar que a concentração mais favorável, que permite a maximização da germinação das sementes, bem como a que regista melhor crescimento das plântulas foi a concentração de 0,2% para ambos os extratos (*Gracilaria gracilis* ou *Codium tomentosum*), sendo também a concentração mais baixa dentro das condições mencionadas anteriormente. Desta forma, foi esta a concentração usada nos ensaios seguintes.

#### IV. Ensaios de Crescimento em condições de Stress Salino

Os ensaios de salinidade são um ponto relevante no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que, as alterações climáticas estão a provocar uma diminuição da água doce disponível para rega, sobretudo nos países com clima mediterrâneo, como é o caso de Portugal. Por outro lado, nas zonas litorais, os lençóis de água subterrâneos estão a sofrer infiltrações de água do mar, salgada, existindo maior quantidade de cloreto de sódio nos aquíferos. Consequentemente existe a necessidade de procurar uma alternativa que seja eficiente e sustentável, uma vez que com a presença de sais na água pode reduzir o rendimento da produção hortícola para aproximadamente metade, devido à presença de stress abiótico (Battacharyya et al., 2015).

Assim foram testados diferentes níveis de salinidade, para aferir sobre um potencial aumento de resistência das plantas (alface e tomate) a este fator de stress (5‰, 15‰, 25‰ e 35‰), na presença de extratos de macroalgas. Para as duas espécies hortícolas, apenas germinaram sementes submetidas à salinidade menor, de 5‰, tendo-se observado uma diminuição da germinação para 70% no controlo, com a introdução deste fator de stress. Como é possível observar na figura 21, o extrato de *C. tomentosum* não promove a germinação das sementes de alface nem de tomate apresentando estas, percentagens de germinação inferiores ao controlo, existindo diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ). Contudo, existe uma germinação ligeiramente mais rápida (3 ° dia) quando o extrato de *C. tomentosum* está presente.

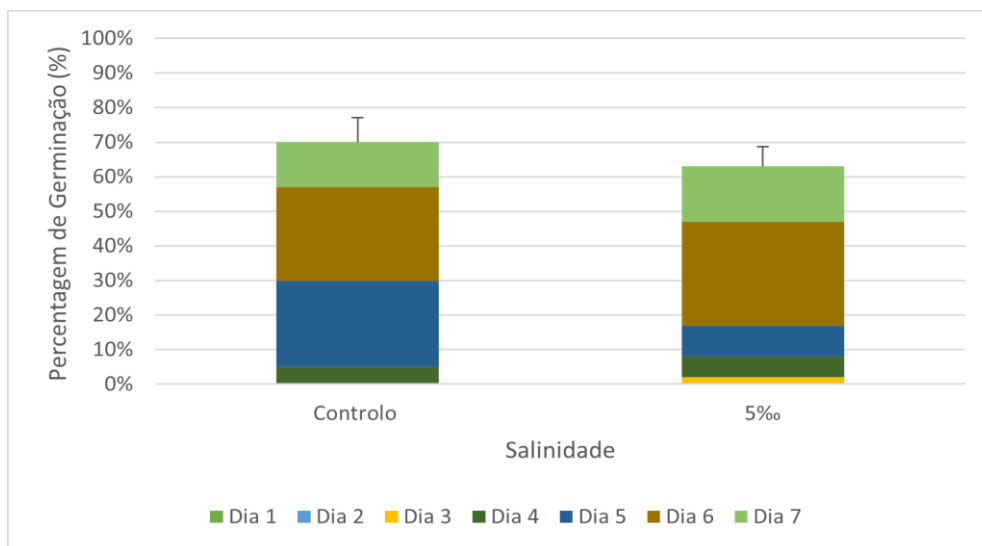


Figura 21 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, durante 7 dias, da concentração do extrato de *Codium tomentosum* (0,2%) com meio MS salino a 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o valor do desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo,  $n=6$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Já para a germinação das sementes de tomate expostas a extrato de *G. gracilis*, como é possível observar na figura 22, também só existe germinação na salinidade mais baixa, sendo ainda possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) do extrato em comparação com o controlo, existindo, porém, um aumento da percentagem de germinação dos 62% do controlo para perto dos 72% do extrato de *G. gracilis*. É, ainda, possível notar que com a presença de extrato de *G. gracilis* existe uma germinação mais rápida (3 ° dia).

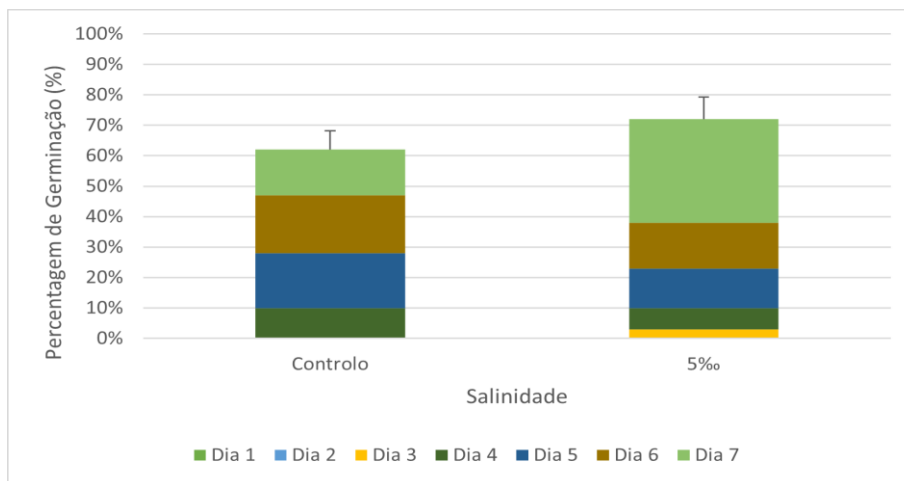


Figura 22 - Percentagem de germinação das sementes de tomate, durante 7 dias, em extrato de *Gracilaria gracilis* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Relativamente à germinação das sementes de alface, tanto para o extrato de *G. gracilis* como para o extrato de *C. tomentosum*, verifica-se, uma vez mais, que apenas germinaram as sementes no meio com salinidade a 5‰, como é possível observar na figura 23 e 24. Conseguir-se, mesmo, atingir uma percentagem de germinação de 100%, ao contrário do controlo, que apresenta uma percentagem de germinação de 93% (figura 23). Não existem, porém, diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).

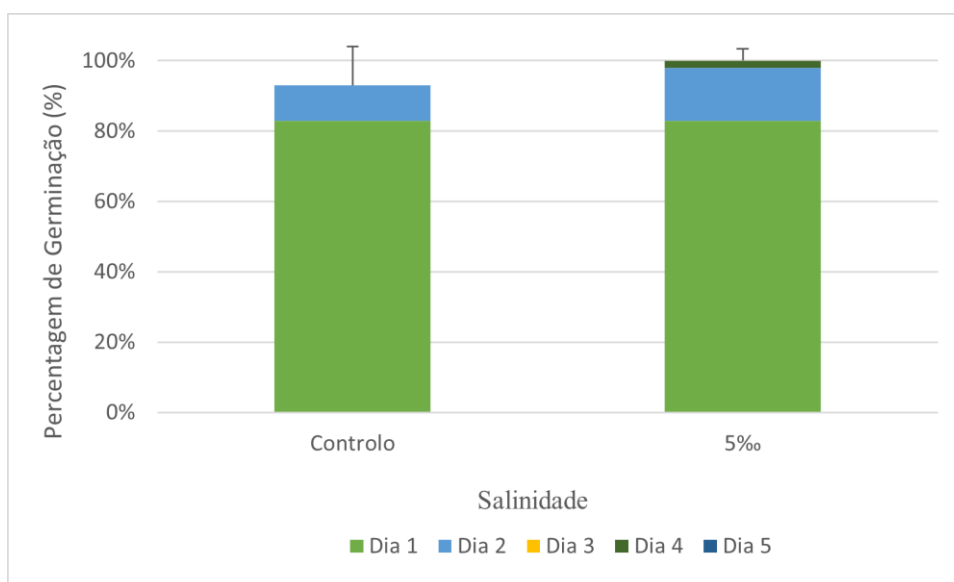


Figura 23 - Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, da concentração do extrato de *Codium tomentosum* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 7 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

O extrato de *G. gracilis* não demonstra qualquer efeito assinalável, uma vez que o controlo apresenta uma percentagem de germinação de 100%, ao contrário do extrato de *G. gracilis* que apenas apresenta uma percentagem de germinação de 98% (figura 24), não havendo a registo de diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).

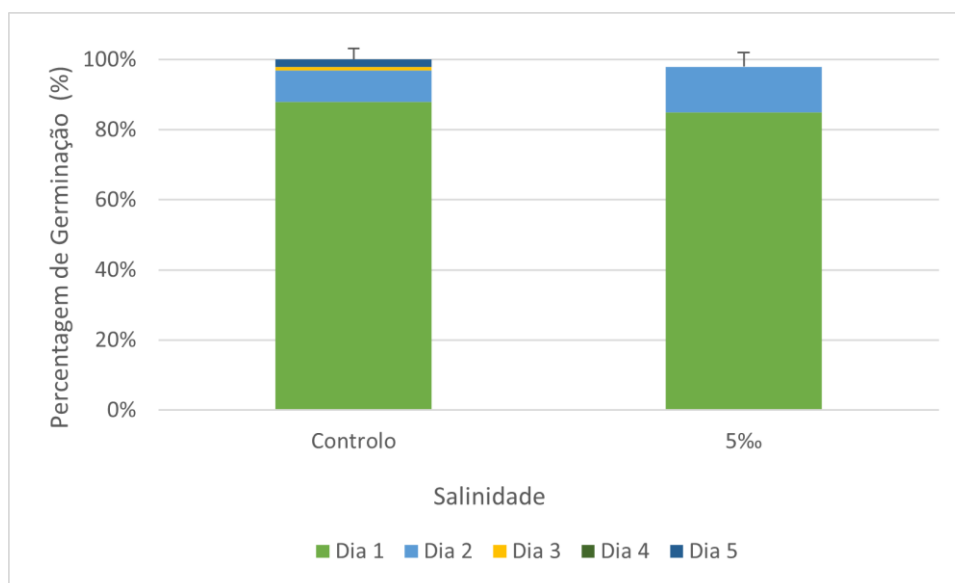


Figura 24 - Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, da concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* (0,2%) com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Segundo Bi et al., (2011) a presença de ficocolóides nos extratos, no extrato da *G. gracilis*, o agar e no extrato do *C. tomentosum* o ulvano, permitem melhorar a resistência das plantas à salinidade, o que aconteceu, apenas parcialmente, no presente trabalho. Contudo, os extratos poderão conter uma concentração reduzida de ficocolóides e, por isso, não ter sido manifestada resistência para concentrações de salinidade acima das 5‰ ou até mesmo as concentrações de NaCl testadas serem demasiado elevadas.

