Allyson Eduardo Nardelli

Cultivo integrado da macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* e do mexilhão *Perna perna* na Enseada do Mar Virado, Ubatuba-SP

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Vicente Gomes

Coorientadora : Fanly Fungyi Chow Ho

São Paulo

2019

Allyson Eduardo Nardelli

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em __/__/__

Versão Corrigida

_____	_____
Prof. Dr. Vicente Gomes	Conceito
_____	_____
Prof. (a) Dr. (a):	Conceito
_____	_____
Prof. (a) Dr. (a):	Conceito

A gambiara de hoje é a tecnologia de amanhã.

Agradecimento

Aos meus pais Fátima Aparecida Jácomo de Souza Nardelli e Jorge Nardelli, meus irmãos Carlos E. Nardelli, Marcos E. Nardelli e Jorge E. Nardelli† e minha esposa Dra. Cíntia Iha, por todo amor e apoio que me deram durante toda a vida, que me possibilitaram a concluir este trabalho.

À minha coorientadora/orientadora professora Dra. Fanly Fungyi Chow Ho por toda a sua enorme dedicação, motivação, paciência e orientação durante este trabalho e que acreditou desde o início na sua realização.

Ao meu orientador professor Dr. Vicente Gomes, por sua grande ajuda, paciência e orientação neste trabalho.

Ao maricultor e amigo Claudio de Oliveira, por ceder um espaço na sua fazenda marinha para a realização deste trabalho e por toda ajuda e ensinamentos que me passou durante esse período.

À professora Dra. Elisabete de Santis Braga da Graça Saraiva e Dr. Vitor Chiozzini pela grande ajuda nas análises e realização do trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Siegle, Lara Conte e Pedro Serrao pela ajuda na realização do modelo de circulação.

A toda equipe do LAM - Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, técnicos Rosário, Willian e Vivian. Aos alunos Luzka, Ana, Talissa, Vanessa, Mariana e André e a pós-doc Patrícia.

A toda equipe do LAM – Laboratório de Aquicultura Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Dr. Daniel Lemos, Ricardo, Júlio e Rafael, pelo suporte técnico em Ubatuba-SP.

A todos os funcionários da base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico, em Ubatuba-SP.

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

Sumário

Lista de Figuras iii

Lista de Tabelas viii

Resumo 1

Introdução geral 4

1. Introdução 4

1.1. Papel das macroalgas na AMTIM 7

1.2. Valorização da biomassa algácea 9

1.3. *Gracilariopsis tenuifrons* 11

1.4. Justificativa 14

2. Objetivo Geral 14

3. Referências 15

Capítulo 1:Testes laboratoriais para cultivo de *Gracilariopsis tenuifrons*: o uso de fonte alternativa de nutrientes e efeito da densidade do cultivo. 23

Resumo 23

Abstract 24

1. Introdução 25

2. Matérias e métodos 27

2.1. Cultivo em laboratório e produção de biomassa algácea 27

2.2. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial 28

2.3. Teste com fertilizante comercial 29

2.4. Análises estatísticas 31

3. Resultados 31

3.1. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial 31

3.2. Teste com fertilizante comercial 32

4. Discussão 36

4.1. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial 36

4.2. Teste com fertilizante comercial 37

5. Conclusão..... 38

6. Referências..... 39

Capitulo 2:Cultivo integrado da alga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* e de mexilhões de uma fazenda marinha na Enseada do Mar Virado..... 42

Resumo 42

Abstract..... 43

1. Introdução 44

2. Objetivo 45

3. Materiais e métodos 45

3.1. Área de estudo..... 45

3.2. Produção de mudas: cultivo *outdoor*..... 46

3.3. Cultivo de mexilhões 48

3.4. Cultivo integrado..... 52

3.5. Análise do material algáceo 67

3.6. Análises estatísticas..... 71

4. Resultados..... 72

4.1. Teste Piloto 72

4.2. Cultivo experimental..... 81

5. Discussão 107

6. Conclusão..... 113

7. Referências..... 113

Lista de Figuras

Figura 1 - Produção da pesca e aquicultura, (Fonte: Relatório SOFIA FAO 2018). 5

Figura 2 - Produção mundial de macroalgas em milhões de toneladas por ano. Fonte: FAO 2018. 9

Figura 3. Aspecto geral de *Gracilariopsis tenuifrons.* Foto: Ana Maria Pereira Barreto Amorim. 12

Figura 4 - Ciclo de vida da *Gracilariopsis tenuifrons*. 13

Figura 5 - Cultivo em laboratório de *Gracilariopsis tenuifrons* feito em garrafas pet de 5 litros. 28

Figura 6 - (A) Sistema fechado recirculante de cultivo de *Gracilaria tenuifrons* indoor com os cinco aquários experimentais, (B) solução Forth e aquário indoor, (C) sonda HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger posicionada a 5 cm da superfície da água. 30

Figura 7 - Taxas de crescimento de *G. tenuifrons* cultivada sob densidades de 1 g/L e 4 g/L ao longo de três semanas de experimentação, T1, T2 e T3 representam as semanas. As diferentes letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. 32

Figura 8 -Taxa de crescimento de *G. tenuifrons* sob duas concentrações de Forth (50% e 100%) ao longo de três semanas de experimentação, T1, T2 e T3 representam as semanas. As diferentes letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. 33

Figura 9 - Média da temperatura da água dos testes da solução Forth. As diferentes letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. 34

Figura 10 - Média da irradiância diárias de fótons dos testes da solução Forth. As diferentes letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. 35

Figura 11 - Análise de componentes principais, fatores ambientais (temperatura, irradiação solar) e as taxas de crescimento. 35

Figura 12- Localização da Enseada do Mar Virado e das estruturas flutuantes da fazenda marinha (23°31’42,70”S, 45°11’20,44”O). ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 13 - Sistema de cultivo outdoor de *Gracilariopsis tenuifrons*. (A) Piscina termorreguladora com os três aquários de 50l para o cultivo, (B) Cobertura para proteção contra radiação excessiva e chuva, (C) Remoção da cobertura em dias de baixa radiação. 47

Figura 14 - Mexilhão *Perna perna*. Fonte: http://www.cenemar.org.br/. 48

Figura 15 - (A) Sistema de coleta de "sementes" de mexilhões na fazenda marinha na Enseada do Mar virado; (B) Trama do coletor em detalhe. 49

Figura 16 - (A)Mesa de limpeza de mexilhões ; (B) Mexilhões limpos e classificados com forme o tamanho das conchas. 50

Figura 17 - Plantio de mexilhões (A,B) é inserido as duas malhas e o cabo em um cano de PVC; (C,D) as “sementes” são colocadas dentro do cano de PVC e preenchem as malhas; (E) amarração do cacho;(F) cacho pronto para ser colocado no *long-line* para a engorda dos mexilhões.. 51

Figura 18 - (A) *Long-line* na fazenda marinha de mexilhões, com flutuadores para mantê-lo na superfície, (B e C) Corda de engordas dos mexilhões em detalhe. 52

Figura 19 - Pontos de cultivo da macroalga *G. tenuifrons* no *long-line* de mexilhões no teste piloto. *P1* corresponde à extremidade voltada para a Praia da Lagoinha, *P2* foi posicionada no centro do *long-line* e *P3* foi posicionada na extremidade opostas à Praia da Lagoinha..... 53

Figura 20 - Teste piloto. (A) Algas cultivadas na superfície, em redes tubulares fixas ao cultivo de mexilhões; (B) algas cultivadas a um metro de profundidade, em redes tubulares ao cultivo de mexilhões..... 54

Figura 21 - Pontos de cultivo da macroalga *G. tenuifrons* no *long-line* de mexilhões durante o cultivo experimental. *P1* corresponde à extremidade voltada para a Praia da Lagoinha, *P2* foi posicionada no centro do *long-line*, *P3* foi posicionada na extremidade opostas à Praia da Lagoinha e *P4* foi colocado fora do *long-line*, cerca de 20m, do lado de dentro da baia. 55

Figura 22 – Réplicas (n=5) das algas mantidas em rede tubulares, com tela de proteção contra herbivoria. 56

Figura 23 - (A) Sistema de cultivo na superfície, com as algas fixas por redes tubulares, envolvidas em uma tela de polietileno para proteção contra herbivoria, e flutuadores nas extremidades para manter as algas na superfície; (B)Sistema de cultivo a um metro de profundidade, com as algas fixas por redes tubulares, envolvidas em uma tela de polietileno para proteção contra herbivoria, pesos nas extremidades para manter as algas na no fundo. 56

Figura 24 - Pontos de amostragem de água do mar , P1, P2, P3 e P4 sendo locais onde as macroalgas foram cultivadas, P5 local sem a influência da fazenda marinha e P6 a desembocadura do rio lagoinha..... 59

Figura 25 - (A) Amostras e água do mar acondicionadas para filtragem das amostras de água; (B) Sistema de filtragem de água do mar. 59

Figura 26 - (A) Sensor de luz e temperatura colocados na superfície e a um metro de profundidade (B) Estrutura onde os Sensor de luz e temperatura foram fixas. 61

Figura 27 - Esquema geral da seção do rio Lagoinha utilizada para o cálculo do fluxo. As letras x representam as distâncias na superfície da seção, as letras h representam as profundidades. .. 62

Figura 28 - Grid da região de estudo, a região onde apresenta um azul mais intenso é a área onde a malha tem um maior refinamento nos cálculos justamente na área do experimento, latitude e longitude em UTM (Universal Transverse Mercator)..... 64

Figura 29 - Batimetria, interpolada com o uso do modelo Delft3D-RGF-GRID, na área da enseada do Mar Virado, latitude e longitude em UTM (Universal Transverse Mercator)..... 65

Figura 30 - Local onde o ADCP foi implantado, (23°31'45.25"S e 45°11'21.14"O, em UTM 480431.35 7397293.06) próximo a fazendo de mexilhões, da Enseada do Mar Virado. 66

Figura 31 - Taxas de crescimento das macroalgas cultivadas ao longo das semanas do teste piloto (média ± DP, n=5). (A) Algas cultivadas na superfície; (B) Algas cultivadas no fundo (z=-1m). As diferentes letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. T1, T2, T3 e T4 é o tempo em semanas, *P1, P2* e *P3* são os pontos de cultivo das macroalgas..... 73

Figura 32 –Variação climatológica no teste piloto. (A) Variação diária da irradiância solar; (B) Variação diária da temperatura na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas vermelha paralela ao eixo Y demarca as semanas de teste. 74

Figura 33 – Concentração de pigmentos nas macroalgas por grama de massa fresca (MF) no teste piloto. (A) Concentração de Clorofila-a. (B) Concentração de Ficoeritrina. (C) Concentração Ficocianina (média ± DP, n = 5). As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas..... 76

Figura 34 – (A) Porcentagem de Proteína total por massa seca (MS) de macroalga do teste piloto. (B) Concentração de proteína solúvel total por massa fresca (MF) de macroalga do teste piloto. (média ± DP, n=5). As letras minúsculas representam as diferenças estatisticamente significativas. .. 77

Figura 35 – Concentração de carboidratos totais por massa fresca (MF) da macroalga do teste piloto (média ± DP, n = 5). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. 78

Figura 36 - Porcentagem de lipídios (por biomassa seca de macroalga) do teste piloto, (média ± DP, n=5). 78

Figura 37 - Porcentagem de umidade das macroalgas do teste piloto, (média ± DP, n=5). 79

Figura 38 – (A) Porcentagem de cinzas (da massa seca (MS) da macroalga) do teste piloto; (B) Porcentagem de fibras digestivas (da massa seca (MS) da macroalga) do teste piloto; (C) Quantidade de energia por 100 g de biomassa seca de macroalga do teste piloto. (média ± DP, n=5). 80

Figura 39 – Taxas de crescimento das macroalgas ao longo das semanas do cultivo experimental. (A) Cultivadas na superfície. (B) Cultivadas no fundo. (média ± DP, n=5). As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada semana e as letras minúsculas representam as diferenças significativas. 82

Figura 40 - Comparação das taxas de crescimento entre superfície e fundo das macroalgas cultivadas ao longo das semanas do cultivo experimental (A) TC em *P1*. (B) TC em *P2*. (C) TC em *P3*. (D) TC em *P4*. (média ± DP, n=5). As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada semana e o símbolo "*" representa a diferença significativamente entre as profundidades. 83

Figura 41 - Variação da temperatura no cultivo experimental. (A) Variação diária de temperatura em *P1*. (B) Variação diária da temperatura em *P3*. Temperatura na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas vermelha paralela ao eixo Y demarcam as semanas. 85

Figura 42 - Variação da irradiância solar no cultivo experimental. (A) Variação diária de irradiância solar em *P1*. (B) Variação diária da irradiância solar em *P3*. Irradiância solar na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas vermelha paralela ao eixo Y demarcam as semanas. 86

Figura 43 – Precipitação diária durante o cultivo experimental. As linhas pontilhadas vermelha paralela ao eixo Y demarcam as semanas. 87

Figura 44 - Média semanal de vazão do rio Lagoinha, durante o a realização do cultivo piloto. T0 corresponde a vazão do rio no início do experimento, T1, T2 e T3 são as semanas decorrentes. ... 87

Figura 45 – Concentração de ureia nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1*, *T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 88

Figura 46 - Concentração de N-amoniacal nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T*0 corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 90

Figura 47 - Concentração de nitrito nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 91

Figura 48 - Concentração de nitrato nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 91

Figura 49 - Concentração de fosfato nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 92

Figura 50 - Concentração de silicato nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 93

Figura 51 - Concentração de clorofila *a* nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes. 93

Figura 52 – Analise das componentes principais (PCA) das algas no cultivo experimental (*P1, P2, P3* e *P4*), sobe a influência dos nutrientes inorgânicos (exceto o silicato), ureia, clorofila-a e TC.94

Figura 53 – .....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 54 -Comparação dos valores observados in-sito coletado com um ADCP, com os valores obtidos no modelo numérico.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 55 – O padrão de circulação na maré de quadratura, da área de estudo. A circulação preferencial é no sentido horário, (A) a corrente entra paralela ao sistema de cultivo *long-line* no

sentido *P3* para *P1*, (B) a direção da corrente muda no sentido horário da direção do *long-line* para *P4*; (C e D) o fluxo se inverte, na maré vazante, em um sentido quase paralelo ao *long-line*, indo de *P4* para o cultivo de mexilhões. 96

Figura 56 - O padrão de circulação na maré de sizígia, da área de estudo. A circulação preferencial é no sentido horário, (A) a corrente entra paralela ao sistema de cultivo *long-line* no sentido *P3* para *P1*, (B) a direção da corrente muda no sentido horário da direção do *long-line* para *P4*; (C e D) o fluxo se inverte, na maré vazante, em um sentido quase paralelo ao *long-line*, indo de *P4* para o cultivo de mexilhões. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 57 -Mapa probabilístico de percurso de derivadores, oriundo do modelo numérico, lançados em diferentes momentos de maré (A) Maré de quadratura. (B) Maré de sizígia. 98

Figura 58 – As linhas azuis representam o caminho percorrido pelos derivadores que foram lançados na embocadura do rio lagoinha, durante um período de sete dias. 99

Figura 59 - Concentração de pigmentos nas macroalgas por grama de massa fresca (MF) no cultivo experimental. (A) Concentração de clorofila *a*. (B) Concentração de ficoeritrina. (C) Concentração de ficocianina (média ± DP, n = 5). As letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas. 101

Figura 60 - (A) Porcentagem de proteína total por massa seca (MS) de macroalga do cultivo experimental. (B) Concentração de proteína solúvel total por massa fresca (MF) de macroalga do cultivo experimental. (média ± DP, n=5). As letras minúsculas representam as diferenças estatisticamente significativas. 102

Figura 61 - Concentração de carboidratos totais por massa fresca (MF) da macroalga do cultivo experimental (média ± DP, n = 5). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. 103

Figura 62 - Porcentagem de lipídios (por biomassa seca de macroalga) do cultivo experimental, (média ± DP, n=5). 103

Figura 63 - Porcentagem de umidade (por biomassa seca de macroalga) do cultivo experimental, (média ± DP, n=5). 104

Figura 64 - (A) Porcentagem de cinzas (da massa seca (MS) da macroalga) do cultivo experimental; (B) Porcentagem de fibras digestivas (da massa seca (MS) da macroalga) do cultivo experimental; (C) Quantidade de energia por 100 g de biomassa seca de macroalga do cultivo experimental. (média ± DP, n=5). 105

Figura 65 - Análise das componentes principais (PCA) das algas no cultivo experimental (*P1, P2, P3* e *P4*) (superfície e fundo), sobre os dados de proteína, ficocianina, ficoeritrina, clorofila *a* e carboidratos. 106

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da solução de enriquecimento de von Stosch (VS) segundo URSI & PLASTINO (2001) e modificado de EDWARDS (1970). 27

Tabela 2. Composição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) do fertilizante Forth correspondente a 50% e 100% da solução de enriquecimento de von Stosch..... 30

Tabela 3 - Classificação do RMAE de acordo com Van Rijn et al. (2003). 67

Tabela 4 - Classificação de Skill de acordo com Henriksen et al. (2003). 67

Lista de abreviações

AMTIM = Aquicultura multiTrófica Integrada Marinha

Ch a = Clorofila-a

FC = Ficocianina

FE = Ficoeritina

MF = Material Fresco

MS = Material Seco

PAR = Photosynthetically Active Radiation

PST = Protéina Soluvel Total

VS = Solução von Stosch

RMAE = Erro Absoluto Médio Relativo

TC = Taxa de crescimento

TFD = Teor de Fibras Digestiva

UTM = Universal Transverse Mercator

VE = Valor Energético

Resumo

A aquicultura é uma das atividades agrícolas que mais cresceu nas últimas décadas, devido ao seu grande potencial de expansão, que ainda não foi explorado. Contudo, é interessante que esse crescimento se direcione para uma produção consciente e que vise a sustentabilidade da produção, aproveitando bens e serviços ecossistêmicos que possam favorecer a obtenção desse propósito. A Aquicultura Multi-Trófica Integrada Marinha (AMTIM) vem com uma alternativa para atingir esse objetivo. Por ser um meio de produção que se baseia na reciclagem e reutilização de recursos, a AMTIM alinha uma maior produtividade aquícola com uma menor pegada ecológica. Visto isso, o objetivo desse trabalho foi compreender as interações entre o cultivo integrado da macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* com o mexilhão *Perna perna* em águas abertas, na enseada do Mar Virado, no município de Ubatuba, litoral norte de São Paulo. No Capítulo 1, foram testadas técnicas de cultivo de cepas de macroalgas em condições semi-controladas, com o objetivo de se manter cepas saudáveis com baixo custo de manutenção. Para isso, testamos diferentes densidades algáceas de cultivo (grama de alga por litro de meio de cultivo) e uma fonte de nutrientes mais barata, em que usamos um fertilizante comercial de orquídeas Forth® 30-10-10. A alga *G. tenuifrons* mostrou melhor cultivo em densidade de 1 $g.L^{-1}$ e o uso do fertilizante de orquídeas também demostrou bons resultados para as taxas de crescimento, chegando a 6 $\%.dia^{-1}$. No Capítulo 2, foi realizado um cultivo integrado entre a macroalga *G. tenuifrons* e o mexilhão *P. perna*, em águas abertas, com o objetivo de caracterizar o ambiente de uma fazenda marinha em relação a suas interações entre os cultivos de mexilhões e da macroalga e os fatores ambientais. As macroalgas foram cultivadas em diferentes pontos da fazenda marinha de mexilhões e nesses locais foram medidos parâmetros bióticos e abióticos, como concentração de nutrientes, velocidade e direção do fluxo d'água, temperatura irradiância solar e taxas de crescimento das macroalgas. Também foi analisada a composição química algácea em cada ponto de cultivo. Os resultados mostraram que existem diferenças no crescimento das macroalgas em pontos distintos, sendo que nos pontos onde o fluxo de nutrientes provenientes dos mexilhões era maior ocorreram as maiores taxas de crescimento e uma maior concentração de compostos no material algáceo, como proteínas, pigmentos e carboidratos. Assim, o conhecimento da dinâmica da área de cultivo integrado favorece uma melhor produção.

Palavas chaves: Aquicultura integrada, sustentabilidade, cultivo de algas, ecoeficiência.

Abstract

Aquaculture is one of the fastest growing agricultural activity in the last decades due to its great potential for expansion, which has not been explored yet. However, it is interesting that this growth should be directed toward a conscious production that aims the sustainability of production, taking advantage of ecosystem goods and services that may favor the attainment of this objective. Marine Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) is an alternative to achieve this goal. The production is based on the recycling and reuse of resources, which makes IMTA aligns higher aquaculture productivity with a lower ecological footprint. The aim of this work was to understand the interactions between the open water integrated cultivation of the red macroalgae *Gracilariopsis tenuifrons* and the mussel *Perna perna* in the cove of Mar Virado, in the Ubatuba city. In the Chapter 1, we tested techniques for growing macroalgae strains under semi-controlled conditions that aims to maintain healthy seeding with a low maintenance cost. They were tested for algal densities of culture (gram of algae per liter of culture medium) and we used a cheapest source of nutrients, the commercial Forth® 30-10-10 orchid fertilizer. *Gracilariopsis tenuifrons* showed preference for 1 $g.L^{-1}$ density cultivation and showed good results for the use of orchid fertilizer. The algae also showed good results for growth rates, with rates higher than 6 $\%.day^{-1}$. In Chapter 2, an open water integrated cultivation was carried out between the macroalgae *G. tenuifrons* and the mussel *P. perna,* with the aim to character the environment of a marine farm in relation to its interactions between the integrated cultivation of mussels and the macroalgae and the environmental factors. The macroalgae were cultivated at different points of the marine mussel farm, in these places we measured biotic and abiotic parameters such as nutrient concentration, velocity and direction of water flow, solar irradiance temperature and growth rates of macroalgae. The chemical algal composition at each culture point was also analyzed. The results showed that there is a difference in the growth of macroalgae at different points, where the nutrient flow from the mussels was higher, with higher growth rates and a higher concentration of compounds in the algal material such as proteins, pigments and carbohydrates. Thus, the knowledge of the dynamics of the integrated crop area is good for a better production.

