

***O uso de extratos comerciais de macroalgas como bioestimulantes***

**Rute Sofia Oliveira Ramos**

2022

*O uso de extratos comerciais de macroalgas como bioestimulantes*

**Rute Sofia Oliveira Ramos**

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

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

2022



Title: The use of commercial macroalgae extracts as biostimulants

Copyright© Rute Sofia Oliveira Ramos

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

2022

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar and the Instituto Politécnico de Leiria have the right, perpetual and without geographical limits, to archive and publish this dissertation/project work/internship report through printed copies reproduced in paper or digital form, or by any other means known or to be invented, and spread through scientific repositories and admit your copying and distribution educational or research purposes, non-commercial purposes, provided that credit is given to the author and Publisher.

## *Agradecimentos*

Para a minha orientadora, Professora Teresa Mouga, um obrigada. Pela oportunidade, por confiar, por acreditar, por me ajudar e muito importante, por ouvir. Ouvir as queixas, os resmungos, as piadas e as “cenas”. Um dia quando falar do meu curso, a professora Teresa vai ser aquela professora que vou referir sempre como a professora que já com cabelos brancos (e muito respeito aos cabelos brancos), foi a professora que ficou para sempre na memória do que Peniche me trouxe, tão longe de casa. Comecei e terminei este ciclo consigo, desde o primeiro ano, como calouira, ao último, já quase mestre.

Para a minha coorientadora, Professora Clélia, um obrigada igualmente enorme. A Professora Clélia foi a culpada de eu ter pedido projeto a professora Teresa na licenciatura, depois de ter confessado numa aula sua que não sabia o que fazer. Hoje, depois do projeto, veio esta tese e a Professora, como grande culpada que foi, tinha de fazer parte dela. Vou para sempre lembrar-me da frase da professora, numa reunião de conselho. “É porque é a Rute”. Vou usá-la sempre que achar que não sou capaz. Eu sou, as vezes só preciso de 5 minutos.

Obrigada por tudo, do fundo do coração, as duas.

Para a Diana que tem uma semente nesta tese, depois de um projeto de licenciatura.

Por falar em sementes, um enorme obrigada a EuroSementes. Ao Senhor Fernando e ao Senhor António Cordeiro pela ajuda e a oferta. Eu prometi que faria um bom trabalho.

Para os meus colegas e amigos, sem exceções, porque como se diz nas frases cliché, eu não estaria aqui e não seria quem sou sem toda a adrenalina da montanha-russa. Para a Carolina que foi minha colega de trabalho e desespero. Para a Ana pelos cafezinhos. Para a Godinho pelos 5 anos.

Professoras e Marta, arranjei terapeuta por causa da tese. Não, estou a brincar. Eu sempre a tive. Faz 12 anos? És a minha “avec” favorita.

Para a Marta, que apesar de não ser nossa responsável, foi sempre atenciosa e pronta a ajudar. Com uma piada aqui e uma fofoca ali, e a Marta estava lá todos os dias a ter a certeza que

não desmaiávamos na sala de investigação e desistíamos de contar sementes. Marta, já sei calibrar a balança sozinha. Da tua miúda favorita.

Aos meus pais. Ao meu pai por ter aceitado a minha ida, a minha mãe por alimentar a minha cadela e ao meu irmão por cuidar da minha tartaruga. A verdade é que se entrasse noutra curso qualquer, eu não seria feliz. Sobreviveram todos até ao final do curso. Sobreviveu o pai, a mãe, a cadela, a tartaruga...

Um obrigada a todos sem esquecer aqueles que já não me viram, neste mundo, chegar aqui.

## ***Resumo***

As algas, do termo em latim “planta marinha”, conhecidas como macroalgas e microalgas, têm despertado nos últimos anos, um elevado interesse. Encontradas em água doce, salobra ou salgada, estes organismos contêm vitaminas, minerais, proteínas, entre outros compostos de interesse, com bioatividades importantes como antibacteriana, antifúngica ou bioestimulante, entre outras. Rhodophyta, Chlorophyta e Phaeophyceae são os 3 grandes grupos de macroalgas que se distinguem pelos seus pigmentos. Um dos interesses das macroalgas, relaciona-se com uso das mesmas enquanto bioestimulantes, efeito muitas vezes correlacionado com a presença de fito-hormonas vegetais na sua composição. As auxinas e citocininas são as mais vulgarmente conhecidas, no entanto, tantas outras têm a sua função e importância. Estas fito-hormonas são extraídas através de extratos aquosos, uma vez que são solúveis em água, sendo os extratos de elevado rendimento e eficiência, economicamente acessíveis e de fácil repetição. Extratos algais encontram-se em comercialização, como seja o Acadian™ Soluble Seaweed Extract Powder (SSEP), produzido pela empresa HortFertplus a partir da macroalga castanha *Ascophyllum nodosum*, ou o AgroGain, produzido pela empresa Sea6Energy, na Índia, com base na macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. A macroalga *A. nodosum* é comumente usada como bioestimulante, devido à presença de fito-hormonas como citocininas, ácido abscísico e giberelinas. Já a *K. alvarezii* possui maioritariamente auxinas, citocininas e giberelinas. As fito-hormonas, comprovadamente, aceleram a germinação das sementes, e ainda, aumentam a resistências das plantas a fatores de stress (particularmente o ácido abscísico). Outros componentes, como enzimas, naturalmente presentes, podem ter um impacto conjunto com as fito-hormonas. Assim, este trabalho visou testar a eficácia de dois extratos comerciais enquanto bioestimulantes em alface, *Lactuca sativa*, e tomate, *Solanum lycopersicum*. Foram realizados testes de germinação, de crescimento e testes de stress. Concluiu-se que os extrato algais em concentrações muito elevadas têm efeito inibitório. Para a germinação, a concentração mais adequada para alface e para tomate foi de 2%. Verificou-se também que diferentes metodologias têm impacto nos resultados dos ensaios desenvolvidos. Assim, sementes previamente embebidas no extrato têm melhores resultados relativamente à utilização do extrato incorporado no meio de cultivo, sendo que em tomate, registou-se maior taxa de germinação nas sementes embebidas e melhor estado fisiológico e sanitário. Finalmente, nos ensaios de stress salino apenas se obtiveram resultados positivos para

uma concentração de 5%. Os extratos utilizados demonstraram melhorar as taxas de germinações apenas em sementes de alface. Futuramente, o aumento do número de amostras e de testes com intervalos mais específicos, como o intervalo 5% - 15 %, são a considerar. Já a temperatura de germinação de 35°C foi muito prejudicial para o tomate, não se tendo obtido qualquer germinação, enquanto para a alface, esta rondou apenas os 60%.

A análise química elementar das plantas testadas, seriam novos elementos a considerar para obtenção de resultados mais completos.

**Palavras-chave:** Macroalgas, bioestimulante, extrato algal comercial, germinação, crescimento, alface, tomate.

## ***Abstract***

Algae, from the Latin term "sea plant", known as macroalgae and microalgae, have aroused high interest in recent years. Found in fresh, brackish, or salt water, these organisms contain vitamins, minerals, and proteins, among other compounds of interest, with important bioactivities such as antibacterial, antifungal, or biostimulant, among others. Rhodophyta, Chlorophyta and Phaeophyceae are the 3 major groups of macroalgae that are distinguished by their pigments. One of the interests in macroalgae is related to their use as biostimulants, an effect often correlated with the presence of plant phytohormones in their composition. Auxins and cytokinins are the most known, however, many others have their function and importance. These phytohormones are extracted through aqueous extracts, since they are water soluble, and the extracts are high yielding, efficient, economically accessible, and easily repeatable. Algae extracts are commercially available, such as the Acadian™ Soluble Seaweed Extract Powder (SSEP), produced by HortFertplus from the brown macroalgae *Ascophyllum nodosum*, or AgroGain, produced by Sea6Energy in India, based on the red macroalgae *Kappaphycus alvarezii*. The macroalga *A. nodosum* is commonly used as a biostimulant, due to the presence of phytohormones such as cytokinins, abscisic acid, and gibberellins. *K. alvarezii* has mainly auxins, cytokinins, and gibberellins. The phytohormones have been shown to accelerate seed germination, and to increase the plants' resistance to stress factors (particularly abscisic acid). Other naturally occurring components or enzymes may have a joint impact with phytohormones. Thus, this work aimed to test the effectiveness of the two commercial extracts as biostimulants on lettuce, *Lactuca sativa*, and tomato, *Lycopersicon esculentum*. Germination tests, growth tests, and stress tests were performed. It was concluded that algal extracts at very high concentrations have an inhibitory effect. For germination, the most suitable concentration for lettuce and for tomato was 2%. It was also found that different methodologies have an impact on the results of the tests developed. Thus, seeds previously soaked in the extract have better results when compared to the use of the extract incorporated in the growing medium, and in tomato, there was a higher germination rate in soaked seeds and better physiological and health status. Finally, in the stress tests, salinity was found to be positive only at a concentration of 5‰. The extracts used were shown to improve germination rates, only for lettuce seeds. In the future, increasing the number of samples, tests with more specific ranges, such as the range 5‰ - 15 ‰, are to be considered. The germination temperature of 35°C,

on the other hand, was very detrimental for tomatoes, obtaining no germination, while for lettuce, it was only around 60%.

The elemental chemical analysis of the tested plants would be new elements to consider in order to obtain more complete results.

**Keywords:** Macroalgae, biostimulant, commercial algal extract, germination, growth, lettuce, tomato

## *Índice*

Introdução .....	1
I. Bioestimulante e biofertilizante.....	4
II. Extratos algais como bioestimulantes .....	7
III. Extratos algais comerciais .....	8
IV. <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	9
V. <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	12
Objetivo .....	15
Materiais e métodos.....	16
I. Preparação inicial.....	19
II. Bioensaio para teste de germinação: determinação da concentração ótima de extrato algal.....	20
III. Bioensaio para testes de contaminação: Otimização do método de assepsia .....	21
IV. Bioensaio para teste das 3 concentrações de extrato algal em tomate .....	23
V. Bioensaio para teste de crescimento e estado fisiológico.....	24
VI. Bioensaio para testes de stress: salinidade e calor .....	26
VII. Análise estatística .....	28
Resultados e Discussão.....	29
I. Bioensaio para teste de germinação: Otimização da concentração ótima de extrato algal.....	29
II. Bioensaio para testes de contaminação: Otimização das condições de assepsia .....	31
a) Percentagem de germinação das sementes de alface .....	31
b) Comprimento das radículas das plântulas de alface .....	32
c) Peso fresco das plântulas de alface.....	33
d) Percentagem de germinação das sementes de tomate.....	35

e)	Comprimento dos caulículos e das radículas de tomate .....	36
f)	Peso fresco do tomate .....	37
g)	Teor de Humidade .....	37
III.	Bioensaio para teste de crescimento e estado fisiológico.....	39
a)	Percentagem de germinação.....	39
b)	Comprimento do caulículo.....	40
c)	Medição de radículas .....	41
d)	Peso fresco do tomate .....	42
e)	Teor de humidade do tomate.....	43
IV.	Bioensaio para testes de stress: salinidade e calor .....	48
a)	Percentagem de germinação de tomate.....	48
b)	Comprimento das radículas de alface .....	50
c)	Medição de caulículos e radículas de tomate.....	51
d)	Peso fresco.....	53
e)	Teor de Humidade .....	55
f)	Percentagem de germinação de alface a 35°C.....	56
g)	Comprimento das radículas de alface .....	57
h)	Peso fresco da alface.....	58
i)	Teor de Humidade .....	58
	Conclusões .....	64
	Perspetivas futuras.....	66
	Bibliografia .....	68
	Anexos .....	76

## *Índice de figuras*

Figura 1: <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	10
Figura 2: Distribuição de <i>Ascophyllum nodosum</i> no oceano Atlântico (Pires, 2019). SST-temperatura da superfície da água do mar. ....	11
Figura 3: Macroalga <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	12
Figura 4: Distribuição global de <i>K. alvarezii</i> (Aquamaps, 2019) .....	13
Figura 5: Extratos usados ao longo dos bioensaios, sendo SSEP em pó e extrato AgroGain, respetivamente.....	19
Figura 6: Sementes de alface, à esquerda, e tomate, a direita, usadas ao longo dos bioensaios....	20
Figura 7: Percentagem de germinação de sementes de alface obtida para o extrato AgroGain nas concentrações 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 6%, 7%, 9% e 100% (A) e no extrato SSEP nas concentrações 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% e 5% (B) ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média ± desvio padrão (n=3). ....	29
Figura 8: Percentagem de germinação de sementes de alface obtida para sementes de alface não desinfetadas ou desinfetadas, com 4 tipos de meio MS. CT- controlo, MS+N Est - meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est - meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut - meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média ± desvio padrão (n=2). ....	32
Figura 9: Média ± desvio padrão do comprimento das radículas de alfices, para sementes desinfetadas e não desinfetadas, em 4 tipos de meio MS: CT- controlo, MS+N Est – meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est – meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut – meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média ± desvio padrão (n=2). ....	33
Figura 10: Média ± desvio padrão dos valores referentes ao peso fresco de alfices, para as sementes desinfetadas e não desinfetadas, com 4 tipos de meio MS: CT- controlo, MS+N Est - meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est - meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut - meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média ± desvio padrão (n=2). ....	34
Figura 11: Percentagem de germinação de sementes de tomate obtida para os diferentes métodos de esterilização do meio: CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, AUT-	

meio MS com extrato algal, autoclavado. Os dados foram recolhidos ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	35
Figura 12: Média do comprimento dos caulículos de tomate (A) nos diferentes métodos de esterilização do meio. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05) e média do comprimento radículas (B) de tomate, nos diferentes métodos de esterilização do meio. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Para ambos, CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão. (n=3).....	36
Figura 13: Peso fresco das plântulas de tomate, com diferentes métodos de esterilização do meio, sendo CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05) quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo (n=3).....	37
Figura 14: Teor de humidade, obtida para o tomate, nos diferentes métodos de esterilização do meio, sendo CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS autoclavado após adição de extrato algal, realizada ao final de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão. (n=3).....	38
Figura 15: Percentagem de germinação de sementes de tomate para as concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B) adicionado no meio MS, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	40
Figura 16: Comprimento dos caulículos de tomate, para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	41
Figura 17: Comprimento das radículas de tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value < 0,05), quando em	

comparação com o respetivo tratamento de controlo. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	42
Figura 18: Peso fresco do tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas (p-value<0,05), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	42
Figura 19: Percentagem de teor de humidade obtida para o tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	43
Figura 20: Percentagem de germinação de sementes de tomate para as concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B) embebidas na semente, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	44
Figura 21: Diferenças do crescimento e desenvolvimento da planta para a concentração 2% no extrato AgroGain para os 3 ensaios realizados, ao fim de 7 dias.....	46
Figura 22: Diferenças do crescimento e desenvolvimento da planta para a concentração 2% no extrato SSEP para os 3 ensaios realizados, ao fim de 7 dias. ....	47
Figura 23: Percentagem de germinação para as sementes de tomate com extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e sementes de alface para o extrato AgroGain (C) e SSEP (D), para as concentrações CT- controlo, 5‰ – solução salina de 5‰, ao longo de 7 e 5 dias respetivamente. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6). ....	48
Figura 24: Comprimento das radículas da alface, para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 5‰ – solução salina 5‰, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6).....	51
Figura 25: Comprimento dos caulículos (A) e da radícula (B), em plântulas de tomate, para o extrato AgroGain e comprimento dos caulículos (C) e da radícula (D) para SSEP nas concentrações CT- controlo, 5‰ – solução salina 5‰. Análises realizadas após 7 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6). ....	52
Figura 26: Peso fresco para plântulas alface, com extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e plântulas de tomate para o extrato AgroGain (C) e SSEP (D), para as concentrações CT- controlo, 5‰ – solução	

salina de 5‰, ao longo de 5 e 7 dias respetivamente. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6).....	54
Figura 27: Teor de humidade obtida, para a alface com o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e o tomate com o extrato AgroGain (C) e SSEP (D) nas concentrações CT- controlo, 5‰ – solução salina 5‰, realizada ao final de 5 e 7 dias, respetivamente. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6).....	55
Figura 28: Média $\pm$ desvio padrão da percentagem de germinação (%) de sementes de alface, para as concentrações: CT- controlo e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B), ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6). ....	56
Figura 29: Média $\pm$ desvio padrão do comprimento das radículas da alface, para plântulas em extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações: CT- controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6).....	57
Figura 30: Média do peso fresco da alface para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6). ....	58
Figura 31: Teor de humidade da alface para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações: CT- controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média $\pm$ desvio padrão (n=6).....	59

## *Índice de tabelas*

Tabela I: Tipo de fito-hormonas presentes nos 3 principais grupos de macroalgas, segundo (Tarakhovskaya et al., 2007).....	7
Tabela II : Metodologias gerais usadas ao longo do estudo .....	16
Tabela III: Descrição da preparação de 3 meios MS.....	22
Tabela IV: Preparação de dois bioensaios para teste de crescimento .....	25
Tabela V: Bioensaio para testes de stress .....	27
Tabela VI Exemplos de benefícios do extrato de <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	76
Tabela VII Taxonomia da <i>Lactuca sativa</i> .....	77
Tabela VIII Taxonomia de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	78

## *Lista de abreviaturas*

% - Percentagem

‰ – Permilagem

ABA – Ácido abcísico

APX – Ascorbato peroxidase

CAT - Catalase

CC – Comprimento do caulículo

Cl<sup>-</sup> - Cloreto

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CR – Comprimento da radícula

CT – Controlo

g – Gramas

h – Horas

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peroxido de hidrogénio

IV – Índice de vigor

MS – Meio Murashige e Skoog

MS+Aut - Meio Murashige e Skoog com extrato algal autoclado em conjunto

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

MS+N Est – Meio Murashige e Skoog com extrato algal adicionado posteriormente sem esterilização

Na<sup>+</sup> - Sódio

O<sub>2</sub> - Dioxigénio

°C – Graus Celcius

PG – Percentagem de germinação

SSEP – Acadian™ Soluble Seaweed Extract Powder

## ***Introdução***

O oceano, um local com enorme variedade de organismos, ocupa cerca de 77% do planeta Terra. Nele encontram-se produtores primários que tal como outros, produzem metabolitos secundários e são fonte de nutrientes, com inúmeros interesses para a investigação sobre novos compostos bioativos (Cardoso, 2018).

As algas, do termo em latim “planta marinha” (Cardoso, 2018), têm adquirido nos últimos anos um elevado interesse económico. São um grupo com cerca de 52 000 espécies contabilizadas na plataforma AlgaeBase, sendo elas subdivididas em microalgas ou macroalgas. Esta distinção é feita tendo em conta o seu tamanho, sendo as microalgas microscópicas (unicelulares ou multicelulares), e a macroalgas macroscópicas. São organismos foto-autotróficos, que constituem a base das cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos, e que podem ser encontradas em água doce, salobra ou salgada, apresentando elevados conteúdos de vitaminas, ácidos gordos polinsaturados (Ullmann & Grimm, 2021), minerais, proteínas e fibras, e baixo teor em lípidos saturados (Cardoso, 2018). Para além disso, existe uma grande diversidade de bioatividades associada à presença destes compostos, como sejam as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória ou bioestimulante, entre outras (Cardoso, 2018). Além da produção de matéria primária, através da luz solar, dióxido de carbono e água (Lee, 2018), as algas são essenciais para a absorção de nutrientes, servem de habitat para vários organismos marinhos e protegem o substrato da força das ondas devido a sua fixação no mesmo (Araújo et al., 2021). Assim, as macroalgas são um elemento importante no ecossistema marinho uma vez que além de servirem de habitat, e ainda fonte de alimento, para diversos organismos, desde larvas até animais adultos, são produtoras de oxigénio, consumidoras de dióxido de carbono, reduzem a acidificação dos oceanos, entre outros importantes serviços ecossistémicos (Viana et al., 2021).

As macroalgas dividem-se em 3 grandes grupos, sendo eles as Rhodophyta ou algas vermelhas, Chlorophyta ou algas verdes e as Ochrophyta (Phaeophyceae) ou algas castanhas. As Rhodophyta são o grupo de macroalgas mais abundante no ecossistema marinho, com cerca de 7500 espécies, e que são abundantemente encontradas em regiões temperadas e tropicais. Consoante a temperatura da água onde se encontram, as algas vermelhas podem ser mais carnudas,

em zonas frias, ou pequenas e filamentosas, em zonas tropicais e são, dos 3 grupos, as algas que têm maior capacidade de viver em profundidade. Chlorophyta é um grupo que possui clorofilas *a* e *b*, com cerca de 7 500 espécies. Trata-se de algas encontradas principalmente em água doce, cerca de 90%, sendo apenas 10% marinhas. Na sua localização em ambiente marinho, as algas verdes encontradas em zonas frias do hemisfério norte ou hemisfério sul, são diferentes, já em zonas tropicais, as espécies tendem a ser idênticas. Por fim, as Phaeophyceae exibem cor castanha devido a grande quantidade de fucoxantina que possuem nos seus cloroplastos, e existem cerca de 2100 espécies. Possuem também clorofilas *a*, *c*<sub>1</sub> e *c*<sub>2</sub>. A maioria das espécies existentes são de água salgada, havendo apenas 4 de água doce, no entanto, existem algumas espécies de água salobra que muitas vezes são uma parte importante da flora, nas zonas de sapal. Quando em água salobra, as algas perdem a capacidade de reprodução sexuada, propagando-se apenas por reprodução vegetativa. São algas encontradas, em maioria, em zonas frias, principalmente no hemisfério norte (Lee, 2018).

Até 2021, os 3 maiores produtores de macroalgas da Europa (Araújo et al., 2021) eram a França, a Espanha e a Irlanda. As espécies mais usadas na Europa, cultivadas ou selvagens, são a *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Gelidium corneum*. As principais utilizações prendem-se com a alimentação, incluindo a extração de alginatos e agar, mas também na indústria farmacêutica, na biomedicina, e diversas outras aplicações biotecnológicas (Araújo et al., 2021). Das espécies mais cultivadas a nível mundial, as Rhodophyta representam 60% da quantidade total (Rudke et al., 2020). A produção de algas através de sistemas de aquacultura é considerada uma produção sustentável, particularmente pelo consumo de CO<sub>2</sub> associado a estes cultivos, estima-se um valor aproximado de captação de 20 toneladas de CO<sub>2</sub> por cada hectare, no espaço de um ano. As algas são cultivadas em água salgada, pelo que não existe competição por terrenos agrícolas, nem consumo de água doce, um recurso cada vez mais escasso (Rudke et al., 2020). Estima-se que cerca de 47% da produção de macroalgas se destine a alimentação humana, sobretudo destinada à extração de ficocolóides (Ullmann & Grimm, 2021). Em 2016, apenas 0,57% das macroalgas produzidas no mundo, foram cultivadas na Europa (Araújo et al., 2021).