Resultados documentados por Ghaderiardakani et al., (2019), comprovam que a utilização de extratos algais promove não só o aumento das percentagens de germinação das sementes, mas também um aumento do nível de nutrientes no solo e a resistência ao stress ambiental, como é o caso do aumento da salinidade. Sendo esta ideia reforçada por Zou et al., (2019), uma vez que os resultados obtidos por estes autores demonstram que os bioestimulantes algais, devido à presença de polissacarídeos nos extratos, melhoram a resistência ao stress salino. Por exemplo, o estudo realizado por Chernane et al., (2015) verificou que o extrato de *Ulva rigida* permite melhorar a resistência ao stress salino e contribuir para a defesa das plantas contra a deterioração oxidativa. Existe, portanto,

evidência do contributo dos extratos de macroalgas no aumento da resistência a stress salino.

É perceptível, relativamente à análise em geral dos dados do comprimento das radículas e dos hipocótilos das plântulas de tomate, que estas apresentam uma redução geral no seu desenvolvimento, quando em comparação com os ensaios anteriores.

No que toca a análise do comprimento das radículas de tomate, na presença do extrato de *Codium tomentosum*, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ), contudo como é possível observar na figura 25, verifica-se, a presença de um desvio padrão elevado no controlo, existindo, portanto, grande heterogeneidade nos resultados.

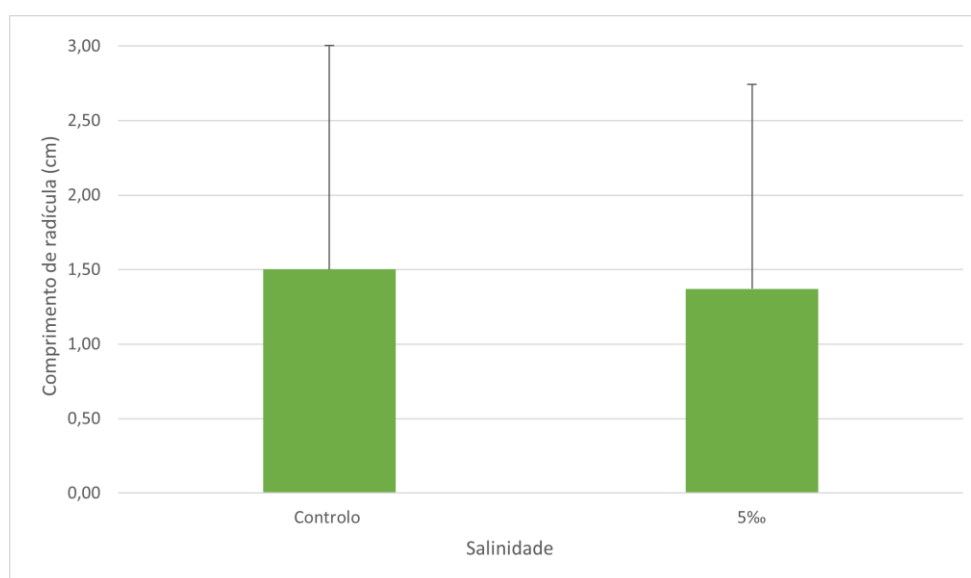


Figura 25 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de sementes de tomate, expostas a uma concentração do extrato de *Codium tomentosum* de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5% e NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Embora fosse expectável que houvesse uma redução no comprimento das radículas em situações de stress salino, as sementes que foram expostas ao extrato de *C. tomentosum* apresentam uma média de comprimento de radícula mais elevada, em comparação com o controlo. Segundo o estudo realizado por Bahmani Jafarlou et al., (2021), demonstrou que ao recorrerem a utilização de extrato de *Spirulina platensis*, e de *Sargassum angustifolium* com diferentes concentrações (0,5, 10 e 15 ml<sup>-1</sup>) em rebentos de flor de seda (*Calotropis procera*) houve um aumento no desenvolvimento das radículas de 24,2% e 9% nas concentrações salinas mais baixas (7,5 dS m<sup>-1</sup> e 15 dS m<sup>-1</sup>), respetivamente. Contudo, estes autores notaram uma diminuição de cerca de 81,8% na concentração salina mais elevada (30 dS m<sup>-1</sup>) relativamente ao controlo, verificando-se um desenvolvimento significativo da radícula das plantas em stress ( $p<0,05$ ).

No presente estudo, relativamente ao comprimento dos hipocótilos em tomate, é possível observar, na figura 26, que as sementes expostas ao extrato do *C. tomentosum* apresentam, em média, hipocótilos com maior comprimento do que o controlo, embora não existam diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ). Este o resultado está de acordo com o estudo realizado por Arroussi et al., (2018) que verificaram que o extrato de *Dunaliella salina*, em particular os exopolissacarídeos, induziu um aumento no comprimento dos hipocótilos das sementes de tomate, bem como um desenvolvimento maior da radícula e ainda um peso de plântulas mais elevado, em comparação com o controlo.

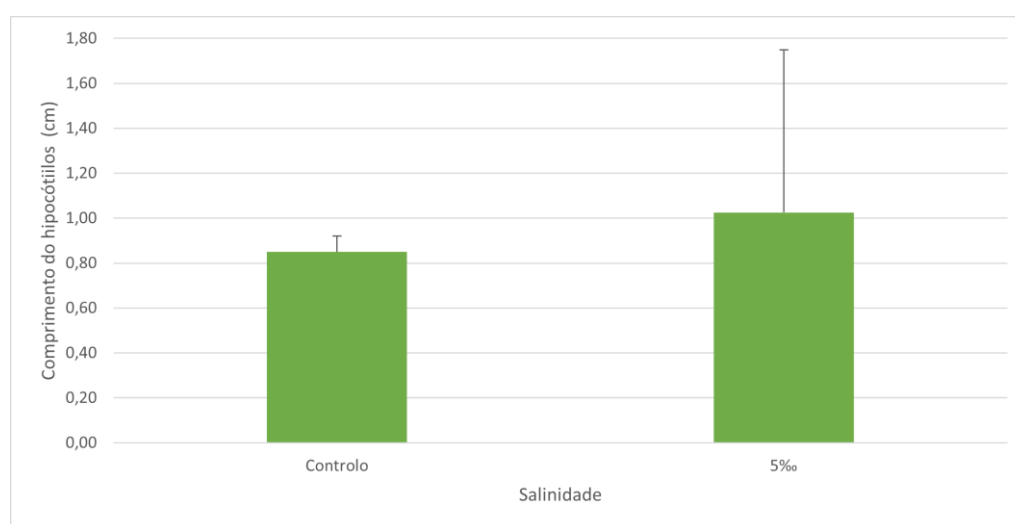


Figura 26 - Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hipocótilos de tomate, expostas a uma concentração do extrato de *Codium tomentosum* de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Nas sementes de alface, ao analisarmos os dados relativos ao comprimento das radículas, é possível verificar que, para o extrato de *Codium tomentosum*, embora se mantenha uma muito ligeira tendência de redução de comprimento da radícula, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) (figura 27). Contudo, segundo o estudo realizado por Hussein et al., (2021) os extrato de *Ulva fasciata*, em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 1,5% e 2%) apresentam uma eficácia significativa no crescimento das plântulas de sementes de feijão-frade (*Vigna sinensis L.*) e de milho (*Zea mays L.*). Embora não seja nem a mesma espécie de alga, nem a mesma espécie vegetal, leva a crer que existia uma possibilidade de obter um desenvolvimento maior das plântulas expostas ao extrato de *C. tomentosum* em comparação ao controlo.

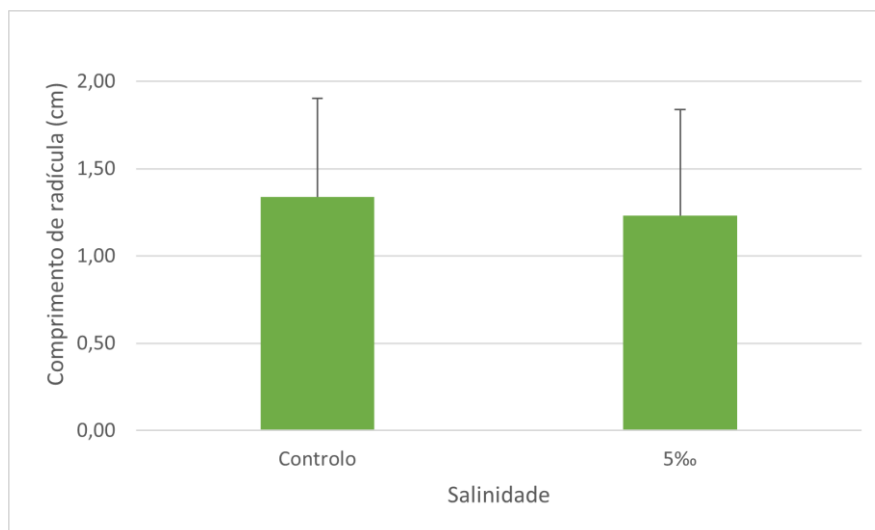


Figura 27- Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de alfaca, expostas a uma concentração de extrato da concentração do extrato de *Codium tomentosum* a 0,2% com meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Relativamente ao extrato de *G. gracilis*, nota-se que, em comparação com o *C. tomentosum*, existem diferenças significativas entre o comprimento das radículas de tomate, uma vez que em média as sementes do controlo apresentam um valor de  $1,86 \pm 1,16$  cm. Já as sementes expostas ao extrato da *G. gracilis* apresentam um valor de  $1,51 \pm 1,36$  cm. Embora não seja a mesma espécie de alga e de semente, este resultado é corroborado pelo estudo realizado por Hussein et al., (2021), que utilizaram extrato líquido de *Laurencia obtusa* com diferentes concentrações ( 0,5%, 1%, 1,5% e 2%), verificando-se uma eficácia significativa no crescimento das plântulas de feijão frade (*Vigna sinensis L.*) e milho (*Zea mays L.*), bem como na atenuação dos danos causados pela suplementação com água do mar, como por exemplo, a desidratação das sementes. De igual forma, não se verifica para o comprimento dos hipocótilos diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) (figura 28).