Keywords: Integrated aquaculture, sustainability, algae cultivation, eco-efficiency.

Introdução geral

1. Introdução

Segundo registros da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018), nas últimas décadas, a aquicultura tem se expandido exponencialmente (Fig. 1) e com esse aumento, tem crescido a preocupação com o uso sustentável do ecossistema aquático. Essa inquietude gera uma maior pressão por parte da mídia e de organizações não governamentais (ONGs) sobre os produtores aquícolas, em relação aos possíveis impactos negativos das operações de cultivo (TILLER; BREKKEN; BAILEY, 2012; ERTÖR; ORTEGA-CERDÀ, 2015), como a eutrofização de corpos d'água, devido ao aumento das concentrações de nutrientes e à deposição de rejeitos sólidos na camada superficial no fundo. Isto pode levar à hipóxia e acidificação dos locais próximos aos cultivos, afetando a diversidade dos organismos bentônicos e planctônicos, induzindo a proliferação de patógenos e de espécies oportunistas e ameaçando a saúde do ecossistema (EKAU *et al*., 2010). Nesse contexto, é recomendável a utilização de métodos de produção que visem não apenas o crescimento econômico, mas também uma maior abordagem ecológica e social (ERTÖR; ORTEGA-CERDÀ, 2015), e uma maneira para alcançar este objetivo é a implementação da Aquicultura Multi-Trófica Integrada Marinha, **AMTIM** (ALEXANDER; HUGHES, 2017).

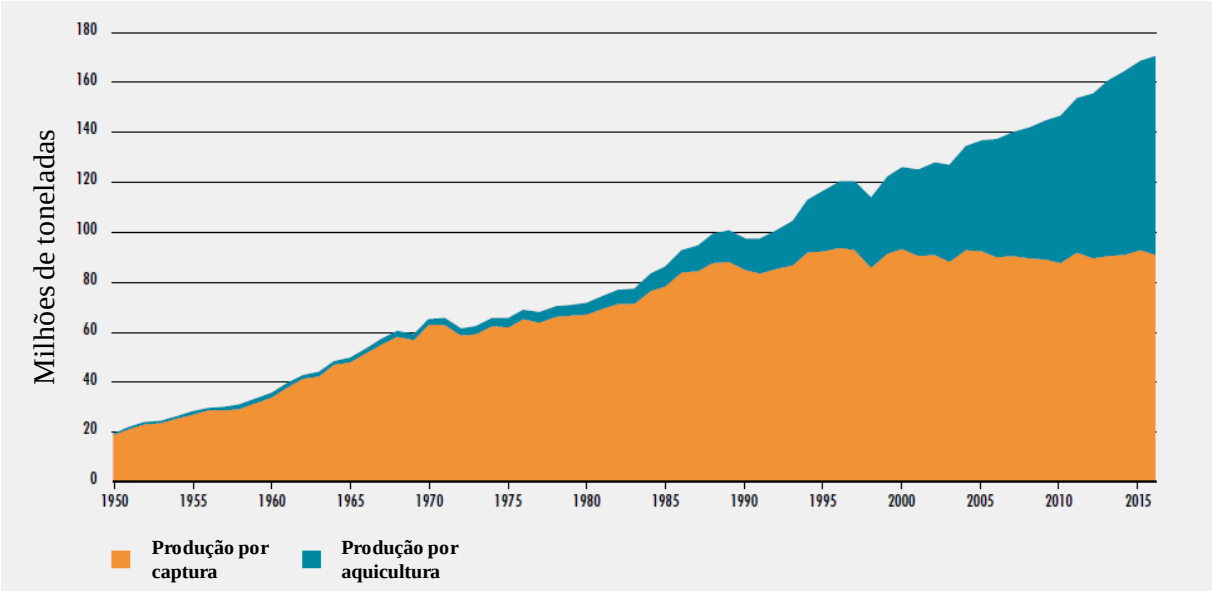


Figura 1 - Produção mundial do volume de pesca (captura) e aquicultura (Fonte: Relatório SOFIA FAO 2018).

A AMTIM é uma abordagem que pode ser adotada para mitigar os possíveis efeitos negativos da monocultura de espécies arraçoadas (CHOPIN, 2006). Esta estratégia de aquicultura baseia-se na produção aquática sob o conceito de reciclagem e reutilização dos recursos (CHOPIN *et al*., 2004). Em lugar de cultivar uma única espécie (monocultura) e incidir os esforços sobre suas necessidades, a AMTIM tenta imitar um ecossistema natural, combinando o cultivo de várias espécies com funções ecossistêmicas complementares, de modo que um tipo de recurso não utilizado (*e.g.*, alimento, resíduos, nutrientes e subprodutos) possa ser reaproveitado e convertido em nutrientes, alimentos e energia para outros níveis tróficos, de forma a integrar as interações sinérgicas de espécies que possam ser exploradas comercialmente (EDWARDS; PULLIN; GARTNER, 1988; CHOPIN, 2006, 2011).

A prática do policultivo difere do sistema de AMTIM por integrar espécies que podem ser cultivadas em conjunto, mas que possuem os mesmos processos biológicos e químicos e que correspondem ao mesmo nível trófico (*e.g.*, cultivo de peixes carnívoros como salmão-bacalhau numa mesma área). A AMTIM combina o cultivo de organismos alimentados com ração ou rejeitos de pesca (como peixes e camarões) e de espécies extrativas (que obtém seu alimento do meio natural, como algas e invertebrados, de modo que os processos biológicos e químicos se equilibram e são complementares (CHOPIN, 2006). Adicionalmente, a AMTIM associa o princípio de cultivar espécies de diferentes níveis tróficos de forma a poder

reaproveitar melhor os recursos de espécies produtoras e consumidoras, dentre elas filtradoras, herbívoras e carnívoras.

Sistemas de AMTIM experimentais vêm seguindo estudos que envolvem, geralmente, espécies arraçoadas, como peixes ou camarões, que são alimentados com ração e/ou rejeitos de pesca. Estes organismos introduzem material orgânico na coluna d'água devido a alimentos não consumidos e produção de fezes, além de liberar compostos inorgânicos como NH_4^+, PO_4^{-3} e CO_2, devido à ação metabólica (WANG *et al.*, 2012). Organismos filtradores, como ostras, vieiras e mexilhões, podem ter um reforço na sua alimentação devido ao abastecimento natural de nutrientes pelos resíduos particulados de alimentos e fezes dos organismos arraçoados, assimilando parte deste material em seus tecidos. Assim, espécies filtradoras podem apresentar uma maior taxa de crescimento, acima das observadas em monocultora de filtradores. Como consequência, a integração de organismos filtradores possibilitaria a diminuição da carga de matéria orgânica para os arredores do cultivo (IRISARRI *et al.*, 2015). Por sua vez, os filtradores também introduzem compostos inorgânicos na água pelas suas vias metabólicas naturais. Na sequência trófica, os compostos inorgânicos provenientes dos arraçoados, dos filtradores e do processo de biodegradação de material orgânico pela ação microbiana são aproveitados pelos produtores primários (*e.g.*, macroalgas), que os usam na produção de biomoléculas vitais para o seu desenvolvimento, como por exemplo, a produção de açúcares, proteínas, enzimas e pigmentos. As macroalgas retiram da água compostos que em dadas concentrações são tóxicos para muitos organismos, como NH_4^+, NO_2^-, PO_4^{-3}, e os incorporam na sua biomassa. Além disso, as macroalgas contribuem para o aumento da concentração de O_2 e a estabilização do pH da água (FAO, 2009; TROELL *et al.*, 2009; CHOPIN, 2011). Por utilizar o resíduo de um subsistema de cultivo (nível trófico) como nutriente de outro e estar dentro de um mesmo domínio do espaço de cultivo, a AMTIM pode inclusive resultar em aumento da capacidade de produção de um determinado local, antes visto como limitado pela sua baixa produtividade (EDWARDS; PULLIN; GARTNER, 1988).

A seleção das espécies para a AMTIM deve ser baseada em práticas convencionais de cultivo, aptidão do local/habitat, possíveis serviços ecossistêmicos, potencial de mitigação de impactos negativos, valor econômico e aceitação pelo consumidor (BARRINGTON; ROBINSON, 2009). A criação simultânea de múltiplas espécies em um mesmo ambiente pode ser vantajosa para o criador, pois com um portfólio diversificado é possível incrementar a resiliência das operações, como por exemplo, com a mudança do preço de um dos produtos

de cultivo ou a perda da safra de uma das espécies (BARRINGTON; ROBINSON, 2009). Além de todos os benefícios anteriormente mencionados, este modelo de cultivo tem a sustentabilidade como o seu maior slogan, uma vez que nos últimos anos tem se observado uma mudança no perfil dos consumidores, que têm demostrado uma maior conscientização sobre os meios de produção e têm buscado consumir produtos que usem meios de produção sustentáveis (ALEXANDER; FREEMAN; POTTS, 2016; ALEXANDER; HUGHES, 2017).

Segundo TROELL *et al.* (2009), a AMTIM tem sido praticada em países asiáticos (principalmente na China) há séculos. No entanto, é relativamente nova para países ocidentais, tendo o início dos estudos na década de 1970 (BARRINGTON; ROBINSON, 2009). Um dos fatos que explica o atraso no desenvolvimento da AMTIM nos países ocidentais é a escassez de evidências documentadas e as dificuldades de acesso a informações das experiências chinesas; desse modo, os países ocidentais estão tendo que "reinventar a roda" (BARRINGTON; ROBINSON, 2009) e buscar subsídios técnico-científicos para definir as melhores estratégias de AMTIM. Este método de cultivo no ocidente está agora operando, principalmente, em pequenos empreendimentos e em escala experimental, tendo as pesquisas concentradas em grupos do Canadá, desde 2001, e da Europa. Globalmente, o cultivo integrado opera em mais de 40 países (CHOPIN; ROBINSON, 2006; CHOPIN, 2011; ALEXANDER; HUGHES, 2017).

1.1. Papel das macroalgas na AMTIM

As algas são parte fundamental dos sistemas de AMTIM (CHOPIN *et al.*, 2001; NEORI; CHOPIN; YARISH, 2004; BUSCHMANN *et al.*, 2008), pois contribuem na incorporação de nutrientes dissolvidos (C, N e P) derivados de níveis tróficos mais altos, como, por exemplo, peixes e moluscos, convertendo esses compostos potencialmente nocivos para o meio ambiente em biomassa (SCHUENHOFF *et al.*, 2003; NEORI *et al.*, 2004). Estudos têm demostrado que algas crescidas em sistemas de AMTIM apresentam elevados teores de proteínas, polissacarídeos, pigmentos e compostos funcionais, contribuindo dessa forma na produção de biomassa de alta qualidade nutricional (CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999; MARTÍNEZ-ESPIÑEIRA *et al.*, 2015), que encontram aplicações em vários setores, desde a produção de suplementos alimentares, fertilizantes, cosméticos e alimentos, até a descoberta de novos fármacos.

As macroalgas dos gêneros *Ulva* (Chlorophyta) e *Gracilaria* (Rhodophyta) têm um enorme potencial na remoção destes nutrientes da água, por isso, são muito utilizadas em trabalhos de cultivo integrado, tanto em escala laboratorial como em sistemas costeiros abertos (CHOW *et al.*, 2001; NEORI *et al.*, 2004; ABREU *et al.*, 2011; NARDELLI *et al.*, 2018).

Espécies de *Ulva* têm mostrado elevadas taxas de crescimento, em média 12 %.dia^{-1}, e grande capacidade de assimilação de nitrogênio, podendo chegar até 97% de eficiência de retenção de NH_4^+ em cultivos associados com peixes (TROELL *et al.*, 2003). Além disso, apresentam alta resistência às condições de estresse ambiental e baixa vulnerabilidade ao epifitismo (RÍO; RAMAZANOV; GARCÍA-REINA, 1996). Porém, o uso de *Ulva* spp. em empreendimentos de AMTIM em águas abertas deve ser realizado de forma controlada, uma vez que este gênero pode causar as "marés verdes" em condições favoráveis de temperatura, luz e nutrientes (ZHANG *et al.*, 2017).

O estudo de MARINHO-SORIANO *et al*. (2009) demostrou a eficiência da macroalga *Gracilaria birdiae* na retenção de nutrientes no cultivo com camarões, reduzindo de 1,85 ± 0,03 µmol.L^{-1} para 0,10 ± 0,02 µmol.L^{-1} a concentração de PO_4^{-3} (93,5% de retenção) e 15,34 ± 0,92 µmol.L^{-1} para 7,34 ± 0,05 µmol.L^{-1} para NH_4^+ (54% de retenção), com taxa de crescimento algáceo de 3,60 ± 0,35 %.d^{-1}. Em estudos realizados no Chile, diversos autores obtiveram resultados positivos na associação de *Gracilaria chilensis* com cultivos de salmões, atingindo taxas de crescimentos até quatro vezes maior do que as observadas em bancos naturais (RETAMALES *et al*., 1994; BUSCHMANN *et al.*, 1996; TROELL *et al*., 1997). Segundo ABREU *et al.* (2009), 100 hectares de cultivo de *G. chilensis* têm eficiência para reter 100% da liberação de N inorgânico de uma produção de 1500 toneladas de salmão.

Outro gênero que apresenta potencial para AMTIM são espécies de *Gracilariopsis.* Estudos têm demonstrado que este gênero é eficiente na remoção de nutrientes da atividade aquícola (HERNANDEZ *et al.*, 2002; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). ALCANTARA *et al.* (1999) demonstraram uma maior taxa de crescimento de *G. bailinae* 4,72 ± 1,64 %.dia^{-1} quando cultivada associada com peixes. *Gracilariopsis longissima* teve retenção de 7,02 ± 0,74 µmol.L^{-1} de PO_4^{3-} e de 163,50 ± 16,30 µmol.L^{-1} de NH_4^+, com taxa de crescimento de 6 %.dia^{-1} (HERNANDEZ *et al.*, 2002).

Em suma, essa característica das macroalgas de retirar os nutrientes dissolvidos presentes na água, como N e P, com facilidade, faz destas espécies potenciais para serem utilizadas como filtros biológicos em sistemas AMTIM (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2009).

1.2. Valorização da biomassa algácea

A produção mundial de algas tem crescido significativamente nos últimos anos, tendo dobrado sua produção entre 2006 e 2015 (Fig. 2) (FAO, 2018). Isso mostra um grande interesse na produção de macroalgas pelo mercado mundial. Por isso a produção de algas em sistema de AMTIM se torna interessante não apenas pelo papel mitigador dos nutrientes que elas exercem nesse sistema, mas, também, por poder ser uma fonte de renda de alto valor, pois elas apresentam inúmeras propriedades nutricionais e bioativas.

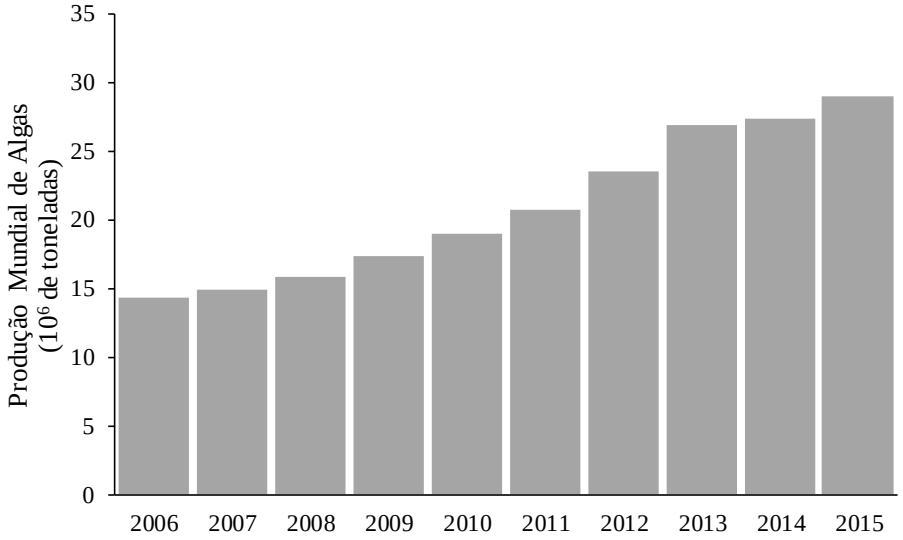


Figura 2 - Produção mundial anual de macroalgas em milhões de toneladas no período de 2006 a 2015 (Fonte: FAO 2018).

A macroalga vermelha *Gracilaria changii* tem em sua composição excelentes percentuais de fibras alimentares (64,74 ± 0,82%), apresenta baixa concentração de gorduras (0,30 ± 0,02%) e baixa razão de Na/K (0,12 ± 0,02) (CHAN; MATANJUN, 2017). Além de teores recomendados de aminoácidos essenciais (55,87 ± 0,02 $mg.g^{-1}$), o que está dentro do exigido pela FAO/WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Ulva lactuca* apresenta 11,5% de proteína bruta e 6,08% de lipídios, valores estes que são favoráveis para a aplicação

dessa macroalga como suplemento alimentar de animais arraçoados (ABDEL-WARITH *et al.*, 2016).

Muitas algas marinhas produzem hidrocoloides associados à parede celular e espaços intercelulares (PEREIRA *et al.*, 2017), que têm como principal mercado a indústria de alimentos, onde são utilizados como agentes de texturização e estabilizadores (BIXLER; PORSE, 2011). Os hidrocoloides carragenana, ágar e fucoidana são amplamente aplicados na produção de alimentos, fármacos e cosméticos, entre outros. A produção de carragenana é feita principalmente pela extração de espécies como *Kappaphycus alvarezii*, *Gigartina stellata*, *Chondrus crispus* e do gênero *Eucheuma* (MATHIESO; TVETER, 1976; WONG; CRAIGIE, 1978; SANTOS,1989; WEBBER; CARVALHO; BARRETO, 2012). O ágar é composto por polissacarídeos de cadeias lineares, estruturalmente semelhantes a carragenana (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009) sendo extraídas de um vasto número de rodófitas, principalmente dos gêneros *Pterocladiella*, *Gracilaria* e *Gelidium* (BOWKER; TURVEY, 1968; AKATSUKA; IWAMOTO, 1979; ESTEVEZ, CIANCIA; CEREZO, 2001; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008; FERREIRA, 2011). Fucoidanas são encontradas principalmente em algas pardas. Esses polissacarídeos apresentam diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidantes, antitumoral e estimulantes do sistema imunológico (GUPTA; ABU-GHANNAM, 2011a; COLLINS *et al.*, 2016; SWEWNEY O'DOHERTY, 2016).

Algumas algas demostraram propriedades bioestimulantes, podendo ser aplicadas na agricultura tradicional e orgânica como fonte nutricional complementar. Alguns trabalhos mostram que espécies das algas vermelhas *Kappaphycus e Gracilaria* têm potencial para uso como bioestimulante, aumentando 28% a produtividade de arroz (SHARMA *et al.*, 2017) e trigo (SALIM, 2016). A alga parda *Sargassum* tem mostrado ação estimulante na produção de cevada, aumentando em 32% a taxa de crescimento do grão (KUMARY; RAJ, 2016). Extratos de *Ulva* demonstraram proteção antioxidante em mudas de sálvia, aumentando a tolerância da planta a estresse de dessecação (MANSORI *et al.*, 2016). Os extratos da feofícea *Ascophyllum nodosum* demonstraram aumento foliar e elevação dos ácidos graxos essenciais em hortelã e manjericão (ELANSARY *et al.*, 2016).

Além de tudo, elas são fontes de antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos. Alguns estudos têm relatado a ação antioxidativa e antimicrobiana de extratos brutos de algas marinhas usando ensaios *in vitro* (COX, 2010; GUPTA; ABU-GHANNAM, 2011b), demostrando capacidade contra a oxidação lipídica em alimentos e estresse oxidativo de

tecidos. Considerando os dados extensos disponíveis sobre as propriedades nutricionais e funcionais de extratos de algas marinhas, seria interessante rever a eficácia destes compostos quando as algas são cultivadas em AMTIM. Alguns trabalhos demonstram que o crescimento das macroalgas em cultivos multitróficos afeta sua composição química, produzindo teores mais elevados de proteínas e outros compostos funcionais (BUSCHMANN *et al.*, 1996; CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999), podendo produzir compostos de alta qualidade que encontram aplicações em vários setores industriais e agrícolas. BUSCHMANN *et al.* (1996) relatam que em sistemas de cultivo do tipo *hatchery* de *G. chilensis*, alimentado com efluentes de cultivo de salmões, a alga apresentou aumento no rendimento de ágar de 26% em relação ao cultivo em sistemas sem influência da AMTIM. Chow *et al.* (2001), demostrou que *G. chilensis* cultivada com efluentes de peixes e ostras apresentam um ágar de melhor qualidade, em relação a algas cultivadas sem efluentes de animais.

1.3. *Gracilariopsis tenuifrons*

Para o cultivo AMTIM foi escolhida a macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* (Fig. 3) por ser uma alga agarófita, nativa (BIRD; OLIVEIRA, 1986; PLASTINO, 1991) e apresentar boas perspectivas de desenvolvimento em cultivo. A distribuição desta alga se dá no litoral oeste do oceano Atlântico, abrangendo países do mar caribenho e a costa brasileira, onde há registros do Ceará até águas mais frias de Santa Catarina (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Figura 3. Aspecto geral de *Gracilariopsis tenuifrons.* Foto: Ana Maria Pereira Barreto Amorim.