Enquadrada no conceito de economia circular, uma das técnicas recentes desenvolvida para produzir macroalgas, é a aquacultura multitrófica integrada, ou *Integrated multi-trophic aquaculture* (IMTA). O sistema IMTA apresenta vantagens para as algas em cultivo, para os restantes organismos heterotróficos envolvidos, habitualmente peixes e organismos filtradores, e para o meio ambiente (Fossberg et al., 2018). Nesta perspetiva, uma das grandes vantagens do cultivo de macroalgas é a possibilidade de estas beneficiarem do reaproveitamento de resíduos orgânicos dissolvidos em águas contaminadas. A biomassa produzida é posteriormente usada para extração de compostos ou então, dependendo do tipo de produção e extração efetuada, a biomassa pode ser usada para ração animal (quer sejam peixes, bovinos, ovinos, aves ou outros). No que toca a ração para peixes, as macroalgas quando adicionadas as rações, aumentam o crescimento e desempenho dos peixes e ainda são capazes de melhorar a resistência a bactérias que são encontradas frequentemente em aquaculturas (Passos et al., 2021). Nos bovinos e ovinos, as macroalgas permitem a redução da produção de metano por estes animais (Morais et al., 2020; Vijn et al., 2020). Por fim, nas aves, a adição de macroalga na ração auxilia a maturação do sistema imunitário (Morais et al., 2020). Importante também será associar o conceito de biorefinaria, permitindo que se usem todos os compostos e biomassa da alga, de uma forma economicamente viável e com zero desperdício (Torres et al., 2019). Além das rações, outras aplicações têm vindo a ser estudadas, tendo sido encontradas novas aplicações na biorremediação, biomonitorização, e produção de biocombustíveis e biopolímeros (Araújo et al., 2021).

Para além de todas as suas aplicações, as macroalgas podem também apresentar um potencial elevado como bioestimulantes e estão a ser redescobertas enquanto biofertilizante (Araújo et al., 2021), tema sobre o qual se debruça este estudo. Recentemente o investimento e estudos sobre produtos à base de algas tem aumentado, por serem substâncias naturais, eficientes e de baixo risco, tanto para a saúde humana e animal, como para o ambiente (Cardoso, 2018).

## I. Bioestimulante e biofertilizante

Os bioestimulantes e biofertilizantes visam a substituição dos compostos químicos usados na agricultura, como fertilizantes. Na atualidade, é possível observar os efeitos negativos das alterações climáticas, como a desertificação, o aumento dos níveis de dióxido de carbono, o aumento da temperatura, a salinização dos solos e o desequilíbrio dos nutrientes (Shukla et al., 2019), de forma cada vez mais marcada. Todos os efeitos negativos indicados anteriormente têm efeitos nefastos na produção e rendimento agrícola, causando redução do crescimento, do desenvolvimento, da produtividade e da qualidade das plantas. Para além disso, as alterações climáticas aumentam a suscetibilidade da planta a patógenos (Shukla et al., 2019). Stresses abióticos como a seca, frio ou calor, originados pelas alterações climáticas, levam à desorganização das membranas celulares, diminuição da atividade fotossintética, desequilíbrio da homeostase e distúrbios na absorção de nutrientes, reduzindo assim a capacidade de defesa e aumentando, consequentemente, a suscetibilidade das plantas a doenças (Agarwal et al., 2021). As algas, enquanto bioestimulantes vêm melhorar a nutrição da planta, a tolerância aos stresses abióticos e bióticos, e melhorar a qualidade das culturas, através da regulação dos sistemas de defesa das plantas e aumento da microflora benéfica no solo (Agarwal et al., 2021). No que toca aos stresses bióticos como fungos e bactérias, provou-se que o uso de extratos algais enquanto bioestimulantes aumenta a expressão de genes associados a mecanismos de defesa da planta. Essa defesa é realizada pela ativação de genes específicos, com recurso a hormonas, metabolitos, proteínas e enzimas (Agarwal et al., 2021).

Segundo o Decreto-Lei nº 103/2015, um biofertilizante é o produto onde o princípio ativo são microrganismos vivos. Estes microrganismos não podem ser patogénicos para o homem, para os animais, nem para as plantas, e favorecem a nutrição e o desenvolvimento das plantas sem afetar a biodiversidade do solo (excluindo biofertilizantes usado como agentes de controlo biológico, biofungicidas, bionematicidas e bioinsecticidas). Por outro lado, um bioestimulante, segundo o Regulamento (EU) 2019/1009 do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu, é composto por um conjunto de microrganismos, substâncias ou misturas que não fornecem nutrientes, no entanto, estimulam os processos de nutrição da planta. Nesta definição enquadram-se os extratos algais.

Assim, a grande diferença, é que o primeiro interfere na nutrição das plantas e o segundo interfere com outros mecanismos fisiológicos que não a nutrição.

O efeito bioestimulante é proporcionado pela presença das fito-hormonas, sendo as mais comuns, as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, mas também o ácido jasmônico e o ácido salicílico. Estas são responsáveis pelos processos fisiológicos, incluindo a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas, a produção de metabolitos e a adaptação a situações de stress. Possuem um baixo peso molecular e são produzidas em pequena quantidade (Shukla et al., 2019), tendo efeitos de regulação.

As auxinas é uma fito-hormona de crescimento e, portanto, como o nome indica, auxilia o crescimento da planta e, tratando-se de uma planta com fruto, acelera o amadurecimento e previne a queda prematura do fruto. Em baixas concentrações trata-se de uma hormona benéfica, mas quando em altas concentrações poderá ser usada como herbicida, uma vez que se torna prejudicial (Tan et al., 2021). Estes herbicidas afetam o metabolismo de ácidos nucleicos e a plasticidade da parede celular, desregulando a produção de outras hormonas. As auxinas, é encontrada no ambiente marinho em macroalgas, diatomáceas, cianobactérias, microalgas, entre outros. Em plantas, as auxinas circulam na planta, sendo conhecidas pelo seu potencial para estimular o enraizamento adventício (Smith, 2010). As citocininas, por sua vez, desempenham um papel importante na divisão celular, diferenciação, morfogénese e podem ser encontradas nas raízes, folhas mais jovens e em sementes em desenvolvimento (Tarakhovskaya et al., 2007). São responsáveis pelo crescimento de rizoides e talos, desenvolvimento de cloroplastos, regulação da atividade fotossintética, produção de metabólitos e aumento da tolerância ao stress (Tan et al., 2021). As citocininas se forem aplicadas na fase de crescimento vegetativo, aceleram o crescimento das plantas. Se forem aplicadas antes da floração, melhoram a produção de frutos e flores (Smith, 2010). As fito-hormonas auxinas e citocininas, quando combinadas, poderão entre outros, resultar numa melhor produção de massa radicular. Uma maior área de raiz melhora a absorção de água e minerais proporcionando uma planta mais saudável e mais resistente (Smith, 2010). As giberelinas controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta, como a germinação das sementes, o alongamento do caule, a floração e o desenvolvimento dos frutos (Bhattacharya, 2019). Nas algas, as giberelinas estão associadas a ativação da divisão celular, aumento das taxas metabólicas e a

acumulação de pigmentos (Tan et al., 2021). O ácido abscísico (ABA) é um dos ácidos presentes, enquanto fito-hormona, e fornece maioritariamente proteção contra fatores externos (Thomas et al., 2016), através do estímulo de respostas fisiológicas que permitem combater o stress, como por exemplo, o fecho dos estomas (Tan et al., 2021). Influência, ainda, aspetos do crescimento e desenvolvimento da planta, e intervém na resposta ao stress (Thomas et al., 2016), como referido anteriormente. Por outro lado, o ácido jasmónico é responsável pelos processos de defesa da planta como ataques de agentes patogénicos e de stress (Gary Loake, Priya Ayyar, 2017) através da estimulação de sinais, que permitem o desenvolvimento de mecanismos de resposta (Raza et al., 2021) a herbivoria, pela senescência foliar (Raza et al., 2021). Para além disso, contribui para o desenvolvimento da planta (Gary Loake, Priya Ayyar, 2017), através da acumulação de açúcares solúveis, do crescimento de raízes e rebentos, melhoria da fixação de carbono e da defesa antioxidante (Raza et al., 2021). Finalmente, o ácido salicílico contribui para a resistência a agentes patogénicos (Ding & Ding, 2020), através da junção do mesmo, com o ácido jasmónico e o etileno. A ação conjunta destas fito-hormonas desenvolve uma resposta de defesa eficaz (Agarwal et al., 2021).

Além das fitohormonas os extratos algais possuem na sua composição outras substâncias bioactivas que promovem o crescimento e desenvolvimento da planta. Trata-se de polissacáridos, ácidos gordos, minerais, aminoácidos, proteínas, lípidos, vitaminas, entre outras, todas elas biologicamente ativas. Todas estas substâncias poderão encontrar-se ou não, em diferentes espécies de alga, tendo ainda em consideração que para cada espécie, as concentrações obtidas e a estrutura química de cada substância, pode ser diferente, dependendo, ainda, do método de extração e da época do ano. Estima-se que cerca de 76% do peso seco das algas são polissacáridos onde se inclui fucoídano, laminarina e alginatos (Ali et al., 2021). Estes compostos são, reconhecidamente, bioestimulantes.

Nas macroalgas marinhas, através de uma extração aquosa, é possível obter substâncias bioestimulantes, como as fito-hormonas. Apesar de existirem hormonas, como as citocininas, que está presente nos 3 grandes grupos de macroalgas, algumas fito-hormonas são características de um determinado grupo. Na tabela I podemos observar as fito-hormonas encontradas, de uma forma geral, nos grupos Chlorophyta, Phaeophyceae e Rhodophyta. Apesar de serem as principais

encontradas, poderá haver, em algas específicas, fito-hormonas diferentes. Na sua maioria, as fito-hormonas encontradas nas macroalgas têm uma atividade biológica semelhante à das plantas terrestres (Tarakhovskaya et al., 2007).

Tabela I: Tipo de fito-hormonas presentes nos 3 principais grupos de macroalgas, segundo (Tarakhovskaya et al., 2007)

<b>Grupo</b>	<b>Fito-hormonas</b>
<b>Chlorophyta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auxinas</li> <li>• Citocininas</li> <li>• Giberelinas</li> <li>• Ácido abcísico</li> <li>• Ácido jasmónico</li> </ul>
<b>Phaeophyceae</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auxinas</li> <li>• Citocininas</li> <li>• Giberelinas</li> <li>• Ácido abcísico</li> </ul>
<b>Rhodophyta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auxinas</li> <li>• Citocininas</li> <li>• Ácido jasmónico</li> </ul>

Assim, consoante o grupo onde a macroalga de interesse esteja integrada, as fito-hormonas obtidas são diferentes. É ainda de referir que poderá haver benefício na junção de diferentes extratos, provenientes de espécies diferentes, e em diferentes concentrações, sendo necessário perceber qual a fase de crescimento das plantas, mais adequada para a aplicações destes extratos (Battacharyya et al., 2015).

## II. Extratos algais como bioestimulantes

De entre os bioestimulantes que têm vindo a ser estudados nos últimos anos, destacam-se os extratos brutos de macroalgas. Os extratos algais podem ser obtidos por diferentes processos, tendo em conta o objetivo final do uso dos mesmos. Estes extratos poderão ser obtidos através de

extração aquosa, etanólica ou com outros solventes orgânicos, por ultrassons, micro-ondas, entre outros métodos químicos ou físicos, sendo as extrações aquosas e etanólicas mais baratas e mais ecológicas (Rudke et al., 2020). O extrato etanólico tem por base a extração de compostos da alga, solúveis em álcool, sendo obtidos extratos ricos em compostos polares como taninos, alcaloides e lípidos (Cardoso, I 2018). Os extratos aquosos são obtidos maioritariamente pelo conjunto de água e alga seca, obtendo-se um extrato rico em compostos hidrossolúveis. Após hidratação da alga, a biomassa é separada por métodos de filtração. A biomassa remanescente pode, então, ser reaproveitada para outros processos, numa perspetiva da biorefinaria. O extrato aquoso obtido é rico em fito-hormonas, como mencionado anteriormente, já que estas são, genericamente, solúveis em água (Shukla et al., 2019). Os extratos aquosos permitem, ainda, um rendimento mais elevado do que os extratos etanólicos, sendo, por isso, usados habitualmente neste contexto. É possível, para maior eficiência e rendimento, combinar vários métodos (Shukla et al., 2019), no entanto, para o presente estudo, foi escolhido o extrato aquoso uma vez que se trata de um solvente verde, eficiente para extração dos compostos de interesse enquanto bioestimulante, com elevado rendimento, economicamente acessível e de fácil repetição e aumento de escala, não exigindo equipamentos específicos para a realização do método.

### III. Extratos algais comerciais

Existem no mercado nacional e internacional vários bioestimulantes desenvolvidos com base em macroalgas marinhas. O presente trabalho desenvolveu trabalho de investigação sobre dois desses bioestimulantes, recentemente colocados no mercado. O Acadian™ Soluble Seaweed Extract Powder (SSEP) é produzido a partir da macroalga castanha *Ascophyllum nodosum*. Trata-se de uma alga com elevados níveis de potássio, e outros minerais, bem como com elevadas concentrações de promotores naturais de crescimento, como as citocininas e os aminoácidos, sendo assim uma das algas mais completas, em termos de efeito como biestimulante. O *A. nodosum*, usada para a produção deste pó comercial, foi recolhida no Canadá (HortFertplus, 2017). Segundo a HortFertplus, produtor de SSEP, este produto tem a capacidade de melhorar as culturas, reduzir os problemas causados por várias doenças, aumentar a resistência da planta ao stress ambiental

(como a ausência de água ou o frio) e, portanto, melhorar a saúde e produtividade das culturas, aumentando os rendimentos e qualidades das culturas. Quando em aplicação foliar induz uma resposta sistêmica natural de resistência, que permite uma maior qualidade da folhagem, aumentando a produtividade e o rendimento, potenciando a capacidade fotossintética das plantas, melhorando o seu crescimento e até o seu aspeto, aumenta a capacidade de absorção dos nutrientes na folhagem e quando aplicado em conjunto com fungicidas e inseticidas, tem efeito sinérgico (HortFertplus, 2017).

O segundo bioestimulante testado foi o AgroGain, produzido pela empresa Sea6Energy na Índia, com base na macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, e que visa melhorar o rendimento e qualidade dos produtos através do aumento da atividade fotossintética, do aumento da absorção de nutrientes e estímulo do metabolismo da planta. Este produto é vendido em formato líquido, pó ou granulado, sendo que neste trabalho foi testada a versão líquida. A empresa Sea6Energy salienta vários aspetos do produto como seja, o acelerar da multiplicação e do alongamento celular, potenciando assim o crescimento vegetativo, aumentando a concentração em polifenóis e aminoácidos, uniformizando o tamanho dos rebentos e aumentando o nível de fito-hormonas. Melhora, ainda, o funcionamento das plantas e o seu estado fisiológico geral através da regulação da utilização de carbono e azoto, e aumenta a eficiência fotossintética, permitindo assim incrementar os rendimentos da planta sem ser necessário esgotar as reservas de nutrientes (SEA6ENERGY, 2022).

#### IV. *Ascophyllum nodosum*

A macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus), pertence à divisão Ochrophyta, classe *Phaeophyceae* e é encontrada no oceano Atlântico (Pereira et al., 2020) (Figura 1).



Figura 1: *Ascophyllum nodosum* (Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2022. *AlgaeBase*)

Trata-se de uma alga fucoide, dominante nas costas abrigadas, intertidais e rochosas. As temperaturas baixas são ideais para o *A. nodosum*, e, portanto, o aumento da temperatura da água determina os limites de distribuição desta espécie (Pereira et al., 2020).

O uso desta macroalga é feito através da recolha direta na natureza, suscitando algumas preocupações sobre o impacto da sustentabilidade deste recurso. Para uma colheita sustentável o corte deve ser feito manualmente, deixando o órgão de fixação e cortando o talo com um comprimento mínimo de 25 cm. Cumprindo estes requisitos, o processo poderá ser repetido a cada 3-5 anos, no mesmo local. Esta macroalga cresce em zonas frias, sujeitas a extremos de temperatura, secura, stress salino e exposição solar (Smith, 2010) (Figura 2).

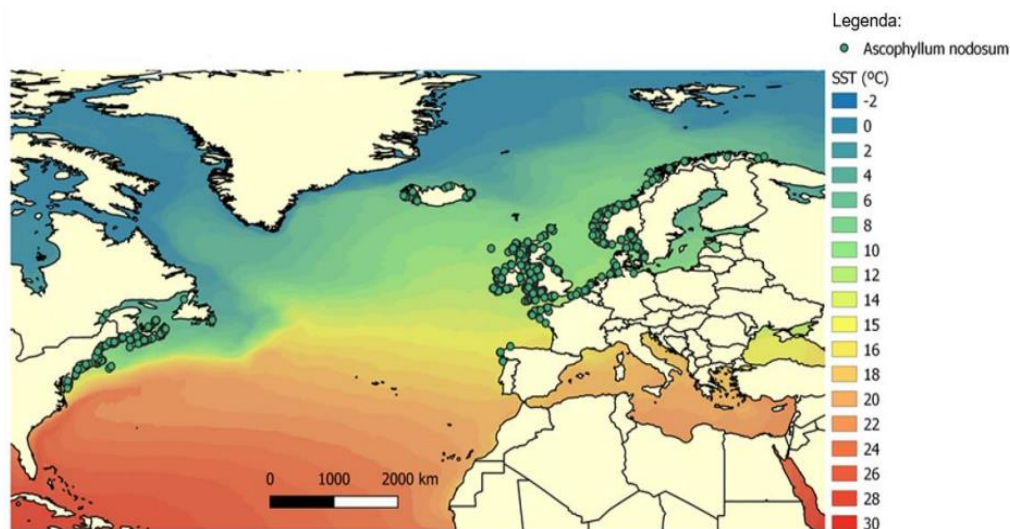


Figura 2: Distribuição de *Ascophyllum nodosum* no oceano Atlântico (Pires, 2019). SST- temperatura da superfície da água do mar.

O *A. nodosum* possui elevadas quantidades de alginato, vitaminas, cinza, carotenoides, fucoidano, iodo, laminarinas, manitol, proteínas, hidratos de carbono, fibras, lípidos e água. É usada na área da alimentação enquanto aditivo e estimulante de apetite. Na saúde, na cosmética e na talassoterapia é usada enquanto suplemento mineral e no tratamento do reumatismo. Também pode ser encontrada na formulação de rações animais (Pereira et al., 2020). As fito-hormonas encontradas na macroalga *A. nodosum* são, principalmente, as citocininas, o ácido abscísico e as giberelinas (Wally et al., 2013).

Por último, e como referido, a macroalga *A. nodosum* tem sido a alga mais usada como bioestimulante a nível industrial e comercial. Extratos desta alga provaram melhorar o crescimento das plantas, diminuir alguns problemas abióticos e bióticos e melhorar as defesas das plantas através da regulação dos processos moleculares, fisiológicos e bioquímicos (Shukla et al., 2019), sendo estas considerados os melhores bioestimulantes do mercado, isto quando a macroalga é recolhida de locais ricos em minerais (Smith, 2010).

A tabela VI (Anexo A3) resume alguns dos benefícios de *A. nodosum* enquanto bioestimulante em espécies de plantas específicas.

## V. *Kappaphycus alvarezii*

A macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) L.M. Liao 1996, poderá ser vermelho-amarelada, castanha ou verde, e inclui-se na Divisão Rhodophyta, classe Florideophyceae. Pode apresentar diferentes tonalidades consoante a concentração de pigmento ficoeritrina (Figura 3). É uma espécie tropical de crescimento e desenvolvimento rápido (Rudke et al., 2020), encontrada na parte superior da zona infralitoral (Hayashi, 2007).



Figura 3: Macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2022. *AlgaeBase*)

Esta espécie encontra-se adaptada a elevada luminosidade e apesar de preferir águas limpas e claras, consegue suportar turbidez elevada, por períodos curtos. A sua temperatura ideal de

crescimento encontra-se entre os 20 e os 32°C, com salinidade superior a 30‰. Quando estes valores se alteram, prejudicam o crescimento da alga. Ainda, quando ocorre uma exposição prolongada ao ar durante a maré baixa, observa-se a descoloração da mesma para uma tonalidade branca (Hayashi, 2007), devida à perda de pigmentos.

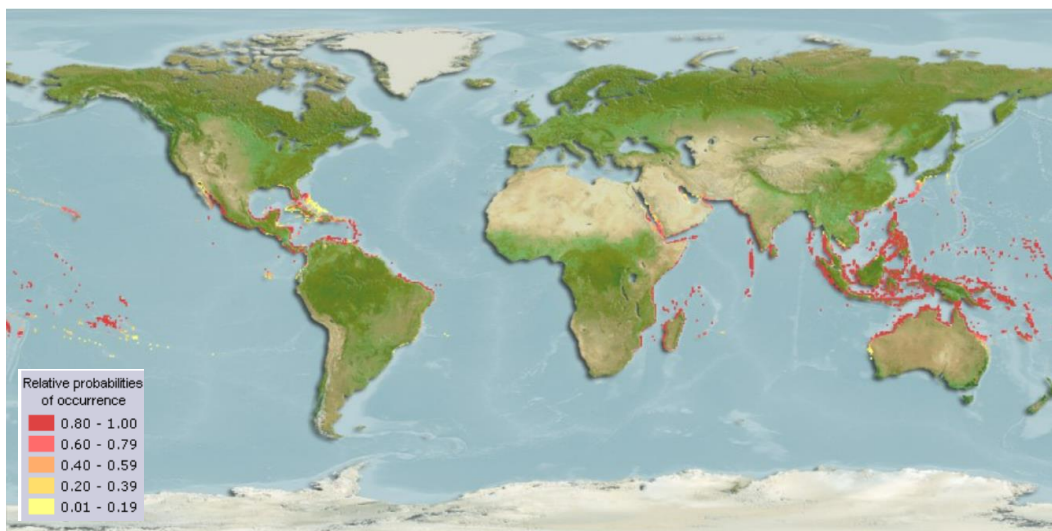


Figura 4: Distribuição global de *K. alvarezii* (Aquamaps, 2019)

Sendo uma espécie tropical, o cultivo da macroalga *K. alvarezii* é realizado maioritariamente por países perto da linha do equador devido à temperatura da água. A Indonésia é o local principal onde se cultiva esta macroalga (Aslan et al., 2020), no entanto, o México, a Índia e as Ilhas Salomão são outros locais igualmente ativos no cultivo comercial desta alga (Mantri et al., 2017). Existem diversas técnicas para o cultivo desta macroalga, sendo umas específicas para águas rasas e outras para águas mais profundas. Os métodos da jangada de bambu flutuante, palangre e rede tubular são os mais usados (Mantri et al., 2017).

*Kappaphycus alvarezii* é uma carragenófita, considerada uma das espécies de alga vermelha mais importantes na indústria alimentar, sendo comumente usada para extração de k-carragenana. A k-carragenana é usada como espessante, gelificante e estabilizante, em gelados, queijos, compotas, no pão e em muitos outros alimentos processados (Rudke et al., 2020). Na área de cosmética é também usada para espessante e estabilizante. Para além disso, esta espécie de alga é usada também na biorremediação de metais pesados (Rudke et al., 2020).

Os estudos feitos até hoje provam que esta macroalga possui atividades anticancerígenas e antioxidantes (Rudke et al., 2020). Possui ainda micronutrientes inorgânicos e potássio (Rudke et al., 2020). Enquanto bioestimulante, *K. alvarezii* deve as suas propriedades à presença de fito-hormonas do tipo auxinas, citocininas e giberelinas (Rudke et al., 2020). Neste contexto já foi estudada a sua eficácia enquanto bioestimulante para várias espécies agrícolas sendo geralmente usada como spray foliar durante as primeiras fases de crescimento da planta, ou, também, embebida em sementes antes da sementeira para uma germinação mais eficiente. Tendo em conta o conceito de biorrefinaria, esta macroalga pode originar extrato e carragenana, naturalmente presente como referido anteriormente, através da biomassa resultante (Hurtado et al., 2021).