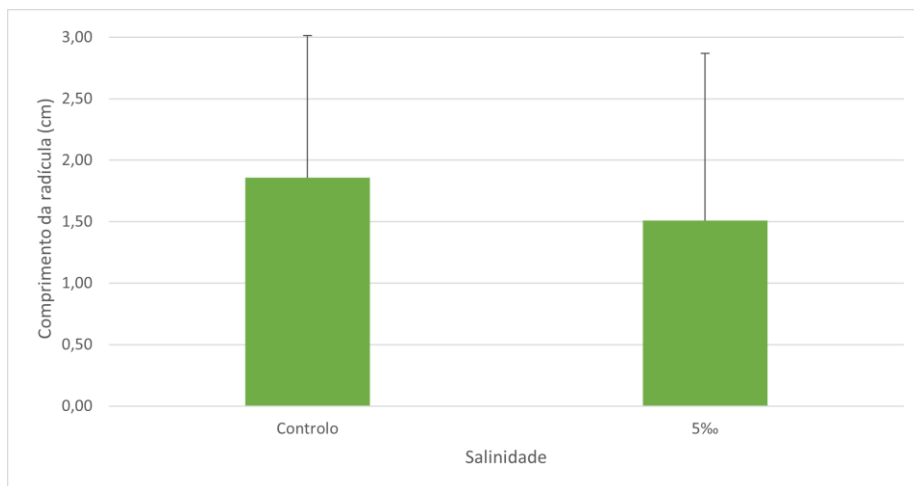


Figura 28- Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de sementes de tomate, expostas a uma concentração de extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2% com meio MS com concentração salina de 5%, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Contudo, relativamente ao comprimento dos hipocótilos, verificou-se a presença de plântulas mais desenvolvidas, bem como uma percentagem de germinação maior, e presença de hipocótilos mais compridos, em comparação com o extrato de *C. tomentosum*. As sementes expostas ao extrato da *G. gracilis* apresentam em média, comprimentos de hipocótilos ligeiramente maiores em comparação com o controlo, embora não se verifiquem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), sendo ainda possível salientar o valor elevado do desvio padrão, o que indica a presença de resultados muitos dispersos (figura 29).

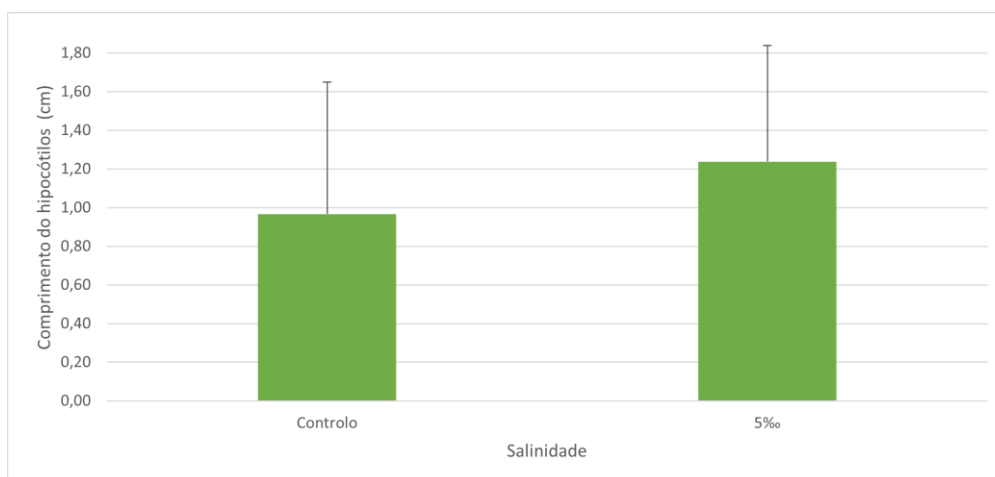


Figura 29 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento dos hipocótilos de tomate, expostas a uma concentração de extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2%, com meio MS com concentração salina de 5% de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

É importante salientar que, nas sementes de tomate, embora tenha havido germinação para ambos os extratos (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*) ao final do 7º dia, não se verificou o desenvolvimento de plântula completa (figura 30), uma vez que a maioria apresentava apenas radículas ou hipocótilos muito reduzidos (figura 31), ao contrário do que se verificou na ausência do stress.

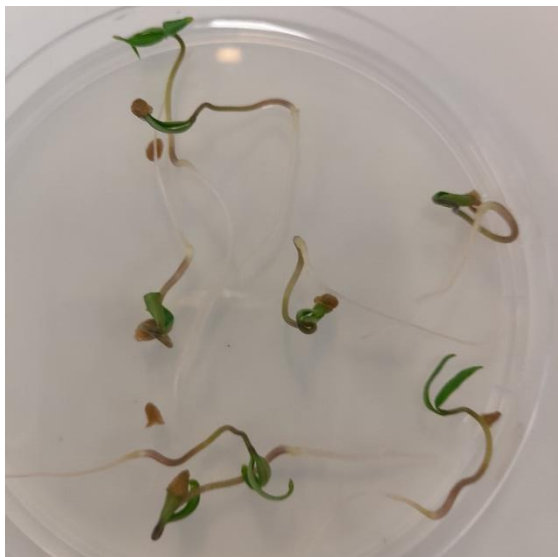


Figura 30 – Plântulas de tomate, expostas ao extrato da *G. gracilis* no meio MS, germinadas em condições ideais ao final do 7º dia de ensaio de crescimento.



Figura 31 – Plântulas de tomate pouco desenvolvidas, ao final do 7º dia de indução do stress salino, expostas ao extrato de *G. gracilis*.

Relativamente às sementes de alface, é possível concluir, segundo análise estatística, que não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as plantas germinadas no controlo e aquelas germinadas no extrato de *G. gracilis* (figura 32). Tal indica que o extrato de *G. gracilis* não apresenta efeito no desenvolvimento das radículas quando as sementes se encontram sob stress salino. No estudo realizado por Vinoth et al., (2012) verificou-se que a utilização de extrato de *Gracilaria edulis*, com uma concentração de 20%, induziu um aumento não só na percentagem de germinação, mas também no desenvolvimento da radícula das sementes de tomate, em linha com os resultados observados no presente estudo.

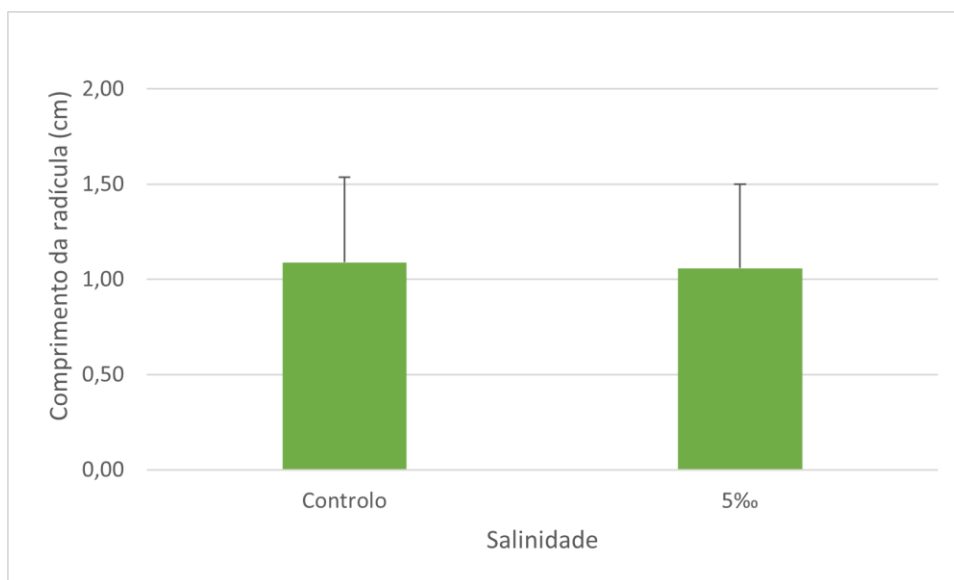


Figura 32 – Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de alface, expostas a uma concentração de extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Relativamente à humidade é possível observar que, para o extrato de *C. tomentosum*, as plântulas de tomate não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre o controlo e o extrato (figura 33), sendo ainda possível salientar que as plântulas do controlo e as expostas ao extrato de *C. tomentosum*, apresentam a mesma percentagem de humidade (82%).

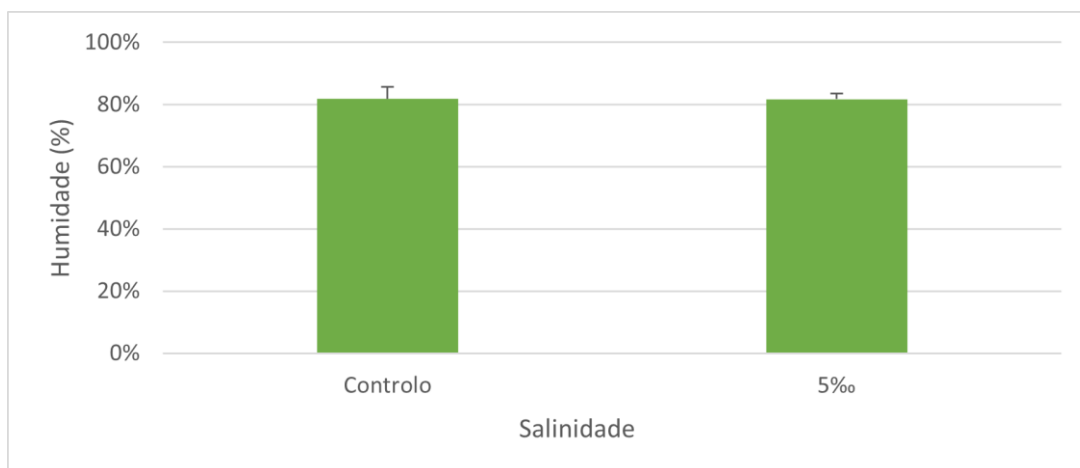


Figura 33 – Percentagem de humidade das plântulas de tomate da concentração do extrato do *Codium tomentosum* (0,2%), em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Já para as plântulas de alface é possível verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas do extrato ( $p>0,05$ ) em comparação com o controlo, contudo, existe uma percentagem maior no controlo do que no extrato de *C. tomentosum* (figura 34). Isto significa que existe maior peso seco nas plântulas de tomate expostas ao

extrato. Esta conclusão é corroborada pelo estudo realizado por Mzibra et al., (2021), o qual observou um efeito positivo no peso seco em comparação com o controle, quando utilizando extrato de *C. tomentosum* (0,1 e 0,2 mg mL<sup>-1</sup>).