Como a maior parte das algas vermelhas, *G. tenuifrons* possui um ciclo de vida trifásico (Fig. 4), apresentando fase gametofítica (haploide), carposporofítica e tetrasporofítica (ambos diploides), com o gametófito e o tetrasporófito similares morfologicamente (isomórfico) e independentes, já o carposporófito é dependente do gametófito feminino (BRITO; SILVA, 2005).

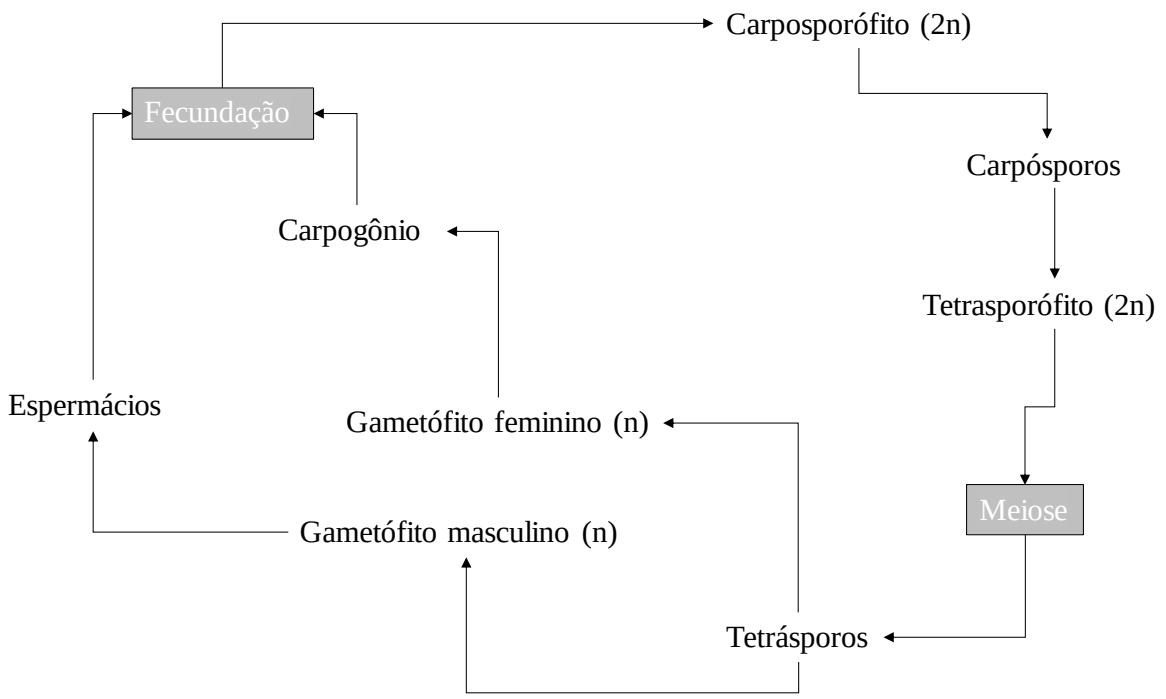


Figura 4 – Esquema geral do ciclo de vida da *Gracilariopsis tenuifrons*.

Gracilariopsis tenuifrons é uma espécie que apresenta bom crescimento, além de ser facilmente manejada em laboratório (PLASTINO, 1991), e possui ágar de qualidade (BRITO; LEMUS, 1998; BRITO; SILVA, 2005), o que é de importância para a indústria interna de ficocoloides, uma vez que a exploração nacional é realizada principalmente de forma extrativista no nordeste, que não supre a demanda interna, havendo a necessidade de importação (TORRES, 2012). Associada a esta conjuntura, esta alga vem despertando interesse científico (PLASTINO *et al.*, 1998; BRITO, 1999; ROSSA *et al.*, 2002; BRITO; SILVA, 2005; WANDERLEY, 2009; HARADA; CHOW, 2009; SERRA, 2013; TORRES; CHOW; SANTOS, 2015). Essa espécie foi escolhida para este trabalho devido ao fato de ser um modelo biológico já estudado, com fácil manejo em laboratório, e estar presente ao longo do litoral brasileiro.

1.4. Justificativa

Frente aos antecedentes apresentados anteriormente, uma produção mais consciente da aquicultura é uma tendência que deve ser seguida para o melhor aproveitamento dos recursos que dispomos. Dessa forma é possível usufruir do ambiente natural com o menor impacto e estresse ecossistêmico, garantindo que tanto os organismos criados e os selvagens que vivem próximos às zonas de cultivo tenham um ambiente saudável para seu desenvolvimento, tendo uma maior produção aquícola em uma menor área e podendo agregar um maior valor à produção, melhorando a imagem do setor. No final, produzindo um maior rendimento financeiro a partir de um "lucro" ecológico e de desenvolvimento sustentável.

Visto isso, o estudo aqui proposto busca relacionar de maneira interdisciplinar abordagens qualitativas e quantitativas, tanto do ponto de vista oceanográfico, quanto biológico e químico, as interações de um cultivo integrado entre molusco e macroalga. Além disso, busca analisar as macroalgas na aquicultura integrada marinha, no papel de retentor de nutrientes e produtora de biomassa com aplicação funcional, e investigar de que maneira a localização das macroalgas no cultivo integrado afeta o seu desenvolvimento e sua composição química.

Portanto, a realização deste estudo se justifica por sua relevância na busca de subsídios para estratégias de cultivo de uma espécie nativa integrada a um sistema de cultivo comercial de mexilhões em mar aberto. Com isso, visa fomentar a melhoria no uso de recursos naturais de forma sustentável para a sua produção no campo da aquicultura marinha para poder ser explorada de forma consciente, buscando o equilíbrio entre a produção e o bem-estar das comunidades marinhas.

2. Objetivo geral

Devido à grande complexidade das interações entre os organismos cultivados de maneira integrada e a interação com o meio marinho, este trabalho tem como objetivo geral a compreensão das interações entre o cultivo da macroalga *Gracilariopsis tenuifrons* integrada a uma fazenda de mexilhões para a produção de biomassa e dos fatores ambientais que podem afetar esta interação.

3. Referências

ABDEL-WARITH, A.W. A.; YOUNISA. M. I.; AL-ASGAHA. N. A. Potential use of green macroalgae *Ulva lactuca* as a feed supplement in diets on growth performance, feed utilization and body composition of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 23, n. 3, p. 404–409, 2016.

ABREU, M. H.; VARELA, D. A.; HENRÍQUEZ, L.; VILLARROEL, A.; YARISH, C.; SOUSA-PINTO, I.; BUSCHMANN, A. H. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. Aquaculture, v. 293, n. 3–4, p. 211–220, 2009.

AKATSUKA, I; IWAMOTO, K. Histochemical localization of agar and cellulose in the tissue of *Gelidium pacificum* (Gelidiaceae, Rhodophyta). Botanica Marina, v. 22, n. 6, p. 367-370, 1979.

ALCANTARA, L. B.; CALUMPONG, H. P.; MARTINEZ-GOSS, M. R.; MEÑEZ, E. G.; ISRAEL, A. Comparison of the performance of the agarophyte, *Gracilariopsis bailinae*, and the milkfish, *Chanos chanos*, in mono- and biculture. Hydrobiologia, v. 398–399, p. 443–453, 1999.

ALEXANDER, K. A.; HUGHES, A. D. A problem shared: Technology transfer and development in European Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA). Aquaculture 473: 13–19, 2017.

ALEXANDER, K. A.; FREEMAN, S.; POTTS, T. Navigating uncertain waters: European public perceptions of integrated multi trophic aquaculture (IMTA). Environmental Science and Policy 61:230–237, 2016.

BARRINGTON. K.; CHOPIN. T.; ROBINSON. S. 2009 Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In: Soto D (ed) Integrated mariculture: a global review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 529. FAO, Rome, pp 7-46

BIRD, C.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria tenuifrons* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta), a species from the tropical western Atlantic with superficial spermatangia 1. Phycologia, v. 25, p. 313–320, 1986.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. Journal of Applied Phycology, v. 23, n. 3, p. 321–335, 2011.

BOWKER, D. M.; TURVEY, J. R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part 1. Constituent units. Journal of Chemical Society, v.8, p. 983-988, 1968.

BRITO, L. Influencia del tratamiento alcalino sobre el agar de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales: Rhodophyta). Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, p. 67-70, 1999.

BRITO, L.; LEMUS, A. Variación anual en el rendimento y fuerza de gel del agar de *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et Oliveira) Fredericq et Hommersand de la Península de Araya, Venezuela. Boletín del Instituto Oceanográfico de la Universidad del Oriente, v. 37, n. 1-2, p. 74-79, 1998.

BRITO, L; SILVA, S Fenología y ciclo de vida del alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae) em Sucre, Venezulela. Revista de Biologia Tropical, v. 53, p.67-73, 2005.

BUSCHMANN, A. H.; TROELL, M.; KAUTSKY, N.; KAUTSKY, L. Integrated tank cultivation of salmonids and *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Hydrobiologia, v. 326–327, n. 1, p. 75–82, 1996.

CHAN, P. T.; MATANJUN, P. Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. Food Chemistry, v. 221, p. 302–310, 2017.

CHOPIN, T. Integrated multi-trophic aquaculture: What it is, and why you should care.and don't confuse it with polyculture. Aquaculture North America July/August: 4, 2006.

CHOPIN, T. Progression of the Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) concept and upscaling of IMTA systems towards commercialization. Aquaculture Europe, v. 36, n. 4, p. 4–12, 2011.

CHOPIN, T.; KERIN, B. F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. Phycological Research, v. 47, n. 3, p. 167–188, 1999.

CHOPIN, T.; SHAWN. R.; SAWHNEY, M.; BASTARACHE, S.; ARMSTRONG, W.; STEWART, I.; FITZGERALD, P. The AquaNet Integrated Multi-Trophic

Aquaculture Project: Rationale of the project and development of kelp cultivation as the inorganic extractive component of the system. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, FALTA VOLUME, PÁGINAS, 2004.

CHOPIN, T.; BUSCHMANN, A. H.; HALLING, C.; TROELL, M.; KAUTSKY, N.; NEORI, A.; KRAEMER, G. P.; ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J. A.; YARISH, C.; NEEFUS, C. Integrating seaweeds into marine aquacultute systems: A key toward sustainability. Journal of Phycology, v. 986, p. 975–986, 2001.

CHOW. F.; MACCHIAVELLO. J.; SANTA. CRUZ. S. FONCK E.; OLIVARES. J. Utilization of Gracilaria chilensis (Rhodophyta: Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. J World Aquacult Soc 32:215–220, 2001.

COLLINS, K; FITZGERALD, G; STANTON, C; ROSS, R. Looking beyond the terrestrial: The potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. Marine Drugs, v. 14, n. 3, p. 60, 2016.

COX, S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. International Food Research Journal, v. 17, p. 205-220, 2010.

CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Quimica Nova, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

EDWARDS, P.; PULLIN, R. S. V.; GARTNER, J. Research and education for the development of integrated crop-livestock-fish farming systems in the tropics. ICLARM Stud. Rev., p. 16–53, 1988.

EKAU. W.; AUEL. H.; Portner. H. O.; Gilbert. D. Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). Biogeosciences, v. 7, n. 5, p. 1669–1699, 2010.

ELANSARY, H. O.; YESSOUFOU, K.; SHOKRALLA, S.; MAHMOUD, E. A.; SKALICKA-WOZNIAK, K. Enhancing mint and basil oil composition and antibacterial activity using seaweed extracts. Industrial Crops and Products, v. 92, p. 50–56, 2016.

ERTÖR, I.; ORTEGA-CERDÀ, M. Political lessons from early warnings: Marine finfish aquaculture conflicts in Europe. Marine Policy , v. 51, p. 202–210, 2015.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. DL-galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. Carbohydrate Research, v. 331, n. 1, 27-41, 2001.

FAO. Integrated Mariculture: A Global Review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529, 2009.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2016.

FAO. The global status of seaweed production, trade and utilization. Globefish Research Programme Volume 124. Rome 120pp. License: CC BU-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 12, n. 4, p. 600–609, 2011a.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends in Food Science & Technology, v. 22, n. 6, pp. 315-326, 2011b.

HARADA, D.; CHOW, F. Efeito da luz nos sistemas antioxidantes da alga *Gracilariopsis tenuifrons*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, Ribeirão Preto. *Anais eletrônicos.* São Paulo: USP, 2009.

Disponível em: < https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo

HERNÁNDEZ, I.; MARTÍNEZ-ARAGÓN, J. F.; TOVAR, A.; PÉREZ-LLORÉNS, J.L.; VERGARA, J. J. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by the three species of estuarine macroalgae with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 2. Ammonium. Journal of Applied Phycology, v. 14, n. 1998, p. 375–384, 2002.

HERNÁNDEZ, I.; MARTÍNEZ-ARAGÓN, J. F.; VERGARA, J. J.; FERNÁNDEZ-ENGO, M. A.; PÉREZ-LLORÉNS, J. L. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: From microscale to macroscale. Aquaculture, v. 252, n. 1, p. 43–53, 2006.

IRISARRI, J.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; LABARTA, U.; CRANFORD, P.; SHAWN, M. C. Availability and utilization of waste fish feed by mussels *Mytilus edulis* in a commercial integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) system: A multi-indicator assessment approach. Ecological Indicators, v. 48, p. 673–686, 2015.

KUMARY, K. S. A.; RAJ, S. Length-weight relationship and condition of climbing perch *Anabas testudineus* Bloch population in Kuttanad, Kerala. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, v. 3, n. 3, p. 21–26, 2016.

MANSORI, M.; CHERNANE, H.; LATIQUE, S.; BENALIAT, A.; HSISSOU, D.; EL KAOUA, M. Effect of seaweed extract (*Ulva rigida*) on the water deficit tolerance of *Salvia officinalis* L. Journal of Applied Phycology, v. 28, n. 2, p. 1363–1370, 2016.

MARINHO-SORIANHO, E.; NUNES, S. O.; CARNEIRO, M. A. A.; PEREIRO, D. C. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. Biomass and Bioenergy, v. 33, n. 2, p. 327–331, 2009.

MARTÍNEZ-ESPIÑEIRA, R.; CHOPIN, T.; ROBINSON, S.; NOCE, A.; KNOWLER, D.; YIP, W. Estimating the biomitigation benefits of Integrated Multi-Trophic Aquaculture: A contingent behavior analysis. Aquaculture, v. 437, p. 182–194, 2015.

MATHIESON, A. C.; TVETER, E. Carrageenan ecology of *Gigartina stellate* (Stackhouse) batters. Aquatic Botany, v. 2, p. 353-361, 1976.

Nardelli, A.E., Chiozzini, V.G., Braga, E.S., Chow, F., 2019. Integerated multi-trophic farming system between the green seaweed Ulva lactuca, mussel, and fish: a production and bioremediation solution. J. Appl. Phycol. 31, 847–856.

NEORI, A.; CHOPIN, T.; YARISH, C. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. Aquaculture v. 231, p. 361–391, 2004.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; TORRANO-SILVA, B. N. *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. BIRD e E. C. OLIVEIRA) FREDERICQ & HOMMERSAND. www.algaemarisbrasilis,ccb.ufsc.br/busca3.php?id=357 2006.

PEREIRA, L.; SOARES, F.; FREITAS, A. C.; DUARTE, A. C.; RIBEIRO-CLARO, P. Extraction, characterization and use of carrageenans, Chapter 3. In Industrial Applications of Marine Biopolymers, 1st ed.; Sudha, P.N., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, p. 472, 2017.

PLASTINO, E.M. Cultivo *in vitro*. Estudos reprodutivos e biossistemática de algas gracilarióides (Rhodophyta, Gracilariales) de talo cilíndrico. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 170 p., 1991.

PLASTINO, E. M; URSI, S; HEIMBECKER, A. M. C. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariles, Rhodophyta). In IV Congresso Latinoamericano de Ficologia, 1998, Caxambú. Programa e Resumos. Caxambú, p.169, 1998.

PRADO, H. J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C. Agarans from the red seaweed *Polysiphonia nigrescens* (Rhodomelaceae, Ceramiales). Carbohydrate Research, v. 343, n.4, p. 711-718, 2008.

RETAMALES, C. A.; MARTINEZ, A.; BUSCHMANN, A. H. Long term productivity and agar yield of *Gracilaria chilensis* tank culture in southern Chile. Revista de Biología Marina, v. 29, p. 251-261, 1994.

RÍO, M. J.; RAMAZANOV, Z.; GARCÍA-REINA, G. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. Hydrobiologia, v. 326–327, p. 61–66, 1996.

ROSSA, M.; OLIVEIRA, M. C, OKAMOTO, O. K; LOPES, P. F. COLEPICOLO, P. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, v. 14, n. 3, p. 151-157, 2002.

SALIM, B. B. M. Influence of biochar and seaweed extract applications on growth, yield and mineral composition of wheat (*Triticum aestivum* L.) under sandy soil conditions. Annals of Agricultural Sciences, v. 61, n. 2, p. 257–265, 2016.

SANTOS, G. A. Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). Aquatic Botany, v. 36, p55-67, 1989.

SCHUENHOFF, A.; SHPIGEL, M.; LUPATSCH, I.; ASHKENAZI, A.; EMSUYA, F. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. Aquaculture, v. 221, n. 1–4, p. 167–181, 2003.

SERRA, D. R. Resposta de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales Rhodophyta) a estímulos de irradiância *in vitro* Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado 2013.

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

SWEENEY, T.; O'DOHERTY, J. Marine macroalgal extracts to maintain gut homeostasis in the weaning piglet. Domestic Animal Endocrinology, v. 56, pp. S84-S89, 2016.

TILLER, R.; BREKKEN, T.; BAILEY, J. Norwegian aquaculture expansion and Integrated Coastal Zone Management (ICZM): Simmering conflicts and competing claims. Marine Policy, v. 36, n. 5, p. 1086–1095, 2012.

TORRES, P. Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz. Tese de Mestrado, p. 104, 2012.

TORRES, P. B.; CHOW, F.; SANTOS, D.Y. Growth and photosynthetic pigments of *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light in vitro culture. Journal of Applied Phycology, v. 27, n. 3, p. 1243-1251, 2015.

TROELL, M.; HALLING, C.; NILSSON, A.; BUSCHMANN, A. H.; KAUTSKY, N.; KAUTSKY, L. Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output. Aquaculture, v. 156, p. 45–61, 1997.

TROELL, M.; HALLING, C.; NEORI, A.; CHOPIN, T.; BUSCHMANN, A. H.; KAUTSKY, N.; YARISH, C. Integrated mariculture: Asking the right questions. Aquaculture, v. 226, n. 1–4, p. 69–90, 2003.

TROELL, M.; JOYCE, A.; CHOPIN, T.; NEORI, A.; BUSCHAMAN, A. H.; FANG, J. G. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. Aquaculture, v. 297, n. 1–4, p. 1–9, 2009.

WANDERLEY, A. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade do nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 140 p., 2009.

WANG, X.; OLSEN, L. M.; REITN, K. I.; OLSEN, Y. Discharge of nutrient wastes from salmon farms: Environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture Environment Interactions, v. 2, n. 3, p. 267–283, 2012.

WEBBER, V.; CARVALHO, S. M.; BARRETO, P. L. M. Molecular and rheological characterization of carrageenan solutions extracted from *Kappaphycus alvarezii*. Carbohydrate Polymers, v. 90, p. 1744–1749, 2012.

WONG, K. F.; CRAIGIE, J. S. Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). Plant Physiology, v. 61, p. 663-666, 1978.

ZHANG, J.; ZHAO, P.; HUO, Y.; YU, K.; He, P. The fast expansion of *Pyropia* aquaculture in “Sansha” regions should be mainly responsible for the *Ulva* blooms in Yellow Sea. Estuarine, Coastal and Shelf Science, v. 189, p. 58–65, 2017.

Capítulo 1:

Testes laboratoriais para cultivo de *Gracilariopsis tenuifrons*: o uso de fonte alternativa de nutrientes e efeito da densidade do cultivo.

Resumo

Para obter bons resultados de produção algácea, a obtenção de cepas saudáveis e de qualidade é indispensável. Por isso, as boas práticas de cultivos laboratoriais devem ser estabelecidas para cada organismo cultivado. Além disso, os custos das operações de manejo devem ser baixos para manutenção das algas. Nesse sentido, os objetivos do trabalho descrito neste capítulo foram o de testar a viabilidade de utilização de uma fonte de nutrientes de baixo custo e o de verificar qual a melhor densidade (grama de alga/volume de meio de cultivo) para o cultivo da alga *Gracilariopsis tenuifrons*. Os resultados indicaram que a fonte alternativa de nutrientes aqui testada (Forth 30-10-10) é viável e promissora para o cultivo em condições semi-controladas de *G. tenuifrons*, e que esta espécie se desenvolve melhor em cultivos em baixa densidade (1 g/L).

Palavras-chaves: fonte alternativa, densidade de cultivo, Rhodophyta, cultivo semi-controlado.

Abstract

To obtain good results from algae production, obtaining healthy and quality strains is indispensable. Good laboratory practices should therefore be established for each organism cultivated. In addition, the costs of management operations should be low for algae maintenance. In this sense, the objectives of the work described in this chapter were to test the viability of using a low-cost nutrient source and to verify the best density (gram of seaweed/volume of culture media) for the cultivation of the seaweed *Gracilariopsis tenuifrons*. The results indicated that the alternative source of nutrients here tested (Forth 30-10-10) is viable and promising for cultivation under semi-controlled conditions of *G. tenuifrons*, and that this species has better culture development under low cultivation density (1 g/L).

Keywords: alternative source, cultivation density, Rhodophyta, semi-controlled cultivation.