Stresses abióticos, sendo eles a seca, salinidade, toxicidade ou variação de temperatura, são amenizados através de extratos de macroalgas (Hurtado et al., 2021). Dois dos quais este estudo vem testar, salinidade e aumento da temperatura, vão ser verificadas com o uso das duas macroalgas referidas, *A. nodosum* e *K. alvarezii*. Atualmente, devido as condições ambientais, vários bioestimulantes algais estão a ser testados para tolerância a stress abióticos sendo comprovado a sua eficiência pela função, em singular ou em conjunto, de todas as propriedades neles existentes, sendo, fito-hormonas, aminoácidos, propriedades antioxidantes, entre outras (Stasio et al., 2018). Para o stress salino, estudos realizados em alface, *Lactuca sativa*, indicaram que concentrações acima de 3‰ diminuem o rendimento da planta (Ünlükara et al., 2008). Já para o tomate, *Solanum lycopersicum*, a perda do rendimento acima de 50% começa numa concentração salina de 3,5‰ (Singh et al., 2012). Para plantas submetidas a stress térmico, sabe-se que a temperatura ótima do tomate ronda entre os 25,9°C e os 29,5°C (Labouriau & Osborn, 1984), e para a alface, ronda os 20°C (Nascimento & Daniel, 2002).

## ***Objetivo***

O objetivo do trabalho baseia-se na determinação do potencial dos extratos comerciais AgroGain e SSEP enquanto bioestimulantes, em diferentes concentrações e formas de utilização, sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plantas hortícolas, de alface e tomate.

Para determinar o efeito bioestimulante foram efetuados os seguintes ensaios:

Ensaio de germinação:

- a) Determinação da concentração ótima dos extratos algais;
- b) Otimização dos métodos de assepsia.

Ensaio de crescimento:

- c) Efeito dos bioestimulantes no stress salino;
- d) Efeito dos bioestimulantes no stress térmico;

## ***Materiais e métodos***

Vários processos foram comuns ao longo do desenvolvimento de todos os ensaios práticos. Na tabela II, encontram-se descritos as principais metodologias gerais usadas em todos os ensaios.

Tabela II : Metodologias gerais usadas ao longo do estudo

<b>Processo</b>	<b>Execução</b>	<b>Referência</b>
<b>Preparação de sementes</b>	As sementes (alface e/ou tomate), fornecidas pela empresa Eurosementes Lda., foram previamente escolhidas, tendo em conta a sua aparência e estrutura, para garantir a utilização de sementes sem danos visíveis.	(Wang, 1989)
<b>Esterilização do material</b>	O material de laboratório necessário ao longo dos processos como placas de Petri de vidro, pinças, etc., foi autoclavado (AJC, Uniclave 88), num ciclo de 15 minutos a 121°C.	(Wang, 1989)
<b>Preparação dos extratos algais</b>	O AgroGain é comercializado na forma líquida (Sea6Energy), tendo sido preparadas soluções com concentrações de 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 6%, 7%, 8% e 9%. Depois de preparadas as soluções foram conservadas a -20°C ou a	(Bajpai et al., 2019; Neto et al., 2020a; Sandepogu et al., 2019; N. Santos et al., 2021; M. Silva et al., 2021; Ternus et al., 2021)

Processo	Execução	Referência
	<p>4°C, se fosse usado num prazo de 48h.</p> <p>O SSEP (HortFertplus), em pó, foi dissolvido em 50 mL de água destilada, num gobelet com 10 g de SSEP. Esta mistura ficou em repouso por 30 minutos, tendo a dissolução sido feita de forma completa. Foram preparadas concentrações de 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% e 5%. Depois de preparadas as soluções foram conservadas a -20°C ou a 4°C, se fosse usado num prazo de 48h.</p> <p>Os controlos para cada extrato e ao longo do estudo, foram constituídos por água ultrapura.</p>	
<p><b>Programação da câmara de crescimento (Aralab, Fitoclima D1200PLH)</b></p>	<p>Fotoperíodo de 12 horas de luz:12 horas de escuro, humidade de 90%, intensidade de luz 83,835 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math> e temperatura de 20°C.</p>	
<p><b>Preparação de meio Murashige e Skoog (MS) (Duchefa Biochemie)</b></p>	<p>O meio foi preparado tendo em conta as indicações do fabricante, usando apenas metade da</p>	

<b>Processo</b>	<b>Execução</b>	<b>Referência</b>
	quantidade indicada, pelo que foi preparado apenas em ½ força. Foi adicionado agar (VWR Chemicals) a 1% e o meio foi autoclavado (AJC, Uniclave 88), num ciclo de 15 minutos a 121°C.	
<b>Desinfecção de sementes</b>	As sementes foram desinfetadas com uma solução a 4% de hipoclorito de sódio por 1 minuto, mexendo vigorosamente. Posteriormente, as sementes foram lavadas por água ultrapura estéril durante 20 segundos e removida a água. Estas sementes foram usadas de imediato.	(Sauer & Burroughs, 1986)
<b>Preparação de soluções salinas</b>	As soluções salinas foram preparadas com cloreto de sódio (VWR CHEMICALS) em concentrações de 5%, 15%, 25% e 35%.	
<b>Medições</b>	Todas as radículas e caulículos foram medidos usando uma régua. Considerou-se na medição dos caulículos desde a base das folhas até ao início da radícula.	

## I. Preparação inicial

Previamente foi realizada a preparação de sementes, esterilização do material por autoclavagem e preparação dos extratos algais, conforme descrito na Tabela II (Figura 5). As espécies de sementes usadas foram a alface, da variedade alface “maravilha verano canastra” (Figura 6), uma vez que a alface é de rápida germinação (Fincheira et al., 2017) e o tomate, da variedade “rio grande” (Figura 6) que, por sua vez, é uma semente mais sensível (Bulgari et al., 2019). As sementes utilizadas foram escolhidas tendo em conta a rapidez de germinação e o prazo de validade das mesmas, segundo o fabricante. Para minimizar erros em relação às sementes, procurou-se realizar o estudo com sementes recentes e com elevada viabilidade. Os bioensaios tiveram duração de 5 dias para a alface e de 7 dias para o tomate. O tomate apresentou germinação apenas ao terceiro dia tendo assim o mesmo tempo de desenvolvimento que a alface.



Figura 5: Extratos usados ao longo dos bioensaios, sendo SSEP em pó e extrato AgroGain, respetivamente.



Figura 6: Embalagens das sementes de alface, à esquerda, e tomate, a direita, usadas ao longo dos bioensaios.

## II. Bioensaio para teste de germinação: determinação da concentração ótima de extrato algal

Para a determinação da concentração que maximiza a taxa de germinação, foi realizado um ensaio usando germinação de sementes de alface, em papel de filtro. As sementes de alface foram sujeitas a uma embebição por duas horas, no extrato correspondente nas concentrações indicadas na Tabela II. Foram usadas placas de Petri de vidro, de 20 cm de diâmetro, com 2 camadas de papel de filtro, humedecidas com água ultrapura, sem embeber demasiado o papel. As caixas de Petri, após a colocação das sementes em 3 pseudo-réplicas por placa, 25 sementes por pseudo-réplica, com uma pinça estéril, foram seladas com Parafilm® para evitar a desidratação. As placas foram colocadas na câmara de crescimento, na programação designada na Tabela II. A temperatura usada teve em conta a temperatura ideal para a germinação de alface (Nascimento & Daniel, 2002). O ensaio foi realizado em triplicado, com 75 sementes cada réplica, sendo que em todos foram realizados controlos com água ultrapura, nas mesmas condições.

Neste estudo, o parâmetro analisado foi a porcentagem de germinação (PG) (L. D. Silva et al., 2019). Considerou-se semente germinada a semente que apresenta radícula. Foram contabilizadas quantas sementes germinaram por placa e aplicada a fórmula abaixo indicada:

$$PG = \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{n^{\circ} \text{ total de sementes}} \times 100\%$$

### III. Bioensaio para testes de contaminação: Otimização do método de assepsia

Com objetivo de fornecer um meio adequado para um melhor cultivo e desenvolvimento das plântulas, foi preparado meio MS segundo a Tabela II. O ensaio foi desenvolvido para avaliar qual o melhor método de desinfecção que permitisse manter a viabilidade das sementes.

Neste ensaio, foi usado apenas o AgroGain e foi escolhida apenas uma concentração (0,02%) uma vez que se tratava de um ensaio teste, com sementes de alface.

Foram realizados 3 ensaios diferentes (Tabela III).

Tabela III: Descrição da preparação de 3 meios MS

<b>Tipo de meio</b>	<b>Especificações</b>	<b>Condições das sementes</b>
<b>Meio A (MS+Est)</b>	Meio MS autoclavado e adicionado o extrato algal para uma concentração final de 0,02% (esterilizado por filtração com filtro de seringa estéril de 0.20µm (Dorsan)), após o ciclo de esterilização do meio.	½ das sementes foram usadas sem qualquer tipo de desinfecção.  ½ das sementes foram sujeitas a desinfecção como indicado na tabela II.
<b>Meio B (MS+N Est)</b>	Meio MS autoclavado e acrescentado o extrato algal, para uma concentração final de 0,02%, sem qualquer tipo de esterilização após o ciclo de esterilização do meio.	
<b>Meio C (MS+Aut)</b>	Meio MS com adição do extrato algal para uma concentração final de 0,02%, autoclavado em conjunto.	

Em condições de assepsia, os meios foram distribuídos por placas de Petri de plástico estéreis. Foram utilizados, para cada meio, os dois tipos de “condição das sementes” indicados na tabela III. Utilizaram-se 8 sementes por réplica, em 2 ensaios, com 16 sementes no total, sendo estas embebidas previamente durante 12 horas em água ultrapura. Uma vez que o teste em estudo tinha como objetivo as diferenças do tipo de meio usado, todas as sementes foram expostas à

mesma solução (água ultrapura). As placas foram seladas e colocadas na câmara de crescimento nas condições indicadas na tabela II.

Os parâmetros analisados foram a PE, o comprimento da maior radícula das plântulas e o peso fresco, calculado conforme a fórmula seguinte.

$$\text{Peso fresco}(g) = \frac{\text{Peso fresco total das plântulas}}{\text{Número de sementes germinadas}}$$

Este ensaio permitiu selecionar o meio mais vantajoso para os ensaios futuros. Como veremos, verificou-se que o meio B é o mais adequado, utilizando-se sementes desinfetadas por imersão em hipoclorito de sódio.

#### IV. Bioensaio para teste das 3 concentrações de extrato algal em tomate

O ensaio anterior foi repetido com sementes de tomate, uma vez que são sementes mais sensíveis. Utilizaram-se 8 sementes por réplica, tendo-se suplementado o meio com concentrações de 0,02%, 0,2% e 2% de extrato algal, para perceber quais as variações na percentagem de germinação. Os meios foram preparados como indicado na tabela III, tendo as sementes sido sujeitas a desinfecção, como indicado na tabela II. As sementes foram embebidas por 12 horas em água ultrapura. Em assepsia, após a distribuição do meio e das sementes pelas placas de Petri de plástico, as mesmas foram seladas com Parafilm® e colocadas na câmara de crescimento nas condições indicadas na tabela II. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Os parâmetros analisados foram a percentagem de germinação, a medição do comprimento da maior radícula do tomate, o comprimento do caulículo, o peso fresco, o teor de humidade e o índice de vigor, ao final de 7 dias.

O teor de humidade foi obtido segundo a norma AOAC. Foi registado o peso fresco da amostra e seco a 105°C durante 48h. Assim, este parâmetro foi calculado em percentagem, tendo em conta o peso fresco e seco das amostras (Afonso et al., 2021).

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\text{Peso da amostra fresca (g)} - \text{Peso da amostra seca (g)}}{\text{Peso da amostra fresca (g)}} \times 100\%$$

O índice de vigor foi calculado usando o comprimento da radícula (CR), comprimento do caulículo (CC) e PG (Karthikeyan et al., 2007), segundo a seguinte fórmula.

$$\text{Índice de vigor (IV)} = (CR (cm) + CC(cm)) \times PG$$

## V. Bioensaio para teste de crescimento e estado fisiológico

Com o objetivo de determinar qual a forma de utilização do extrato mais vantajosa, seja a embebição de sementes ou incorporação no meio, foi realizado um ensaio com os dois tipos de extratos. Em ambos os ensaios foram utilizadas 8 sementes. Os ensaios foram feitos em triplicado.

Tabela IV: Preparação de dois bioensaios para teste de crescimento

Extrato algal inserido no meio	Sementes embebidas em extrato algal
Concentrações: 0,02%, 0,2% e 2%.	
Sementes de tomate.	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio B preparado como designado na tabela III;</li> <li>• Sementes desinfetadas (Tabela II) e embebidas em água ultrapura por 12 horas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meio MS preparado como indicado na tabela II;</li> <li>• Sementes desinfetada (Tabela II) e embebidas nas concentrações dos extratos indicadas por 12 horas.</li> </ul>
3 ensaios	
<p>Avaliação do ensaio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PG;</li> <li>• Medição do comprimento da maior radícula e do caulículo;</li> <li>• Peso fresco;</li> <li>• Teor de humidade.</li> </ul>	<p>Avaliação do ensaio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PG.</li> </ul> <p>Este estudo tinha como objetivo a comparação e a observação do estado fisiológico da planta. Assim, o ensaio foi terminado assim que foi atingida a percentagem de germinação de 100%.</p>

O ensaio onde se realizou a embebição das sementes, realizou-se após o ensaio do extrato algal no meio, e, portanto, se o estado fisiológico e sanitário fosse visivelmente melhor, seria decidido que concentração algal, 0,02%, 0,2% ou 2%, iria ser usada nos ensaios subsequentes.

## VI. Bioensaio para testes de stress: salinidade e calor

Com o objetivo de observar o potencial efeito dos extratos no aumento da resistência das sementes, quando expostas a stress salino ou térmico, foram realizados testes de salinidade, para testar a resistência das sementes quando eventualmente plantadas em solos com maior percentagem de sal, e de aumento da temperatura, uma vez que com as alterações climáticas a temperatura tende a aumentar (tabela V).

Foram preparadas soluções salinas (Tabela II) com diferentes concentrações entre a salinidade da água doce (Gonçalves, 2006) e a salinidade da água do mar (Amaro, 2016).

A concentração 2% de extrato algal foi escolhida após a análise dos resultados obtidos no ensaio anterior.

Tabela V: Bioensaio para testes de stress

<b>Bioensaio de salinidade</b>	<b>Bioensaio de temperatura</b>
<p>Meio MS preparado segundo a tabela II, sendo substituída a água ultrapura pelas soluções salinas preparadas.</p> <p>O Controlo foi exposto à mesma concentração salina e as sementes foram embebidas em água ultrapura.</p>	<p>Meio MS preparado tendo em conta a tabela II.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribuição do meio por placas de Petri de plástico;</li> <li>• Sementes, alface e tomate, embebidas por 12 horas em extrato algal, para ambos os extratos, a 2%;</li> <li>• Desinfecção das sementes (tabela II);</li> <li>• Placas seladas com Parafilm® e colocadas na câmara de crescimento.</li> </ul>	
<p>Programação da câmara indicada na tabela II.</p>	<p>Programação da câmara como indicado na tabela II, mas a 35°C.</p>
<p>10 sementes por réplica. 6 ensaios.</p>	
<p>Avaliação do ensaio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PG;</li> <li>• Comprimento da maior radícula e do caulículo (caulículos para as plantas de tomate);</li> <li>• Peso fresco;</li> <li>• Teor de humidade.</li> </ul>	

## VII. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram consideradas significativas a um nível de 5% ( $p$ -value $<0,05$ ). Para testar a normalidade e homogeneidade de variância, o teste de Shapiro-Wilk e o teste F de Levene foram utilizados, respectivamente. Sempre que os dados não cumpriram a normalidade, foram feitos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o IBM SPSS software estatístico, versão 28.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA).

## Resultados e Discussão

### I. Bioensaio para teste de germinação: Otimização da concentração ótima de extrato algal

Com objetivo de determinar a concentração ótima dos extratos algais utilizados (AgroGain e SSEP), foram realizados testes de germinação, em papel de filtro, com as concentrações utilizadas anteriormente com sementes de alface (dado que são sementes de fácil germinação), tendo-se obtido os resultados ilustrados na figura 7. Dado que os testes de normalidade Shapiro-Wilk, quando aplicados aos dados de germinação de alface expostas a diferentes concentrações de AgroGain (Figura 7A) e SSEP (Figura 7B), indicaram que os dados em estudo não cumprem os testes de normalidade, foram realizados testes não paramétricos (de Kruskal-Wallis). Os resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na taxa de germinação das sementes de alface, expostas a AgroGain e SSEP, quando comparados com o controlo.

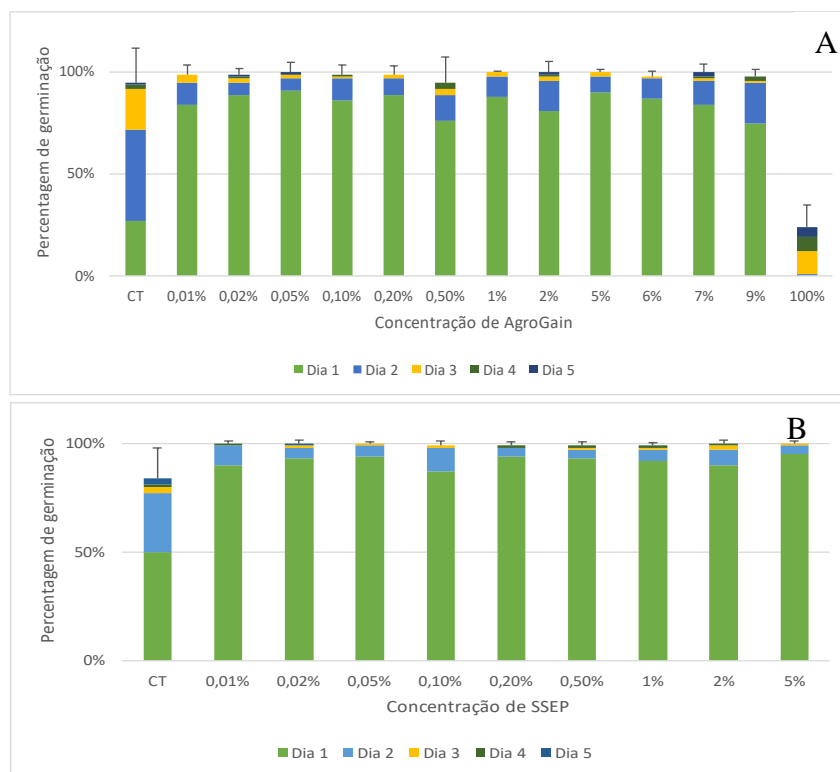


Figura 7: Percentagem de germinação de sementes de alface obtida para o extrato AgroGain nas concentrações CT (controlo), 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 6%, 7%, 9% e 100%

(A) e no extrato SSEP nas concentrações 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% e 5% (B) ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Na figura 7A, é possível observar os resultados obtidos para o extrato AgroGain. Para este extrato, todas as concentrações, exceto 100%, no dia 1, obtiveram resultados significativamente melhores que o controlo, obtendo-se percentagens de germinação sempre superiores a 75%, enquanto o controlo obteve 27 %. Quando comparados os resultados do ensaio ao final dos 5 dias, pode-se observar que a maioria das concentrações obtiveram taxas de germinação superiores ao controlo, com as concentrações 0,05%, 1%, 2%, 5% e 7%, a atingirem 100% de taxa de germinação. Para o extrato puro, a germinação das sementes não foi assinalável, podendo observar-se que o extrato puro se torna inibitório do processo germinativo. Sendo o objetivo do estudo encontrar um intervalo de concentrações ideais, pretendeu-se otimizar a utilização de extratos na menor concentração possível. Os extratos mais interessantes são os seguintes, 0,02%, 0,05%, 0,2%, 1%, 2% e 5%, com elevadas taxas de germinação ao fim do 1º dia e do 5º dia de germinação. O extrato puro, mesmo que apresentasse melhores resultados, dificilmente seria utilizado do ponto de vista comercial, por se tornar, em termos económicos, de custo demasiado elevado.

A partir da concentração 5%, quando comparado o primeiro dia, observa-se um declínio das taxas de germinação nas concentrações mais elevadas, e por isso, optou-se por utilizar concentrações inferiores a 5% nos ensaios seguintes. Excluem-se, assim, as concentrações mais elevadas por serem menos eficientes do ponto de vista agrícola e económico.

Na figura 7B, relativa ao extrato SSEP, obtiveram-se também melhores resultados ao fim do primeiro dia em relação ao controlo e, ainda, quando comparado com o extrato AgroGain. Todas as concentrações utilizadas, originaram percentagens de germinação superiores a 87%, enquanto o controlo obteve uma percentagem de germinação de 50%. As concentrações 0,01%, 0,02%, 0,05%, 2% e 5% obtiveram uma percentagem de germinação de 100% ao fim dos 5 dias do ensaio.

Sendo que se trata de um ensaio de germinação, onde só foi observado o potencial enquanto acelerador da mesma, observa-se que o extrato SSEP, para o controlo, obtém uma PG de 84% e 100% para o uso do extrato. O extrato SSEP obtém maior diferença entre os valores de controlo e as diferentes concentrações de extrato. Estes valores poderão estar associados à presença das fitohormonas de cada macroalga, especificamente, as giberelinas, que são características do grupo da

macroalga *A. nodosum*, responsáveis pela germinação de sementes. Ainda assim, a macroalga *K. alvarezii* possui também giberelinas. A diferente eficiência poderá estar nas diferentes concentrações desta fito-hormona em cada extrato, diferentes compostos químicos de natureza giberelínica ou mesmo a presença de outras substâncias bioestimulantes como vitaminas e minerais.

Atendendo aos resultados obtidos, e visando a utilização de concentrações tão baixas quanto possível, mas ainda assim eficientes, foram selecionadas, para os bioensaios seguintes, 3 concentrações, sendo elas: 0,02%, 0,2% e 2%.

## II. Bioensaio para testes de contaminação: Otimização das condições de assepsia

No bioensaio anterior verificou-se a presença de bolores na maioria das placas, e, portanto, realizaram-se alguns bioensaios preliminares, para selecionar o melhor método de desinfecção. Para estes, foi usado apenas AgroGain como indicado anteriormente, e, também, apenas sementes de alface, uma vez que se tratava de um ensaio exploratório. No primeiro bioensaio usaram-se 3 tipos de desinfecção de meio e sementes de alface desinfetadas ou não desinfetadas.

### a) Percentagem de germinação das sementes de alface

A figura 8 mostra a percentagem de germinação de sementes de alface, germinadas ao fim de 5 dias de ensaio.

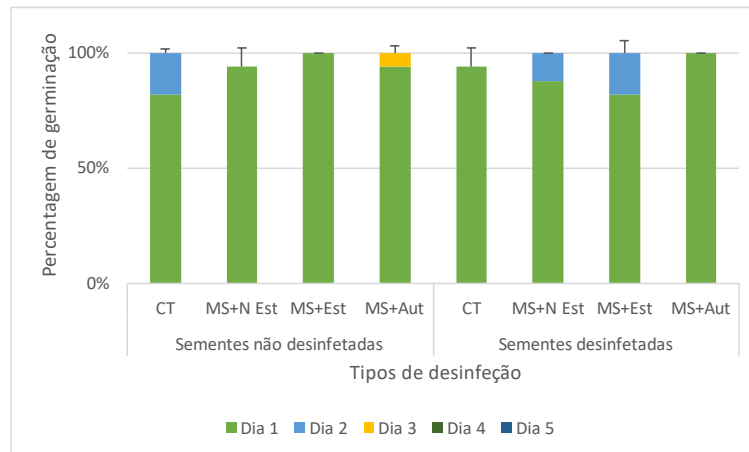


Figura 8: Percentagem de germinação de sementes de alface obtida para sementes de alface não desinfetadas ou desinfetadas, com 4 tipos de meio MS. CT- controlo, MS+N Est - meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est - meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut - meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=2).