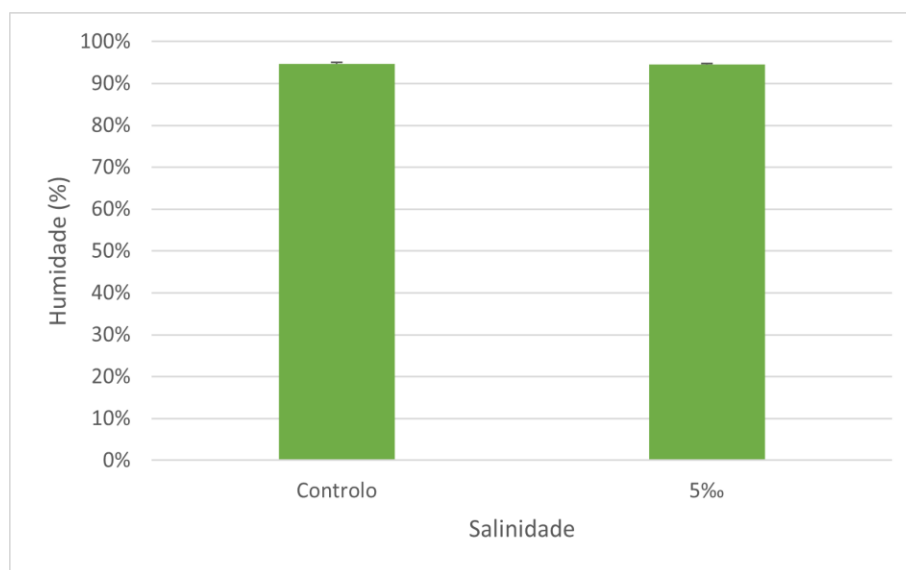


Figura 34 - Percentagem de umidade das plântulas de alface expostas a uma concentração do extrato do *Codium tomentosum* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5% de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Para o extrato de *G. gracilis*, observa-se que, nas plântulas de tomate, o controle apresenta, também, maior percentagem de umidade, não ultrapassando, contudo, os 84% de umidade, ainda que não existam diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ), como é possível observar na figura 35. Tal como no extrato analisado anteriormente, estes resultados eram expectáveis, uma vez que segundo o estudo realizado por Mzibra et al., (2021), verificou-se um aumento do peso seco em comparação com o controle, recorrendo ao extrato de uma alga vermelha (*Gracilaria pistillata*) com uma concentração de 0,2 mg mL<sup>-1</sup>.

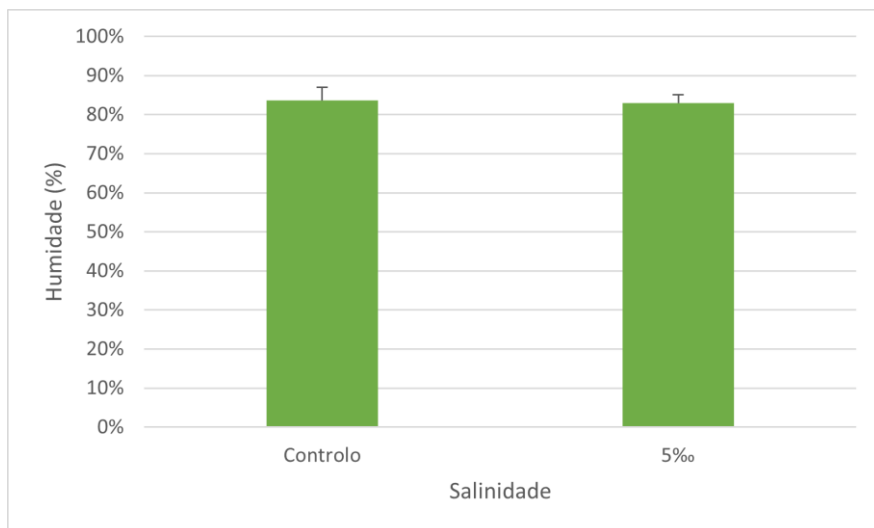


Figura 35 - Percentagem de humidade das plântulas de tomate da concentração do extrato do *Gracilaria gracilis* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

A alface, apresenta exatamente o resultado oposto, uma vez que a percentagem de humidade das plântulas, expostas ao extrato, em comparação com o controlo, é mais elevada, rondando os 95% de humidade, contudo não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) (figura 36).

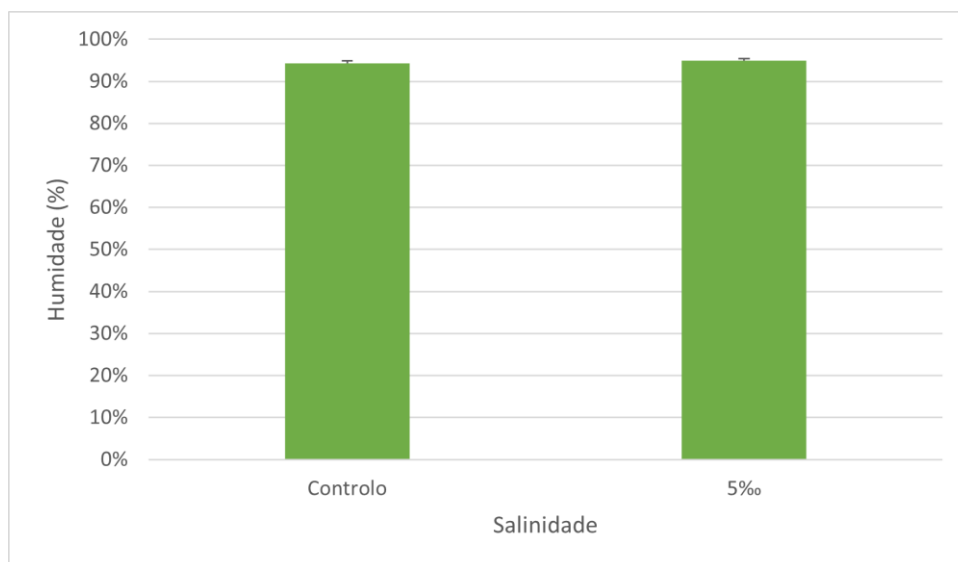


Figura 36- Percentagem de humidade das sementes de alface da concentração do extrato de *Gracilaria gracilis* de 0,2%, em meio MS com concentração salina de 5‰ de NaCl, n=6, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

De salientar que, a ausência de germinação das sementes de alface e de tomate, nas salinidades mais elevadas, pode ter-se devido ao facto de os extratos não apresentarem as concentrações necessárias de ficocolóides ou a quantidade de NaCl estar em demasia, anulando assim qualquer efeito que possa ser visível. Contudo, para concentrações mais

baixas de NaCl, os ficocolóides, entre outras substâncias bioestimulantes, que se encontram presentes nos extratos não serão suficientes para evitar uma quebra no crescimento das plantas e no desenvolvimento das mesmas. Segundo o estudo realizado por Patel et al., (2018), a utilização de extrato algal de uma macroalga vermelha (*Kappaphycus alvarezzi*), conhecida por conter elevadas concentrações de carragenina, um ficocolóide e regulador de crescimento, em três variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob stress salino, obtiveram um aumento no comprimento e peso das raízes e nas plântulas, bem como um aumento de aminoácidos, cálcio, entre outras substâncias, comprovando a eficácia do extrato algal. Da mesma forma, o estudo realizado por Ibrahim et al., (2014), demonstra que recorrendo ao extrato de uma macroalga verde (*Ulva lactuca*) a 1% em plântulas de trigo sob uma salinidade de 50 mM, houve um aumento quer no peso fresco, como também no seco, bem como um aumento geral do crescimento das raízes.

#### **V. Ensaios de Crescimento em condições de Stress Térmico**

Este ensaio visou determinar se os extratos algais apresentam algum efeito no aumento da resistência das plantas hortícolas (alface e tomate) ao stress térmico. Assim, as sementes foram sujeitas a uma temperatura de germinação de 35°C, muito acima da temperatura ótima de crescimento destas plantas.

Na realização deste ensaio, as sementes de tomate não germinaram, indicando, assim, que devido à temperatura elevada a viabilidade da semente foi comprometida. A inativação de alguns compostos, nomeadamente fitohormonas, impedirá a quebra da dormência das sementes de tomate (Stirk et al., 2004). Por outro lado, as sementes de tomate são mais sensíveis a alterações térmicas do que as sementes de alface, podendo também ser uma das razões para não ter havido germinação das sementes de tomate (Alsamir et al., 2021).

Relativamente às sementes de alface, submetidas a uma temperatura de germinação de 35°C, é possível observar na figura 37 que houve germinação das sementes para todos os extratos testados. O extrato da *G. gracilis*, porém, apresenta uma germinação abaixo dos 40%, muito inferior à germinação registada para o controlo, o qual apresenta uma percentagem de germinação de 60%. Já para o extrato de *C. tomentosum* é possível verificar que, embora com diferenças reduzidas, as sementes com o extrato algal exibem uma percentagem de germinação maior em comparação com o controlo, bem como uma

germinação mais rápida, já que o controlo ainda apresenta germinação de sementes ao 5º dia. Verifica-se, ainda, que não existem diferenças estatisticamente significativas nos extratos (*G. gracilis* ou *C. tomentosum*) em comparação com o controlo ( $p>0,05$ ) (figura 37).