1. Introdução

O cultivo em laboratório de algas sob condições controladas ou semi-controladas é fundamental para a obtenção de cepas saudáveis e de qualidade (ANDERSEN, 2005), o que favorece o desenvolvimento de inúmeras áreas da ciência e tecnologia nas quais essas algas são aplicadas. O ambiente laboratorial oferece um maior controle das condições em que as algas são submetidas, favorecendo a manipulação de condições de cultivo que possam ser mais adequadas para a obtenção de material limpo e com maior vigor de performance (ANDERSEN, 2005). Uma cultura algácea bem-sucedida requer cinco fatores chaves para a seu desenvolvimento, são eles: luz, temperatura, aeração, água e nutrientes (REDMOND *et al.*, 2014). Dentre as principais condições determinantes para o desenvolvimento de um cultivo em laboratório, dois são os que recebem maior destaque: a luz e os nutrientes.

As algas, como organismos fotossintetizantes, utilizam a energia luminosa para converter compostos inorgânicos em biomassa orgânica, usando a radiação fotossinteticamente ativa (PAR - *Photosynthetically Active Radiation*), que fica dentro da faixa do espectro de radiação da luz visível (400 nm-700 nm). Em um ambiente laboratorial, lâmpadas fluorescentes ou LEDs podem providenciar energia luminosa suficiente para o desenvolvimento de uma cultura, desde que se tome o devido cuidado para que as lâmpadas forneçam os comprimentos de onda adequados para as plantas (REDMOND *et al.*, 2014).

Do ponto de vista dos nutrientes, a água do mar é constituída por diversos elementos, que têm papel fundamental na nutrição das macroalgas. Esses nutrientes são peças-chave em vários processos biológicos, como crescimento, fotossíntese e reprodução (LOURENÇO, 2006). De modo geral, a água do mar tem as concentrações adequadas de nutrientes para o desenvolvimento das algas (HARRISON; BERGES, 2005), no entanto, sob um sistema de cultivo laboratorial é necessária a frequente suplementação de nutrientes, visto que em condições laboratoriais não existe uma renovação natural dos nutrientes na água que são consumidos pelas algas. Por isso, diversas formulações de soluções para a nutrição algácea têm sido propostas (LOURENÇO, 2006). Alguns meios de cultura são amplamente usados em pesquisas com macroalgas, como as soluções “f/2” propostas por GUILLARD (1975), Provasoli (PROVASOLI, 1966) e a solução de von Stosch (EDWARDS, 1970). Apesar desses meios de enriquecimento apresentarem bons resultados no crescimento das macroalgas, o custo da aplicação dessas soluções para a aquicultura se torna inviável. Por

isso, a busca por fontes alternativas de nutrientes que tenham baixo custo é muito apreciável para melhorar as despesas de produção (LOURENÇO, 2006).

O sistema de aeração tem múltipla importância na cultura de algas. Além de promover a troca gasosa entre o ambiente aéreo e aquático, fundamental para a difusão dos gases produto da fotossíntese e para a respiração, o sistema tem um papel de difusor, que promove a agitação do meio de cultura, promovendo o encontro das algas com os nutrientes dissolvidos na água e favorecendo a uma maior exposição dos talos da macroalga à irradiância luminosa. Fora isso, a constante agitação diminui a chance da proliferação de organismos epibiontes oportunistas, como algumas espécies de diatomáceas e algas verdes filamentosas, que não se desenvolvem bem em um ambiente turbulento (REDMOND *et al*., 2014). A água do mar é o meio de crescimento das macroalgas, portanto é indispensável que a cultura tenha um suprimento confiável de água limpa livre de contaminantes, como esporos de outras algas, microalgas e invertebrados. A água do mar natural é preferível em relação à água marinha artificial (ANDERSEN, 2005), pois a água do mar natural contém todos os componentes minerais essenciais, mais de 50 elementos conhecidos, nas proporções naturais (SVERDRUP; MARTIM; FLEMING, 1942), que podem ou não estar disponíveis em água do mar artificial.

Além dos fatores listados acima, a densidade das macroalgas em um cultivo (gramas de alga/volume ou m^2 de água do mar) é um fator primordial para o sucesso da cultura, visto que essa densidade afeta o quanto de recurso que cada grama de alga vai ter a sua disposição (REDMOND *et al*., 2014), afetando diretamente a proporção disponível de nutrientes e irradiância para o crescimento algáceo.

Portanto, o objetivo deste estudo é contribuir para o entendimento da melhor técnica de cultivo em laboratório da alga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* em condições controladas e semi-controladas, mediante a avaliação do uso de uma fonte de nutrientes de baixo custo, da densidade de cultivo *in vitro* e de um sistema de tanques indoor.

2. Matérias e métodos

2.1. Cultivo em laboratório e produção de biomassa algácea

A partir de uma biomassa de 38 g da cepa BG0039 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas "Édison de José Paula" (LAM) do Instituto de Biociências da USP (IB-USP), que corresponde à fase gametofítica de *G. tenuifrons* coletada em Cabo Frio RJ por Estela M. Plastino (COSTA, 2013), as algas foram multiplicadas vegetativamente por fragmentação dos seus talos e cultivadas em condições controladas de laboratório em água do mar filtrada e esterilizada, de salinidade de 32‰ e enriquecido com solução de von Stosch 50% (VS), preparada segundo URSI & PLASTINO (2001) e modificado de EDWARDS (1970) (Tabela 1). O material foi cultivado em uma proporção de 4 g de massa fresca (MF) por 1 L de meio de cultivo (Fig. 5), temperatura mantida a 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 14 h, irradiância de 100 ± 7 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e aeração fornecida em períodos alternados de 30 minutos. Esse cultivo foi realizado até se atingir biomassa suficiente para realizar os experimentos descritos abaixo.

Tabela 1. Composição da solução de enriquecimento de von Stosch (VS) segundo URSI & PLASTINO (2001) e modificado de EDWARDS (1970).

Composto	**Concentração**
$NaNO_3$	500 µM
$Na_2HPO_4.12H_2O$	30,00 µM
$MnSO_4.H_2O$	0,10 µM
$FeCl_3.6H_2O$	1,15 µM
Tiamina	0,59 µM
Biotina	4,10 nM
Cianocobalamina	0,74 nM
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	12,70 µM

Figura 5 - Cultivo em laboratório de *Gracilariopsis tenuifrons* feito em garrafas pet de 5 litros.

A água do mar foi coletada no município de São Sebastião, São Paulo, SP, e sua esterilização foi feita por meio de dupla filtração (filtro de pressão CUNO, porosidade de 5 e 1 µm) e com luz ultravioleta (UV-C) (*Germicide light water filter* – PHILIPS). A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo "luz do dia" (40 W, Osram, Brasil) e mensurada a cada duas semanas com medidor de quanta LI- 250 (LI-COR, EUA) e sensor esférico LI-193 (LI-COR, EUA).

Semanalmente, foram feitas as trocas do meio de cultivo e a mensuração da biomassa. Para isso, os talos foram lavados com água doce corrente, secos cuidadosamente em papel absorvente e pesados em balança analítica A500 (Marte, Brasil). Após esse procedimento os talos foram colocados em um novo frasco com meio de cultivo.

2.2. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial

A otimização das condições de cultivo em laboratório é uma peça chave na produção de biomassa algácea. Para tal, foram testadas duas densidades de algas: (a) 1 g/L (baixa densidade) e (b) 4 g/L (alta densidade), e mantidas nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. O crescimento foi acompanhado semanalmente por um período de quatro semanas, tendo cada tratamento três réplicas mantidas separadamente. A biomassa excedente foi retirada semanalmente para manter a densidade inicial. A taxa de crescimento

(TC) foi estimada segundo o modelo proposto por LIGNELL & PEDERSÉN (1989), **equação 1**:

$$\boldsymbol{TC}\ (\%.\boldsymbol{dia^{-1}}) = [(\boldsymbol{M_f}\ /\boldsymbol{M_i})^{\frac{1}{t}} - \mathbf{1}]\ \boldsymbol{x}\ \mathbf{100\%} \quad \textit{(1)}$$

onde: M_f = massa final (g), M_i = massa inicial (g), t = tempo (dias).

Segundo (YONG; YONG; ANTON, 2013) este modelo de TC é o que apresenta a melhor resolução para a descrição das taxas de crescimento das macroalgas.

2.3. Teste com fertilizante comercial

Com o objetivo de substituir a solução de enriquecimento de VS por um fertilizante comercial de custo menor, foi testado o fertilizante Forth® para crescimento de orquídeas 30-10-10 (Tecnutri do Brasil). Para este experimento, o cultivo foi implementado em sistema indoor sob condição semi-controlada de temperatura da água e luminosidade natural. O sistema era composto de cinco aquários plásticos de 11 L (Fig. 6A-B), com fluxo de água de 6 $L.h^{-1}$, correspondendo ao recâmbio total do volume do aquário em aproximadamente a cada 2 horas. A água de saída dos aquários era direcionada, através da gravidade, para um filtro Bag (BN da Hydro filtros duplos) com porosidade de 10 e 0,5 µm e, posteriormente, para uma caixa d'água de 150 L, que por uso de uma bomba sub Boyu Fp 2500 a água retornava aos aquários. A água usada nesse sistema tem a mesma origem (município de São Sebastião) e processo de esterilização (dupla filtração, 5 e 1 µm e UV-C) que o descrito anteriormente.

Neste experimento foram testadas duas concentrações da solução Forth, uma equivalente a 50% da concentração de nitrogênio da solução de VS (0,6 µM) e outra de 100% da concentração de nitrogênio de VS (1,2 µM). A Tabela 2 mostra as quantidades dos elementos N, P e K que compõem o fertilizante comercial e a respectiva concentração. O experimento teve duração de três semanas e semanalmente a biomassa era pesada e a taxa de crescimento calculada usando a equação 1. A massa excedente foi retirada semanalmente para manter a densidade inicial de 1 g/L.

Os dados de temperatura e luz em cada um dos tanques experimentais foram registrados com o uso da sonda HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger (UA-002-xx) (Fig. 6C).

Tabela 2. Composição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) do fertilizante Forth correspondente a 50% e 100% da solução de enriquecimento de von Stosch.

Nutriente	50%	100%
Nitrogênio (g)	0,0438	0,0876
Fósforo (g)	0,0146	0,0292
Potássio (g)	0,0146	0,0292

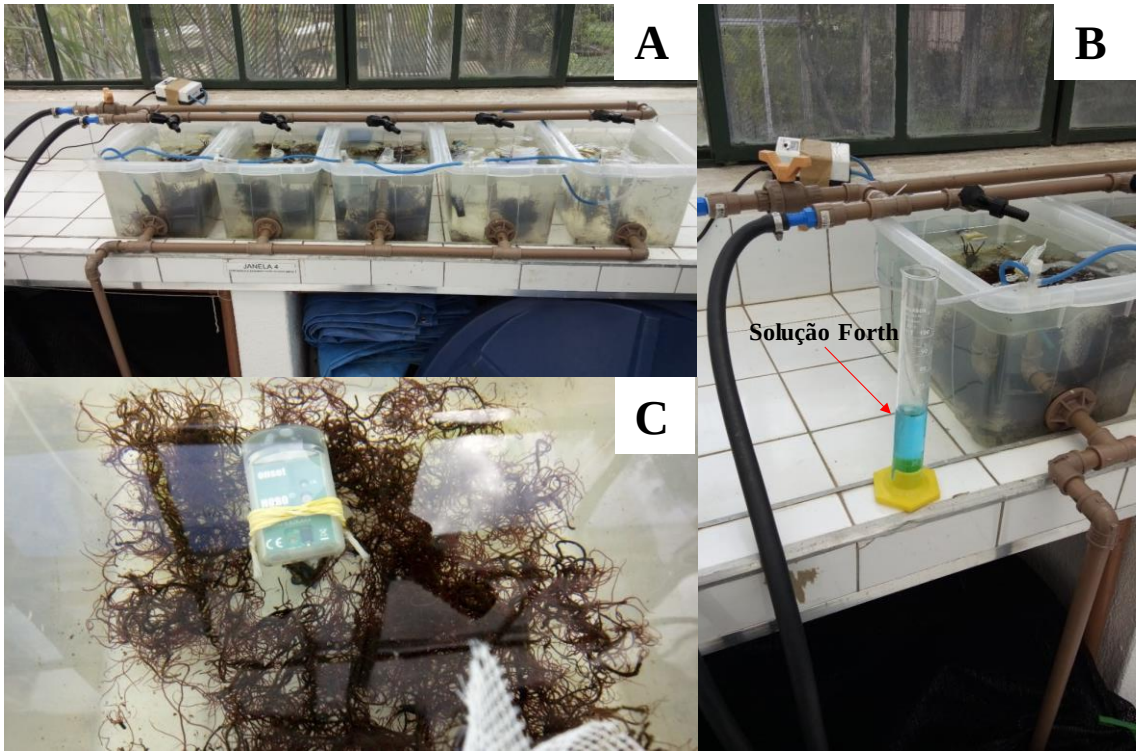


Figura 6 - (A) Sistema fechado recirculante de cultivo de *Gracilaria tenuifrons* indoor com os cinco aquários experimentais, (B) solução Forth e aquário indoor, (C) sonda HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger posicionada a 5 cm da superfície da água.

2.4. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) unifatorial. Observadas diferenças entre as médias, os dados foram submetidos à análise *pos-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (ZAR, 1984). Também foi feita uma análise de componentes principais (PCA) analisando múltiplos fatores. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Past v.2.17c.

3. Resultados

3.1. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial

As taxas de crescimento (TC) de *G. tenuifrons* ao longo do período experimental mostraram melhor desempenho na densidade de 1 g/L em relação à de 4 g/L (Fig. 7), com TC superiores entre 1 a 2 vezes apresentando diferenças (ANOVA $F = 31,35$; $df = 5,317$; $p = 0,00063$). O cultivo em densidade de 1 g/L teve média da taxa de crescimento de 6,33 ± 1,00 $\%.dia^{-1}$, enquanto o cultivo sob densidade de 4 g/L teve 2,42 ± 0,36 $\%.dia^{-1}$. O cultivo com menor densidade teve uma produtividade média 161% maior em relação ao do cultivo de maior densidade.

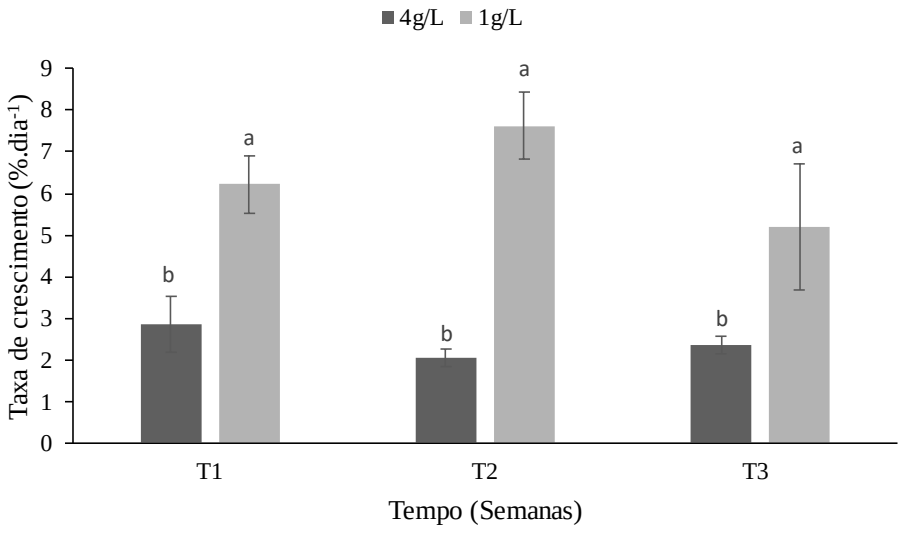


Figura 7 - Taxas de crescimento de *G. tenuifrons* cultivada sob densidades de 1 g/L e 4 g/L ao longo de três semanas de experimentação, T1, T2 e T3 representam as semanas. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas.

3.2. Teste com fertilizante comercial

O fertilizante comercial Forth foi avaliado em duas concentrações, 50% e 100% (ver composição de nutrientes em Tabela 2). O valor médio das taxas de crescimento para Forth 50% foi de 4,76 ± 0,89 %.dia^{-1} e para Forth 100% de 5,46 ± 1,44 %.dia^{-1} (Fig. 8). As algas cultivadas com Forth 100% tiveram taxas de crescimento diferentes das de Forth 50% na terceira semana de cultivo (ANOVA $F = 3{,}996$; $df = 10{,}71$; $p = 0{,}02696$).

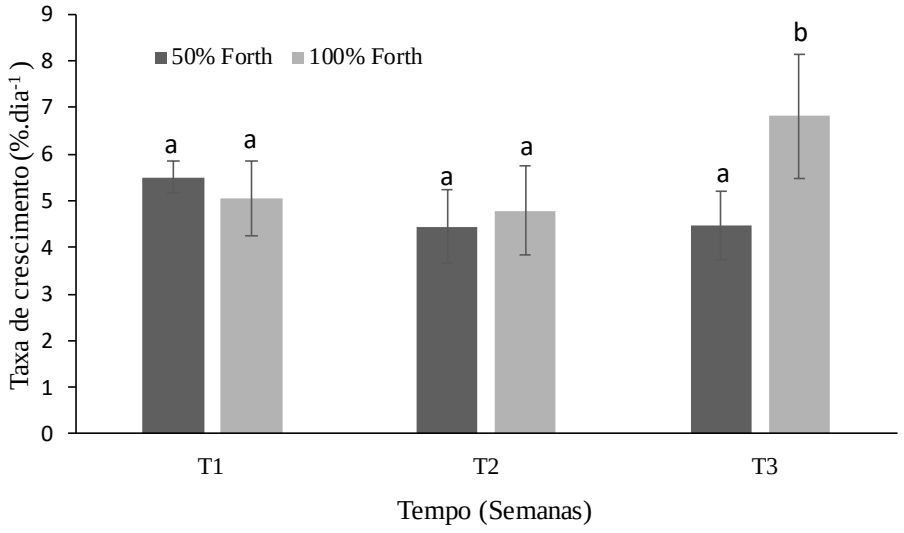


Figura 8 -Taxa de crescimento de *G. tenuifrons* sob duas concentrações de Forth (50% e 100%) ao longo de três semanas de experimentação, T1, T2 e T3 representam as semanas. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas.

A temperatura média nos aquários cultivados com Forth 50% foi 20,9 ± 0,06 °C, enquanto com Forth 100% foi 18,88 ± 0,15°C, sendo estatisticamente diferentes as temperaturas nos dois testes (Fig. 9) (ANOVA *F = 709,6; df = 5,395; p < 0,0001*). A média diária de irradiância foi de 105,3 ± 17,52 µmol de fótons.m^{-2}.d^{-1} para o cultivo com Forth 50% e de 73,2±15,2 µmol fótons.m^{-2}.d^{-1} para Forth 100%. A média de irradiância diária foi cerca de 30% maior no cultivo com Forth 50%, sendo estatisticamente diferentes (Fig. 10) (ANOVA *F = 11,9; df = 21,31; p = 0,002*).

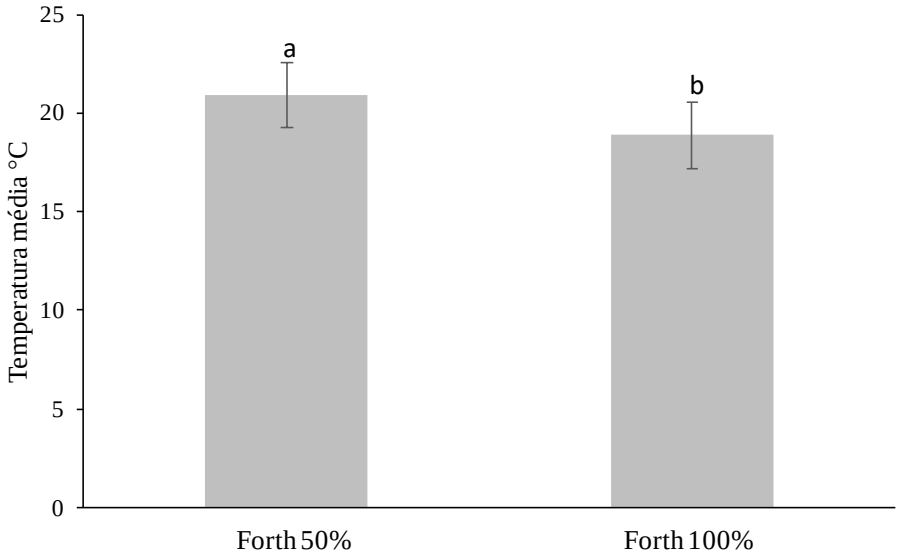


Figura 9 - Média da temperatura da água dos testes da solução Forth. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas.

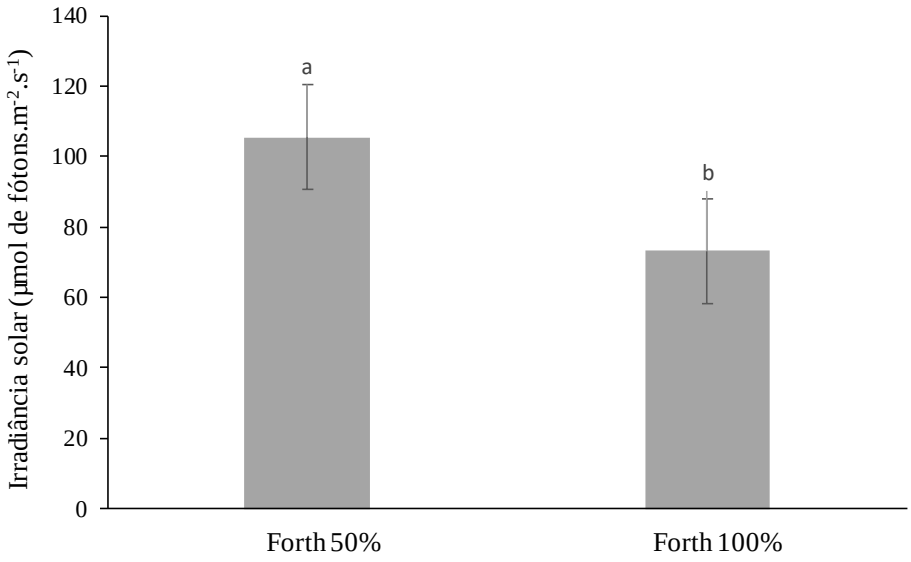


Figura 10 - Média da irradiância diária de fótons dos testes da solução Forth. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas.