No ensaio de percentagem de germinação das alfices, como indicado na Figura 8, foram obtidos ótimos resultados, atingindo os 100% de germinação na maioria das variantes ao longo dos 5 dias. No entanto, os bolores encontrados ao longo do estudo, para as sementes não desinfetadas e desinfetadas foram determinantes para a seleção do método de desinfecção. Por exemplo, o controlo para sementes não desinfetadas tinha um total de 6 sementes contaminadas nos dois ensaios realizados, enquanto as sementes desinfetadas tinham apenas uma. A utilização de sementes não desinfetadas, em meio MS com extrato algal não estéril, mostrou uma percentagem de germinação mais baixa, pelo que esta não parece ser a solução mais eficiente. Poderá, ainda, descartar-se o possível impacto negativo na germinação das sementes pelo hipoclorito de sódio, uma vez que não se regista um decréscimo da percentagem de germinação. Decidiu-se também aumentar o tempo de embebição das sementes de 2 para 12 horas, para as proteger da eventual agressão do hipoclorito de sódio.

#### b) Comprimento das radículas das plântulas de alface

Na Figura 9 encontram-se os resultados relativos à medição do comprimento da radícula principal das plântulas germinadas, sob os diferentes métodos de esterilização.

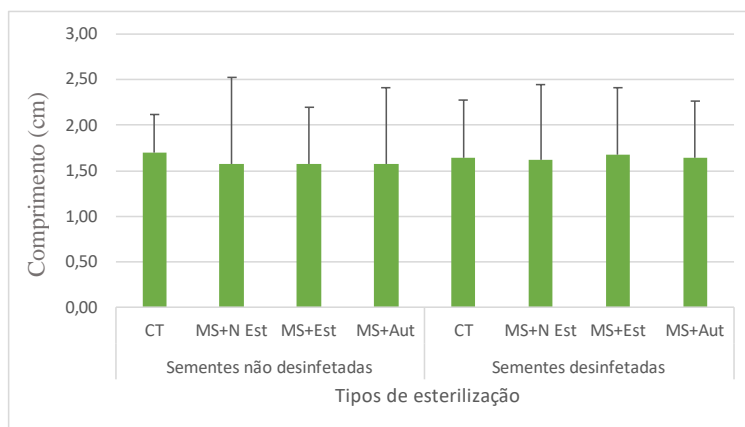


Figura 9: Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas de alfáce, para sementes desinfetadas e não desinfetadas, em 4 tipos de meio MS: CT- controlo, MS+N Est – meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est – meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut – meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=2).

Todos os meios MS obtiveram melhores resultados com sementes desinfetadas, exceto o controlo, quando comparado com as sementes não desinfetadas. Assim, comparando com o controlo, as sementes desinfetadas obtiveram, em média, a tendência para exibir maior comprimentos de radícula.

### c) Peso fresco das plântulas de alface

A figura 10 mostra o peso fresco das plântulas de alface ao fim de 5 dias de ensaio. Verifica-se que, para todas as amostras, o peso fresco é superior nas plântulas obtidas a partir de sementes desinfetadas, comparativamente ao peso fresco das sementes não desinfetadas.

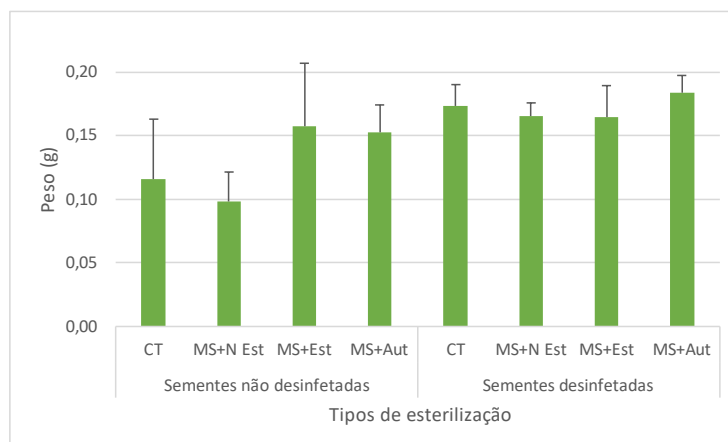


Figura 10: Média  $\pm$  desvio padrão dos valores referentes ao peso fresco de alfaces, para as sementes desinfetadas e não desinfetadas, com 4 tipos de meio MS: CT- controle, MS+N Est - meio MS com extrato algal não esterilizado, MS+Est - meio MS com extrato algal esterilizado por filtração, MS+Aut - meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=2).

Para as sementes não desinfetadas, apenas 2 tipos de meio obtiveram resultados mais elevados que o controlo, já para as sementes desinfetadas apenas o meio autoclavado foi superior, por décimas, ao controlo (Figura 10). Entre os 3 tipos de esterilização, nas sementes desinfetadas, o melhor resultado foi o meio autoclavado após adição de extrato, e o pior, o meio com extrato esterilizado por meio de filtração.

Assim, apesar da PG não apresentar grandes diferenças, o número de sementes contaminadas encontradas neste ensaio indica que a utilização do método de desinfecção com hipoclorito de sódio é um método benéfico, uma vez que, quanto maior a quantidade de sementes germinadas, maior o número de sementes disponível para avaliação dos parâmetros seguintes.

Entre os meios MS, no parâmetro do peso, os valores menos favoráveis foram observados para o meio com extrato algal esterilizado por filtração. Este é um método muito laborioso, sendo necessário filtros estéreis para esterilização do mesmo, e, o extrato puro é demasiado denso, e difícil de passar pelo filtro. Uma vez que os valores apresentados para este parâmetro não são consideravelmente mais elevados que para os restantes, não foram feitos ensaios adicionais com esta metodologia.

Assim, nos ensaios seguintes, decidiu-se seguir o protocolo usando meio MS autoclavado em conjunto com extrato algal, e meio MS autoclavado e posteriormente adicionado extrato algal sem qualquer tipo de esterilização, ambos com sementes desinfetadas com hipoclorito de sódio como indicado na tabela II previamente embebidas durante 12h.

De seguida, procedeu-se a um novo bioensaio, desta vez com sementes de tomate, uma vez que são mais sensíveis, para decisão final sobre o meio mais adequado. Neste bioensaio foram usadas as concentrações definidas anteriormente. Assim, testou-se o meio MS sem qualquer tipo de esterilização do extrato (concentrações 0,02%, 0,2% e 2%), e o meio MS autoclavado (concentrações 0,02%, 0,2% e 2). O controlo corresponde a água ultrapura.

#### d) Percentagem de germinação das sementes de tomate

A figura 11 mostra os resultados da germinação das sementes de tomate em diferentes meios após 7 dias.

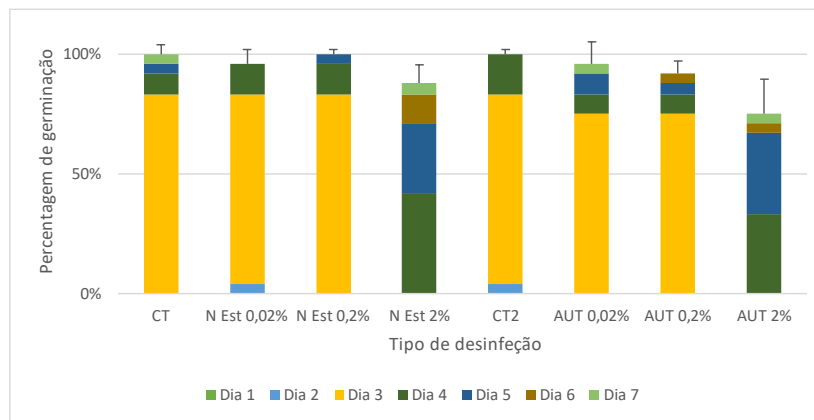


Figura 11: Percentagem de germinação de sementes de tomate obtida para os diferentes métodos de esterilização do meio: CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, AUT- meio MS com extrato algal, autoclavado. Os dados foram recolhidos ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

Para a PG, apresentada na Figura 11, pode-se observar resultados superiores no meio MS com extrato algal sem esterilização. A concentração de 0,2%, para o meio com extrato algal sem esterilização, atingiu os 100% de germinação ao fim dos 5 dias do ensaio, assim como o controlo. Por outro lado, no meio com extrato algal autoclavado, nenhuma concentração atingiu a

percentagem máxima de germinação. Ao terceiro dia obteve-se a maior percentagem de germinação para a maioria dos ensaios. Assim, em resumo, registam-se melhores resultados quanto usado o extrato algal sem qualquer esterilização. Para os resultados obtidos para extrato algal sem esterilização, apenas ao quinto dia houve resultados estatisticamente significativos ( $p$ -value <0,05). Por outro lado, para o extrato algal autoclavado, ao quarto e quinto dia houveram resultados estatisticamente significativos ( $p$ -value <0,05).

#### e) Comprimento dos caulículos e das radículas de tomate

A figura 12 mostra o comprimento da radícula principal e do caulículo, de plântulas de tomate germinadas, ao fim de 7 dias de ensaio.

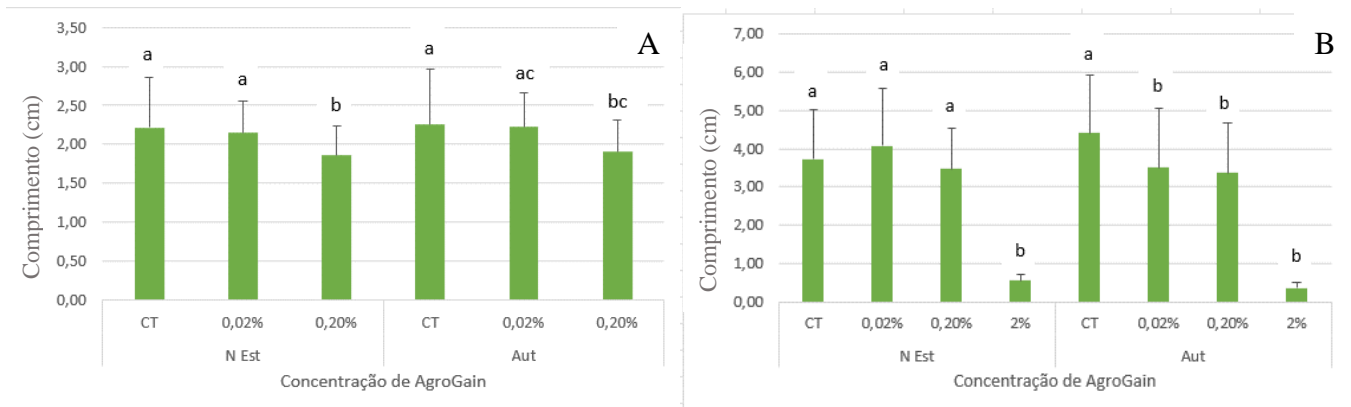


Figura 12: Média do comprimento dos caulículos de tomate (A) nos diferentes métodos de esterilização do meio. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05) e média do comprimento radículas (B) de tomate, nos diferentes métodos de esterilização do meio. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Para ambos, CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão. (n=3).

Para os parâmetros analisados na Figura 12A, o meio MS com extrato algal autoclavado apresenta valores de caulículos ligeiramente maiores, sendo que, em relação ao comprimento das radículas (Figura 12B) o meio com extrato não esterilizado apresenta melhores resultados sendo estatisticamente significativos ( $p$ -value<0,05). Inclusive, o comprimento da radícula do controlo, com o meio MS autoclavado e sementes embebidas em água ultrapura, foi superior quando em

comparação com todos os outros ensaios. Porém para as medições de radículas, comparativamente ao controlo, não se registam diferenças significativas para o meio não estéril, exceto, na concentração de extrato 2%, que regista comprimento de radícula muito mais baixo. Para os caulículos, é até, inexistentes quaisquer resultados para a concentração 2%.

#### f) Peso fresco do tomate

A figura 13 mostra o peso fresco das plântulas de tomate ao fim de 7 dias de ensaio.

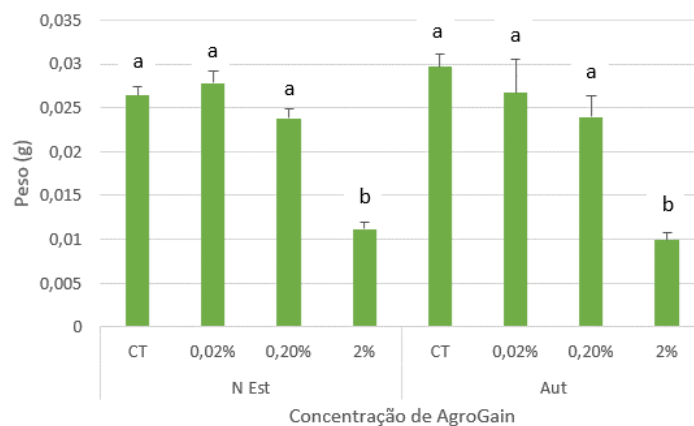


Figura 13: Peso fresco das plântulas de tomate, com diferentes métodos de esterilização do meio, sendo CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS com extrato algal, autoclavado, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05) quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo (n=3).

O peso fresco médio das plântulas analisadas foi mais elevado no meio com extrato algal sem esterilização, quando comparado com o controlo. Já no extrato autoclavado, o peso foi mais elevado no controlo, em comparação os diferentes extratos algais usados (Figura13).

#### g) Teor de Humidade

A figura 14 mostra a percentagem de humidade das plântulas de tomate ao fim de 7 dias de ensaio.

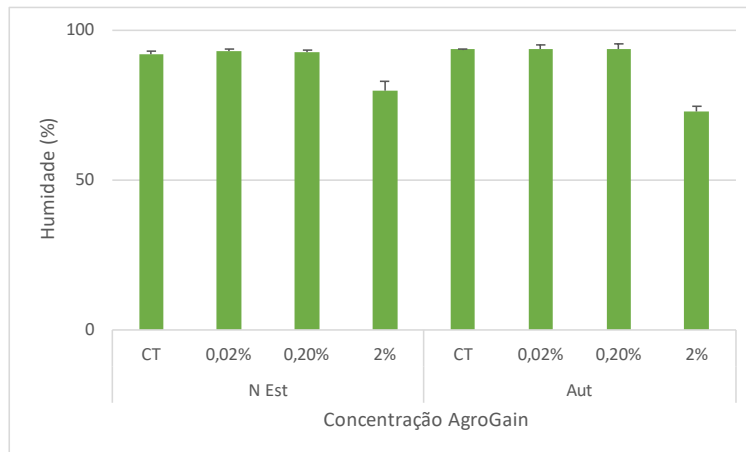


Figura 14: Teor de humidade, obtida para o tomate, nos diferentes métodos de esterilização do meio, sendo CT- controlo, N Est- meio MS com extrato algal sem esterilização, Aut- meio MS autoclavado após adição de extrato algal, realizada ao final de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão. (n=3).

Para o meio MS com extrato algal autoclavado, pode-se observar, na maioria, um resultado ligeiramente mais elevado de humidade quando comparada com os outros 2 tipos de meio (Figura14). Estas diferenças não são, porém, estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

Calculado o Índice de Vigor (IV), observou-se que, para o meio com extrato algal sem esterilização, a concentração 0,02% foi a que apresentou um valor mais elevado quando comparado ao controlo, sendo os índices de 6,14 e 5,95, respetivamente, e, dado que a concentração 2% não obteve caulículos mensuráveis, foi a que apresentou valor menor, com 0,55. Para o extrato algal autoclavado após adição de extrato algal, o IV apresentou melhores resultados para o controlo, com 6,66. A concentração mais próxima do controlo foi 0,02% com 5,65. Como observado para o extrato algal sem esterilização, a concentração 2% não obteve caulículos mensuráveis, e, portanto, é a concentração com menor valor de IV, com 0,37. Feita a média das 3 concentrações usadas, 0,02%, 0,2% e 2%, para o meio com extrato algal sem esterilização e para o meio com extrato algal autoclavado após adição de extrato algal, sendo ela 4,01 e 3,71, respetivamente, observa-se que, em média, o índice de vigor obtido para meio com extrato algal sem esterilização foi mais elevado, não se registando, porém, diferenças muito evidentes entre os tratamentos. Regista-se, apenas, grandes diferenças para o extrato 2%, com um vigor significativamente mais baixo do que para os restantes extratos algais.

Após a análise da PG, comprimentos da maior radícula e peso fresco, pode-se averiguar que o meio MS com extrato algal sem qualquer tipo de esterilização obteve, genericamente, melhores resultados. Ainda que o comprimento do caulículo e a percentagem de humidade indicasse resultados ligeiramente mais elevados para o meio MS com extrato autoclavado, a PG é visivelmente maior (Figura 11) para o extrato adicionado sem qualquer tipo de desinfeção.

Assim, com os testes de assepsia constatou-se que sementes desinfetadas e extrato não esterilizado era mais vantajoso, pelo que os ensaios seguintes seguiram esta metodologia.

### III. Bioensaio para teste de crescimento e estado fisiológico

Foi realizado inicialmente um teste com sementes de tomate para testar as 3 concentrações escolhidas com ambos os extratos algais em estudo, AgroGain e SSEP.

#### a) Percentagem de germinação

Para o extrato algal AgroGain, a concentração 0,2% atingiu os 100% de germinação assim como o controlo. Já para o extrato algal SSEP, a concentração 0,02% e 0,2% atingiram o máximo de germinação, sendo superior ao controlo (Figura 15). Para a PG com o extrato algal AgroGain, apenas o quinto dia apresentou resultados estatisticamente significativos ( $p$ -value  $<0,05$ ), já para o extrato SSEP as diferenças não são estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

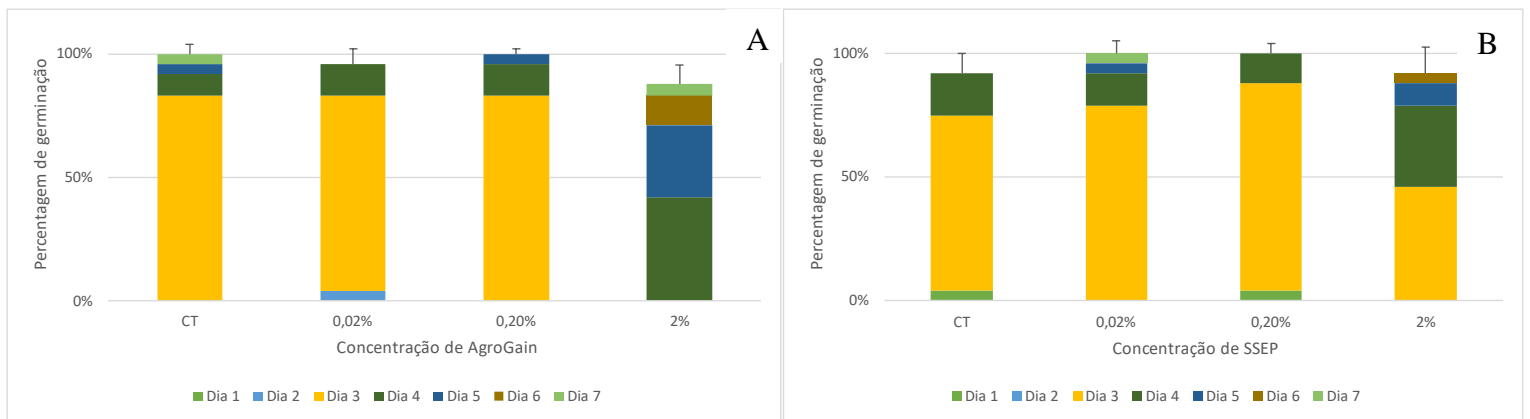


Figura 15: Percentagem de germinação de sementes de tomate para as concentrações CT- controle, 0,02%, 0,2% e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B) adicionado no meio MS, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Como observado para a germinação de alfices em papel de filtro, descrito anteriormente, o extrato SSEP apresenta melhores resultados de germinação quando comparado com o extrato AgroGain. Ainda assim, as diferenças não são estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

#### b) Comprimento do caulículo

Como também observado na PG, o SSEP foi o extrato algal que obteve melhores resultados para o comprimento dos caulículos, obtendo valores significativamente superiores ao controle. O extrato que obteve melhores resultados foi o 0,2%, seguido do 0,02%. O extrato a 2% obteve valores inferiores ao controle. Por outro lado, os valores do comprimento do caulículo das plântulas obtidas de sementes expostas ao extrato AgroGain não foram, em média, superiores ao controle (Figura16). Para este extrato, apesar de existirem sementes germinadas para a concentração 2%, as mesmas não se desenvolveram ao ponto de obter caulículos para medição, ao contrário do SSEP.

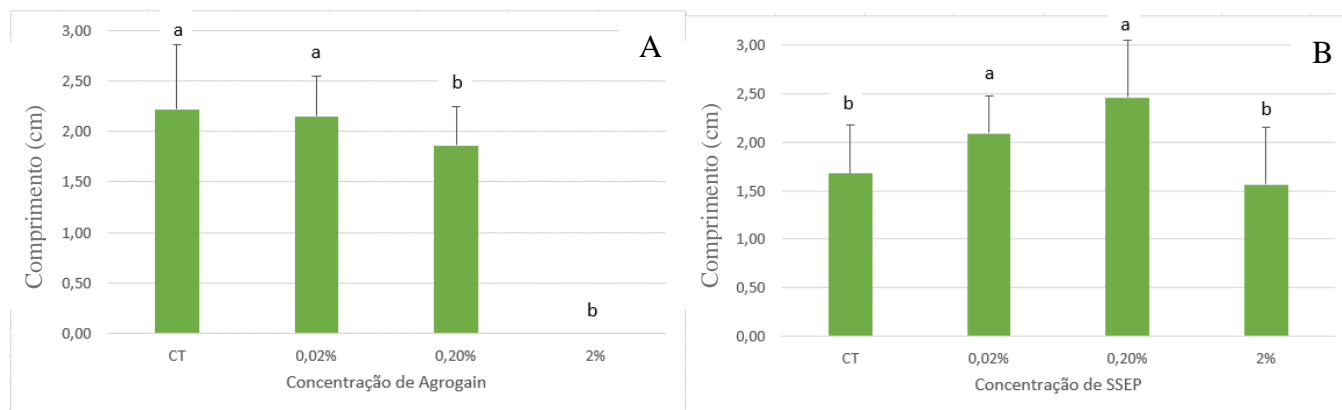


Figura 16: Comprimento dos caulículos de tomate, para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value<0,05), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

Nas macroalgas usadas, é reconhecida a presença de auxinas e citocininas (Rudke et al., 2020; Wally et al., 2013). Estas hormonas, como descrito anteriormente, auxiliam o crescimento e desenvolvimento da planta. A macroalga *K. alvarezii*, presente no extrato AgroGain, possui na sua composição citocininas e auxinas, e, por isso, seria esperado observar melhores resultados quando comparado com o controlo. Não se tendo verificado esta tendência, tal pode dever-se à estrutura das fito-hormonas presentes nas macroalgas quando comparada com as plantas, podendo ter, por isso, efeitos fisiológicos distintos. Já a espécie *A. nodosum* do extrato SSEP, possui na sua composição também o ácido abcísico, implicado na proteção contra diversos fatores de stress externos e, ainda, em aspetos do crescimento e do desenvolvimento. Assim, de facto, obtiveram-se significativamente melhores resultados para as concentrações de 0,02% e 0,2%, quando comparados com o controlo, o que se poderá dever-se à presença da fito-hormona descrita anteriormente. Não tendo sido efetuadas análises químicas à biomassa, não podemos concluir com certeza se o efeito se deve à presença desta (ou de outras) substâncias bioativas.