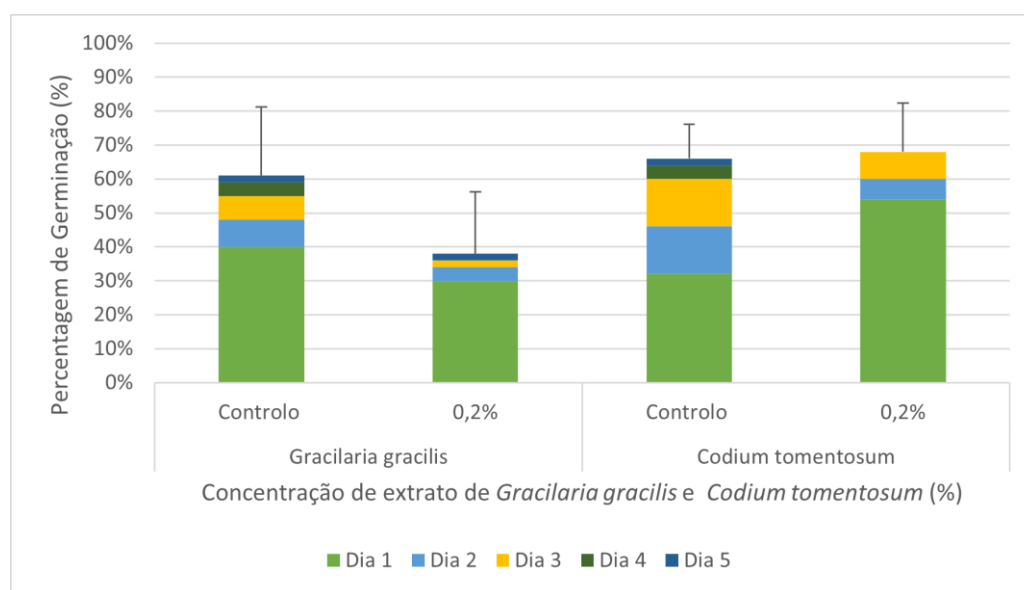


Figura 37- Percentagem de germinação das sementes de alface, durante 5 dias, na concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e em extrato de *Codium tomentosum* à 0,2%, à temperatura de 35°C. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo o desvio padrão o valor médio dos 5 dias em estudo,  $n=5$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Quando se procede à comparação da germinação na presença dos extratos é possível verificar que o extrato de *C. tomentosum* induz uma percentagem de germinação mais elevada, comparativamente com o extrato de *G. gracilis*, sugerindo assim que o extrato de *C. tomentosum* confere maior resistência ao stress térmico. Tal poderá dever-se à presença de fito-hormonas, conforme ficou comprovado pelo estudo de Vasconcelos & Chaves, (2020). Este estudo descreve o sucesso da utilização de um bioestimulante comercial (Stimulate®), composto por 0,009% citocinina, 0,005% giberelina e 0,005% de auxina, no combate do stress provocado pelo aumento da temperatura, observando-se uma diminuição dos efeitos negativos normalmente provocados nas plantas (tomate, alface, aipo, salsa, entre outros), como a redução da percentagem de germinação, o atraso no crescimento, a fotossíntese reduzida e, mesmo, a morte das plantas.

De salientar, porém, que a temperatura interfere com a composição em fitohormonas das macroalgas. Um estudo realizado por Stirk et al., (2004), mostrou que o armazenamento de extratos algais durante 14 dias a uma temperatura elevada (54°C) determina o aumento na concentração total de citocininas e uma redução de auxinas, uma

vez que a temperatura elevada provavelmente causa a degradação destas moléculas, já que estas moléculas são mais instáveis.

Relativamente ao comprimento das radículas das alfaces, quando procedemos à comparação com ensaios anteriores, é possível observar que houve uma diminuição no crescimento das mesmas, uma vez que as radículas não chegam a atingir, em média, os  $0,15 \text{ cm} \pm 0,25$  de comprimento, valor muito inferior ao obtido nas radículas no ensaio de stress salino ( $1,06 \text{ cm} \pm 0,44$ ). Não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) no comprimento das radículas das sementes germinadas com os extratos relativamente ao controlo (figura 38).

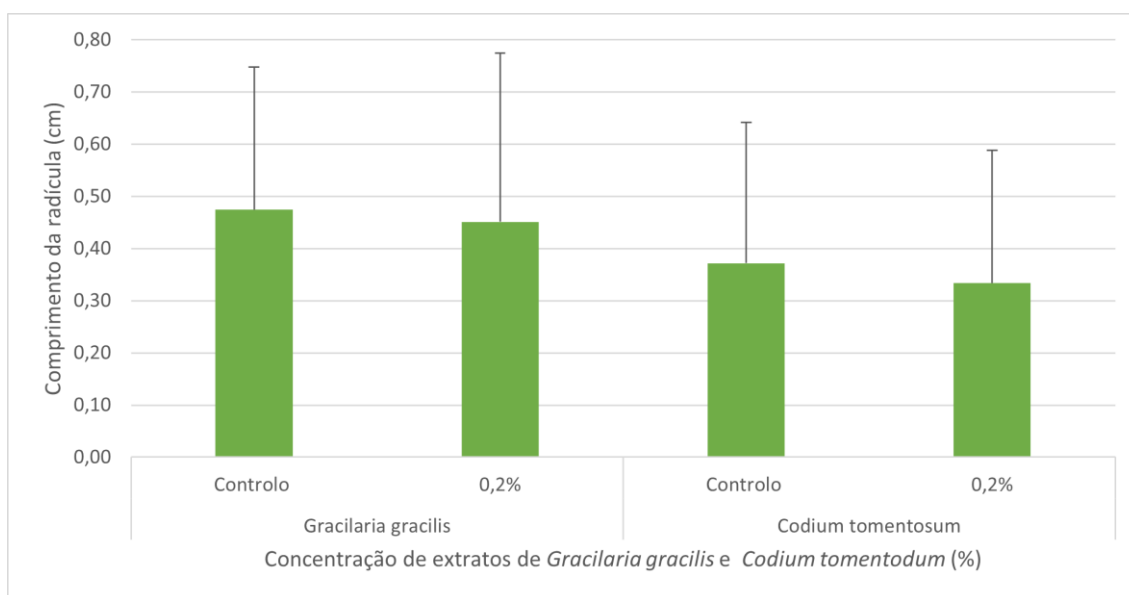


Figura 38- Comprimento das radículas de sementes de alface em cm, ao fim de 5 dias de germinação, na concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e de extrato de *Codium tomentosum* de 0,2%,  $n=5$ , sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

Segundo o estudo realizado por Ahammed & Yu, (2016), as fito-hormonas presentes em extratos algais, tais como ácido abscísico, auxinas, giberelinas, citocininas, interferem na resposta das plantas ao stress térmico, determinados resultados que não são os esperados. Também o estudo de Stirk et al., (2004) demonstrou a degradação das citocininas e auxinas, uma vez que estas são moléculas instáveis. Outra hipótese colocada pelos autores para explicar os resultados insatisfatórios será a concentração de auxinas e giberelinas inferior ao necessário para fazer face ao stress térmico. Todavia, não é possível averiguar, uma vez que para tal era necessário a realização de análises químicas, para determinar a composição dos extratos e verificar se as moléculas presentes se encontravam degradadas.

A humidade da biomassa da alface apresenta-se maior nos controlos do que nos extratos, sendo a percentagem mais elevada, de aproximadamente 94%, registada no controlo com extrato da *G. gracilis* (figura 39). A temperatura elevada pode levar a uma maior desidratação das plântulas, diminuindo assim o peso húmido da biomassa. Não existem, contudo, diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).

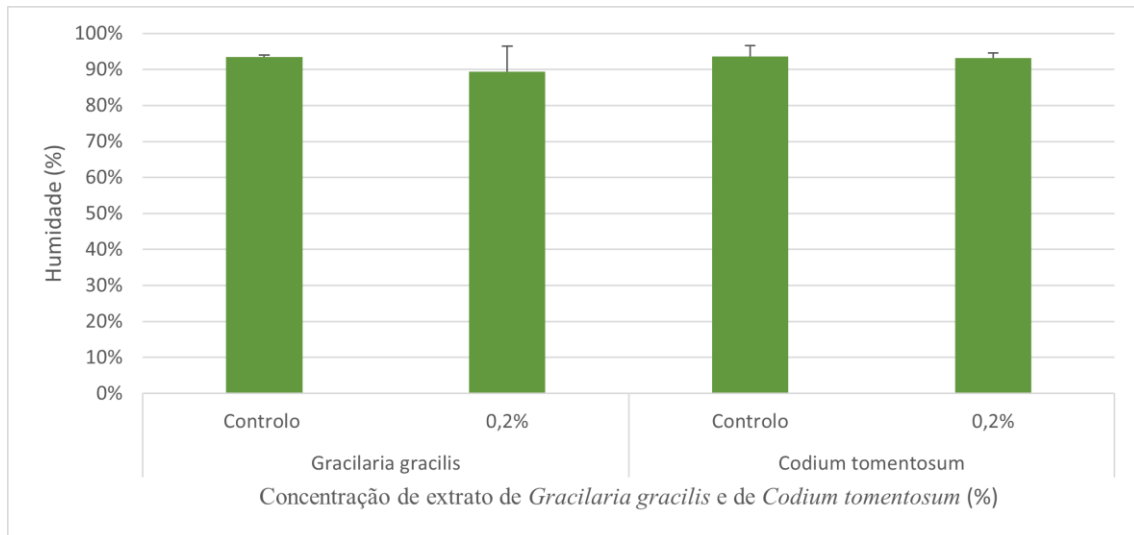


Figura 39 – Percentagem de humidade das sementes de alface, da concentração do extrato da *Gracilaria gracilis* de 0,2% e do *Codium tomentosum* de 0,2%, n=5, sendo as barras de erro representativas da variabilidade de dados.

## Conclusão

O trabalho desenvolvido procura aprofundar o conhecimento sobre o potencial efeito e benefício associado à utilização de macroalgas, na melhoria da germinação e crescimento de plantas hortícolas, a potencial aplicação na redução dos efeitos de stress salino e térmico.

Existe a probabilidade de os extratos algais *Gracilaria gracilis* e *Codium tomentosum* apresentarem na sua composição fito-hormonas como é o caso das giberelinas, uma vez que ambos os extratos são responsáveis por originar uma taxa germinação mais elevada, em comparação com o controlo, contudo poderá existir uma variação na concentração desta fito-hormona, tendo por base os resultados obtidos.