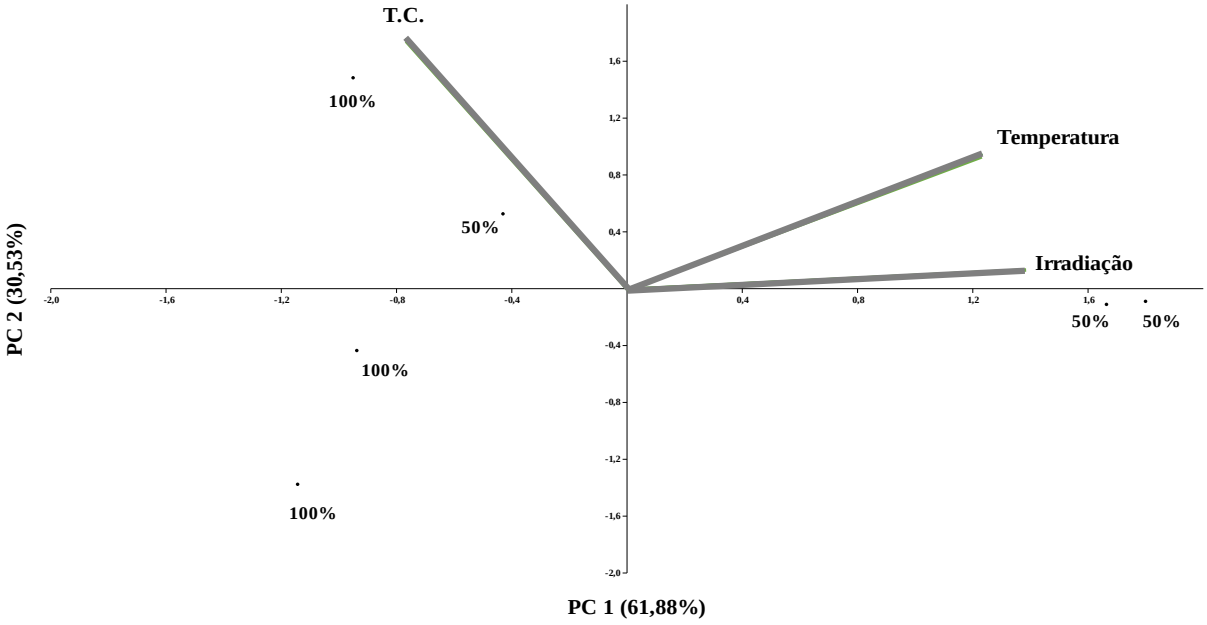


Figura 11 - Análise de componentes principais, fatores ambientais (temperatura, irradiação solar) e as taxas de crescimento.

Pela análise das componentes principais (Fig. 11), observa-se que o teste de com Forth 50% teve em geral maior influência da temperatura e irradiância, e o teste Forth 100% teve uma influência menor dos parâmetros ambientais, mas obtendo, na sua grande maioria, maiores taxas de crescimento.

4. Discussão

4.1. Teste de densidade algácea em cultivo laboratorial

Densidades de cultivo de 1 g de *G. tenuifrons* por litro de meio de cultivo mostrou melhor desempenho na taxa de crescimento do que densidades de 4 g/L. Uma menor biomassa de cultivo representa uma maior disponibilidade de nutrientes por grama de alga, tendo cerca de quatro vezes mais disponibilidade de nutrientes do que o tratamento de 4 g de macroalga por litro de meio de cultivo. Diversos estudos em algas Gracilariales têm mostrado que a concentração de nutrientes no meio afeta a taxa de crescimento. O trabalho de WANDERLEY (2009) mostrou que *G. tenuifrons* tem uma resposta positiva no seu crescimento com o aumento da oferta de nitrogênio. As taxas de crescimento observadas por essa autora foram similares aos deste trabalho, em que a relação quantidade de nitrogênio no meio de cultivo por grama de alga foi semelhante, sendo 0,6 µM (para 1 g de alga por litro) e 0,15 µM (para 4 g de alga por litro). Esse estudo, junto com os nossos resultados, mostra que *G. tenuifrons* é uma espécie que cresce muito bem em concentrações mais elevada de nitrogênio.

Outras espécies de rodófitas, também mostram uma preferência por concentrações mais elevadas de nutrientes. Para *Gracilaria birdiae*, COSTA (2005) avaliou concentrações de nitrogênio de 0,3 µM por litro, tendo taxas de crescimento de (6,4 ± 0,5 %.dia^{-1}), similares às obtidas em nosso estudo para *G. tenuifrons* sob densidade de cultivo de 1 g/L. *Gracilaria cornea* cultivada em densidade de 1 g/L, demostrou taxas de crescimento de 13 ± 0,76 %.dia^{-1}, com concentrações de nitrogênio similares aos do nosso estudo. Porém, no trabalho de NAVARRO-ÂNGULO & ROBLEDO (1999), foi usado amônia com fonte de nitrogênio, diferindo da fonte usada em nosso trabalho (nitrato). O uso de amônia em vez de nitrato pode favorecer o desenvolvimento das macroalgas, uma vez que para o nitrato ser usado nas vias

metabólicas é necessária a ação das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase para a redução de NO_3^- e NO_2^- em NH_4^+, gerando uma maior demanda energética, sendo menos vantajoso usar essas formas nitrogenadas oxidadas. Alguns trabalhos mostram que a presença de concentrações apreciáveis de NH_4^+, inibem a absorção de NO_2^- e NO_3^- (HAINES; WHEELER, 1978; TOPINKA, 1978; RYTHER *et al.*, 1981; CHOW, 2013; NARDELLI *et al.*, 2018). *Gracilariopsis lemaneiformis* cultivada com uma disponibilidade de NO_3^- 20% menor do que o cultivo (1 g/L) mostrou taxa de crescimento de 4,0 ± 1,4 %.dia^{-1} (ZOU, 2014).

Algumas algas gracilarioides apresentam respostas diferentes em relação a maior disponibilidade de nitrogênio, tendo taxas de crescimento menores à medida que se aumenta a oferta. É o caso de *Gracilaria tenuistipitata* que teve queda na sua taxa de crescimento com aumento dos nutrientes (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 1993).

O cultivo em baixa densidade também é vantajoso em relação a disponibilidade de luz por talo, uma vez que com menor densidade se diminui o efeito do auto-sombreamento (KÜBLER; RAVEN, 1995; PANG; LÜNING, 2004). Claramente, esse efeito do auto-sombreamento é reduzido em um cultivo laboratorial, onde se tem luz constante e agitação do cultivo pela aeração. Porém, em nosso sistema de cultivo, a aeração se faz por períodos alternados de 30 min, o que faz que parte do material cultivado receba menos incidência luminosa. Isto pode ter um efeito pequeno sobre esse sistema de cultivo, mas não deve ser descartado a sua influência. Além disso, *G. tenuifrons* demostrou taxas de crescimento maiores em alta irradiância luminosa (TORRES; CHOW; SANTOS, 2015), o que indica que o cultivo dessa alga em baixa densidade é vantajoso, tanto pelo melhor aproveitamento dos nutrientes como da irradiância.

4.2. Teste com fertilizante comercial

A busca por fontes de nutrientes menos custosas é muito importante para possibilitar a viabilidade da produção de cepas de macroalgas em sistemas laboratoriais sem a renovação de água, tornando sua produção sustentável do ponto de vista econômico, além de favorecer a geração de algas saudáveis para maricultura.

A utilização do fertilizante comercial Forth 30-10-10 em duas concentrações apresentou bons resultados em relação as taxas de crescimento, chegando a 5,5 %.dia^{-1} para

Forth 50% e de 6,8 %.dia^{-1} para Forth 100%. Estes valores são equiparáveis aos observados em cultivos laboratoriais de *G. tenuifrons* com solução de von Stosch 50%. SOUZA (com. pess.) cultivando com solução VS na densidade de 1 g/L teve taxa de crescimento de 5,30 ± 0,92 %.dia^{-1}; WANDERLEY (2009) teve 8 %.dia^{-1} de crescimento usando solução VS 50% enriquecida com nitrato. OLIVEIRA (2014) obteve taxas de crescimento de 1,14 ± 0,92 %.dia^{-1}, cultivando as algas com a mesma densidade e irradiância semelhante a este estudo, com efluentes da carcinicultura como fontes de nutrientes.

Nas condições de cultivo em aquários avaliadas neste estudo, *G. tenuifrons* crescida com solução Forth teve resultados similares a outros trabalhos com algas vermelhas. *Gracilaria birdiae* cultivada em tanques com densidade de 1 g/L teve taxas de crescimento de 3,60 ± 1,96 %.dia^{-1} (MARINHO-SORIANO, 2009); *Gracilaria tikvahiae* cultivada em VS teve 8,0 ± 2,6 %.dia^{-1} (KIM; YARISH, 2014); *Palmaria palmata* cultivada também em VS (50%) teve 5,8 ± 1,3 %.dia^{-1} (KIM *et. al.*, 2014); *Gracilariopsis lemaneiformis* crescida em meio com 100 µmol $NaNO_3$ teve taxas de 4,0 ± 1,4 %.dia^{-1} (ZOU, 2014); *Chondrus crispus* crescida em VS teve taxa de 5,25 ± 1,50 %.dia^{-1} (KIM *et. al.*, 2014).

5. Conclusão

Gracilariopsis tenuifrons teve maior taxa de crescimento em densidade de cultivo de 1 g/L, indicando bom crescimento em condições com maior disponibilidade de nutrientes por grama de alga cultivada, o que sugere uma preferência dessa alga por quantidades elevadas de nutrientes.

O fertilizante Forth para crescimento de orquídeas 30-10-10 se mostrou uma alternativa interessante para a produção de biomassa de *G. tenuifrons* e pode ser uma fonte de nutrição algácea de baixo custo, facilitando que produtores possam manter cepas em estoque com um baixo custo de manutenção.

6. Referências

ANDESEN, R. Phycological Methods: Algal Culturing Techniques. Academic Press, Elsevier Publ. 578 pp, 2005.

COSTA, V.L. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 100 p, 2005.

COSTA. E. Algas *Gracilarióides* (Gracilariaceae Rhodophta) na costa brasileira: Uma abordagem morfológica e molecular. Tese de Doutorado Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 2013.

CHOW, F.; PEDERSÉN, M.; OLIVEIRA, M. C Modulation of nitrate reductase activity by photosynthetic electron transport chain and nitric oxide balance in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 25:1847–1853, 2013.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, F. X. Biochemical and physiological responses of Gracilaria tenuistipitata under two different nitrogen treatments. Physiol. Plant. 88: 631-637, 1993.HAINES, K.C.; WHEELER, P.A. Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). J. Phycol. 14, 319– 324, 1978.

HARRISON, P. J.; BERGES, J. A. Phycological Methods: Algal Culturing Techniques. Academic Press, Elsevier Publ. 157-166 pp, 2005.

EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and seagrasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions to Marine Science, University of Texas at Austin 15: p1 – 228, 1970.

GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith, M.L. and Chanley, M.H., Eds., Culture of Marine Invertebrates Animals, Plenum Press, New York, p29-60,1975.

KIM, J. K.; DUSTON, J.; COREY, P.; GARBARY, D. J. Marine finfish effluent bioremediation Effects of stocking density and temperature on nitrogen removal

capacity of *Chondrus crispus* and *Palmaria palmata* (Rhodophyta) Aquaculture p414–415, p210–216, 2013.

KIM, J. K.; YARISH, C. Development of a sustainable land-based Gracilaria cultivation system. Algae n29(3), pp 217-225, 2014.

KÜBLER, J. E.; RAVEN, J. A. The interaction between inorganic carbon acquisition and light supply in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). Journal of Phycology 31: p369- 375, 1995.

LIGNELL, A.; PEDERS, M. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Botanica Marina v.32 p, 219-227, 1989.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações- São Carlos: RiMa, 606p. il. ISBN 85-7656-113-1, 2006.

MARINHO-SORIANO, E.; NUNES, S.O.; CARMNEIRO, M. A. A.; PEREIRA, D. C. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae Gracilaria birdiae. Biomass and Bioenergy, v. 33, n. 2, p. 327–331, 2009.

NARDELLII, A.E.; CHIOZZINI, V.G.; BRAGA, E.S.; CHOW, F. Integrated multi-trophic farming system between the green seaweed *Ulva lactuca*, mussel, and fish: a production and bioremediation solution J Appl Phycol, v. 30, 2018. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1581-4

NAVARRO-ANGULO, L.; ROBLEDO, D. Effects of nitrogen source, N:P ratio and Npulse concentration and frequency on the growth of Gracilaria cornea (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. Hydrobiologia 398/399: p315-320, 1999.

OLIVEIRA, S. R. Fluxo de nutrientes em um sistema de aquicultura orgânica, tese de Doutorado Departamento de Oceanografia e Limmologia, programa de pós-graduação em ecologia, 2014.

PANG, S. J.; LÜNING, K. Tank cultivation of the red alga Palmaria palmata: effects of intermittent light on growth rate, yield and growth kinetics. Journal of Applied Phycology 16: p93-99, 2004.

PROVASOLI, L. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A (end) Cultures and collections of algae. Proceedings of the US-Japan conference held at Hakone, p12-15, 1966.

REDMOND, S. L.; GREEN, C.; YARISH, J.; KIM, NEEFUS, C. New England Seaweed Culture Handbook-Nursery Systems. Connecticut Sea Grant CTSG-14-01. 92 pp, 2014.RYTHER, J. H.; CORWIN, N.; DEBUSK, T. A.; WILLIAMS, L. D. Nitrogen uptake and storage by the red algae *Gracilaria tikvahiae* McLachlan 1979, Aquaculture 26: p107–115, 1981.

SVERDRUP, H. U.; MARTIM, W. J.; FLEMING, R. H.; The Oceans, Their Physics, Chemistry, and GeneralBiology. NewYork: Prentice 1942.

TOPINKA, J. A. Nitrogen Uptake by *Fucus spiralis* (Phaeophyceae), Journal of Phycology 14: 241-247, 1978.

TORRES, P. B.; CHOW, F.; SANTOS, D. Y. Growth and photosynthetic pigments of *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light in vitro culture. Journal of Applied Phycology. 27(3): p1243 – 1251, 2015.

URSI, S.; PLASTINO, E. M. Cresimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de Gracilaria sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: analise de diferentes estádios reprodutivos. Revta brasil. Bot: p587-594, 2001

WANDERLEY, A. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento,

atividade do nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em

Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta). Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado. 140 p. 2009.

YONG, Y. S.; YONG, W. T. L.; ANTON, A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. Journal of Applied Phycology, v. 25, n. 6, p. 1831–1834, 2013.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 1984.

ZOU, D. Temperature response of photosynthetic light – and carbon -usecharacteristic in the red seaweed *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilarioles, Rhodophyta) Phycol. 50, p366–375, 2014.

Capítulo 2:

Cultivo integrado da alga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* e de mexilhões de uma fazenda marinha na Enseada do Mar Virado

---

Resumo

A produção da aquicultura tem projeções de crescimento para os próximos anos. Por isso, desenvolver práticas de cultivo que privilegiem o aproveitamento dos recursos e que minimizem o impacto que esses cultivos possam gerar no ambiente são de vital importância para garantir a sustentabilidade dessa produção. A Aquicultura Multi-Trófica Integrada Marinha (AMTIM) é uma técnica de cultivo que se baseia na reciclagem dos recursos disponíveis, isto favorece não só a produção aquícola, mas também ao meio ambiente. Com tudo, para que AMTIM seja eficiente em águas abertas, conhecer o ambiente e as interações entre o cultivo e o meio de criação são importantes para o real desenvolvimento desse método de produção. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o ambiente de uma fazenda marinha em relação a suas interações entre o cultivo integrado de mexilhões *Perna perna* e a macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* e fatores ambientais. As macroalgas foram colocadas em diferentes pontos da fazenda marinha de mexilhões e nesses pontos foram medidos parâmetros como concentração de nutrientes, velocidade e direção do fluxo d'água, temperatura e irradiância solar. Além disso, foi verificada a composição algácea em cada ponto de cultivo. Os resultados mostraram que existe uma diferença no crescimento das macroalgas em diferentes pontos, sendo que nos pontos em que o fluxo de nutrientes provenientes dos mexilhões era maior tiveram as maiores taxas de crescimento e uma maior concentração de compostos no material algáceo como proteínas, pigmentos e carboidratos. Assim, o conhecimento da dinâmica da área de cultivo integrado favorece uma melhor produção.

Palavras-chaves: multi-trófico, circulação, ecoeficiência, cultivo costeiro, produtividade.

Abstract

The production of aquaculture has growth projections for the coming years. Therefore, to develop cultivation practices that privilege the use of resources and minimize the environment impact are important to guarantee the sustainability of this production. Marine Integrated MultiTrophic Aquaculture (IMTA) is a farming technique based on the recycling available resources, which favors not only aquaculture but also the environment. Therefore, for IMTA efficiency in open water it is important to know the environment and the interactions between the different cultivation for the real development of this method of production. The aim of this work was to characterize the environment of a marine farm in relation to its interactions between the integrated cultivation of the mussel *Perna perna* and the red macroalga *Gracilariopsis tenuifrons* and environmental factors. The macroalgae were placed in different points of the marine mussel farm and in these points parameters such as nutrient concentration, velocity and direction of water flow, temperature, and solar irradiance were measured. In addition, the algal composition was verified at each growing point. The results showed that there was a difference in the growth of macroalgae at different points, in which points with higher nutrient flow from the mussels had higher algal growth rates and higher concentration of compounds such as proteins, pigments and carbohydrates. Thus, the knowledge of the dynamics of the integrated crop area favors a better production.

Keywords: multi-trophic, circulation, eco-efficiency, coastal cultivation, productivity.

1. Introdução

A produção no setor da aquicultura deve crescer 17% até 2025 em relação à safra de 2015, que foi de 166 milhões de toneladas (FAO, 2016). Para que esse crescimento seja sustentável, é necessário que as técnicas de produção consigam otimizar o uso dos recursos que o meio produtivo oferece (ERTÖR; ORTEGA-CERDÀ, 2015). Para esse fim, a Aquicultura Multi-Trófica Integrada Marinha (AMTIM) vem como uma solução prática e eficiente, trazendo diversos benefícios em comparação à monocultura como o aumento da produtividade de uma determinada área e a diminuição da pegada ecológica (TROELL *et al*., 2009).

A AMTIM baseia-se em um método de produção aquática sob o conceito de reciclagem e reutilização dos recursos (CHOPIN, 2006). Em lugar de cultivar uma única espécie (monocultura) e incidir os esforços sobre suas necessidades, a AMTIM tenta imitar um ecossistema natural, combinando o cultivo de várias espécies com funções ecossistêmicas complementares (CHOPIN *et al*., 2004). Dessa forma, os recursos não utilizados ou gerados por um nível trófico como, por exemplo, alimento ou ração, nutrientes particulados e dissolvidos, resíduos e subprodutos podem ser reaproveitados e convertidos em nutrientes e energia para outras culturas de nível trófico diferente, tendo a água como meio de conectividade entre os diversos níveis tróficos.

No cultivo multi-trófico integrado, as macroalgas retiram da água compostos dissolvidos como NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+, PO_4^{-3} e CO_2, que são provenientes das ações metabólicas dos organismos de níveis tróficos superiores ou da sua transformação no ambiente, e os incorporam na sua biomassa. Isto favorece o seu desenvolvimento, aumentando as taxas de crescimento, possibilitando também uma melhoria no valor energético e comercial das algas devido à produção e acúmulo de certos componentes metabólicos de grande interesse para a indústria e aplicações biotecnológicas, como por exemplo proteínas e polissacarídeos (WANG *et al.*, 2012).

O cultivo de várias espécies em um ambiente de águas abertas apresenta, contudo, muitas dificuldades devido à grande variedade de fatores bióticos e abióticos que o ambiente marinho possui (FAO, 2018). Por isso, conhecer as características do ambiente e a sua dinâmica nos locais onde se pretende realizar um cultivo é fundamental, de forma a possibilitar ao máximo o aproveitamento dos recursos com o mínimo de impacto (DUARTE, 2003).

2. Objetivo

O objetivo geral deste estudo é compreender as interações entre o cultivo da macroalga *Gracilariopsis tenuifrons* integrada a uma fazenda de mexilhões para a produção de biomassa e os fatores ambientais que podem afetar esta interação. Com isso, os objetivos específicos deste capítulo são:

- Estimar a área de influência de uma fazenda de mexilhões em relação à dispersão de nutrientes;
- Mensurar as taxas de crescimento das macroalgas e sua produtividade em diferentes pontos de cultivo ao longo da fazenda marinha;
- Avaliar as alterações na composição química algal nos diferentes pontos de cultivo da fazenda marinha.

3. Materiais e métodos

3.1. Área de estudo

O cultivo algáceo foi realizado de forma integrada dentro de uma fazenda marinha de mexilhões localizado na Praia da Lagoinha (23°31’42,70”S, 45°11’20,44”O), na Enseada do Mar Virado (Fig. 12), no município de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo. A região fica dentro do Parque Estadual da Serra do Mar e é composta por nove praias e dois rios, o rio da Lagoinha e o rio da Maranduba. A Enseada do Mar Virado possui profundidade média de 6 m, tendo uma desembocadura larga voltada para sul-sudeste. Os sedimentos superficiais da enseada são característicos de ambiente de baixo hidrodinamismo, com locais de deposição na região mais ocidental da enseada, tendo predomínio de fluxo superficial no sentido horário (MAHIQUES, 1995).