### c) Medição de radículas

A figura 17 apresenta os resultados obtidos para a média do comprimento da maior radícula de tomate, na presença dos 2 extratos. Para o extrato AgroGain, apenas a concentração 0,02% obteve melhores resultados que o controlo, ainda que a diferença não seja estatisticamente

significativa ( $p\text{-value}>0,05$ ). Por outro lado, o extrato SSEP obteve valores significativamente maiores do que os obtidos no controle, para os extratos 0,02% e 0,2%.

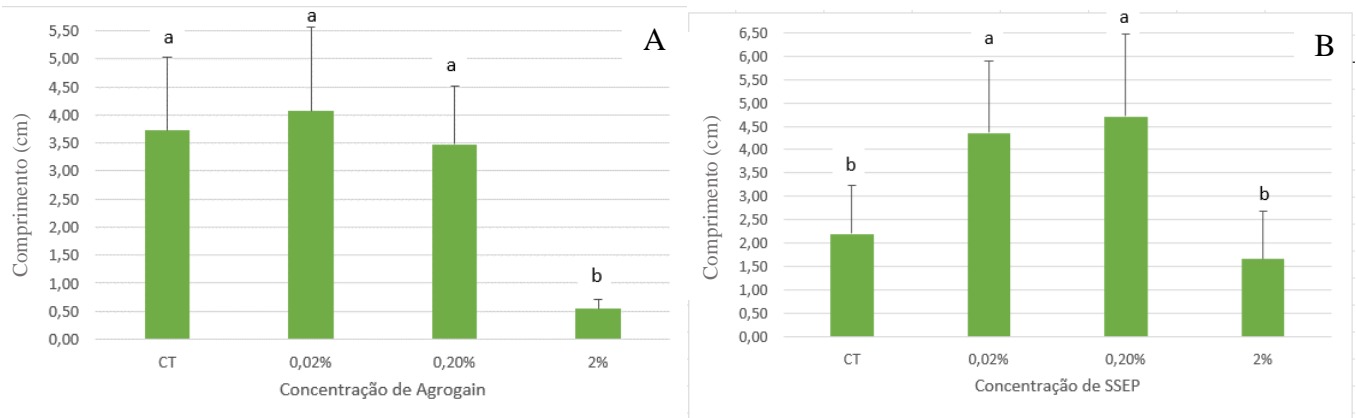


Figura 17: Comprimento das radículas de tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controle, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ), quando em comparação com o respetivo tratamento de controle. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

É possível observar pelos resultados obtidos que, mais uma vez, o extrato SSEP aparenta possuir efeitos mais benéficos, como descrito anteriormente.

#### d) Peso fresco do tomate

A figura 18 mostra o peso fresco das plântulas de tomate ao fim de 7 dias de ensaio.

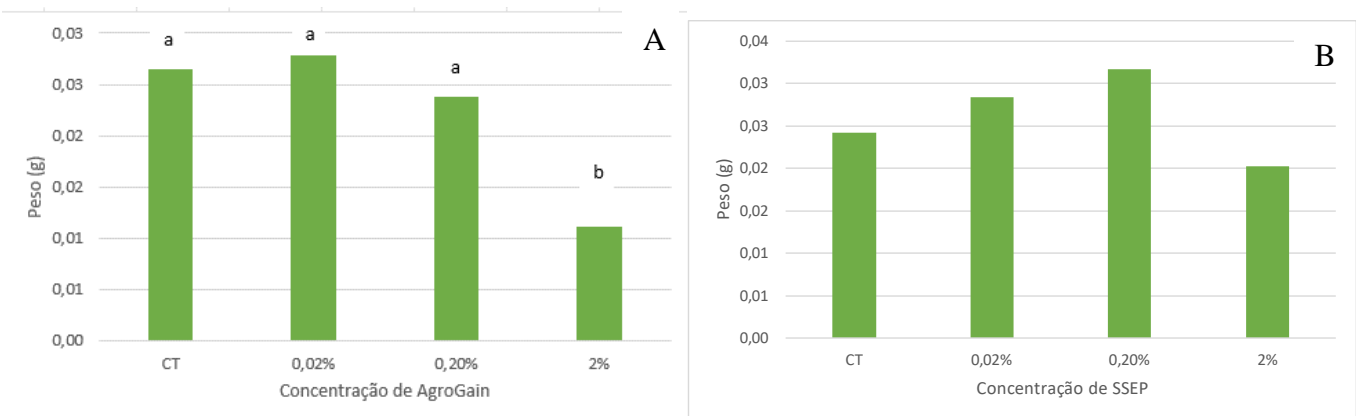


Figura 18: Peso fresco do tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controle, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Diferentes letras minúsculas representam diferenças

estatisticamente significativas ( $p$ -value $<0,05$ ), quando em comparação com o respetivo tratamento de controlo. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

Como observado na Figura 18, para o comprimento médio da radícula principal, o SSEP obtém melhores resultados com 2 concentrações acima do controlo, 0,02% e 0,2%, enquanto o extrato AgroGain apenas obtém um melhor resultado com a concentração 0,02%. Porém, para o extrato SSEP, as diferenças não são estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

#### e) Teor de humidade do tomate

A figura 19 mostra o teor de humidade das plântulas de tomate, ao fim de 7 dias de ensaio.

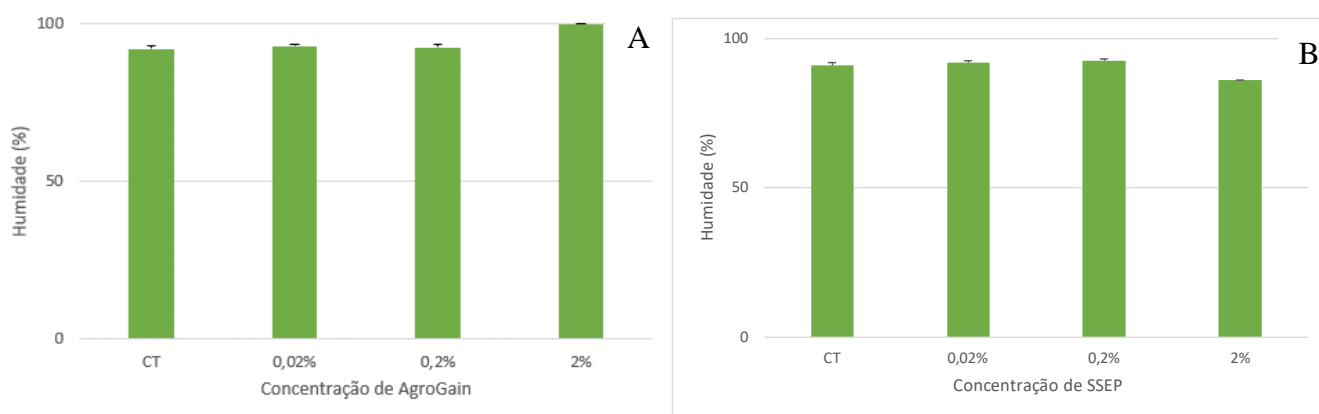


Figura 19: Percentagem de teor de humidade obtida para o tomate para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2%, realizada ao final de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

O teor de humidade entre as diferentes concentrações testadas e o controlo foi equivalente (Figura19), exceto na concentração 2%, onde no extrato AgroGain, resultou num teor de humidade maior que do que o controlo e no extrato SSEP onde os valores registados foram inferiores ao controlo. Estas diferenças não são, porém, estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

#### A. Percentagem de germinação de sementes de tomate embebidas em extrato

Para testar o método de exposição da semente ao extrato, decidiu-se embeber as sementes no próprio extrato, nas diferentes concentrações, em vez de se adicionar o extrato ao meio MS. Avaliou-se então, a percentagem de germinação das sementes de tomate. O controlo utilizado neste ensaio foram as sementes embebidas em água ultrapura. Para ambos os extratos em estudo, observou-se resultados estatisticamente significativos ( $p$ -value $<0,05$ ) ao segundo dia.

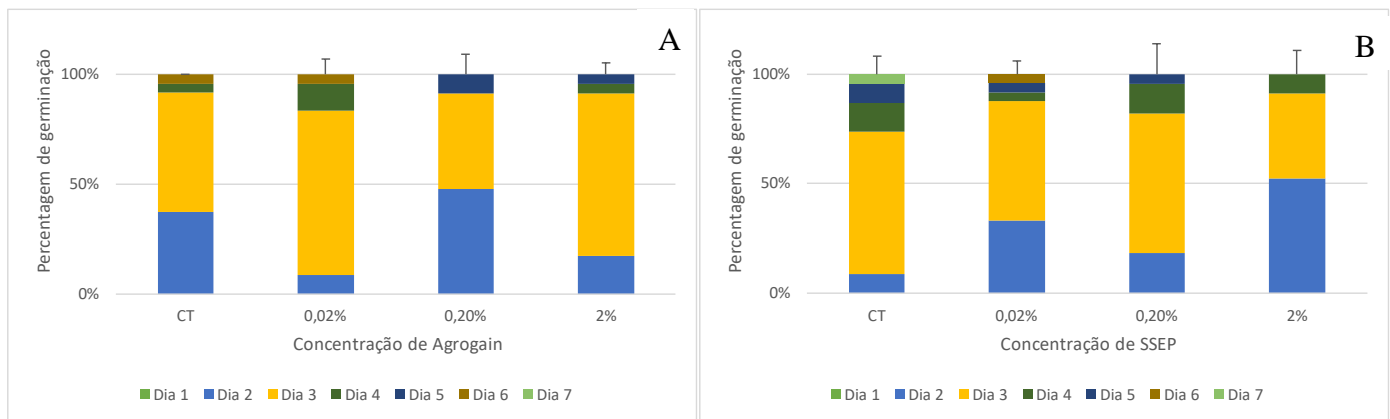


Figura 20: Percentagem de germinação de sementes de tomate para as concentrações CT- controlo, 0,02%, 0,2% e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B) embebidas na semente, ao longo de 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

É possível observar, através da figura 20, que para ambos os extratos em estudo as percentagens atingiram os 100% de germinação ao fim de 7 dias de estudo. Quando comparada a PG das sementes embebidas em extrato ou em extrato adicionado ao meio MS (Figura 15) pode-se concluir que não há diferenças de valores para as PG quando comparadas entre si ao final dos 7 dias de resultados. Ainda assim, para o estudo em análise, as sementes embebidas em extrato obtiveram melhores resultados de PG na concentração 0,02%, para AgroGain, obtendo 100%. Já para as concentrações 0,2% e 2% obtiveram-se PG de 96%, ainda que, ao fim de 2 dias, a concentração 0,2% tenha uma maior PG. Para SSEP a concentração 0,02% atingiu os 100% sendo que na concentração 2% obteve-se melhores resultados de PG ao segundo dia. Quando comparadas com o controlo, as concentrações obtinham a PG de 100%, na sua maioria, e em menos tempo que o controlo. Observando o controlo do ensaio com AgroGain (Figura 20A) obteve-se germinação até ao sexto dia, sendo que em duas das concentrações a germinação completa ocorreu até ao quinto dia. Para o controlo de SSEP (Figura 20B), os resultados foram registados até ao sétimo dia do estudo sendo que as PG de 100%, nas concentrações 0,02%, 0,2% e 2%, ocorreram até ao sexto, quinto e quarto dias, respetivamente. Logo, esta metodologia é benéfica para a germinação da semente, havendo uma clara antecipação do fenómeno de germinação, correlacionada com a concentração de extrato utilizada.

Tendo em conta os resultados obtidos, na comparação entre extrato algal inserido no meio ou sementes embebidas em extrato, para os ensaios seguintes, o método escolhido foi a embebição de sementes.

Foi ainda observado o estado fisiológico geral e o aspeto da planta ao final dos 7 dias de estudo para determinar que concentração usar para os restantes ensaios.

As observações, meramente visuais, indicaram que para as concentrações 0,02% e 0,2% não foram observadas diferenças nas plantas, mas para a concentração de 2% foi notória a diferença, como se pode confirmar nas fotos constantes da figura 21 e 22.

Quando o extrato se encontra no meio, a semente precisa de germinar, desenvolver radícula e só depois pode dispor dos nutrientes que, eventualmente, o extrato fornece. Por outro lado, quando aplicado o extrato na semente, a semente germina com o auxílio do extrato após a absorção do mesmo, assim, procurava-se uma concentração com maior impacto entre estas duas condições onde o extrato era inserido. A concentração 2% foi a concentração com um maior impacto visual e que mostrou plântulas com melhor estado fisiológico e sanitário (Figura 21 e 22). Obteve-se para o extrato AgroGain plântulas desenvolvidas com caulículos e folhas, para sementes embebidas em extrato, sendo que, com extrato inserido no meio apenas se observou germinação. Para o extrato SSEP observou-se maior estado sanitário nas placas, quando comparado com o extrato no meio. Portanto, a concentração foi escolhida para proceder os ensaios.

Extrato Algal AgroGain adicionado ao meio MS

Sementes de tomate embebidas em extrato algal AgroGain

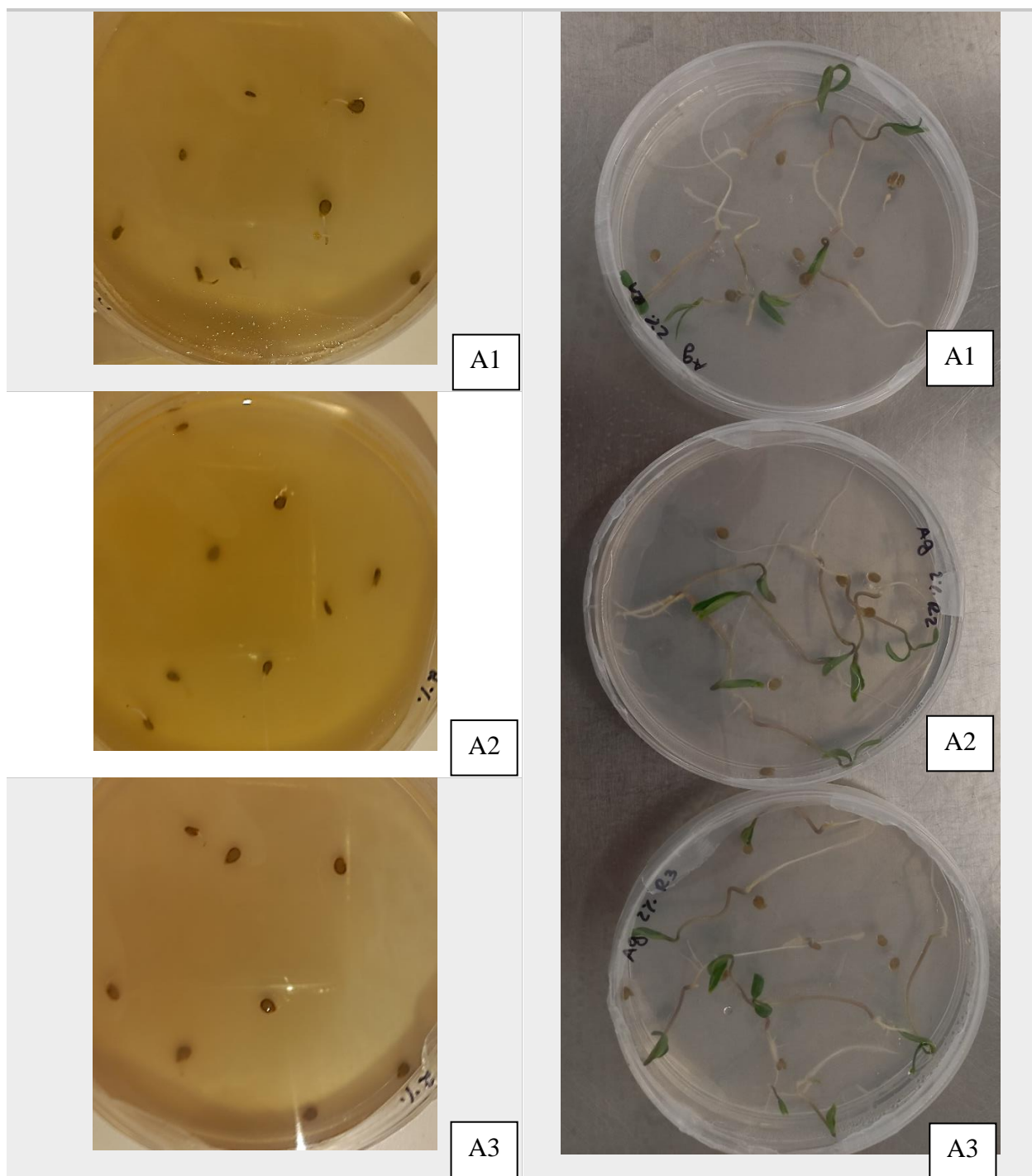


Figura 21: Diferenças do crescimento e desenvolvimento da planta para a concentração 2% no extrato AgroGain para os 3 ensaios realizados, ao fim de 7 dias, com 3 amostras (A1, A2 e A3).

**Extrato Algal SSEP adicionado ao meio MS Sementes de tomate embebidas em extrato algal SSEP**

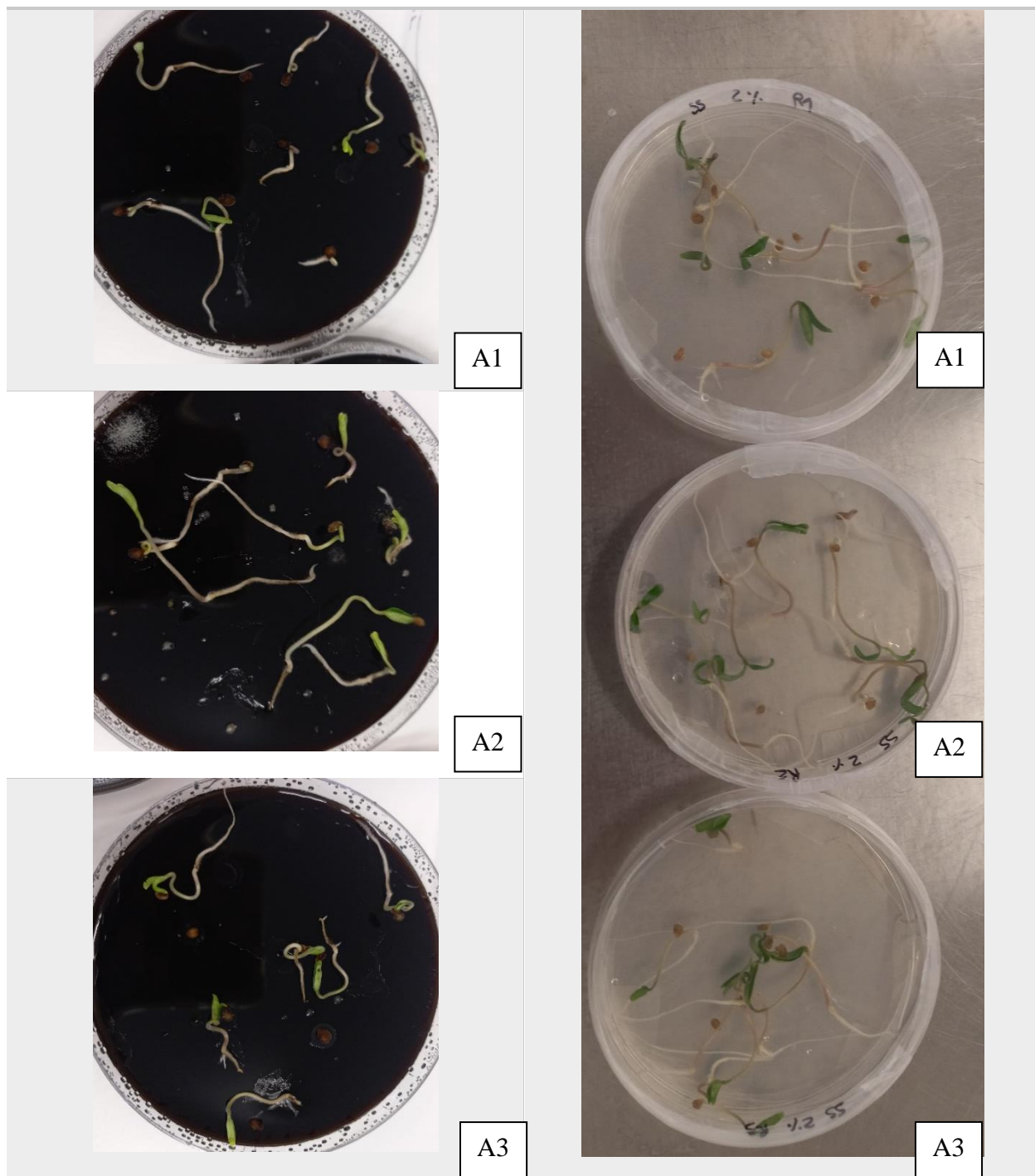


Figura 22: Diferenças do crescimento e desenvolvimento da planta para a concentração 2% no extrato SSEP para os 3 ensaios realizados, ao fim de 7 dias, com 3 amostras (A1, A2 e A3).

#### IV. Bioensaio para testes de stress: salinidade e calor

##### A. Ensaio de stress: avaliação do efeito da salinidade

Para os testes de stress foram testados dois fatores, a salinidade e a temperatura, realizados, para ambos os extratos e ambas as espécies em estudo. Para cada extrato realizou-se um controlo. No que se refere à salinidade apenas a concentração 5‰ obteve resultados. As restantes concentrações salinas de 15‰, 25‰ e 35‰ obtiveram germinação nula, seja para o tomate, seja para a alface.

##### a) Percentagem de germinação de tomate

A figura 11 mostra os resultados da germinação das sementes de tomate e alface em diferentes meios após 7 e 5 dias, respetivamente.