Relativamente à desinfeção das sementes, é possível constatar que existe melhores resultados quando as sementes são desinfetadas relativamente as sementes que não são desinfetadas, observando-se uma ocorrência de contaminações mais reduzida. Já a utilização de extrato algal sem desinfeção obteve melhores resultados quando em comparação com ao extrato autoclavado, uma vez que possivelmente ocorre a degradação das moléculas presentes no extrato algal.

A embebição das sementes, contrariamente à adição do extrato algal no meio, demonstrou uma eficiência maior, uma vez que quando as sementes são embebidas no extrato algal conseguem uma absorção direta das moléculas bioativas, algo que não acontece quando o extrato é inserido no meio de cultivo, uma vez que inicialmente as sementes têm de germinar para conseguir aceder as moléculas bioativas.

É possível concluir, com base nos resultados obtidos, que ambos os extratos apresentam potencial bioestimulante com uma concentração ideal de 0,2%, sendo que o extrato da *Gracilaria gracilis* apresenta melhores resultados sobre a germinação e sobre o crescimento das plantas. Contudo, em situação de stress térmico, este extrato não apresenta os melhores resultados, pelo menos na temperatura testada.

Já para o extrato de *Codium tomentosum* é possível salientar que apresentou melhores resultados em comparação com o extrato de *Gracilaria gracilis* nos ensaios das plantas submetidas a condições de stress térmico.

## **Perspetivas Futuras**

Como perspetivas futuras, no intuito de ter resultados mais sólidos, existe a necessidade de recorrer ao aumento do número de amostras, havendo assim posteriormente a diminuição do desvio padrão, tornando os resultados mais fiáveis.

Existe a necessidade de, posteriormente, realizar ensaios em campo, já que os resultados obtidos são limitados, uma vez que são realizados sob condições ambientais controladas e em pequena escala. Contudo, nestes ensaios deve-se ter em atenção a estabilidade dos extratos, quando submetidos a variações naturais de temperatura, pH, entre outras, as quais podem alterar as propriedades físico-químicas dos extratos. Outro estudo importante será o isolamento, identificação e caracterização dos compostos ativos presentes em cada extrato, com o intuito de perceber a sua composição química, e identificar os compostos potencialmente benéficos.

O maior desafio, porém, é tentar perceber como melhorar o potencial bioestimulante dos extratos, podendo conseguir melhorar o efeito dos mesmos, recorrendo à utilização dos extratos na forma spray foliar, ou adicionado ao mecanismo de rega, uma vez que haveria maior contacto dos extratos com as sementes e posteriormente com as plântulas, do que apenas na embebição das sementes. Estes ensaios seriam já ensaios à escala piloto e em condições de campo.

É possível salientar que futuramente se a intenção for obter um bioestimulante algal que tenha um melhor desempenho relativamente ao stress térmico a alga que apresentaria melhor desempenho seria o *C.tomentosum*, já se o intuito for um bioestimulante mais virado para a germinação, crescimento ou stress salino a alga que apresenta um elevado desempenho é a *G.gracilis*.

## Bibliografia

- Afonso, C., Correia, A. P., Freitas, M. v., Mouga, T., & Baptista, T. (2021). In vitro evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of extracts of *Gracilaria gracilis* with a view into its potential use as an additive in fish feed. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/app11146642>
- Ahammed, G. J., & Yu, J. Q. (2016). Plant hormones under challenging environmental factors. In *Plant Hormones under Challenging Environmental Factors*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7758-2>
- Ahmadi, E., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Savadkoobi, S. K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina [christti]* seed in vitro culture. *Trees - Structure and Function*, 26(4), 1299–1304. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8>
- Ali, O., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2021). Biostimulant properties of seaweed extracts in plants: Implications towards sustainable crop production. *Plants*, 10(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/plants10030531>
- Alsamir, M., Mahmood, T., Trethowan, R., & Ahmad, N. (2021). An overview of heat stress in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1654–1663. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.088>
- Anisimov, M., Chaikina, E., Klykov, A., & Rasskazov, V. (2013). Effect of Seaweeds Extracts on the Growth of Seedling Roots of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) is depended on the Season of Algae Collection. *Agriculture Science Developments*, 2(8), 67–75. [www.tijournals.com](http://www.tijournals.com)
- Antón E, Herrera H, & Gonzalez G. (2021). Potencial de las macroalgas marinas como bioestimulantes en la producción agrícola de Cuba. *Articulo*, 48(3), 92.
- Ashok Kumar, N., Vanlalzarzova, B., Sridhar, S., & Baluswami, M. (2012). *Effect of liquid seaweed fertilizer of Sargassum wightii grev. on the growth and biochemical content of green gram (Vigna radiata (L.) R. wilczek)*. 4(4), 40–45. <http://recent-science.com/>
- Augusto, A., Miranda, A., Crespo, D., Campos, M. J., Raimundo, D., Pedrosa, R., Mitchell, G., Niranjana, K., & Silva, S. F. J. (2022). Preservation of fresh-cut Rocha Pear using *Codium tomentosum* extract. *Lwt*, 155(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112938>
- Bahcevandziev, K. and Pereira, L. (2021). Seaweeds as plant fertilizer, agricultural biostimulants and animal fodder - a book presentation. *Acta Hort.* 1320, 405–412  
DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1320.54 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1320.54>

- Bahmani Jafarlou, M., Pilehvar, B., Modarresi, M., & Mohammadi, M. (2021). Performance of Algae Extracts Priming for Enhancing Seed Germination Indices and Salt Tolerance in *Calotropis procera* (Aiton) W.T. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 45(2), 493–502. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01071-x>
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Becker, A. & Silva, V. (2021). Tratamento de sementes de alface com bioestimulantes à base de algas. *Acta Biológica Catarinense*, 8(1), 11–17. <https://doi.org/10.21726/abc.v8i1.817>
- Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A. S., & Bourgoignon, N. (2014). Bioactive components from seaweeds: Cosmetic applications and future development. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00012-3>
- Benítez-García, I., Dueñas-Ledezma, A. K., Martínez-Montaña, E., Salazar-Leyva, J. A., Carrera, E., & Osuna Ruiz, I. (2020). Identification and quantification of plant growth regulators and antioxidant compounds in aqueous extracts of *Padina durvillaei* and *Ulva lactuca*. *Agronomy*, 10, 1–13.
- Bi, F., Iqbal, S., Arman, M., Ali, A., & Hassan, M. ul. (2011). Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of chickpea and maize plants. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(3), 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.10.003>
- Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., & Billen, G. (2009). Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970-2050. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(4). <https://doi.org/10.1029/2009GB003576>
- Cardoso. (2018). *Extração E Análise De Compostos Com Potencial Antibacteriano E Antifúngico Da Alga Vermelha Grateloupia Turuturu*. Universidade de Coimbra.
- Cardoso, P. (2019). Cultivo e utilização de macroalgas em alimentos funcionais para aquacultura [Faculdade de Ciências, Universidade do Porto]. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 31, Issues 1–4). <https://doi.org/10.1007/s00343-015-4332-2>
- Castellanos-Barriga, L. G., Santacruz-Ruvalcaba, F., Hernández-Carmona, G., Ramírez-Briones, E., & Hernández-Herrera, R. M. (2017). Effect of seaweed liquid extracts from *Ulva lactuca* on seedling growth of mung bean (*Vigna radiata*). *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2479–2488. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1082-x>

- Chanthini, K. M. P., Stanley-Raja, V., Thanigaivel, A., Karthi, S., Palanikani, R., Sundar, N. S., Sivanesh, H., Soranam, R., & Senthil-Nathan, S. (2019). Sustainable agronomic strategies for enhancing the yield and nutritional quality of wild tomato, *Solanum lycopersicum* (1) Var Cerasiforme Mill. *Agronomy*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy9060311>
- Cheng, H., Wang, W., Yang, M., & Zhou, Y. (2020). Could animal hormone regulate plant development? *Authorea*, *Doi: 10.22541/au.159665037.74367275*, 1–20.
- Chernane, H., Latique, S., Mansori, M., & Kaoua, M. el. (2015). *Salt stress tolerance and antioxidative mechanisms in wheat plants (Triticum durum L.) by seaweed extracts application*. 8(3), 36–44. <https://doi.org/10.9790/2380-08313644>
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2020). Microalgae: New Source of Plant Biostimulants. *Agronomy*, 10(9), 1–4. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091240>
- Correia, S. (2014). Fito-hormonas. *Casa Das Ciências, Fundação Calouste Gulbenkian*, 2 (1), 64.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371–393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- Crivelare, A., et al. (2021). Desenvolvimento de mudas de alface e rúcula tratadas com biofertilizante de extrato de algas. *Multidisciplinary Journal*, V8(N1), 1–10. <https://doi.org/10.37951/2358-260X.2021v8i1.5652>
- Crouch, I. J., & van Staden, J. (1993). Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*, 13(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/BF00207588>
- Devault, D. A., Pierre, R., Marfaing, H., Dolique, F., & Lopez, P. J. (2021). Sargassum contamination and consequences for downstream uses: a review. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 567–602. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02250-w>
- di Filippo-Herrera, D. A., Muñoz-Ochoa, M., Hernández-Herrera, R. M., & Hernández-Carmona, G. (2019). Biostimulant activity of individual and blended seaweed extracts on the germination and growth of the mung bean. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 2025–2037. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1680-2>
- Dick, J. A., & Dick, A. A. (2014). *Tomato Seed Disinfection with Chlorine*. <http://www.tomatosolutions.ca/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/tomdis.pdf>
- el Arroussi, H., Benhima, R., Elbaouchi, A., Sijilmassi, B., el Mernissi, N., Aafsar, A., Meftah-Kadmiri, I., Bendaou, N., & Smouni, A. (2018). *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato

- (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2929–2941. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1>
- el Boukhari, M. E. M., Barakate, M., Bouhia, Y., & Lyamlouli, K. (2020). Trends in seaweed extract based biostimulants: Manufacturing process and beneficial effect on soil-plant systems. *Plants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/plants9030359>
- Escamilla, D., Rosso, M. L., & Zhang, B. (2019). Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. *Food Science and Nutrition*, 7(10), 3194–3205. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1166>
- Fayzi, L., Dayan, M., Cherifi, O., Boufous, E. H., & Cherifi, K. (2020). Biostimulant effect of four moroccan seaweed extracts applied as seed treatment and foliar spray on maize. *Asian Journal of Plant Sciences*, 19(4), 419–428. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.419.428>
- Ferreira, A. B. G., Carneiro, M. A. do A., Fernandes, F. de O., & Soriano, E. M. (2021). Evaluation of ecosystem services provided by farmed and wild seaweeds. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(6), 499–511. <https://doi.org/10.6008/cbpc2179-6858.2021.006.0041>
- Filote, C., Santos, S. C. R., Popa, V. I., Botelho, C. M. S., & Volf, I. (2021). Biorefinery of marine macroalgae into high-tech bioproducts: a review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 19, Issue 2). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01124-4>
- Fonseca, J. A. (2016). Aplicação de Algas na Indústria Alimentar e Farmacêutica. *Faculdade de Ciências Da Saúde, Universidade Fernando Pessoa*.
- Freitas, M. v., Mouga, 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. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/jmse9060562>
- Gaspar, R., Pereira, L., & Neto, J. M. (2017). Intertidal zonation and latitudinal gradients on macroalgal assemblages: Species, functional groups and thallus morphology approaches. *Ecological Indicators*, 81(May), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.060>
- Ghaderiardakani, F., Collas, E., Damiano, D. K., Tagg, K., Graham, N. S., & Coates, J. C. (2019). Effects of green seaweed extract on *Arabidopsis* early development suggest roles for hormone signalling in plant responses to algal fertilisers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38093-2>
- Govinden-Soulange, J., & Levantard, M. (2008). Comparative studies of seed priming and pelleting on percentage and meantime to germination of seeds of

- tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of Agricultural Research*, 3(10), 725–731.
- Hallmann, A. (2019). *Grand Challenges in Algae Biotechnology* (Pabulo H. Rampelotto, Ed.). Grand Challenges in Biology and Biotechnology Armin. <http://www.springer.com/series/13485>
- Han, T., Shi, R., Qi, Z., & Huang, H. (2021). The overgrowth of epiphytic *Ulva prolifera* during seedling cultivation of *Sargassum hemiphyllum* can be mitigated by regulating nitrogen availability. *Aquaculture*, 543(May), 736930. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736930>
- Hector-Ardisana, E., Torres-Garcia, A., Fosado-Tellez, O., Penarrieta-Bravo, S., Solorzano-Bravo, J., Jarre-Mendoza, V., Medranda-Vera, F., & Montoya-Bazan, J. (2020). Influence of biostimulants on growth and yield of short cycle crops in Manabi, Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 41(4).
- Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M. A., Norrie, J., & Hernández-Carmona, G. (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 619–628. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0078-4>
- Hoyle, G. L., Steadman, K. J., Good, R. B., McIntosh, E. J., Galea, L. M. E., & Nicotra, A. B. (2015). Seed germination strategies: An evolutionary trajectory independent of vegetative functional traits. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00731>
- Hussein, M. H., Eltanahy, E., al Bakry, A. F., Elsafty, N., & Elshamy, M. M. (2021). Seaweed extracts as prospective plant growth biostimulant and salinity stress alleviator for *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Journal of Applied Phycology*, 33(2), 1273–1291. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02330-x>
- Ibrahim, W. M., Ali, R. M., Hemida, K. A., & Sayed, M. A. (2014). Role of *Ulva lactuca* Extract in Alleviation of Salinity Stress on Wheat Seedlings. *Hindawi*, 2014.
- Iqbal, S., Wang, X., Mubeen, I., Kamran, M., Kanwal, I., Díaz, G. A., Abbas, A., Parveen, A., Atiq, M. N., Alshaya, H., Zin El-Abedin, T. K., & Fahad, S. (2022). Phytohormones Trigger Drought Tolerance in Crop Plants: Outlook and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 12(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.799318>
- Jard, G., Marfaing, H., Carrère, H., Delgenes, J. P., Steyer, J. P., & Dumas, C. (2013). French Brittany macroalgae screening: Composition and methane potential for potential alternative sources of energy and products. *Bioresource Technology*, 144, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.114>

- Jung, K. A., Lim, S. R., Kim, Y., & Park, J. M. (2013). Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*, *135*, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.025>
- Kaya-Altop, E., Uysal, M. S., Haghnama, K., & Mennan, H. (2023). Environmental factors on seasonal germination of different weedy rice (*Oryza sativa* L.) biotypes. *Ciência Rural*, *53*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210728>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *28*(4), 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Kholssi, R. et al. (2022). Green Agriculture: a Review of the Application of Micro- and Macroalgae and Their Impact on Crop Production on Soil Quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00944-3>
- Kholssi, R., Lougraimzi, H., Grina, F., Lorentz, J. F., & Silva, I. (2022). Green Agriculture: a Review of the Application of Micro - and Macroalgae and Their Impact on Crop Production on Soil Quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00944-3>
- Kirchherr, J., Reike, D., & Hekkert, M. (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. *Resources, Conservation and Recycling*, *127*(April), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.09.005>
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Arakere, U. C., Chowdappa, S., & Ramachandrappa, N. S. (2020). Efficacy of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and Trichoderma strains in eliciting resistance against bacterial wilt in a tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *30*(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00303-3>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, *3*, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, *18*(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Lee, Z. H., Hirakawa, T., Yamaguchi, N., & Ito, T. (2019). The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem

- activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16).  
<https://doi.org/10.3390/ijms20164065>
- Leyva, R., Sánchez-Rodríguez, E., Ríos, J. J., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., Ruiz, J. M., & Blasco, B. (2011). Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. *Plant Science*, 181(2), 195–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.007>
- Lok, M., Benson, E., Gough, M., Ahlroth, S., Greenfield, O., Confino, J., and Wormgoor, W. (2018). *Natural capital for governments: why, what and how (DRAFT 1.0, 20 November 2018)*. <https://naturalcapitalcoalition.org/projects/government-dialogue-on-natural-capital/>
- Martinez, R. (2015). Potencial Bioestimulante do extrato aquoso de alga (*Sargassum cymosum* C. Agardh) em mudas de couve. In *Universidade de Brasília-Faculdade de agronomia e medicina veterinária* (Vol. 16, Issue 1994).  
[http://eprints.ums.ac.id/37501/6/BAB II.pdf](http://eprints.ums.ac.id/37501/6/BAB%20II.pdf)
- Martinho, Paula e Jacquinet, M. (2020). Economia do Desenvolvimento Sustentável. *CULTIVAR Cadernos de Análise e Prospetiva*, 60–65.  
<http://www.wook.pt/ficha/economia-do-desenvolvimento-sustentavel/a/id/2694891>
- Martins, C. (2019). *Avaliação de alguns métodos de extração de substâncias bioativas de macroalgas* [Universidade da Beira Interior].  
<http://hdl.handle.net/10400.6/9972>
- Meinita, M. D. N., Harwanto, D., & Choi, J. S. (2022). Seaweed Exhibits Therapeutic Properties against Chronic Diseases: An Overview. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(5), 2638. <https://doi.org/10.3390/app12052638>
- Melo, P., Abreu, C., Bahcevandziev, K., Araujo, G., & Pereira, L. (2020). Biostimulant effect of marine macroalgae bioextract on pepper grown in greenhouse. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(11).  
<https://doi.org/10.3390/app10114052>
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 581–591.  
<https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
- Mildenberger, J., Stangeland, J. K., & Rebours, C. (2022). Antioxidative activities, phenolic compounds and marine food allergens in the macroalgae *Saccharina latissima* produced in integrated multi-trophic aquaculture systems. *Aquaculture*, 546, 737386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737386>
- Moura, M. (2020). Análise Crítica da Aplicação das Macroalgas na Área Alimentar. *Instituto Superior de Engenharia Do Porto, Mestrado Em Engenharia Química*.

- Muhammad Mudassir Iqbal, Gulzar Muhammad, Muhammad Shahbaz Aslam, Muhammad Ajaz Hussain, Zahid Shafiq, H. R. (2021). Algal Biofertilizer. In and M. R. Inamuddin, Mohd Imran Ahamed, Rajender Boddula (Ed.), *Wiley Global Headquarters*. Scrivener Publishing, Wiley.
- 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>
- Mzibra, A., Aasfar, A., el Arroussi, H., Khouloud, M., Dhiba, D., Kadmiri, I. M., & Bamouh, A. (2018). Polysaccharides extracted from Moroccan seaweed: a promising source of tomato plant growth promoters. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2953–2962. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1421-6>
- Neto, A. P. D. A., Oliveira, G. R. F., Mello, S. da C., da Silva, M. S., Gomes-Junior, F. G., Novembre, A. D. da L. C., & Azevedo, R. A. (2020). Seed priming with seaweed extract mitigate heat stress in Spinach: Effect on germination, seedling growth and antioxidant capacity. *Bragantia*, 79(4), 377–386. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200127>
- Nunes, C. dos R., Arantes, M. B., de Faria Pereira, S. M., da Cruz, L. L., de Souza Passos, M., de Moraes, L. P., Vieira, I. J. C., & de Oliveira, D. B. (2020). Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163726>
- Øverland, M., Mydland, L. T., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9143>
- Pacheco, D., Cotas, J., Rocha, C. P., Araújo, G. S., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., Bahcevandziev, K., & Pereira, L. (2021). Seaweeds' carbohydrate polymers as plant growth promoters. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100097>
- Pardilhó, S., Costa, E., Melo, D., Machado, S., Espírito Santo, L., Oliveira, M. B., & Maia Dias, J. (2021). Comprehensive characterization of marine macroalgae waste and impact of oil extraction, focusing on the biomass recovery potential. *Algal Research*, 58(July). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102416>
- Pardilhó, S., Cotas, J., Pacheco, D., Bahcevandziev, K., Pereira, L., & Beatriz, M. (2022). Back to the Origins: Potential of Beach - Cast Macroalgae as Biofertilizer. *Waste and Biomass Valorization*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01922-7>

- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531(May 2020), 735888. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735888>
- Patel, K., Agarwal, P., & Agarwal, P. K. (2018). *Kappaphycus alvarezii* sap mitigates abiotic-induced stress in *Triticum durum* by modulating metabolic coordination and improves growth and yield. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2659–2673. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1423-4>
- Pereira, L. (2008). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. *Monografias*, 913, 1–19. <http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/1desafio/algas-marinhas-utilidades.pdf>
- PEREIRA, L. (2010). Extracção, Caracterização e Utilização das Carragenanas. In *Departamento de Botânica, Laboratório de Microscopia e Ficolofia, Universidade de Coimbra, ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/341056733>
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 1(1), 177–188. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1010017>
- Pudoli, I., Prasetyati, S. B., & Fadhlullah, M. (2022). Valorization of Seaweed *Gracilaria sp.* Biomass Waste into Liquid Organic Fertilizer: Assessment on Growth of Cayenne Pepper *Capsicum Frutescens L.* *Fisheries Product Processing Department, Karawang Polytechnic of Marine and Fisheries, Karawang, West Java 41314 Indonesia*, 11.
- Punitha, P., Priyadharshini, P., Nanthini Devi, K., Dinesh Kumar, S., Roopavathy, J., Begum, A., Santhanam, P., & Perumal, P. (2022). Effect of seaweed liquid extract as an organic biostimulant on the growth, fatty acids and high-value pigment production of *Vigna radiata*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03048-1>
- Rey, F., Cartaxana, P., Melo, T., Calado, R., Pereira, R., Abreu, H., Domingues, P., Cruz, S., & Rosário Domingues, M. (2020). Domesticated populations of *Codium tomentosum* display lipid extracts with lower seasonal shifts than conspecifics from the wild-relevance for biotechnological applications of this green seaweed. *Marine Drugs*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/md18040188>
- Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, 183, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057>

- Rohela, G. K., Shabnam, A. A., Shukla, P., Aurade, R., Gani, M., Yelugu, S., & Sharma, S. P. (2018). In vitro clonal propagation of PPR-1, a superior temperate mulberry variety. *Indian Journal of Biotechnology*, *17*(4), 619–625.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Plant Bioestimulants: Rationale, State of the art and evolution. *Frontiers in Plant Science*, *11*(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Saeed, K. S., Ahmed, S. A., Hassan, I. A., & Ahmed, P. H. (2015). Effect of biofertilizer and chemical fertilizer on growth and yield in cucumber (*Cucumis sativus*) in green house condition. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *18*(3), 129–134. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2015.129.134>
- Sandepogu, M., Shukla, P. S., Asiedu, S., Yurgel, S., & Prithiviraj, B. (2019). Combination of *Ascophyllum nodosum* extract and humic acid improve early growth and reduces post-harvest loss of lettuce and Spinach. *Agriculture (Switzerland)*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/agriculture9110240>
- Santos, N. H. S. dos, Silveira, A. C. D., Fernandes, V. de O., & Machado, L. P. (2021). Efeito do extrato de algas no desempenho germinativo e crescimento radicular em sementes de feijão BRS Estilo em resposta a diferentes métodos de aplicação. *Hoehnea*, *48*. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-100/2020>
- Santos, P. (2016). *Biotechnological Evaluation of Seaweeds As Bio-Fertilizer*. Universidade de Coimbra.
- Santos, S. A. O., Oliveira, C. S. D., Trindade, S. S., Abreu, M. H., Rocha, S. S. M., & Silvestre, A. J. D. (2016). Bioprospecting for lipophilic-like components of five Phaeophyta macroalgae from the Portuguese coast. *Journal of Applied Phycology*, *28*(5), 3151–3158. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0855-y>
- Schwechheimer, C. (2012). Gibberellin signaling in plants - The extended version. *Frontiers in Plant Science*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00107>
- Seng, M., & Cheong, E. J. (2020). Comparative study of various pretreatment on seed germination of *Dalbergia cochinchinensis*. *Forest Science and Technology*, *16*(2), 68–74. <https://doi.org/10.1080/21580103.2020.1758801>
- Shamya Arokia rajan, M., Thriunavukkarasu, R., Joseph, J., & Aruni, W. (2020). Effect of seaweed on seed germination and biochemical constituents of *Capsicum annum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*(August), 101761. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101761>
- Shao, Z., & Duan, D. (2022). The Cell Wall Polysaccharides Biosynthesis in Seaweeds: A Molecular Perspective. *Frontiers in Plant Science*, *13*(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.902823>
- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2014). Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts

- for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465–490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Shi, T. Q., Peng, H., Zeng, S. Y., Ji, R. Y., Shi, K., Huang, H., & Ji, X. J. (2017). Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Bioengineered*, 8(2), 124–128. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1212138>
- Silva, J. (2020). Metabolitos Secundários das Macroalgas Castanhas de Elevado Potencial para a Indústria Farmacêutica. *Faculdade Ciências Da Saúde, Universidade Fernando Pessoa*, 2507(2), 1–9.
- Silva, M. B. P., Silva, V. N., & Vieira, L. C. (2021). Biopriming of sweet pepper and tomato seeds with *Ascophyllum nodosum*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(1), 9423–9430. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n1.88240>
- Soad M. (2015). Utilization of Seaweed Extracts As Bio-Fertilizers To Stimulate the Growth of Wheat Seedlings. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*, 11(1), 31–39. <https://www.ejmanager.com/my/ejebz/>
- Stirk, W. A., Arthur, G. D., Lourens, A. F., Novák, O., Strnad, M., & van Staden, J. (2004). Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. *Journal of Applied Phycology*, 16(1), 31–39. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000019057.45363.f5>
- Sukriti, Kaith, B. S., & Jindal, R. (2017). Controlled biofertilizer release kinetics and moisture retention in gum xanthan-based IPN. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 26(8), 563–577. <https://doi.org/10.1007/s13726-017-0539-8>
- Sunarpi, H., Nikmatullah, A., Ambana, Y., Ilhami, B. T. K., Abidin, A. S., Ardiana, N., Kirana, I. A. P., Kurniawan, N. S. H., Rinaldi, R., Jihadi, A., & Prasedya, E. S. (2021). Phytohormone content in brown macroalgae *Sargassum* from Lombok coast, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 712(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/712/1/012042>
- Tarakhovskaya, E. R., Maslov, Y. I., & Shishova, M. F. (2007). Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(2), 163–170. <https://doi.org/10.1134/S1021443707020021>
- Ternus, F. L., Tortelli, B., Milanesi, P. M., & Silva, V. N. (2021). Efeito do extrato de *Ascophyllum nodosum* na germinação de sementes de couve em diferentes temperaturas. *Scientific Electronic Archives*, 14(5), 29–34. <https://doi.org/10.36560/14520211274>
- Torres, P., Santos, J. P., Chow, F., & dos Santos, D. Y. A. C. (2019). A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37(1), 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.009>

- Tsaniya, A. R., Dewi, E. N., & Anggo, A. D. (2021). Characteristics of liquid organic fertilizer from different composition types of seaweed between *Gracilaria sp.* And *Sargassum sp.* *Journal of Physics: Conference Series*, 1943(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1943/1/012071>
- Tuan, P. A., Kumar, R., Rehal, P. K., Toora, P. K., & Ayele, B. T. (2018). Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00668>
- van der Loos, L. M., Eriksson, B. K., & Falcão Salles, J. (2019). The Macroalgal Holobiont in a Changing Sea. *Trends in Microbiology*, 27(7), 635–650. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.002>
- van Oosten, M. J., Pepe, O., de Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Vasconcelos, A., & Chaves, L. (2020). Biostimulants and Their Role in Improving Plant Growth under Abiotic Stresses. *Biostimulants in Plant Science*, 1–14. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88829>
- Vinoth, S., Gurusaravanan, P., & Jayabalan, N. (2012). Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency in vitro mass propagation of *Lycopersicon esculentum L.* (tomato) through double cotyledonary nodal explant. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1329–1337. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9717-9>
- Wang, W. (1989). Toxicity assessment of the aquatic environment using phytoassay methods. In *Toxicity Assessment*. State Water Survey Division.
- Wang, W., Cai, L., Long, Z., Zhang, X., & Zhao, F. (2021). Effects of non-uniform salt stress on growth, yield, and quality of tomato. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(5), 545–556. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1966834>
- Wang, W. Q., Song, B. Y., Deng, Z. J., Wang, Y., Liu, S. J., Møller, I. M., & Song, S. Q. (2015). Proteomic analysis of lettuce seed germination and thermoinhibition by sampling of individual seeds at germination and removal of storage proteins by polyethylene glycol fractionation. *Plant Physiology*, 167(4), 1332–1350. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00045>
- Wójcik-Gront, E., Gozdowski, D., Derejko, A., & Pudelko, R. (2022). Analysis of the Impact of Environmental and Agronomic Variables on Agronomic Parameters in Soybean Cultivation Based on Long-Term Data. *Plants*, 11(21), 2922. <https://doi.org/10.3390/plants11212922>
- Wolny, E., Betekhtin, A., Rojek, M., Braszewska-Zalewska, A., Lusinska, J., & Hasterok, R. (2018). Germination and the early stages of seedling development

in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102916>

- Xu, L., Wu, C., Oelmüller, R., & Zhang, W. (2018). Role of phytohormones in piriformospora indica-induced growth promotion and stress tolerance in plants: More questions than answers. *Frontiers in Microbiology*, 9(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01646>
- Yildiz, M., & Ekiz, H. (2014). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) hypocotyl explants. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(7), 1161–1164. <https://doi.org/10.4141/CJPS2013-250>
- Zhang, X., Ervin, E. H., & Schmidt, R. E. (2003). Plant Growth Regulators Can Enhance the Recovery of Kentucky Bluegrass Sod from Heat Injury. *Crop Science*, 43(3), 952. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0952>
- Zou, P., Lu, X., Zhao, H., Yuan, Y., Meng, L., Zhang, C., & Li, Y. (2019). Polysaccharides derived from the brown algae *Lessonia nigrescens* enhance salt stress tolerance to wheat seedlings by enhancing the antioxidant system and modulating intracellular ion concentration. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00048>

## Anexos

Anexo A: Biomassa de *Codium tomentosum* e *Gracilaria gracilis*, durante a limpeza de organismos epífitos, outros organismos aderentes e detritos.



Anexo B: À esquerda, a biomassa de *Codium tomentosum* previamente seca transformada em pó fino e uniforme, à direita, a biomassa de *Gracilaria gracilis* após o processo de reidratação.