EMÍLSON *et al.* (1963) realizaram estudos oceanográficos e atmosféricos na Enseada do Mar Virado para avaliar a viabilidade da implantação de uma usina nuclear na Praia da Caçandoca, situada na enseada. Os autores caracterizaram a região como apta à implantação do empreendimento desde o ponto de vista de circulação marinha e condições atmosféricas. No entanto, apesar de apresentar uma característica de enseada abrigada, esta não oferece uma boa proteção às embarcações, pois ondas incidentes de sudeste ao chocarem com a linha de

costa acabam refletindo nos costões e ilhas rochosas da enseada, gerando uma intensa agitação de suas águas.

A população que reside na Enseada do Mar Virado é composta, hoje, principalmente por caiçaras, quilombolas e imigrantes de diversos estados brasileiros (CLAUZET; RAMIRES; BARRELLA, 2005). A região tem tradicionalmente uma intensa atividade de pesca, que é fonte de alimento e renda para as famílias locais. Atualmente, além da pesca, a comunidade local tem outras fontes de renda, como o turismo (CLAUZET; RAMIRES; BARRELLA, 2005). Na última década, houve implementação da maricultura, usufruindo da costa recortada e abrigada, ideais para o cultivo de organismos aquáticos.

Os cultivos de mexilhões da Enseada do Mar Virado ficam concentrados próximos ao costão rochoso da Praia da Lagoinha (Fig. 12). Eles foram implantados no início dos anos 80 por iniciativa da população local com apoio de instituições governamentais (CLAUZET, 2006).

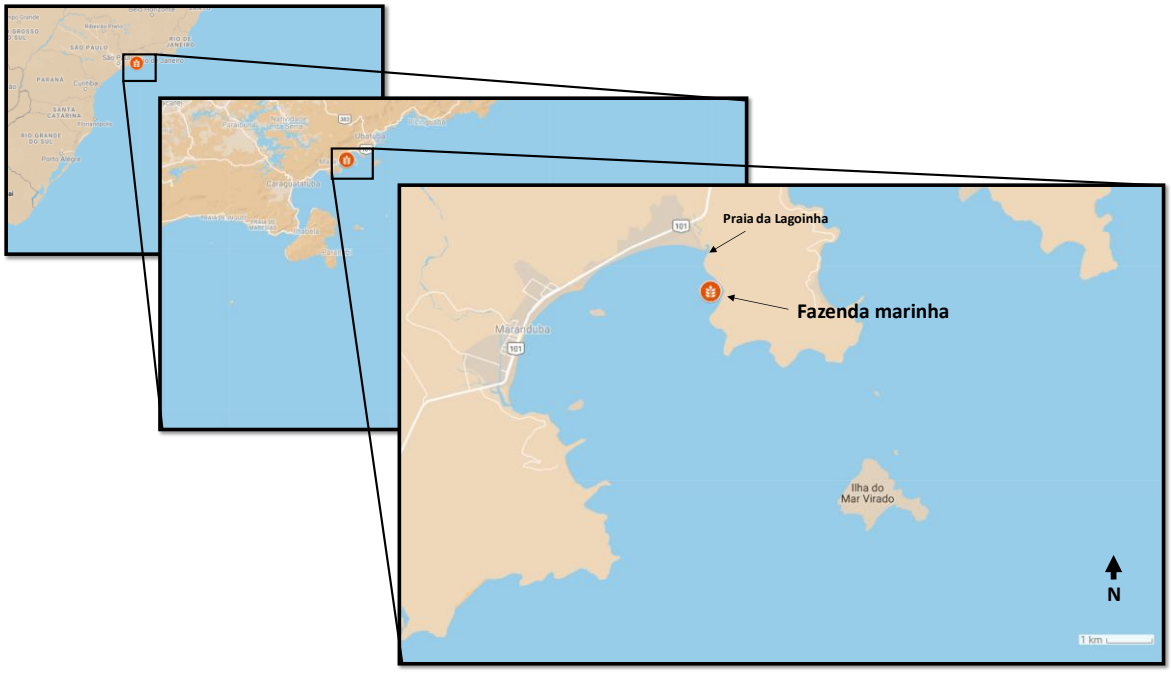


Figura 12- Localização da Enseada do Mar Virado e das estruturas flutuantes da fazenda marinha (23°31′42,70″S, 45°11′20,44″O).

3.2. Produção de mudas: cultivo *outdoor*

O material crescido em laboratório e *indoor* sob condições controladas e semi-controladas, respectivamente (ver detalhes em Material e métodos do Capítulo 1), foi cultivado *outdoor* a fim de aumentar a produção de biomassa para serem utilizados como mudas nos experimentos no mar e de aclimatar o material às condições climatológicas naturais. Cerca de 210 g de material foram cultivados em três aquários de vidro, com densidade algácea de 1 g/L (Fig. 13A) na base de pesquisa "Clarimundo de Jesus" do Instituto Oceanográfico da USP em Ubatuba, SP. Os aquários foram alocados dentro de uma piscina de plástico de 400 L que servia como sistema termorregulador para evitar o sobreaquecimento da água dos aquários (Fig. 13A). Cada aquário possuía um sistema de aeração independente. Para proteger os aquários da insolação excessiva e da chuva, foi construída uma cobertura que sobe-desce (Fig. 13B-C) para que, quando necessário, os aquários ficassem descobertos ou protegidos.

Figura 13 - Sistema de cultivo *outdoor* de *Gracilariopsis tenuifrons*. (A) Piscina termorreguladora com os três aquários de 50 L para o cultivo, (B) Cobertura para proteção contra radiação excessiva e chuva, (C) Remoção da cobertura em dias de baixa irradiância.

3.3. Cultivo de mexilhões

3.3.1 Mexilhão *Perna perna*

Figura 14 - Mexilhão *Perna perna*. Fonte: http://www.cenemar.org.br/.

O mexilhão usado neste trabalho é da espécie *Perna perna* (Fig. 14), que é um molusco filtrador, bivalve, da família Mytilidae. Tem um tamanho médio de 5-8 cm de comprimento, são mirtiliformes e sua cor é castanha pouco escuro (KLAPPENBACH, 1964). É o maior dos mitilídeos brasileiros, podendo atingir até 14 cm de comprimento (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1997). Ele habita desde a faixa exposta pelas marés baixas, do mediolitoral e infralitoral, até níveis superiores na face das rochas não protegidas dos impactos das ondas. É amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico e Índico e no Mar Mediterrâneo (VAKILY, 1989). Na costa atlântica da América do Sul é encontrado no Uruguai, Brasil e Venezuela (KENSLEY; PENRITH, 1970).

Perna perna é vulgarmente conhecido como marisco e é de grande importância econômica nacional e internacional, muito apreciado na alimentação humana. Por isso, tem sido estudado seu potencial para a mitilicultura no litoral brasileiro. SAWAYA (1965) já indicou o potencial do *P. perna* no litoral do estado de São Paulo e atualmente vários pesquisadores e mesmo pequenas empresas têm feito, com sucesso, bancos de criação no litoral de São Paulo e Santa Catarina.

3.3.2. Cultivo de mexilhões

Os mexilhões usados no experimento de cultivo foram provenientes de uma fazenda marinha, situada na Praia da Lagoinha (23°31’42,70”S, 45°11’20,44”O) no município de Ubatuba, SP (Fig. 12), sob a colaboração do maricultor Claudio Oliveira.

As “sementes” (larvas) de mexilhões foram obtidas através de coletores artificiais (Fig. 15A), que são cabos filamentosos instalados na superfície do mar, próximos aos bancos naturais de mexilhões ou próximo aos cultivos já existentes para a “captação” das larvas dos mexilhões que irão posteriormente recrutar e se desenvolver em juvenis e adultos.

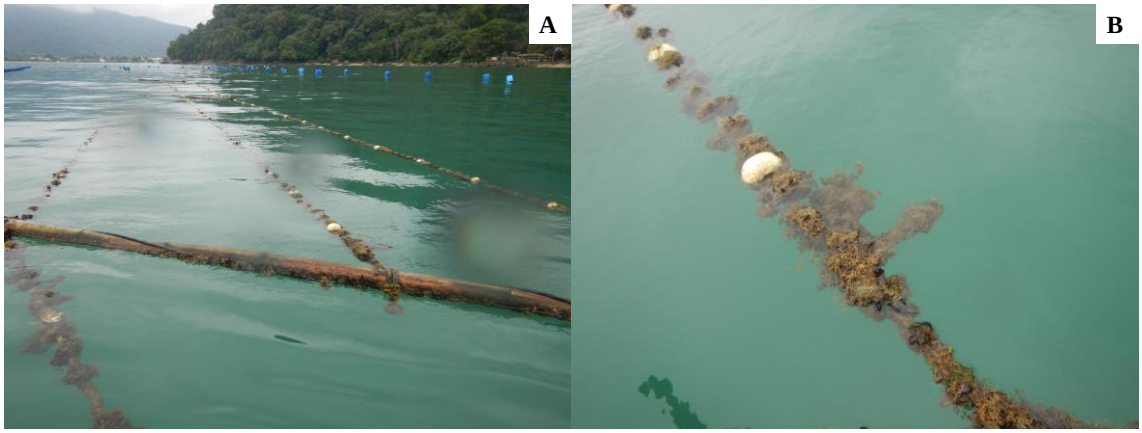


Figura 15 - (A) Sistema de coleta de "sementes" de mexilhões na fazenda marinha na Enseada do Mar virado; (B) Trama do coletor em detalhe.

Para se obter bons resultados na captação de “sementes”, é importante conhecer as épocas de reprodução e os picos de desova, sendo que o melhor período para a implantação dos coletores no mar é de um a dois meses antes do período de desova, devido à necessidade de formação de “limo” nos coletores, que trata de um biofilme (Fig. 15B). Este se forma sobre os cabos coletores mantidos submersos na água, que favorece o assentamento larval (Laboratório de Moluscos Marinhos – UFSC 2014*)*. Quando os coletores não são colocados no mar na época adequada há incrustação de outros invertebrados que não são interessantes do ponto de vista de cultivo, competindo com os mexilhões por recursos, como espaço e alimento. Os períodos de pico de liberação dos gametas dos mexilhões são entre abril e maio, setembro e entre novembro e janeiro (CLAUDIO OLIVEIRA, com. pess.).

Após quatro a seis meses da captação das “sementes”, foi feita a “debulhada”, que é a retirada das “sementes” do cabo coletor para limpeza das conchas, retirando os epibiontes. A

limpeza foi feita em uma mesa com uma tela rígida (Fig.16A). As sementes são esfregadas vigorosamente contra a tela, lavadas com água corrente (Fig. 16B), posteriormente classificadas conforme tamanho e replantadas nos cabos de engorda. O replantio para a engorda foi feito usando cabos de nylon de 8 mm de diâmetro e 1,5 m de comprimento, sendo plantados cerca de 500 indivíduos por cabo. O cabo é colocado dentro de um cano de PVC e este é vestido com uma rede fina de algodão. Por cima desta é colocada uma rede de nylon de 60 mm de malha. As sementes são colocadas no interior do cano de PVC com o auxílio de um funil. O tubo de PVC é então retirado e os mexilhões permanecem em contato com o cabo, mantidos pela rede de algodão, para a renovação do bisso e fixação definitiva dos animais; a rede de poliamina, mais rígida, tem a função de dar forma ao cacho. As duas redes se desmancham em algumas semanas, o que aumenta o fluxo de água para os mexilhões, favorecendo o seu desenvolvimento. A sequência de montagem dos cachos é mostrada nas Fig. 17 (A-F).

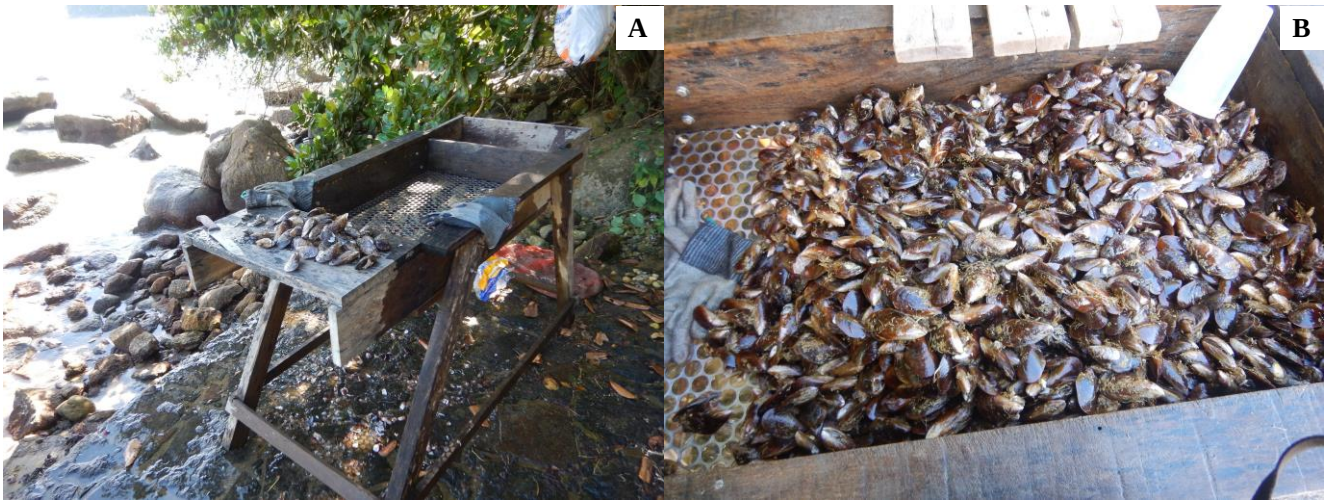


Figura 16 - (A) Mesa de limpeza de mexilhões; (B) Mexilhões limpos e classificados conforme o tamanho das conchas.

Figura 17 - Plantio de mexilhões. (A, B) inserção do cano de PVC dentro das duas malhas e do cabo; (C, D) as "sementes" são colocadas dentro do cano de PVC e preenchem as malhas; (E) amarração do cacho; (F) cacho pronto para ser colocado no *long-line* para a engorda dos mexilhões.

Após a montagem dos cachos em terra, eles foram levados novamente para o mar, onde foram colocados em um *long-line*. O sistema consiste de uma corda mestra (*long-line*) de 70 m, com flutuadores de plástico, espaçado de um metro entre si (Fig. 18A), que mantém o *long-line* na superfície. Para que a corda mestra permaneça posicionada, ela é fixada ao fundo por âncoras presas em ambas as extremidades. Ao todo, são colocados 100 cachos no *long-line* (Fig. 18B-C). A fazenda marinha tem uma área de 2000 m^2 de área lâmina d'água,

que é ocupada por um *long-line*, um cabo coletor de “sementes” e uma balsa de 3x3 m utilizada para o manejo da fazenda.

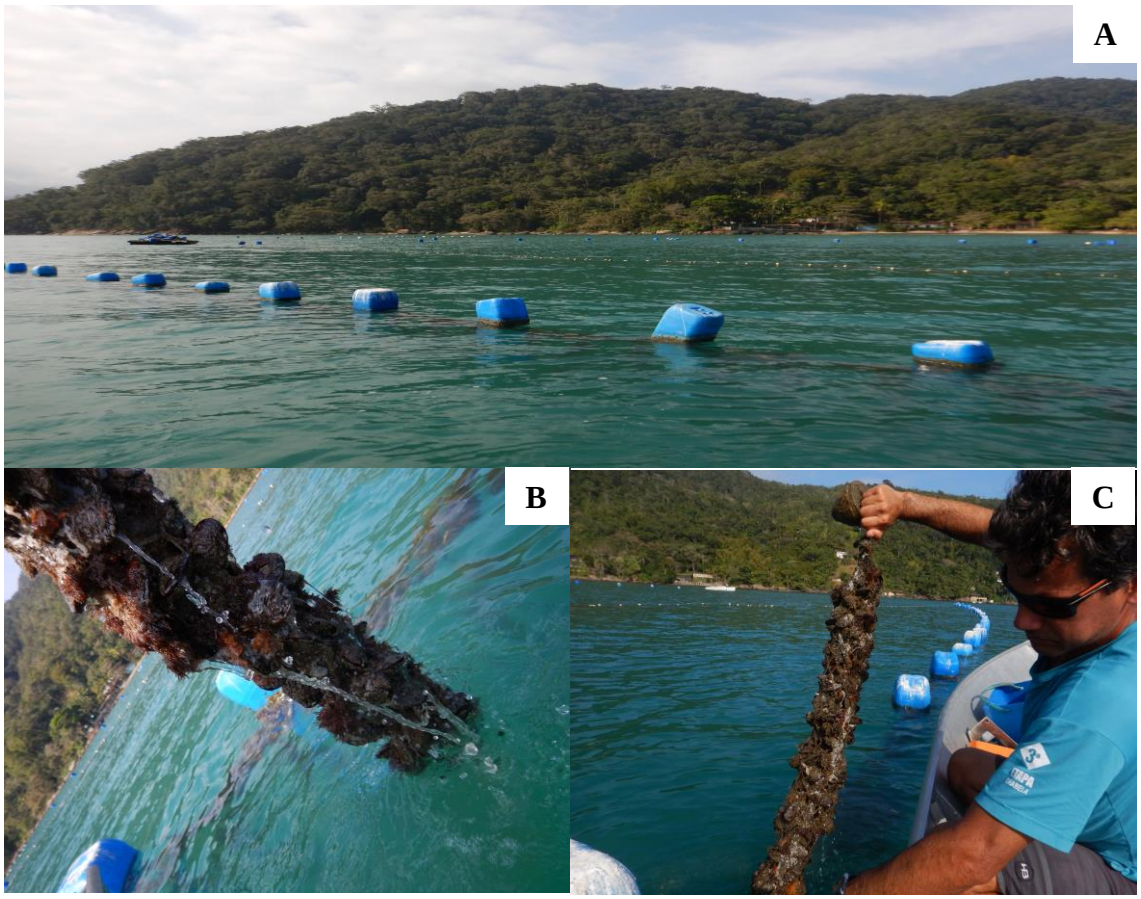


Figura 18 - (A) *Long-line* na fazenda marinha de mexilhões, com flutuadores para mantê-lo na superfície, (B e C) Corda de engordas dos mexilhões em detalhe.

3.4. Cultivo integrado

3.4.1. Teste piloto

Antes da realização do cultivo experimental, foi realizado um teste piloto para avaliar os possíveis pontos de fixação do cultivo de *G. tenuifrons* na fazenda de mexilhões e o sistema de cultivo de *G. tenuifrons*, a fim de verificar os problemas que poderiam dificultar a realização do experimento. Esse experimento piloto foi realizado de 9 de janeiro a 6 de fevereiro de 2018.

No teste piloto, foram escolhidos três pontos de cultivo de *G. tenuifrons* ao longo do *long-line* de mexilhões (*P1*, *P2* e *P3*), sendo dois deles fixos em cada extremidade do *long-line* e uma no meio do mesmo. *P1* corresponde à extremidade voltada para a Praia da Lagoinha, *P2* foi posicionada no centro do *long-line* e *P3* foi posicionada na extremidade opostas à Praia da Lagoinha (Fig. 19). Nestes pontos, as algas foram colocadas dentro de redes tubulares de 10 mm de trama (Fig. 20), com biomassa inicial de 5 g e com cinco réplicas para cada ponto (n = 5). Além disso, em cada ponto foram testadas duas profundidades de cultivo das algas, uma na superfície (Fig. 20A) e outra a 1 m de profundidade (Fig. 20B). Os procedimentos de biometria no teste piloto foram os mesmos dos do cultivo experimental (descrito abaixo). A tomada de dados climatológicos (temperatura e irradiância solar) também foram semelhantes ao cultivo experimental, porém, no teste piloto, só foi feito a coleta de dados em um ponto.

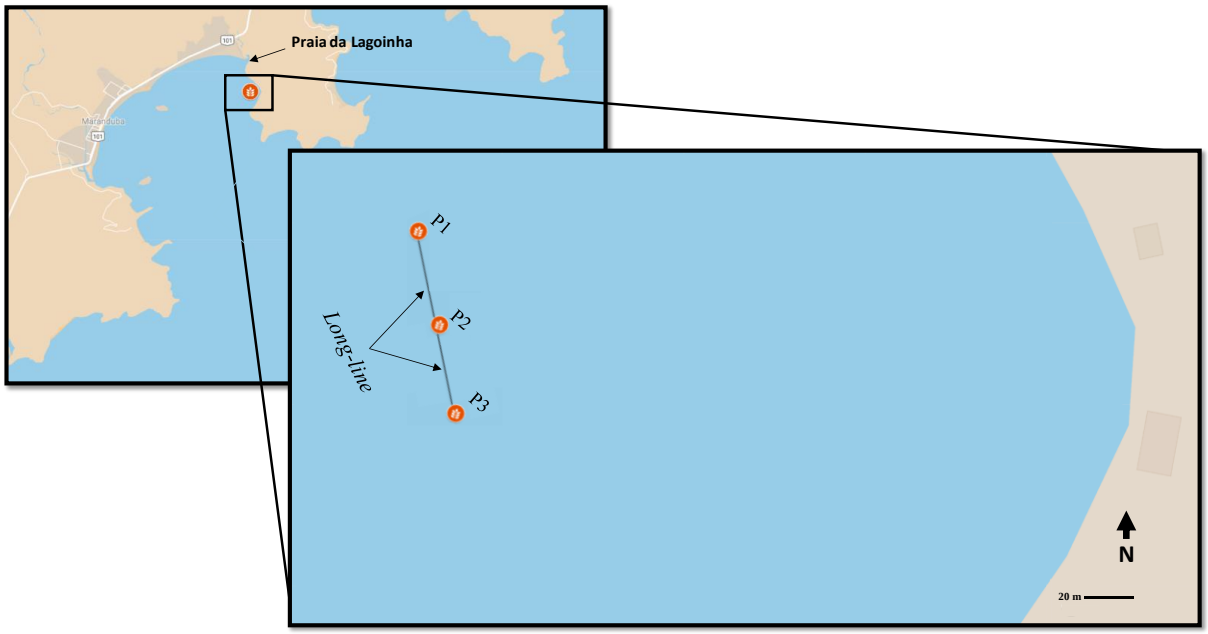


Figura 19 - Pontos de cultivo da macroalga *G. tenuifrons* no *long-line* de mexilhões no teste piloto. *P1* corresponde à extremidade voltada para a Praia da Lagoinha, *P2* foi posicionada no centro do *long-line* e *P3* foi posicionada na extremidade opostas à Praia da Lagoinha.