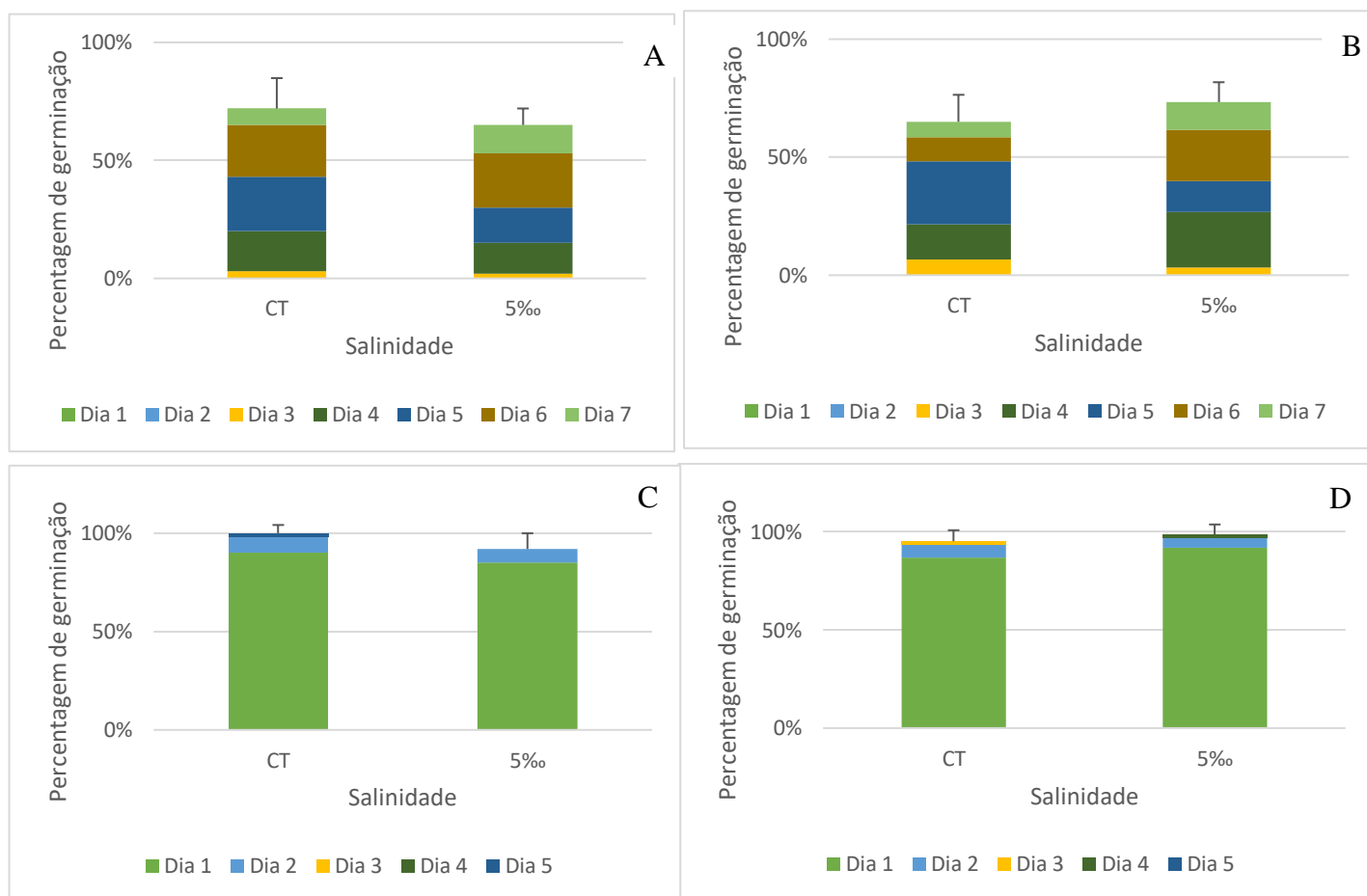


Figura 23: Percentagem de germinação para as sementes de tomate com extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e sementes de alface para o extrato AgroGain (C) e SSEP (D), para as concentrações CT- controlo, 5‰

solução salina de 5‰, ao longo de 7 e 5 dias respetivamente. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

De uma forma geral, para as sementes de alface, foi possível observar resultados perto dos 100% de germinação quando expostas a salinidade de 5‰. Para o extrato AgroGain (Fig, 23C), o controlo, obteve resultados de germinação mais elevados, chegando mesmo aos 100% de percentagem de germinação. Para o extrato SSEP (Figura 23D), as sementes embebidas em extrato e colocadas em meios com salinidade 5‰, obtiveram melhores resultados que o controlo, atingindo os 98% de germinação. Estas diferenças não são, porém, estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ). Estudos feitos com salinidade em alface mostraram que salinidades acima de 3‰ diminuem o rendimento da planta (Ünlükara et al., 2008). Tendo em conta os resultados obtidos, poderá observar-se que o extrato poderá ter beneficiado as sementes de alface uma vez que se obtiveram taxas de germinação de 100% para a salinidade de 5‰, especialmente na presença do extrato SSEP.

A PG foi visivelmente mais baixa para as sementes de tomate, provando que se trata de uma semente mais sensível. Os resultados obtidos são semelhantes aos observados para alface, sendo que, para o extrato AgroGain (Figura23A), o controlo obteve melhores resultados, com maior PG. Já para o extrato SSEP (Figura23B) as sementes tiveram melhores percentagens de germinação. Foi estudada a salinidade tolerada pelo tomate com concentrações de cerca de 3,5‰, sendo que, para esta concentração salina, apesar de tolerada, se observa uma perda do rendimento que ultrapassava os 50% (Singh et al., 2012), e para as concentrações 3,5‰ e 7‰ houve uma redução na germinação das sementes, e no peso fresco e seco de raízes e caules (Mustafa et al., 2021). A PG de tomate obteve, no extrato AgroGain, para o controlo e para as sementes embebidas em extrato, 72% e 65%, respetivamente. Já o extrato SSEP obteve uma PG de 65% e 73%, para controlo e sementes embebidas, respetivamente. De facto, o tomate, quando comparando a PG deste ensaio, com um dos anteriores com um meio não salino, a PG desce cerca de 30-35%, sendo que o estudo decorreu com salinidade de 5‰, 1,5‰ a mais do que o tolerado pelo tomate segundo a literatura. Assim, o extrato algal, especificamente o SSEP, poderá ter beneficiado as plantas no que toca à diminuição do stress causado pela salinidade.

Uma possível explicação para a ausência de resultados nas salinidades restantes, poderá ser a pressão osmótica, uma vez que quanto maior a concentração da solução salina, maior é a

percentagem de cloreto de sódio presente influenciando negativamente as relações minerais-nutrientes na planta (Shukla et al., 2018). A relação entre as células e a água é prejudicada por este desequilíbrio entre água e cloreto de sódio, conseqüentemente, inibe a expansão celular e reduz a taxa de crescimento, dado que, quando as sementes são expostas a alta salinidade, a pressão osmótica interfere na função da membrana, reduzindo a atividade metabólica e podendo, conseqüentemente, originar a morte celular (Shukla et al., 2019) através da acumulação tóxica de iões de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Dell'aversana et al., 2021). Poderá assim colocar-se em hipótese que as concentrações 15‰, 25‰ e 35‰ testadas podem ter sido nefastas para as sementes. Apesar destes dois iões referidos por vezes não se encontrarem em concentrações tóxicas, não significa que não tenham conseqüências para a planta.  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  causam, como indicado, pressão osmótica e inibem o crescimento dos tecidos através de desequilíbrios nutricionais (Dell'aversana et al., 2021). Assim, agregando a sensibilidade do tomate, como indicado anteriormente, justificar-se-iam os resultados de germinação mais baixos quando comparado a um meio não salino. Ainda assim, para ambas as espécies de sementes usadas, o extrato SSEP foi o que apresentou resultados superiores ao controlo e a macroalga nele presente, *A. nodosum*, é já estudada e conhecida, por diminuir a acumulação de  $\text{Na}^+$  nas folhas e a sua absorção nas raízes (Dell'aversana et al., 2021). De facto, o estudo de (Shukla et al., 2019) usando a macroalga *A. nodosum*, comprova que a redução de efeitos nocivos da salinidade nas plantas, pode ser conseguida através do melhoramento do crescimento das raízes, pela absorção de nutrientes e transferência dos mesmos da raiz para a planta. Em suma, poderá ser uma hipótese, o extrato SSEP oferecer um acréscimo da capacidade de resistência das sementes devido a presença de substâncias como o ácido abscísico presente na macroalga. Esta hormona fornece proteção contra fatores externos e estimula a resposta de combate ao stress (Tan et al., 2021; Thomas et al., 2016).

#### b) Comprimento das radículas de alface

A figura 24 mostra o comprimento da radícula principal das plântulas de alface germinadas ao fim de 5 dias de ensaio.

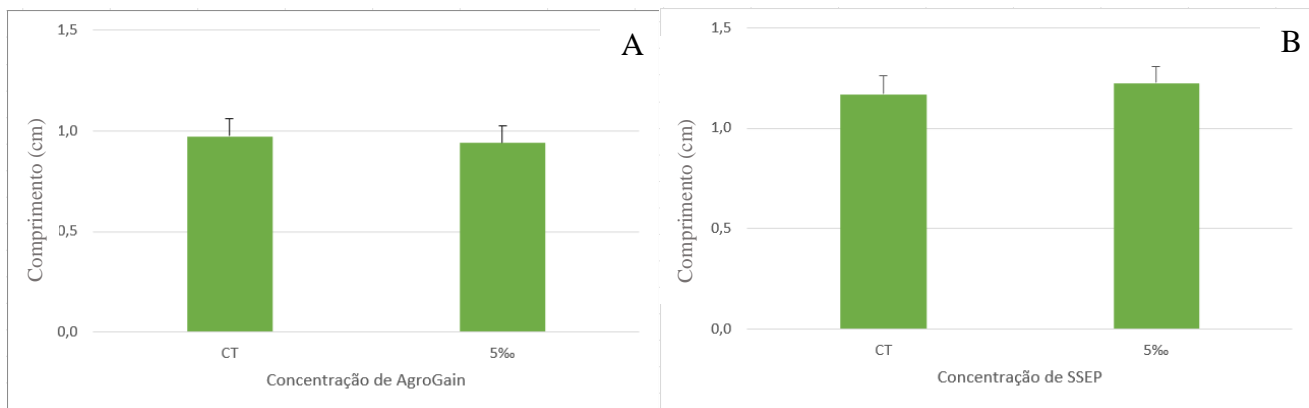


Figura 24: Comprimento das radículas da alface, para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT- controle, 5‰ – solução salina 5‰, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

Através da medição da média do comprimento da radícula principal da alface, foi possível observar resultados positivos para o extrato SSEP (Figura 24B), tendo as plantas expostas a este extrato, radículas mais longas, do que as plântulas provenientes de sementes embebidas em água ultrapura. Já para o extrato AgroGain (Figura 24A), o controle foi apenas ligeiramente mais elevado. Não existem, portanto, diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ) para nenhum dos extratos usados.

Como descrito no parâmetro acima, a hormona ácido abscísico, conhecida como estando presente no extrato SSEP promove a resposta da planta para combate do stress (Tan et al., 2021; Thomas et al., 2016).

#### c) Medição de caulículos e radículas de tomate

A figura 25 mostra o comprimento da radícula principal e do caulículo das plântulas de tomate germinadas ao fim de 7 dias de ensaio.

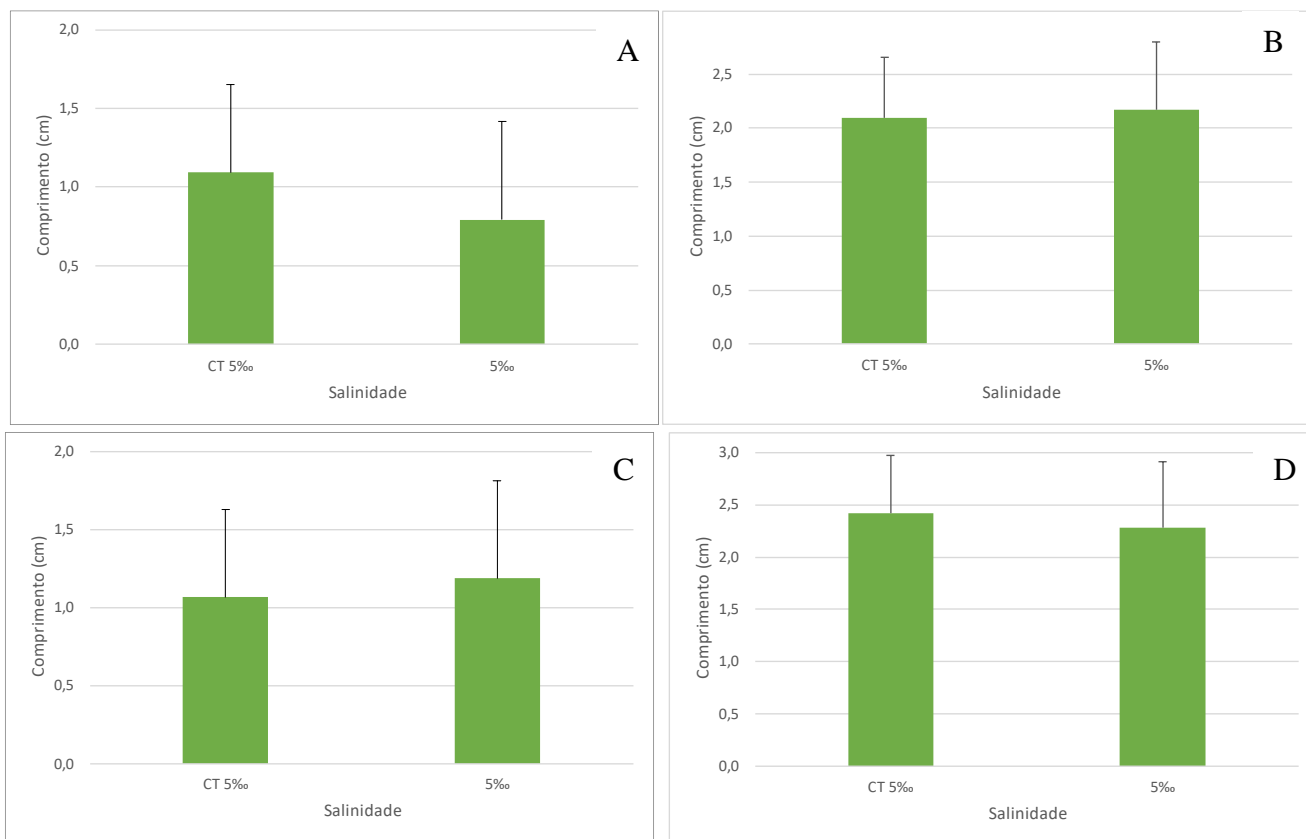


Figura 25: Comprimento dos caulículos (A) e da radícula (B), em plântulas de tomate, para o extrato AgroGain e comprimento dos caulículos (C) e da radícula (D) de tomate, para SSEP, nas concentrações CT- controle, 5‰ – solução salina 5‰. Análises realizadas após 7 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

O extrato AgroGain (Figura 25A-B), originou um comprimento da radícula principal mais elevado do que o controle; por outro lado, o controle obteve melhores resultados no comprimento do caulículo. Para o extrato SSEP (Figura 25C-D), em comparação com o extrato AgroGain, os resultados obtidos foram o inverso, obtendo-se caulículos mais compridos no extrato e radículas mais compridas no controle. Estas diferenças não são, porém, estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Os resultados obtidos para o tomate e para a alface, comparando o parâmetro comprimento da radícula principal, foi contrário sendo que, para a alface o extrato mais benéfico foi o SSEP e para o tomate o AgroGain. Diferentes extratos, em diferentes plantas, mostram, pois, originar resultados diferentes. Estudos realizados com sementes de tomate embebidas em extrato de A.

*nodosum*, com salinidade de 5 e 10 ‰, mostraram obter melhores resultados de comprimento de radícula e caulículo para as sementes embebidas em extrato a 0,5% (Ali et al., 2018). De facto, para o extrato AgroGain, as sementes embebidas em extrato obtiveram melhores resultados que o controlo no parâmetro das radículas.

Extrato algal de *A. nodosum*, usada no extrato comercial SSEP, foi testado em *Arabidopsis thaliana*, numa solução salina de 5‰, comprovando-se que melhorou o crescimento e desenvolvimento da planta através do aumento do comprimento da radícula em presença de meio salino (Shukla et al., 2018). Comparando aos resultados obtidos para a mesma macroalga pode-se observar um comprimento de radícula maior quando embebida a semente em extrato, ao invés de água ultrapura, com valores de 1,22 cm e 1,17 cm, respetivamente para a alface (figura 24B), não se obtendo valores positivos para o tomate (figura 25D). Nos parâmetros analisados, o comprimento das radículas de alface e tomate, é possível afirmar que as plantas fazem a absorção de água e nutrientes através das raízes (M. Singh et al., 2015). Assim, quando expostas ao extrato, verifica-se um benefício no desenvolvimento e crescimento das raízes, com uma maior área de superfície radicular, em comparação com o controlo. Tal beneficiará a absorção de nutrientes pela planta.

Os sais são deslocados das raízes para os caules e a elevada acumulação de sal nas células pode diminuir a eficiência da fotossíntese das plantas (M. Singh et al., 2015). Apesar dos valores obtidos para a medição da radícula não ter sido promissor para o extrato SSEP, os valores do comprimento do caulículo do tomate para o mesmo extrato foram superiores ao controlo, 1,188g e 1,068g, respetivamente. Já o extrato AgroGain não obteve resultados positivos para a medição do caulículo.

#### d) Peso fresco

A figura 26 mostra o peso das plântulas de alface e tomate germinadas ao fim de 5 e 7 dias de ensaio, respetivamente.

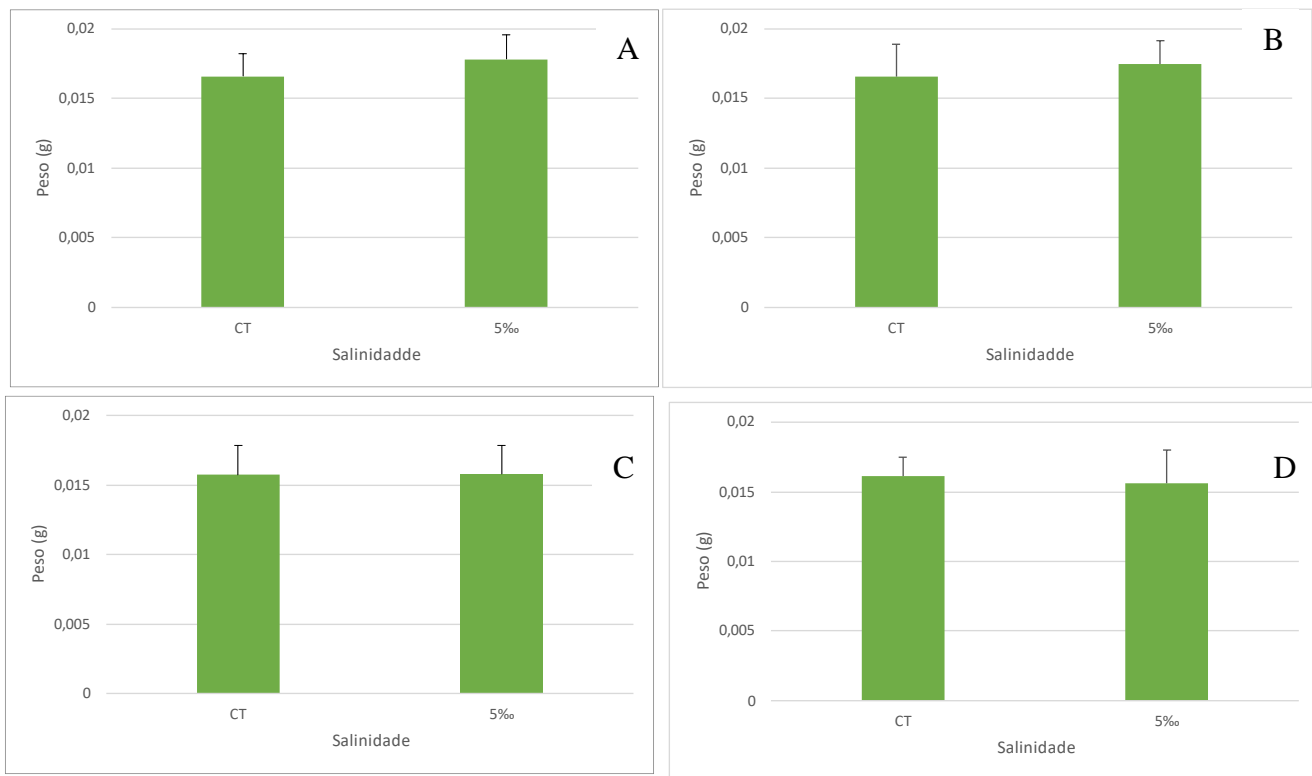


Figura 26: Peso fresco para plântulas alface, com extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e plântulas de tomate para o extrato AgroGain (C) e SSEP (D), para as concentrações CT- controle, 5‰ – solução salina de 5‰, ao longo de 5 e 7 dias respectivamente. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

A planta que apresentou maiores diferenças entre o controle e o extrato foi a alface, ainda assim, estas diferenças não são estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ). Para o extrato AgroGain e para o extrato SSEP (Figura26A-B), é possível observar valores mais elevados nas sementes embebidas em extrato, comparativamente com o controle. Por outro lado, para o tomate, os extratos AgroGain e SSEP (Figura 26C-D) obtiveram valores muito semelhantes, onde o controle, para o AgroGain, apresentou plântulas com um peso 0,001g superior à média e para o SSEP as plântulas registaram um peso 0,001g inferior à média.

Apesar de nas sementes de alface, a percentagem germinação do AgroGain ser mais baixa nas sementes embebidas no extrato do que no controle, o peso das sementes germinadas é maior do que o controle.

Estudos com *Arabidopsis thaliana*, usando a macroalga *A. Nodosum*, presente em SSEP, mostrou que a presença de 5‰ de solução salina reduzia severamente o peso fresco e seco das plantas, mas quando aplicada uma concentração de 0,1% de extrato, melhorava o peso fresco e seco da planta (Shukla et al., 2018). Comparando com os valores em estudo, para o tomate (Figura 26D), os valores foram iguais para o controlo e as sementes embebidas em extrato, com valor de 0,016g. Já para a alface (Figura 26B) os valores foram de 0,017g para o controlo e 0,018g para sementes embebidas em extrato. Ao contrário do que Shukla et al., 2018 obteve, portanto, não se registou um aumento significativo no peso das plantas submetidas a stress salino.

#### e) Teor de Humidade

A figura 27 mostra percentagem teor de humidade das plântulas de alface e tomate ao fim de 5 e 7 dias de ensaio, respetivamente.

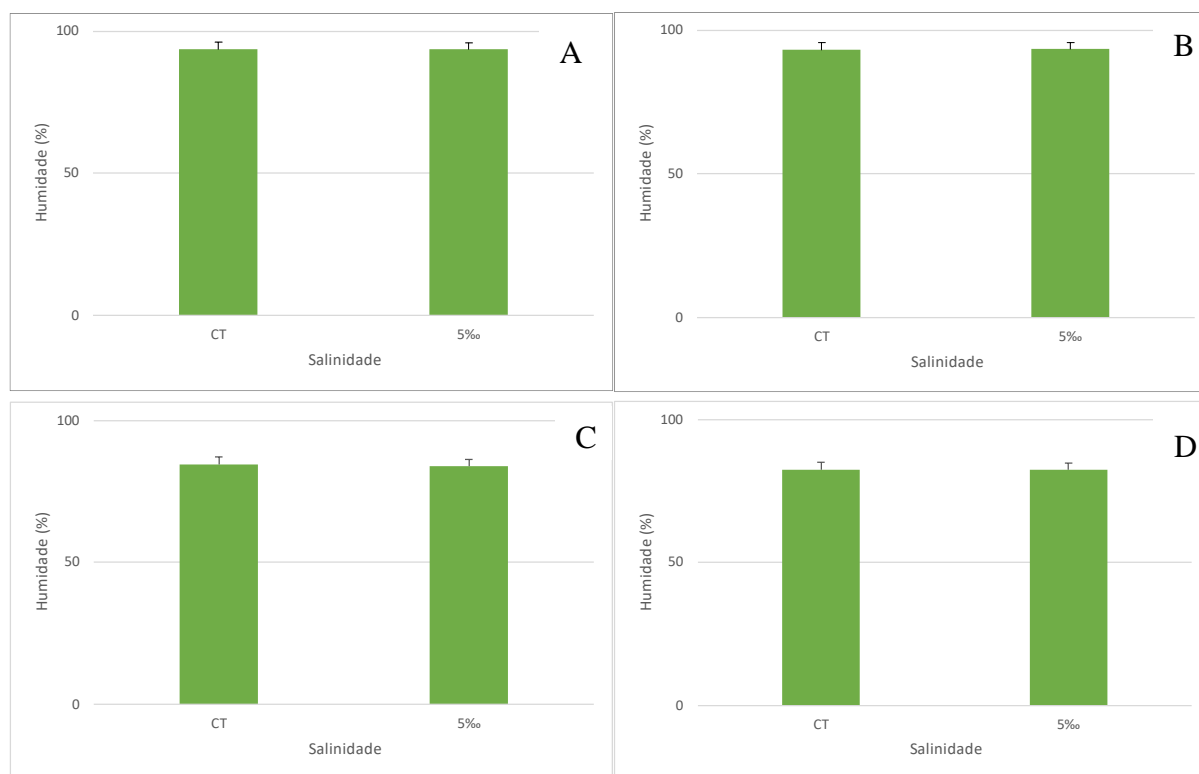


Figura 27: Teor de humidade obtida, para a alface com o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) e o tomate com o extrato AgroGain (C) e SSEP (D) nas concentrações CT- controlo, 5‰ – solução salina 5‰, realizada ao final de 5 e 7 dias, respetivamente. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

Relativamente ao teor de humidade, para ambos os extratos e para ambas as plantas (Figura 27) os valores foram semelhantes, entre o controlo e as sementes embebidas no extrato. Não houve diferenças significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

#### B. Ensaio de stress: avaliação do efeito da temperatura

Para os testes de stress foi, como referido, avaliado também o efeito da temperatura, tendo sido testados valores de 35°C, para ambos os extratos e ambas as plantas. Porém, apenas as sementes de alface germinaram, pelo que apenas podemos discutir estes resultados. A semente de tomate, novamente, mostra maior sensibilidade quando os valores de temperatura saem fora da sua amplitude térmica, sendo que a temperatura máxima tolerada pelo tomate é de 29,5°C.

#### f) Percentagem de germinação de alface a 35°C

A figura 28 mostra a percentagem de germinação das sementes de alface ao fim de 5 dias de ensaio. Para ambos os extratos algais não houve diferenças significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

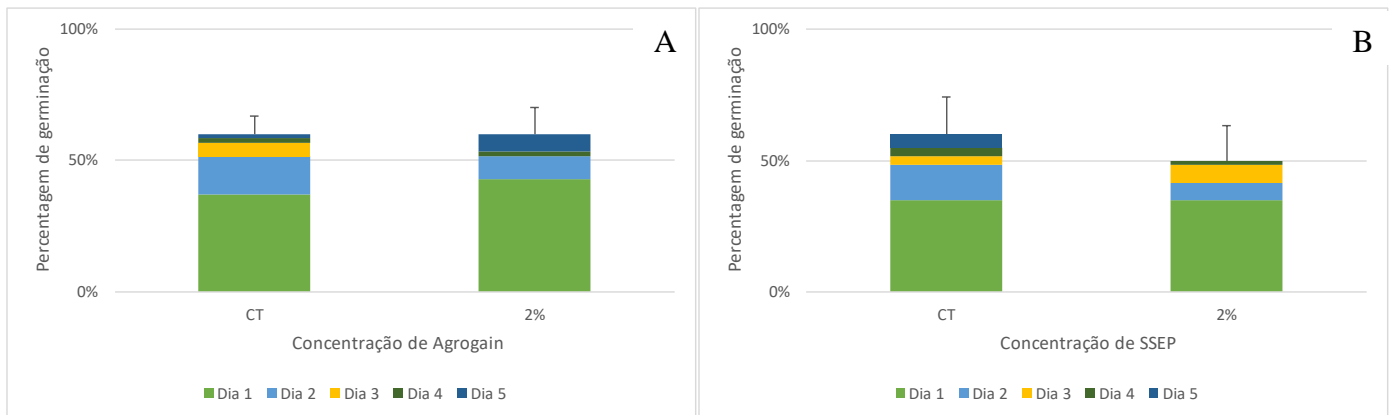


Figura 28: Média  $\pm$  desvio padrão da percentagem de germinação (%) de sementes de alface, para as concentrações: CT- controlo e 2% para o extrato algal AgroGain (A) e SSEP (B), ao longo de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ).

O extrato algal de AgroGain (Figura 28A), obteve resultados semelhantes entre o controlo e a concentração de extrato 2%. Já o extrato SSEP (Figura 28B), teve valores de PG mais elevados no controlo. Ou seja, os extratos não interferem de forma positiva na germinação, em situações de stress térmico. Foi usada a temperatura 35°C, e como referido anteriormente, a temperatura máxima tolerada pelo tomate é 29,5°C (Labouriau & Osborn, 1984). Por ser uma planta muito sensível,

nenhuma das sementes de tomate germinou. No entanto, para a alface, apesar da temperatura ideal rondar os 20°C (Nascimento & Daniel, 2002), foram observados alguns resultados, ainda que, não os esperados, já que para o extrato SSEP, por exemplo, o controlo obteve resultados mais elevados quando comparado ao extrato. Uma hipótese para explicar estes resultados poderá ser a degradação dos extratos algais por exposição à temperatura. Porém, não tendo sido efetuadas análises químicas aos extratos, não podemos comprovar esta hipótese.

### g) Comprimento das radículas de alface

A figura 29 mostra o comprimento das radículas, de plântulas de alface, ao fim de 5 dias de ensaio.

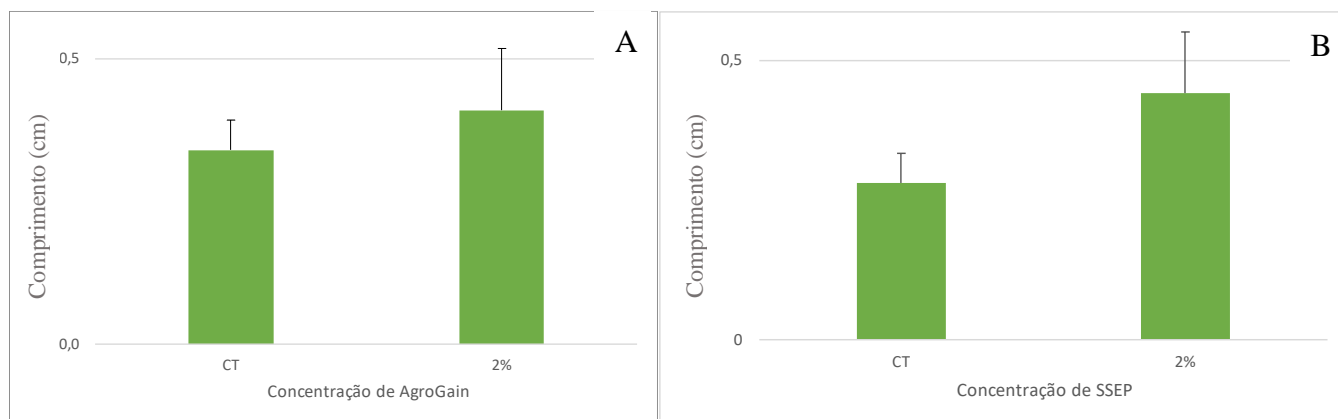


Figura 29: Média  $\pm$  desvio padrão do comprimento das radículas da alface, para plântulas em extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações: CT- controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

Ambos os extratos obtiveram resultados mais interessantes na concentração 2% (Figura 29), ainda que estas diferenças não sejam estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ). Apesar dos extratos não terem interferido de forma positiva na germinação, a média do comprimento da radícula das plântulas germinadas obteve resultados mais expressivos. A composição dos extratos algais, quando exposto a temperaturas mais elevadas, poderá sofrer alterações, e, portanto, influenciar o comportamento dos compostos em estudo.

#### h) Peso fresco da alface

A figura 30 mostra o peso médio das plântulas de alface ao fim de 5 dias de ensaio.

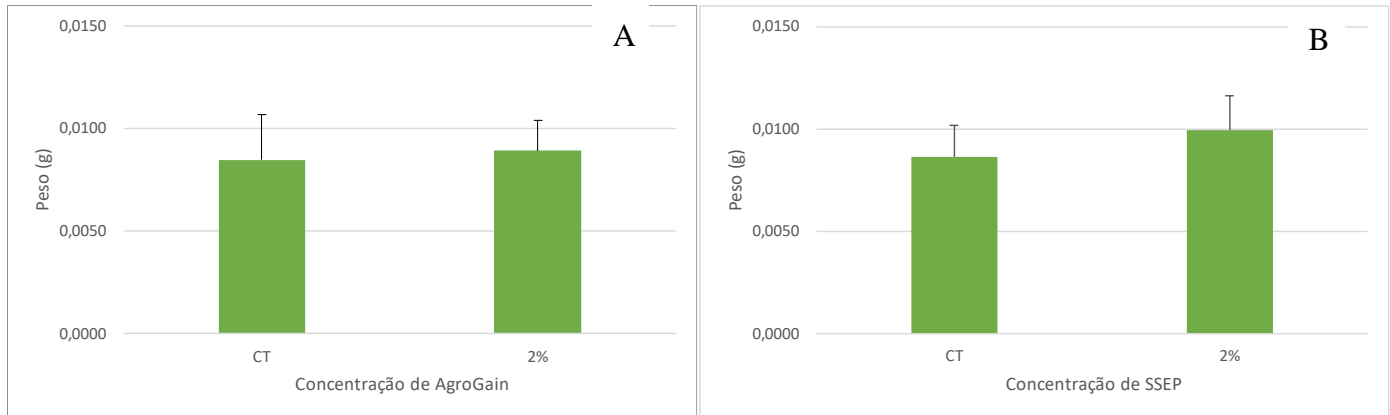


Figura 30: Média do peso fresco da alface para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações CT-controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

Neste parâmetro, ambos os extratos algais obtiveram melhores resultados, do que o controlo (Figura 30), obtendo-se para o controlo e a concentração de 2% do AgroGain, 0,0085g e 0,0089g, respetivamente. Já para o extrato SSEP, o controlo e a concentração usada obtiveram 0,0086g e 0,0099g, respetivamente. O extrato SSEP obteve um resultado ligeiramente mais elevado, ainda que não existam diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

#### i) Teor de Humidade

A figura 31 mostra a percentagem de humidade das plântulas de alface ao fim de 5 dias de ensaio.

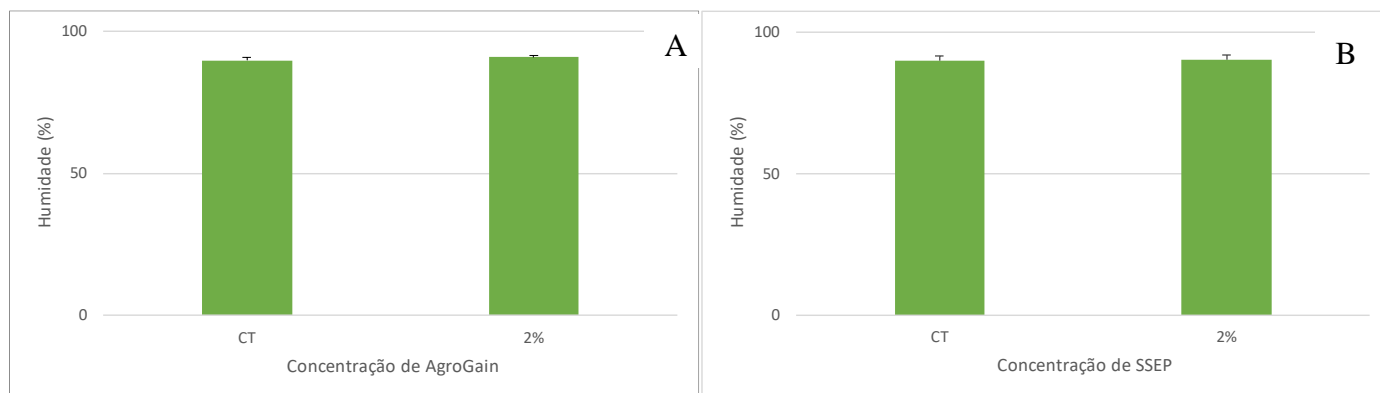


Figura 31: Teor de humidade da alface para o extrato AgroGain (A) e SSEP (B) nas concentrações: CT- controlo e 2%, realizada ao final de 5 dias. Os valores indicados referem-se a média  $\pm$  desvio padrão (n=6).

Os resultados obtidos para o teor de humidade (Figura 31), para ambos os extratos, foi equivalente entre o controlo e a concentração de extrato de 2%, sendo que, neste caso se obtiveram valores de humidade superiores em cerca de 1%. Não existem, portanto, diferenças estatisticamente significativas ( $p$ -value  $>0,05$ ).

De forma geral, os extratos de macroalgas interferiram com os resultados dos bioensaios realizados. O extrato algal AgroGain, com a macroalga *K. alvarezii*, possui naturalmente na sua composição auxinas, citocininas e giberelinas, sendo conhecido no grupo de algas vermelhas ainda a presença de ácido jasmónico. Para o extrato SSEP, composto pela macroalga *A. nodosum*, encontra-se as citocininas, o ácido abcísico e as giberelinas, onde, no grupo de algas castanhas, apenas faltaria observar as auxinas (Tarakhovskaya et al., 2007; Wally et al., 2013). A base para uma germinação e crescimento mais favorável do que nos controlos, já poderia ser esperado uma vez que as giberelinas estimulam a germinação de sementes. Isto verificou-se, de facto, no ensaio de otimização da concentração ótima, para as concentrações 0,02%, 0,2% e 2% de extrato algal.

As auxinas auxiliam o crescimento da planta, as citocininas auxiliam o crescimento de caules e podem ajudar a tolerar stress externo, e os ácidos abcísico e jasmónico estimulam respostas ao stress (Gary Loake, Priya Ayyar, 2017; Tan et al., 2021; Tarakhovskaya et al., 2007; Thomas et al., 2016). Efetivamente, estas fito-hormonas poderão ter sido responsáveis pelos resultados num todo, mas especificamente, nos ensaios de stress como temperatura e salinidade para a alface, sendo a espécie que obteve resultados para ambos os ensaios.

Portanto, desde promover a germinação, o desenvolvimento e a tolerância ao stress, as macroalgas usadas eram promissoras. De acordo com a bibliografia, as duas macroalgas descritas possuem a mesma fito-hormona responsável pela germinação das sementes, as giberelinas, no entanto, foi possível observar resultados diferentes, sendo isto, possivelmente, devido a uma diferença de concentração ou de molécula presente, em cada macroalga. O extrato SSEP foi o extrato que, de forma global, ofereceu melhores resultados, observando-se melhores percentagens de germinação, maior comprimento de caules e de raízes, e ainda, melhor estado fisiológico e sanitário da planta, em comparação com o AgroGain. Poderá isto justificar-se com a potencial presença da fito-hormona característica a macroalga, o ácido abscísico, uma vez que protege contra fatores externos e estimula a resposta ao stress (Tan et al., 2021; Thomas et al., 2016).

Várias referências indicam que, quanto menor a concentração do extrato, melhores os resultados obtidos, com o por exemplo o trabalho de Ali et al., (2018), quando comparado com concentrações elevadas, e isso foi comprovado pelo primeiro bioensaio realizado. Resultados obtidos por L. Silva, (2015) com concentrações de extrato aquoso bruto e processado de *A. nodosum* a 25%, 75% e 100%, embebido em papel de filtro, mostraram que a germinação de semente de alface não foi promovida em relação ao controlo, tendo a concentração de 100% obtido resultados de germinação abaixo do controlo em cerca de 20%. Assim a ideia de que concentrações mais baixas são mais benéficas foi reforçada. Por outro lado, estudos realizados usando extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*, pertencentes à mesma classe de *K. alvarezii*, sendo ambas da família Gracilariaceae (WoRMS Editorial Board, 2022), onde foram usadas concentrações de extrato aquoso de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5% em microplacas, apesar de não terem obtido resultados positivos na germinação em relação ao controlo, segundo Torres et al., (2018), mostraram resultados promissores no desenvolvimento da alface, designadamente no comprimento das radículas e caulículo. Baixas concentrações, para além de serem mais benéficas para a semente, são também vantajosas a nível financeiro e ambiental, dado que, é necessária pouca quantidade para se obterem bons resultados, favorecendo, portanto, uma colheita ambientalmente sustentável, já que algumas das algas usadas como bioestimulantes, como seja o *A. nodosum*, são colhidas na natureza.

No que se refere à utilização de sementes desinfetadas, foram desenvolvidos estudos por Popescu, (2016) com sementes de tomate desinfetadas e com extrato aquoso de *A. nodosum*, usando

extrato a 0,1% e 0,5% em papel de filtro e embebido diretamente nas sementes, com duas variantes de tempo, sendo elas 1 minuto ou 24 horas, onde o controlo foi papel de filtro embebido apenas em água destilada. Os resultados obtidos para PG não foram estatisticamente significativos ( $p$ -value  $>0,05$ ). De acordo com Popescu, (2016), no comprimento de radícula principal, sementes embebidas por 1 minuto, obtiveram melhores resultados do que os restantes, no entanto, para o comprimento dos caulículos foi possível observar uma diferença clara nas sementes embebidas pelo extrato, com ambos os tempos, obtendo assim melhores resultados para sementes embebidas no mesmo. Estes resultados são consistentes com os obtidos no presente trabalho, já que se comprovou que sementes embebidas no extrato obtêm melhores resultados quando comparado com o extrato inserido no meio. Como já observado, nas percentagens de germinação de sementes de alface e de tomate, utilizando extratos de *Gracilaria gracilis*, pertencente à mesma classe da macroalga vermelha em estudo e da família Gracilariaceae (WoRMS Editorial Board, 2022), os extratos não se mostraram benéficos ou relevantes, segundo Demir et al., (2006). Em todas as referências bibliográficas referidas, o extrato algal de macroalgas vermelhas não é considerado benéfico na germinação de sementes. De facto, comparando os dois extratos usados em estudo, o SSEP, da macroalga *A. nodosum*, uma alga castanha, obtêm de forma geral melhores resultados de germinação, mesmo em ensaios de stress de salinidade, sendo o único extrato a obter melhores resultados que o controlo. Ainda assim, a obtenção de menor percentagem de germinação não significa resultados menos interessantes, já que outros dos parâmetros analisados exibem, por vezes resultados mais vantajosos, nomeadamente o comprimento da maior radícula, do caulículo ou o peso fresco. Por esse motivo, os extratos algais enquanto bioestimulantes poderão ser benéficos para plantas já germinadas, para o seu desenvolvimento, por métodos de rega ou por aplicação foliar.

Os stresses abióticos como a temperatura e a salinidade, levam ao aumento do stress oxidativo acumulando  $O_2$  e  $H_2O_2$ . Esta acumulação danifica lípidos, hidratos de carbono, proteínas, entre outros (Khan et al., 2009). Duas enzimas antioxidantes presentes no sistema de defesa das macroalgas são a enzima ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). A enzima APX converte, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), em água e a enzima CAT, converte  $H_2O_2$  em água e dióxigénio ( $O_2$ ) (Rezayian et al., 2019). Assim, no estudo indicado, os extratos de macroalgas AgroGain e

SSEP foram testados tanto no stress salino como no stress térmico, tentando aferir o efeito destes extratos na resposta das plantas ao stress.

Para ensaios de stress salino, foi possível observar resultados positivos para *A. nodosum* com sementes de tomate desinfetadas e embebidas no extrato a 0,5% (Ali et al., 2018). Foram usadas soluções salinas de 5‰ e 10‰, tendo, em ambos os casos, o extrato obtido melhores resultados que o controlo, ainda assim, as percentagens de germinação rondaram os 50 a 60%, metade da PG obtida quando comparado com a PG em meio não salino. Estas percentagens de germinação estão em concordância com resultados obtidos no presente estudo, no qual a percentagem de germinação do tomate rondou igualmente os 60%, para a mesma macroalga, e para as sementes de tomate submetidas a desinfecção e embebição de extrato. Esperava-se, efetivamente, uma germinação menor, já que as sementes estão em situação de stress. Nestas circunstâncias, de facto, o extrato mostrou-se eficiente na resposta ao stress, dado que os resultados obtidos para o comprimento da radícula e do caulículo foram melhores quando comparados com o controlo. Estudos realizados com sementes de tomate mostraram que o uso de extratos algais, especificamente *A. nodosum*, aumentam a atividades das enzimas CAT e APX quando expostas a stress e, permitem assim, obter um desempenho significativamente melhor quando comparado com os controlos (Ali et al., 2018). Já com a macroalga *K. alvarezii* foi comprovada a reduzida formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, quando usada como bioestimulante em plantas de trigo expostas a salinidade de 8‰ (Patel et al., 2018). Portanto, o facto de as macroalgas terem enzimas como a APX, que converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água, e a enzima CAT, que transforma em água e O<sub>2</sub>, faria com que fosse espectável obter melhores resultados. Apesar de existirem estudos que comprovam a presença dos compostos anteriormente descritos nas macroalgas, inclusive as fito-hormonas, a estrutura química das mesmas pode ser diferente, gerando substâncias distintas e, portanto, obter-se resultados diferentes dos esperados quando comparado com as funções das mesmas nas plantas.

As diferentes respostas das plantas expostas aos extratos SSEP e AgroGain pode, também, dever-se à diferente composição química dos próprios extratos algais. Para ambos os extratos é possível observar, por exemplo, nitrogénio e potássio e especificamente para cada um deles, magnésio para SSEP e fosfato para AgroGain. O nitrogénio é essencial para a síntese dos pigmentos fotossintéticos e coenzimas, entre outras moléculas (Maathuis, 2009) e a sua deficiência pode causar uma diminuição de área foliar e raízes com menos espessura (Chen et al., 2018). O potássio

é conhecido por auxiliar o crescimento nas plantas (Maathuis, 2009) e a sua ausência faz-se sentir igualmente no crescimento da planta originando plantas mais baixas, com menos rebentos e menor área foliar (Chen et al., 2018). Presente no AgroGain, o fosfato é conhecido por ser armazenado nas sementes para posteriormente promover a germinação e o crescimento (Maathuis, 2009), portanto, agregado à presença das fito-hormonas, naturalmente presentes na macroalga, deveria potenciar a germinação. De igual forma, o magnésio, presente no extrato SSEP, é considerado muito importante na fotossíntese (Maathuis, 2009). Portanto, esta diferente composição pode ter influenciado os resultados obtidos, sendo que, no ensaio para otimização da concentração de extrato foi visível a diferença entre os dois extratos.

É importante ressaltar que diferentes macroalgas, mesmo pertencendo à mesma classe, têm composições químicas diferentes. Por outro lado, o método de extração influencia, também, grandemente, a composição química dos extratos, tornando os extratos únicos e com características diferentes. Assim, o uso da mesma macroalga para obtenção de extrato com métodos distintos poderá ter resultados diferenciados. Por outro lado, outro aspeto que poderá fornecer resultados particulares é a fase de crescimento da planta onde o extrato é aplicado e quanto tempo ele permanece ativo em benefício da planta (Battacharyya et al., 2015). Ou seja, mesmo que um extrato não seja benéfico na germinação da semente, por exemplo, não significa que não o seja para o desenvolvimento da planta, como observamos para o extrato AgroGain.