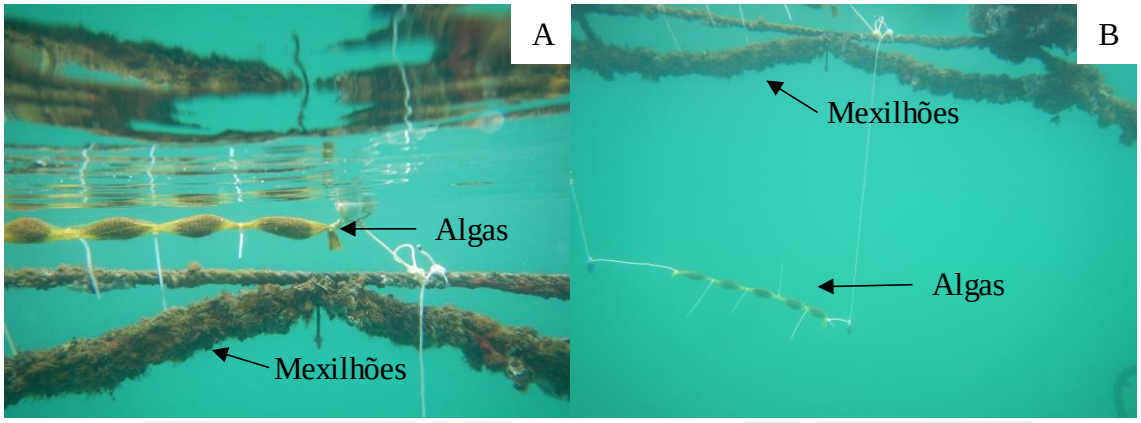


Figura 20 - Teste piloto. (A) Algas cultivadas na superfície, em redes tubulares fixas ao cultivo de mexilhões; (B) algas cultivadas a um metro de profundidade, em redes tubulares ao cultivo de mexilhões.

3.4.2. Cultivo experimental

Após o teste piloto com *G. tenuifrons*, com o intuito de entender a dinâmica em um cultivo integrado em águas abertas entre mexilhões e macroalgas, foi proposto um desenho experimental onde foram distribuídas mudas de 5 g da macroalga *G. tenuifrons* em quatro pontos ao longo de uma fazenda marinha de mexilhão (Fig. 21). Desses pontos, três pontos que estavam posicionados ao longo do *long-line*, sendo *P1* voltado para a Praia da Lagoinha, *P2* no centro do *long-line* e *P3* na extremidade oposta à Praia da Lagoinha. Além disso, foi posicionado o *P4* fora do *long-line* cerca de 20 m. Este experimento ocorreu entre os dias 29 outubro e 25 novembro de 2018.

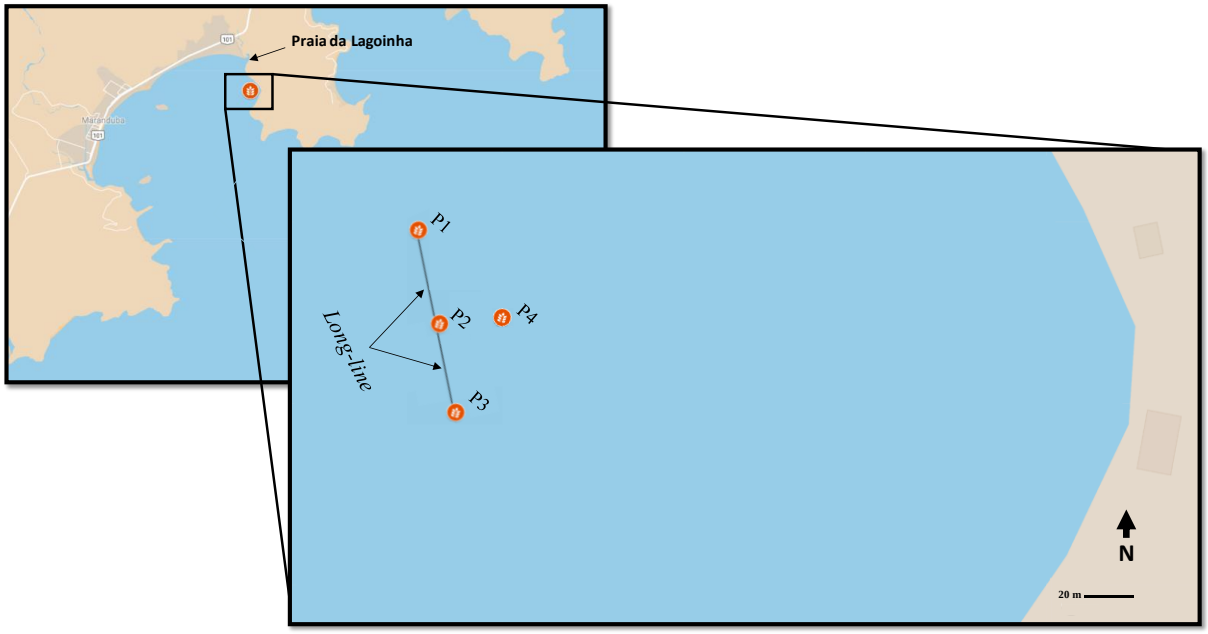


Figura 21 - Pontos de cultivo da macroalga *G. tenuifrons* no *long-line* de mexilhões durante o cultivo experimental. *P1* corresponde à extremidade voltada para a Praia da Lagoinha, *P2* foi posicionada no centro do *long-line*, *P3* foi posicionada na extremidade opostas à Praia da Lagoinha e *P4* foi colocado fora do *long-line*, cerca de 20 m, do lado de dentro da baia.

O cultivo da macroalga *G. tenuifrons* foi feito em redes tubulares de nylon de 10 mm de trama. Para cada ponto de cultivo, foram utilizadas cinco réplicas (n = 5), cada uma separada com o auxílio de abraçadeiras de nylon (Fig. 22). Segundo VEERAGURUNATHAN *et al*. (2015), o método de cultivo com redes tubulares apresentou os melhores resultados de crescimento em relação a outras técnicas para espécies de algas gracilarioides, por isso, tal método foi adotado no presente estudo.

Os cultivos foram feitos na superfície e a um metro de profundidade. As redes tubulares com as algas foram mantidas na superfície com o uso de flutuadores presos às extremidades (Fig. 23A) e as algas cultivadas a um metro de profundidade foram mantidas no fundo com o uso de pesos de chumbo de 300 g nas extremidades das redes tubulares (Fig. 23B).

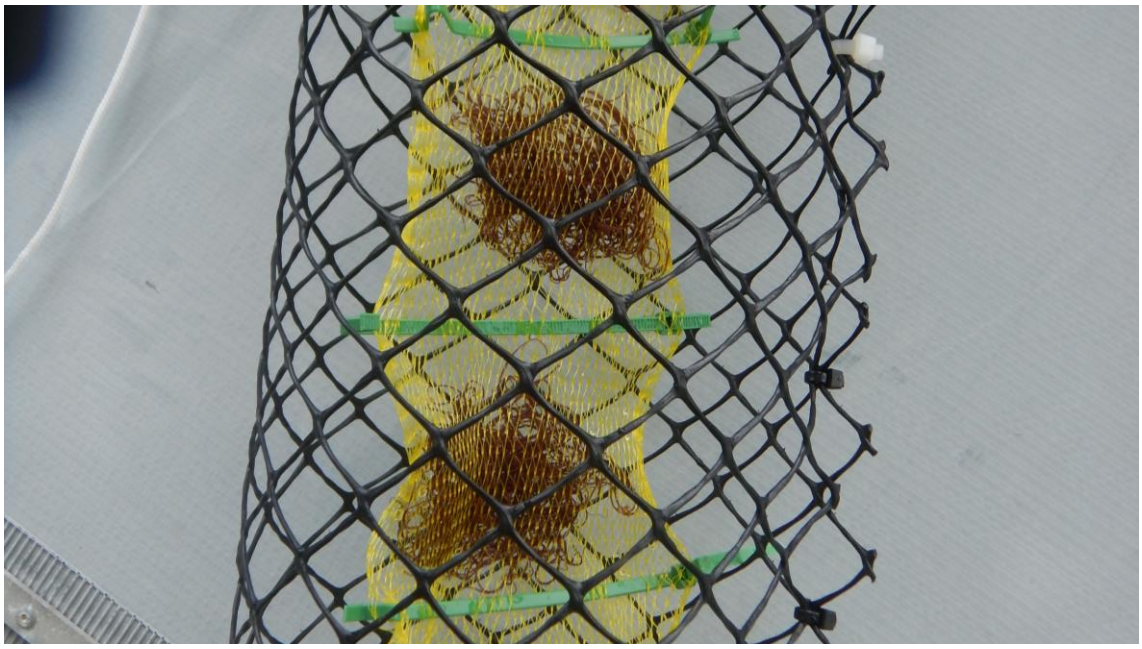


Figura 22 – Réplicas (*n* = 5) das algas mantidas em rede tubulares, com tela de proteção contra herbivoria.

No experimento piloto, descrito anteriormente, foi observado uma alta incidência de tartarugas marinhas que se alimentam das algas, rasgando as redes de cultivo. Por isso, optou-se por usar uma rede de proteção de polietileno de alta densidade com malha de 60 mm, como pode ser visto na Figura 23.

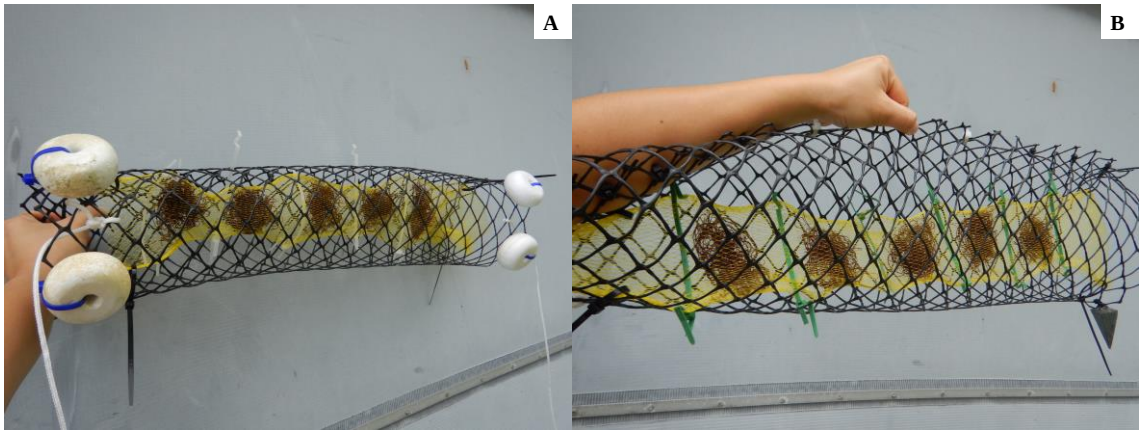


Figura 23 - (A) Sistema de cultivo na superfície, com as algas fixas por redes tubulares, envolvidas em uma tela de polietileno para proteção contra herbivoria, e flutuadores nas extremidades para manter as algas na superfície; (B) Sistema de cultivo a um metro de profundidade, com as algas fixas por redes tubulares, envolvidas em uma tela de polietileno para proteção contra herbivoria, pesos nas extremidades para manter as algas na no fundo.

3.4.3. Biometria das macroalgas

Semanalmente, foram realizadas pesagens para estimar as taxas de crescimento da alga, em balança semi-analítica (Electronic Pocket Scale®, Modelo Diamond 500), sendo que, após as medidas, as algas retornavam ao mar sem que houvesse retirada da biomassa excedente. A taxa de crescimento foi calculada segundo o modelo proposto por LIGNELL & PEDERSÉN (1989), **Equação (1)**:

$$TC = \left[\left(M_f/M_i\right)^{1/t} - 1\right] x100 \qquad (1)$$

Onde TC é a taxa de crescimento (%.dia^{-1}), M_f é a massa final (g), M_i é a massa inicial (g) e t é o tempo (dias) decorrido entre as medições.

3.4.4. Concentrações de nutrientes e clorofila

Durante a realização do cultivo experimental, foram coletadas semanalmente amostras de água em seis pontos: nos locais onde foram cultivados as macroalgas (*P1*, *P2*, *P3* e *P4*), um ponto fora da baia onde fica a fazenda marinha, que foi usado como ponto controle, sem a influência do cultivo de mexilhões (*P5*) e outra na desembocadura do rio Lagoinha (*P6*) (Fig. 24). A amostragem foi realizada com frascos plásticos opacos, envolvidos em papel alumínio, com capacidade de armazenamento de 2 L de amostra, para quantificação da concentração de nutrientes e clorofila. Os frascos de coleta foram previamente lavados com solução ácida (HCl 5%) e enxaguados abundantemente com água destilada. Após a amostragem, as amostras foram mantidas em um *cooler* com gelo até serem levadas ao laboratório em Ubatuba na base de pesquisa "Clarimundo de Jesus" do Instituto Oceanográfico da USP para filtração.

Ao chegar no laboratório, em um ambiente escuro para evitar a degradação da clorofila, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e filtradas com um sistema de filtração a vácuo (0,5 bar de pressão negativa) (Fig. 25), utilizando filtro de microfibra de borosilicato de 47 mm de diâmetro, com porosidade nominal de 0,45 μm Whatman® GF/F, onde o material particulado em suspensão foi retido. Os filtros contendo o material

particulado em suspensão foram então cuidadosamente retirados do sistema de filtração com a ajuda de pinças, acondicionados individualmente em tubos de polipropileno com tampa, com capacidade de 15 mL e, em seguida, os tubos foram embrulhados em papel alumínio e armazenados em freezer a -20 °C até o momento da análise das amostras. A água filtrada foi coletada em frascos plásticos de 250 mL, congelada a -20 °C e mantidas assim até a análise de concentração de nutrientes dissolvidos.

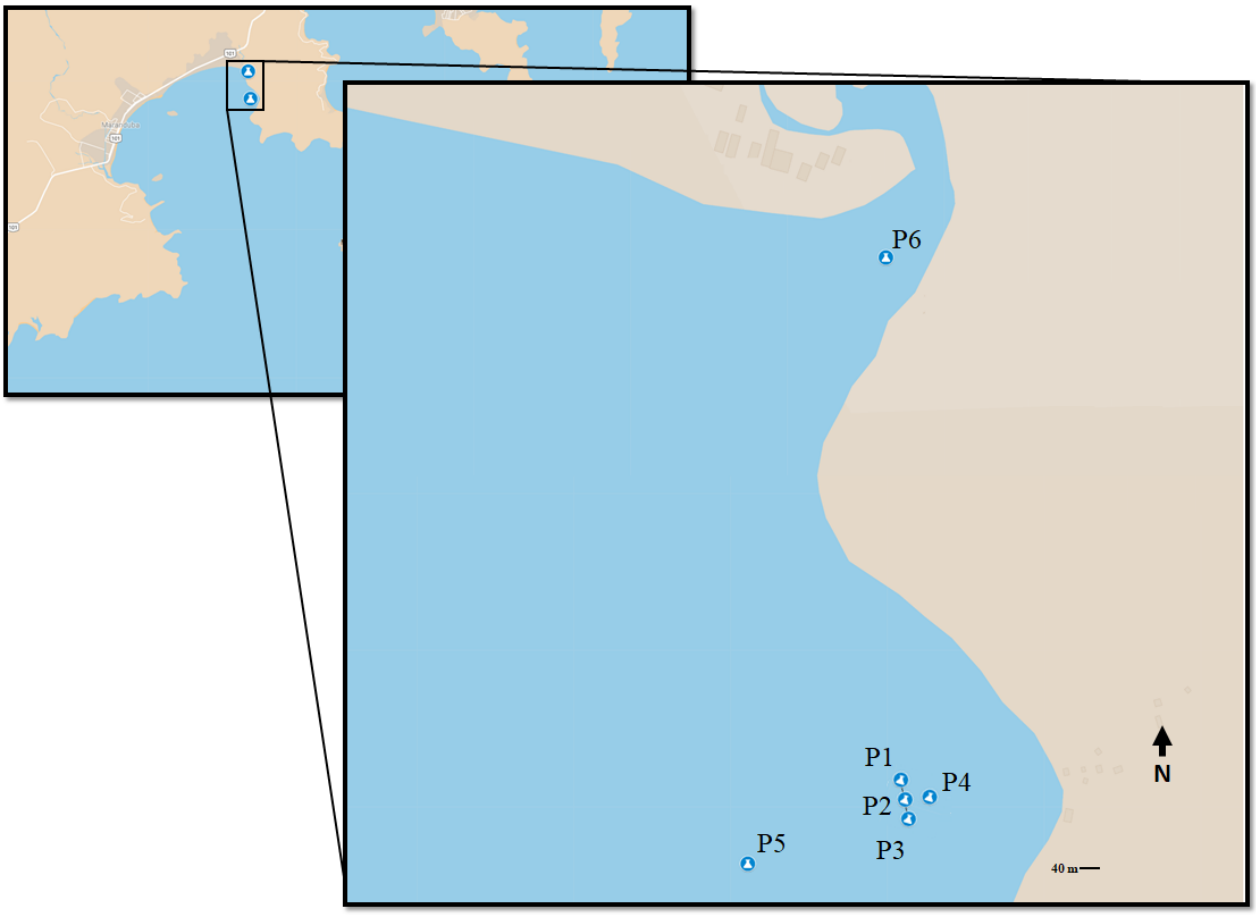


Figura 24 - Pontos de amostragem de água do mar, *P1*, *P2*, *P3* e *P4* sendo locais onde as macroalgas foram cultivadas, *P5* local sem a influência da fazenda marinha e *P6* a desembocadura do rio lagoinha.

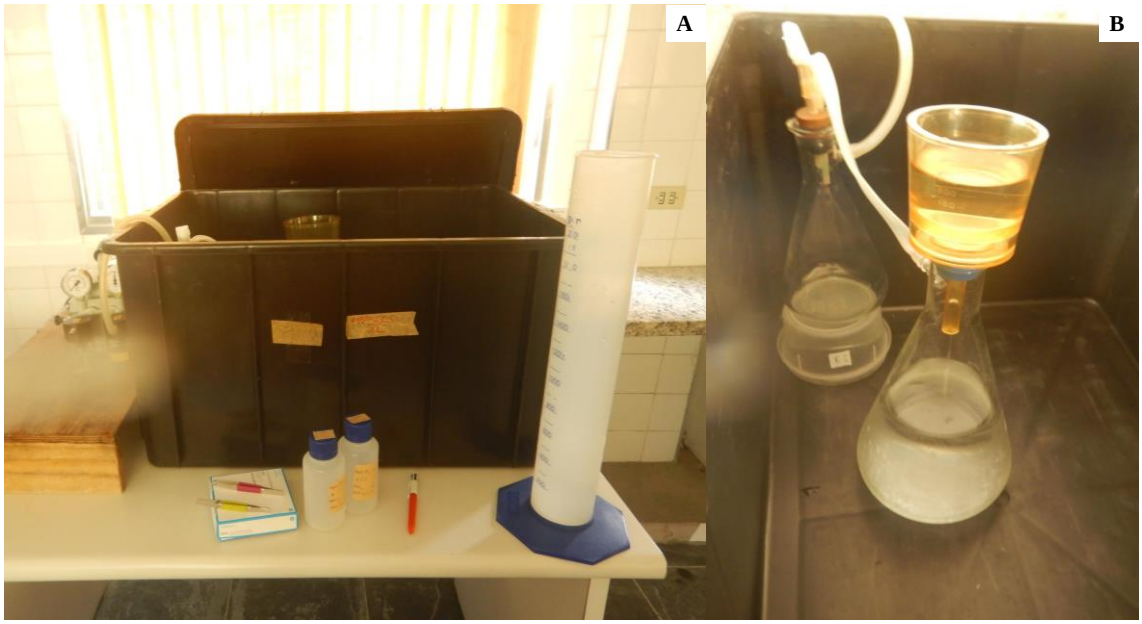


Figura 25 - (A) Amostras e água do mar acondicionadas para filtragem das amostras de água; (B) Sistema de filtragem de água do mar.

As análises de nutrientes e clorofila da água do mar foram feitas em colaboração com o Laboratório de Biogeoquímica de Nutrientes, Micronutrientes e Traços nos Oceanos (LABNUT) do Instituto Oceanográfico da USP. Os teores de ureia foram avaliados através da análise descrita por AMINOT & KEROUEL (1982), com adaptações feitas por BRAGA (com. Pess.). As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Thermo® Evolution modelo 201, em cubetas de quartzo de 50 mm de percurso ótico a 526 nm. A precisão do método é de ± 0,15 $\mu mol.L^{-1}$.

A quantificação das concentrações de N-amoniacal foi feita através do método espectrofotométrico, como descrito em TRÉGUER & LE CORRE (1975), sob o comprimento de onda de 630 nm, em cubetas de quartzo de 50 mm de percurso ótico, utilizando um espectrofotômetro Thermo® Evolution, modelo 201. A precisão do método é de ± 0,05 $\mu mol.L^{-1}$.