Dando o estudo como terminado, e de forma geral, podemos constatar que os extratos algais têm efeito bioestimulante, em várias vertentes. Potenciam a germinação de sementes, favorecem o crescimento da radícula e, por vezes, do caulículo, e podem aumentar o peso da planta. São, comprovadamente, eficazes em baixas concentrações. No que se refere ao efeito sobre o stress, mais testes teriam de ser realizados, mas do que foi possível concluir, o extrato SSEP mostrou-se mais eficaz no aumento da resposta ao stress por parte das plantas. Finalmente, a realização do passo de desinfeção das sementes e do meio mostrou-se relevante para a prevenção das contaminações.

## ***Conclusões***

Em suma, os extratos algais AgroGain e SSEP deverão possuir fito-hormonas como as giberelinas, a hormona responsável pela germinação das sementes, já que ambos os extratos promovem a germinação das plantas estudadas. No entanto, esta fito-hormona poderá ter concentrações diferentes consoante o taxa/a divisão ao qual a macroalga pertence, e ainda, serem molecularmente distintos das plantas, dado os resultados obtidos.

Seria espectável constatar a presença de fito-hormonas de crescimento presentes nas macroalgas, como as giberelinas, responsável pela germinação de sementes ou até mesmo o ácido abscísico que estimula a proteção da planta contra fatores externos como o stress. Em conjunto com a composição dos extratos e as enzimas APX e CAT, os extratos algais possuem grande potencial enquanto bioestimulante.

O extrato puro de macroalga mostra-se inibitório, exibindo valores de germinação das sementes consideravelmente mais baixos do que o controlo, uma vez que auxinas em excesso poderá ser tóxica. Conclui-se através do estudo e da literatura que as concentrações ideais para bioestimulante de sementes, como a alface e tomate, são concentrações baixas, sendo um facto benéfico economicamente, porque é preciso pouca quantidade para se obterem bons resultados, sendo também ambientalmente mais sustentável.

No que se refere à desinfeção das sementes, de facto, a utilização de sementes desinfetadas permite obter melhores resultados, de forma geral, nos parâmetros analisados e uma maior qualidade da semente, uma vez que, a incidência de contaminações é consideravelmente menor. O uso de extrato algal sem qualquer tipo de desinfeção produziu melhores resultados de taxa de germinação de sementes em comparação com os restantes, sobretudo relativamente ao meio autoclavado, provavelmente pela degradação de moléculas bioativas termo sensíveis existentes no extrato.

O uso de extrato algal diretamente na embebição de sementes, ao invés da sua adição no meio, mostrou também ser mais eficiente, uma vez que o extrato aplicado diretamente na embebição permite o acesso imediato às moléculas bioativas pela semente. Inversamente, quando

o extrato é aplicado no meio a semente terá primeiro de germinar e desenvolver-se, antes de ter acesso a essas mesmas moléculas bioativas.

Concluiu-se, também, que o tomate é, de facto, uma semente sensível, tendo baixa tolerância ao sal, verificando-se, ainda assim, uma germinação razoável na única concentração de sal na qual germinou. Para o stress térmico, não se obtiveram resultados para temperaturas acima da sua amplitude térmica habitual, pelo que os extratos algais não tiveram qualquer efeito no aumento da resistência ao stress térmico. Já para as sementes de alface, apesar das sementes de alface terem uma PG perto de 100% na salinidade de 5‰, o seu estado fisiológico era visivelmente mais baixo do que quando germinadas em meio MS não salino. Quanto ao stress térmico, apenas sementes de alface foram germinadas e com um PG a rondar os 50% quando embebidas em extrato e 60% para o controlo, e sendo por isso, não satisfatória.

Bioensaios como o stress induzido por temperatura são importantes na sociedade atual, dada a tendência de aumento da temperatura global. Assim os resultados obtidos não foram os esperados, uma vez que será necessário encontrar soluções para o aumento da temperatura para a continuação da produção agrícola e os resultados obtidos não foram promissores.

Ainda assim, os extratos algais podem possuir na sua composição fatores de resistência ao stress abiótico, como enzimas, fito-hormonas importantes a germinação e desenvolvimento da planta, e ainda, a sua composição, promovendo no geral uma resposta mais eficaz da planta. Os extratos algais são muito promissores para dar respostas aos problemas originados pelo mundo atual.

## *Perspetivas futuras*

Para obtenção de resultados mais robustos, seria necessário aumentar o número de amostras e o número de sementes por amostra diminuindo, assim, o erro associado e tornando os testes mais robustos.

Para os estudos realizados com extrato algal adicionado ao meio, seria necessário analisar a alteração química do extrato ao longo do estudo, uma vez que, o extrato é armazenado a 4°C para o uso em 48 horas e o ensaio decorre a temperaturas de 20°C durante 7 dias. É possível que tenham ocorrido alteração da composição química, com alguma degradação de compostos bioativos, que tenham interferido com os resultados devido a temperatura usada no estudo. Não tendo sido efetuada nenhuma análise química, questiona-se a eficácia dos extratos, ao fim de alguns dias de extração.

Os testes de stress poderiam ser realizados com temperaturas mais perto do limite máximo da amplitude térmica do tomate, visto que é uma semente mais sensível. O mesmo relativamente à salinidade, podendo realizar-se ensaios com salinidades no intervalo 5‰ e 15‰ para se ter um estudo mais detalhado.

Alguns autores fizeram também ensaios de spray foliar, em plantas mais maduras, para observar o desenvolvimento e o crescimento da planta, além do potencial fungicida ou bactericida dos extratos algais. Este estudo adicional seria também interessante de realizar no futuro.

Todas as plantas obtidas no estudo podiam ter sido analisadas quimicamente (análise proximal), uma vez que não há certeza da alteração, ou não, da sua composição e até a aquisição de componentes tóxicos devido ao uso dos extratos algais. Para além de efeitos prejudiciais, seria também benéfico descobrir efeitos positivos sobre, por exemplo, eventuais aumentos de concentrações de hidratos de carbono, incluindo fibras, lípidos, proteína, vitaminas, e macro e microelementos cálcio, magnésio, ferro, fósforo, cálcio, potássio e sódio.

Por fim, numa perspetiva da biorefinaria, seria importante o aproveitamento da biomassa remanescente quando é realizado um extrato algal, ainda que, não se saiba o processo realizado pelas empresas que o fornecem. Apesar de não ser o âmbito deste estudo em concreto, vários

extratos algais têm como produtos finais, o extrato e um resíduo. Quando realizado um extrato aquoso, o resíduo poderá ainda passar por outra extração, como etanólica, para obtenção de outros componentes, ou, o uso para, por exemplo, formulação de rações de peixe, ou outras aplicações, visando o aproveitamento completo da biomassa.

## ***Bibliografia***

- Afonso, C., Correia, A. P., Freitas, M. v., Baptista, T., Neves, M., & Mouga, T. (2021). Seasonal changes in the nutritional composition of agarophyton vermiculophyllum (Rhodophyta, gracilariales) from the center of Portugal. *Foods*, 10(5), 3. <https://doi.org/10.3390/foods10051145>
- Agarwal, P. K., Dangariya, M., & Agarwal, P. (2021). Seaweed extracts: Potential biodegradable, environmentally friendly resources for regulating plant defence. *Algal Research*, 58, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102363>
- Ali, O., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2021). Biostimulant properties of seaweed extracts in plants: Implications towards sustainable crop production. In *Plants* (Vol. 10, Issue 3, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10030531>
- Ali, O., Ramsubhag, A., Jayaraman, J., & Augustine, S. (2018). Ascophyllum nodosum (Linnaeus) Le Jolis seaweed extract improves seed germination in tomato and sweet pepper under NaCl-induced salt stress. *Tropical Agriculture*, 95(2), 141–147.
- Amaro, C. (2016). *Monitorização e simulação de afluências salinas a sistema de saneamento em zonas costeiras* [Tese de mestrado]. Técnico de Lisboa.
- Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Garcia Tasende, M., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., & Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Aslan, L., Cahyani, H., Hardianti, H., Kurnia, D., Febriani, A., Prity, N., Ariskanti, Anastasia, H., Disnawati, Iba, W., Ruslaini, & Sulistiani, E. (2020). Field cultivation of Kappaphycus alvarezii (DOTY) doty ex silva using tissue-cultured seedlings at bungin permai costal waters, south konawe, Southeast (SE) Sulawesi: The third year of seaweed growth monitoring. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 473(1), 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/473/1/012007>
- Bajpai, S., Shukla, P. S., Asiedu, S., Pruski, K., & Prithiviraj, B. (2019). A biostimulant preparation of brown seaweed Ascophyllum nodosum suppresses powdery mildew of strawberry. *Plant Pathology Journal*, 35(5), 406–416. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0066>

- Battacharyya, D., Babgohari, M., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Bhattacharya, A. (2019). Effect of High-Temperature Stress on the Metabolism of Plant Growth Regulators. In *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules* (1st ed., pp. 510–533). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817562-0.00006-9>
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, *9*(6), 1–30. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Cardoso, I. (2018). *EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO DA ALGA VERMELHA GRATELOUPIA TURUTURU* [Tese de mestrado]. Universidade de Coimbra.
- Chen, C. T., Lee, C. L., & Yeh, D. M. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, or magnesium deficiency on growth and photosynthesis of Eustoma. *HortScience*, *53*(6), 795–798. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12947-18>
- Dell'aversana, E., Cirillo, V., van Oosten, M. J., di Stasio, E., Saiano, K., Woodrow, P., Ciarmiello, L. F., Maggio, A., & Carillo, P. (2021). Ascophyllum nodosum based extracts counteract salinity stress in tomato by remodeling leaf nitrogen metabolism. *Plants*, *10*(6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants10061044>
- Demir, N., Dural, B., & Yildirim, K. (2006). Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. *Journal of Biological Sciences*, *6*(6), 1130–1133. <https://doi.org/10.3923/jbs.2006.1130.1133>
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science*, *25*(6), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Fincheira, P., Parada, M., & Quiroz, A. (2017). Volatile organic compounds stimulate plant growing and seed germination of Lactuca sativa. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *17*(4), 853–867. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400002>
- Fossberg, J., Forbord, S., Broch, O. J., Malzahn, A. M., Jansen, H., Handå, A., Førde, H., Bergvik, M., Fleddum, A. L., Skjermo, J., & Olsen, Y. (2018). The potential for upscaling kelp (*Saccharina latissima*) cultivation in salmon-driven integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Frontiers in Marine Science*, *9*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00418>
- Friani, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., & Palliotti, A. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening

- dynamics and fruit quality of grapevines. *Scientia Horticulturae*, 232, 97–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.054>
- Gary Loake, Priya Ayyar, S. H. (2017). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd ed.). Elsevier.
- Gonçalves, A. (2006). *Efeitos ecológicos em espécies de água doce sob stress salino* [Tese de mestrado]. Faculdade de ciências e tecnologia - Universidade de Coimbra.
- Hayashi, L. (2007). *Contribuição à maricultura da alga vermelha Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenanas* [Doutoramento]. Instituto de Biociências.
- HortFertplus. (2017). *Acadian Seaweed Powder-Technical Sheet*.
- Hurtado, A., Neish, I., Ali, M., Norrie, J., Pereira, L., Michalak I, Shukla P, & Critchley, A. (2021). Extracts of seaweeds used as biostimulants on land and seacropsdan efficacious, phyconomic, circular blueeconomy: with special reference to Ascophyllum (brown) and Kappaphycus (red) seaweeds. In S. Gupta & J. Staden (Eds.), *Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development A Practical Approach* (Vol. 1, pp. 263–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00017-4>
- Karthikeyan, B., Jaleel, C. A., Gopi, R., & Deiveekasundaram, M. (2007). Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. *Journal of Zhejiang University. Science. B.*, 8(7), 453–457.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0453>
- 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>
- Knapp, S. (2013). A revision of the Dulcamaroid Clade of *Solanum* L. (Solanaceae). *PhytoKeys*, 22, 1–432. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.22.4041>
- Labouriau, L., & Osborn, J. (1984). TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE GERMINATION OF TOMATO SEEDS. *J. Therm. Biol*, 9(4), 285–294.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4565\(84\)90010-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4565(84)90010-X)
- Lee, R. (2018). *Phycology* (5th ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/9781316407219>
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>

- Mantri, V., Eswaran, K., Shanmugam, M., Ganesan, M., Veeragurunathan, V., Thiruppathi, S., Reddy, C., & Seth, A. (2017). An appraisal on commercial farming of *Kappaphycus alvarezii* in India: success in diversification of livelihood and prospects. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 335–357. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0948-7>
- Marchioro, S., & Marchioro, V. (2010). Management of *Ascophyllum nodosum* on the culture of wheat. *Cultivando o Saber*, 3(1), 64–71.
- Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed potential in the animal feed: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/JMSE8080559>
- Mustafa, A. A., Abass, M. H., Awad, K. M., & Cruz-Sosa, F. (2021). RESPONSES OF THREE TOMATO (*Lycopersicon esculentum* L.) VARIETIES TO DIFFERENT SALINITY LEVELS Article Information. *Original Research Article Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(42), 277–291.
- Nascimento, W., & Daniel, C. (2002). Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. *Horticultura Brasileira*, 20(1), 103–106. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362002000100020>
- 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. (2020a). 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>
- 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. (2020b). 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>
- Neumann, É. R., Resende, J. T. v, Camargo, L. K., Chagas, R. R., & B Lima Filho, R. (2017). Produção de mudas de batata doce em ambiente protegido com aplicação de extrato de *Ascophyllum nodosum*. *Horticultura Brasileira*, 35(4), 490–498. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620170404>
- 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, 1–12. <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., Morrison, L., Shukla, P., & Critchley, A. (2020). A concise review of the brown macroalga Ascophyllum nodosum (Linnaeus) Le Jolis. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3561–3584. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02246-6>/Published
- Popescu, M. (2016). COMPARATIVE STUDIES OF SEAWEEDS EXTRACT ON SEEDS GERMINATION OF TOMATO. *Current Trends in Natural Sciences*, 5(10), 117–122. <http://www.natsci.upit.ro>
- Raza, A., Charagh, S., Zahid, Z., Mubarik, M. S., Javed, R., Siddiqui, M. H., & Hasanuzzaman, M. (2021). Jasmonic acid: a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1513–1541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02614-z>
- Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, 6, 1309–1313. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>
- Rudke, A. R., de Andrade, C. J., & Ferreira, S. R. S. (2020). Kappaphycus alvarezii macroalgae: An unexplored and valuable biomass for green biorefinery conversion. *Trends in Food Science and Technology*, 103, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.018>
- 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, P. L. F. dos, Zabotto, A. R., Jordão, H. W. C., Boas, R. L. V., Broetto, F., & Tavares, A. R. (2019). Use of seaweed-based biostimulant (Ascophyllum nodosum) on ornamental sunflower seed germination and seedling growth. *Ornamental Horticulture*, 25(3), 231–237. <https://doi.org/10.1590/2447-536x.v25i3.2044>
- Santos, N., Silveira, A., Fernandes, V., & Machado, L. (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, 1–8. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-100/2020>
- Sauer, D. B., & Burroughs, R. (1986). Desinfection of Seed Surfaces with Sodium Hypochlorite. *Phytopathology*, 76(7), 745–749. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-745>

SEA6ENERGY. (2022). *AGROGAIN*.

<https://www.sea6energy.com/products/agriculture/agrogain>.

- Shukla, P. S., Borza, T., Critchley, A. T., Hiltz, D., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2018). Ascophyllum nodosum extract mitigates salinity stress in Arabidopsis thaliana by modulating the expression of miRNA involved in stress tolerance and nutrient acquisition. *PLoS ONE*, *13*(10), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206221>
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2019). Ascophyllum nodosum-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655>
- Silva, L. (2015). *Avaliação do potencial dos extratos de algas marinhas Sargassum muticum e Ascophyllum nodosum (Phaeophyceae) como fertilizante agrícola* [Tese de mestrado]. FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.
- Silva, L. D., Bahcevandziev, K., & Pereira, L. (2019). Production of bio-fertilizer from Ascophyllum nodosum and Sargassum muticum (Phaeophyceae). *Journal of Oceanology and Limnology*, *37*(3), 918–927. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-8109-x>
- Silva, M., Silva, V., & Vieira, L. (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>
- Singh, J., Sastry, D., & Singh, V. (2012). Effect of salinity on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) during seed germination stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *18*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0097-z>
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *14*(3), 407–426. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Smith, H. (2010). *Seaweed Extracts and Plant Growth Hormones*. Hydrodynamics International. [www.hydrodynamicsintl.com](http://www.hydrodynamicsintl.com)
- Stasio, E., van Oosten, M. J., Silletti, S., Raimondi, G., dell’Aversana, E., Carillo, P., & Maggio, A. (2018). Ascophyllum nodosum-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, *30*(4), 2675–2686. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1439-9>
- Tan, C.-Y., Dodd, I. C., Chen, J. E., Phang, S.-M., Chiew, & Chin, F., Yow, Y.-Y., & Ratnayeke, S. (2021). Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology,

- and application in agriculture: an overview. *Journal of Applied Phycology*, 33, 2995–3023. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02475-3>
- Tarakhovskaya, E., Maslov, Y., & Shishova, M. (2007). Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(2), 163–170. <https://doi.org/10.1134/S1021443707020021>
- Ternus, F. L., Tortelli, B., Milanese, 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>
- Thomas, B., Murray, B. G., & Murphy, D. J. (2016). Encyclopedia of Applied Plant Sciences. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2nd ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.005>
- Torres, M. D., Kraan, S., & Domínguez, H. (2019). Seaweed biorefinery. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 18(2), 335–388. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09496-y>
- Torres, P., Novaes, P., Ferreira, L., Santos, J., Mazepa, E., Duarte, M., Nosedá, M., Chow, F., & Santos, D. (2018). Effects of extracts and isolated molecules of two species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) on early growth of lettuce. *Algal Research*, 32, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.016>
- Ullmann, J., & Grimm, D. (2021). Algae and their potential for a future bioeconomy, landless food production, and the socio-economic impact of an algae industry. *Organic Agriculture*, 11(2), 261–267. <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00337-9>
- Ünlükara, A., Cemek, B., Karaman, S., & Erşahin, S. (2008). Response of lettuce (*Lactuca sativa* var. *Crispa*) to salinity of irrigation water. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36(4), 265–273. <https://doi.org/10.1080/01140670809510243>
- Viana, D., Oliveira, J., Hazin, F., & Souza, M. (2021). *Ciências do Mar: dos oceanos do mundo ao Nordeste do Brasil* (1st ed., Vol. 2).
- Vijn, S., Compart, D. P., Dutta, N., Foukis, A., Hess, M., Hristov, A. N., Kalscheur, K. F., Kebreab, E., Nuzhdin, S. v., Price, N. N., Sun, Y., Tricarico, J. M., Turzillo, A., Weisbjerg, M. R., Yarish, C., & Kurt, T. D. (2020). Key Considerations for the Use of Seaweed to Reduce Enteric Methane Emissions From Cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597430>
- Wally, O., Critchley, A., Hiltz, D., Craigie, J., Han, X., Zaharia, L., Abrams, S., & Prithiviraj, B. (2013). Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in *Arabidopsis* Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum*

nodosum. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 324–339.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-012-9301-9>

Wang, W. (1989). TOXICITY ASSESSMENT OF THE AQUATIC ENVIRONMENT USING PHYTOASSAY METHODS. *SWS Contract Report*, 455, 1–66.  
<https://doi.org/10.1.1.616.4518>

WoRMS Editorial Board. (2022, September 12). *World Register of Marine Species*.

## Anexos

### Anexo A1: Exemplo de benefícios do extrato de *Ascophyllum nodosum*

Tabela VI Exemplos de benefícios do extrato de *Ascophyllum nodosum*

Planta (Espécie)	Benefício	Autor
<b>Tomateiros</b> ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Melhoramento do crescimento da planta e da qualidade do fruto – diminuição do stress por salinidade.	(Shukla et al., 2019)
<b>Tomateiros</b> ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Melhoramento do crescimento da planta e raiz.	(M. Silva et al., 2021)
<b>Morangueiros</b> ( <i>Fragaria ananassa</i> )	Melhoramento do crescimento da planta e da qualidade do fruto; melhoramento do crescimento da raiz.	(Shukla et al., 2019)
<b>Morangueiros</b> ( <i>Fragaria ananassa</i> )	Melhoramento da defesa da planta contra infecções quando usado enquanto adubo foliar – indução do metabolismo secundário e regulação das atividades enzimáticas	(Bajpai et al., 2019)
<b>Milho</b> ( <i>Zea mays</i> )	Melhoramento da morfologia e nutrição da raiz.	(Shukla et al., 2019)
<b>Milho</b> ( <i>Triticum aestivum L.</i> )	Melhoramento da produção de espigas e rendimento dos grãos, aumento assim a produtividade da cultura.	(Marchioro & Marchioro, 2010)
<b>Espinafres</b> ( <i>Spinacia oleracea</i> )	Melhoramento do crescimento, rendimento e qualidade nutricional; Atenuação do stress através da seca – Pelo conteúdo fenólico e antioxidante; Melhoramento da qualidade pós-colheira para o seu armazenamento.	(Shukla et al., 2019)
<b>Espinafres</b> ( <i>Spinacia oleracea</i> )	Melhoramento da germinação e vigor em condições de stress por altas temperaturas.	(Neto et al., 2020b)
<b>Nabo</b> ( <i>Brassica napa</i> )	Melhoramento do crescimento e rendimento – Pelo metabolismo de nitrogênio, carbono e enxofre.	(Shukla et al., 2019)
<b>Couve</b> ( <i>Brassica oleracea</i> )	Fornecimento de isotiocianato, compostos fenólicos e flavonoides.	(Shukla et al., 2019)
<b>Couve</b> ( <i>Brassica oleracea var acephala</i> )	Melhoramento do crescimento da raiz	(Ternus et al., 2021)

<b>Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)</b>	Melhoramento da germinação e comprimento da raiz.	(M. Silva et al., 2021)
<b>Videiras (<i>Vitis vinifera</i>)</b>	Melhoramento do crescimento, rendimento, amadurecimento e qualidade da fruta.	(Shukla et al., 2019)
<b>Videiras (<i>Vitis vinifera</i>)</b>	Melhoramento da maturação e propriedades químicas do vinho.	(Frioni et al., 2018)
<b>Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)</b>	Melhoramento da percentagem de germinação com a diminuição do tempo necessário para a mesma. Plantas maiores e aumento da massa fresca e seca.	(P. L. F. dos Santos et al., 2019)
<b>Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>)</b>	Melhoramento do vigor das mudas.	(Neumann et al., 2017)

## Anexo A2: Taxonomia da *Lactuca sativa*

Tabela VII Taxonomia da *Lactuca sativa*

### Taxonomia *Lactuca sativa* Kartesz, J.T. 1994

<b>Domínio</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Sub-reino</b>	Viridiplantae
<b>Infra-reino</b>	Streptophyta
<b>Superdivisão</b>	Embryophyta
<b>Divisão</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisão</b>	Spermatophytina
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Superordem</b>	Asteranea
<b>Ordem</b>	Asterales
<b>Família</b>	Asteraceae
<b>Género</b>	<i>Lactuca</i>

<b>Espécie</b>	<i>Lactuca sativa</i>
----------------	-----------------------

Anexo A3: Taxonomia de *Solanum lycopersicum* (Knapp, 2013)

Tabela VIII Taxonomia de *Solanum lycopersicum*

**Taxonomia *Solanum lycopersicum* L.**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordem</b>	Solanales
<b>Família</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Espécie</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>