As determinações de nitrato e nitrito foram realizadas através de método colorimétrico, sendo que para o nitrato, houve a redução para nitrito com o uso de coluna de cádmio cuperizado, conforme descrito em WOOD *et al.* (1967). A diferença entre os teores de nitrito total (NO_2^- + NO_3^- reduzido) e nitrito inicial forneceram o valor de nitrato. As análises foram realizadas por procedimento automatizado, utilizando um sistema Seal® AutoAnalyzer II, em fluxo segmentado, seguindo as recomendações de TRÉGUER & LE-CORRE (1975), BRAGA (1997a, 1997b) e GRASSHOFF; EHRHARDT; KREMLING (1999). A precisão do método para nitrito é de ± 0,01 $\mu mol.L^{-1}$ e para nitrato é de ± 0,02 $\mu mol.L^{-1}$.

A quantificação das concentrações de fosfato inorgânico foi feita por método espectrofotométrico, utilizando a metodologia descrita em GRASSHOF; EHRHARDT; KREMLING (1999). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Thermo® Evolution, modelo 201, sob o comprimento de onda de 880 nm, em cubetas de quartzo de 50 mm de percurso ótico. O método tem precisão de ± 0,01 $\mu mol.L^{-1}$.

Os teores de silicato nas amostras foram determinados segundo o procedimento espectrofotométrico descrito por GRASSHOFF (1983). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro Thermo® Evolution, modelo 201, utilizando cubetas de 10 mm de percurso ótico, em 810 nm de comprimento de onda. O método apresenta uma precisão de 0,05 $\mu mol.L^{-1}$.

A determinação das concentrações de clorofila foi realizada através do método espectrofotométrico em um equipamento Thermo® Evolution modelo 201. A clorofila *a* ativa do fitoplâncton, retida nos filtros, foi extraída com acetona 90% durante 24 h, a 4 °C e as

concentrações de clorofila foram determinadas pelo método de STRICKLAND & PARSONS (1968).

3.4.5. Dados climatológicos

A temperatura e a irradiância solar foram mensuradas com as sondas HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger, instaladas na superfície (Fig. 26A) e a um metro de profundidade (Fig. 26B). No teste piloto, os sensores foram colocados apenas em um ponto (próximo ao *P2*), enquanto no cultivo experimental foram colocados sensores no ponto voltado para a praia da Lagoinha (*P1*) e no ponto voltado para o mar (*P3*).

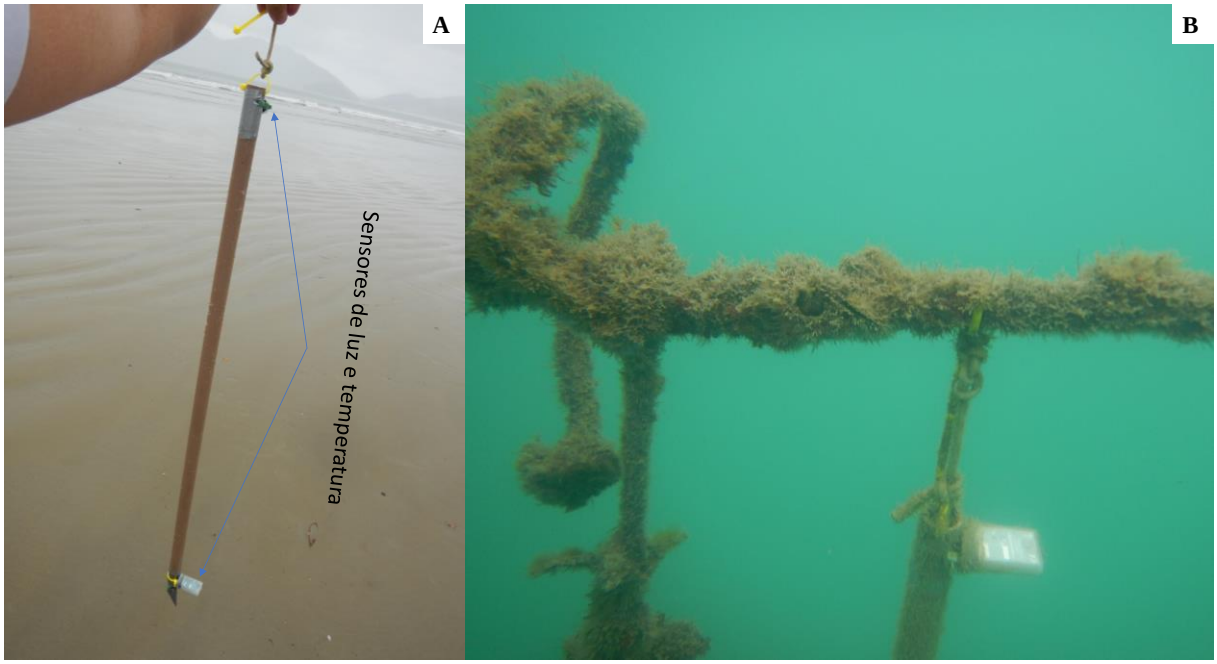


Figura 26 - (A) Sensor de luz e temperatura colocados na superfície e a um metro de profundidade. (B) Estrutura onde o sensor de luz e temperatura foi fixa.

3.4.6. Descarga fluvial

Próximo à fazenda marinha existe a desembocadura do rio Lagoinha, que fica aproximadamente a 900 m do cultivo. É um rio de pequeno porte, mas que pode ter influências sobre o cultivo. Por isso, sua vazão foi estimada semanalmente.

Foi tomada uma seção longitudinalmente ao rio, próximo a sua desembocadura, onde foi medido o comprimento da seção e a profundidade em três pontos ao longo dessa seção (Fig. 27), para calcular a área, usando a **Equação 2**. Esta área foi então multiplicada pela velocidade do fluxo do rio afim de encontrar o fluxo médio.

$$\text{Á}\boldsymbol{rea} = \left(\frac{\boldsymbol{x1.h1}}{\mathbf{2}} + \frac{(\boldsymbol{h1+h2}).\boldsymbol{x2}}{\mathbf{2}} + \frac{\boldsymbol{x3.h2}}{\mathbf{2}}\right) \qquad \textbf{(2)}$$

Onde x_n são das distancias entre profundidades e h_n são as profundidades.

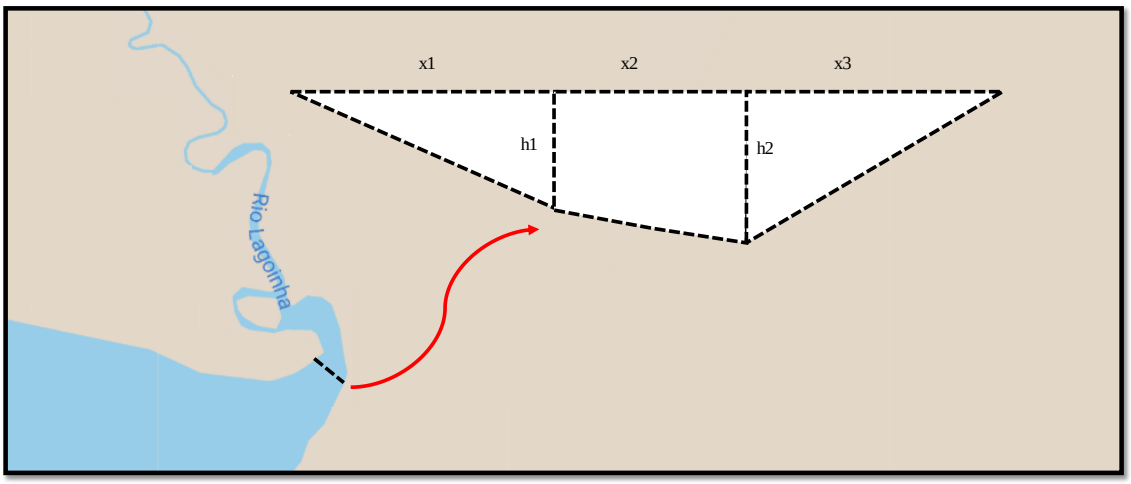


Figura 27 - Esquema geral da seção do rio Lagoinha utilizada para o cálculo do fluxo. As letras x representam as distâncias na superfície da seção, as letras h representam as profundidades.

A velocidade do fluxo d'água no rio foi calculado com o uso de um celular e um aplicativo esportivo STRAVA. Este aplicativo obtém a variação da posição do aparelho celular ao longo do tempo e calcula a velocidade média de deslocamento. O aparelho celular foi colocado em um saco estanque e deixado a deriva no rio para a tomada de dados pelo STRAVA, com um percurso aproximado de 10 m. Esse processo foi repetido três vezes. Com as velocidades indicadas pelo aplicativo nos três lançamentos, foi feita a média da velocidade para calcular a vazão do rio.

3.4.7. Precipitação

A precipitação foi mensurada usando um pluviômetro (Ruralban) com capacidade de até 120 mm, que foi colocado na balsa de manejo da fazenda marinha que fica próximo a *P4*.

3.4.8. Salinidade

A salinidade foi medida com o uso de um refratômetro Atago -ATC S/MIII, sendo amostrados nos pontos *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* mostrados na Figura 24, que foram coletados no período de estofa.

3.4.9. Modelagem numérica

Os modelos numéricos vêm cada vez mais demostrando a sua aplicabilidade como uma ferramenta para a representação do ambiente costeiro. Com o uso de modelos, é possível interpretar os processos atuantes na área de interesse frente a inúmeras variantes ambientais que compõem a zona costeira, como ondas, ventos e marés.

O padrão de circulação deste estudo foi feito com a colaboração do Laboratório de Dinâmica Costeira (LDC) do Instituto Oceanográfico da USP, com o uso do software Delft3D, desenvolvido pelo Instituto Independente de Pesquisa Deltares, da Holanda. O sistema de modelagem Delft 3D consiste em uma série de módulos operacionais, dentre eles o módulo de hidrodinâmico Deltf 3D-Flow. Este modelo é recomendado para estudos hidrodinâmicos e de dispersão de poluentes (DELTARES, 2014).

O domínio do modelo compreende a área de estudo localizada na região central a fim de evitar o efeito de borda. A malha computacional foi criada com o auxílio do módulo de suporte RGF-Grid no próprio Delft3D, com um maior detalhamento na área da região da fazenda marinha (Fig. 28). O contorno batimétrico e a linha de costa foram obtidos no banco de dados do Laboratório de Dinâmica Costeira (LDC), sendo usado para interpolar a batimetria da região (Fig. 29).

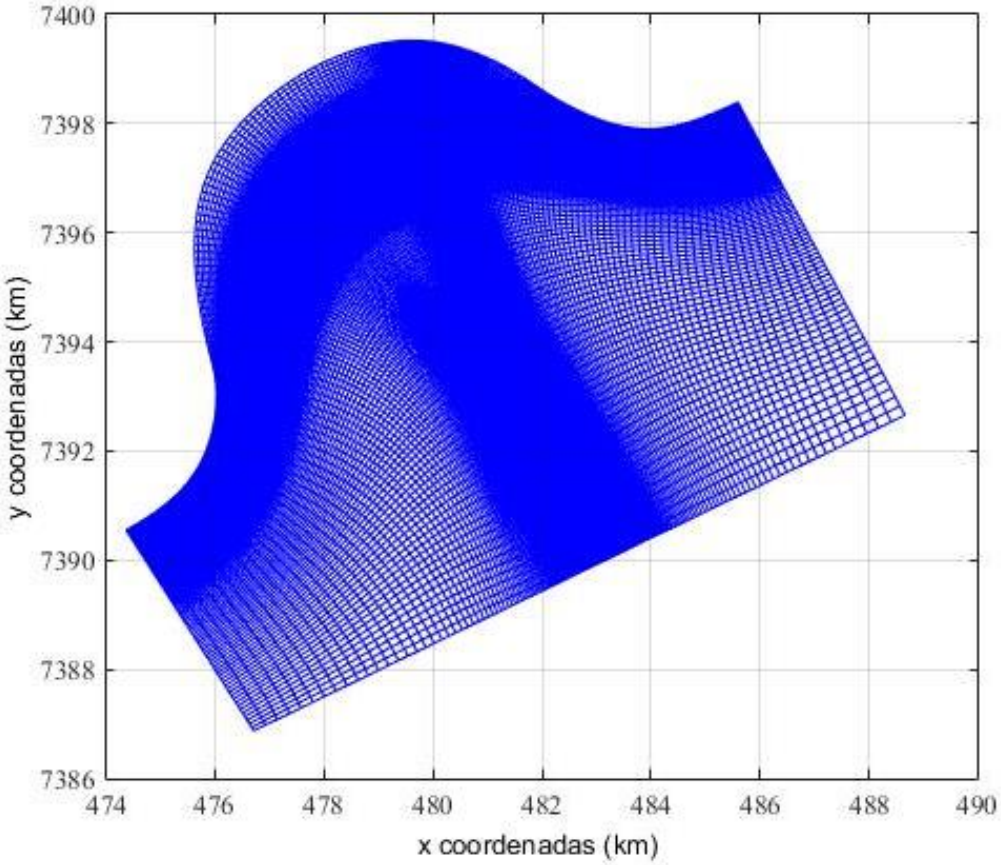


Figura 28 - *Grid* da região de estudo, a região onde apresenta um azul mais intenso é a área onde a malha tem um maior refinamento nos cálculos justamente na área do experimento, latitude e longitude em UTM (Universal Transverse Mercator).

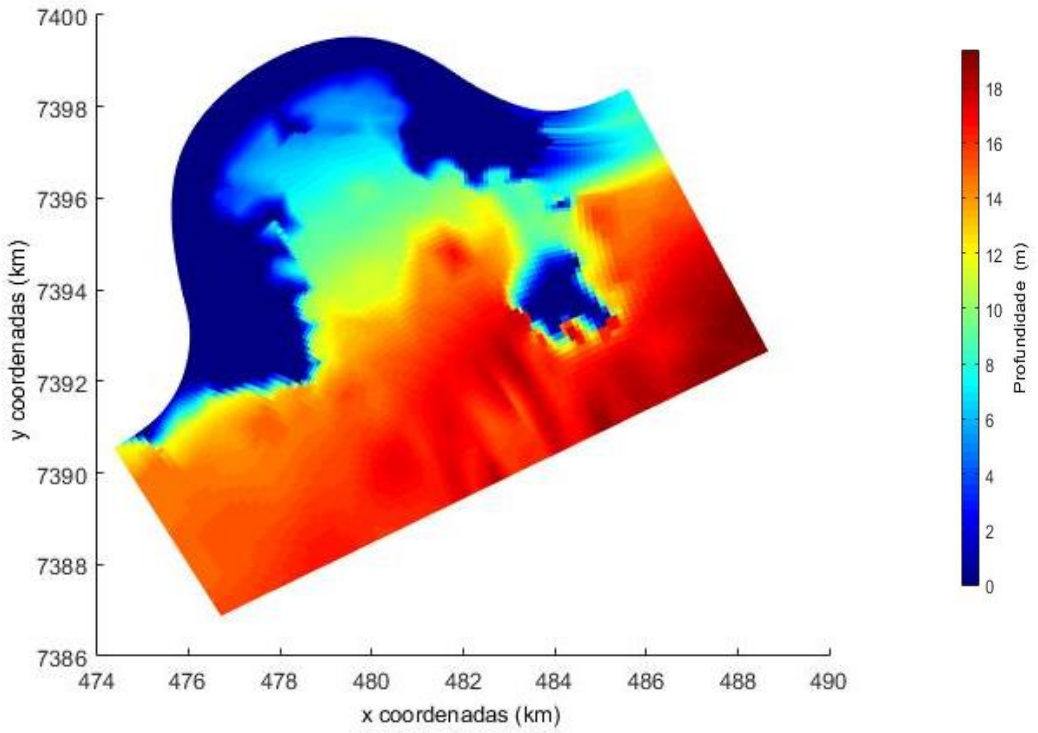


Figura 29 - Batimetria, interpolada com o uso do modelo Delft3D-RGF-GRID, na área da enseada do Mar Virado, latitude e longitude em UTM (Universal Transverse Mercator).

O módulo Delft3D-Flow é um programa de simulação hidrodinâmica e transporte multidimensional (2D ou 3D) que calcula os fluxos não estacionários e transportes resultantes de formantes como, meteorológicas e astronômicas (maré), em contornos curvilíneos e regulares dos grids. Este modelo é baseado na equação de Navier-Stokes, aplicada para a aproximação de águas rasas.

Foram usados como dados de entrada no modelo os contornos batimétricos interpolados em todo *Grid* para o domínio do modelo, dados de maré (obtidos Delft Dashboard) e direção e intensidade dos ventos (obtida da estação meteorológica do Instituto Oceanográfico da USP de Ubatuba, que fica localizado a 8 km do local de estudo). Para rodar o modelo foi considerado a densidade da água (1027 kg/m^3) e a aceleração da gravidade (9,8 m/s^2).

Para a finalidade de calibrar o modelo numérico de circulação dominante na área da fazenda marinha, foi instalado um perfilador hidroacústico de correntes ADCP (*Acoustic Doppler Current Profilers*) modelo Aquadopp Nortek 1 MHz, com capacidade de coleta de dados em três dimensões, podendo mensurar velocidade e direção em várias camadas na

coluna d'água. Este equipamento mede a velocidade da água por efeito Doppler. O ADCP foi configurado para coletar a direção e intensidade das correntes, com intervalo de amostragem de 30 minutos, e células de meio metro de profundidade.

O equipamento foi acoplado a um suporte em aço inoxidável, que assegura ao instrumento a manutenção de seu posicionamento na vertical, e fundeado em um ponto próximo à fazenda marinha (23°31'45.25"S e 45°11'21.14"O em UTM 480431.35 7397293.06) (Fig. 30), permanecendo no local entre os dias 16/11/17 e 19/12/17, possibilitando o registro de um ciclo mensal de marés de sizígia e de quadratura, para uma melhor calibração do modelo.

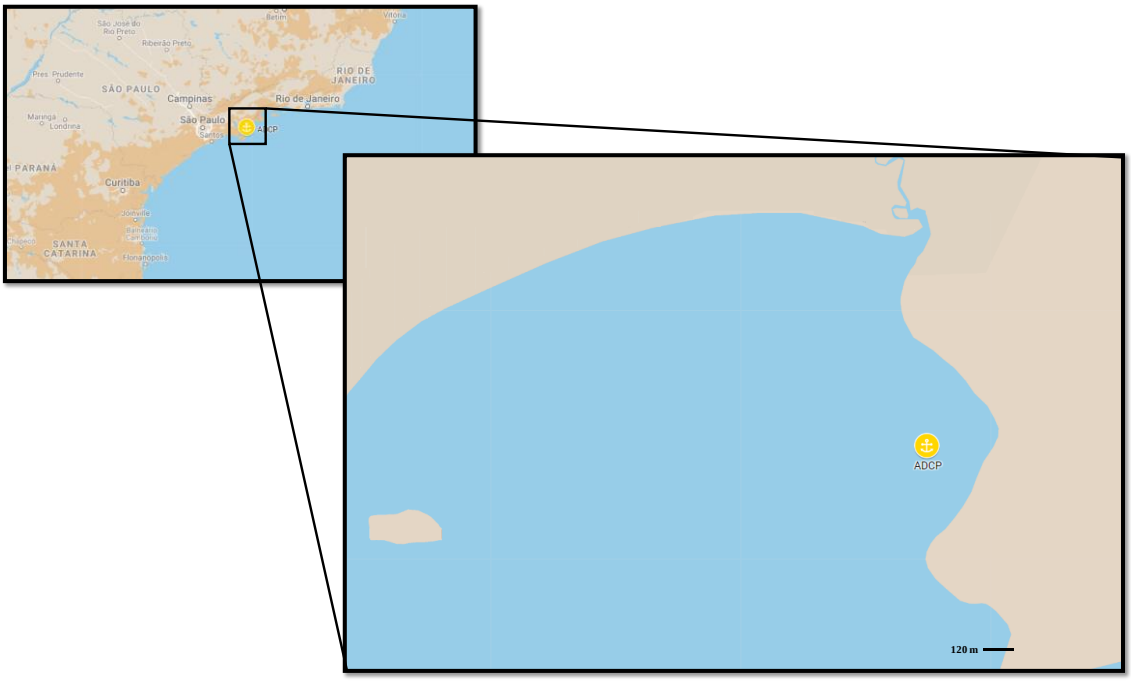


Figura 30 - Local onde o ADCP foi implantado (23°31'45.25"S e 45°11'21.14"O, em UTM 480431.35 7397293.06) próximo à fazenda de mexilhões, da Enseada do Mar Virado.

Para a implementação de um modelo numérico em determinada região, é necessário que ele passe pelo processo de calibração e validação, de forma a avaliar sua qualidade. A calibração é o processo de ajuste de parâmetros do modelo numérico para que se aproxime dos valores coletados *in situ*. Os parâmetros do modelo numérico que podem ser ajustados são a rugosidade do fundo e o coeficiente de viscosidade, para o modelo do Software Deft3D. A validação é feita através da comparação com parâmetros estatísticos que avaliam a acurácia do modelo.

A calibração e validação foram realizadas qualitativamente, através de comparações gráficas, e quantitativamente, através de análises estatísticas. A análise quantitativa foi realizada através do Erro Absoluto Médio Relativo (RMAE) (Tabela 3), descrito por VAN RIJN *et al*. (2003) e através do parâmetro de Skill (Tabela 4), descrito por WARNER *et al*. (2005), com os dados de elevação da superfície do mar.

Tabela 3 - Classificação do RMAE de acordo com VAN RIJN *et al*. (2003).

Classificação	RMAE
Excelente	<0,1
Bom	0,1 - 0,3
Razoavel	0,3 - 0,5
Pobre	0,5 - 0,7
Ruim	> 0,7

Tabela 4 - Classificação de Skill de acordo com HENRIKSEN *et al*. (2003).

Classificação	Skill
Excelente	> 0,85
Muito bom	0,65 - 0,85
Bom	0,5 - 0,65
Pobre	0,2 - 0,5
Muito pobre	<0,2

3.5. Análise do material algáceo

3.5.1. Pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais (PST)

Análises dos teores de pigmentos fotossintetizantes, ficobiliproteínas e clorofila *a*, assim como a quantidade de proteínas solúveis totais (PST), foram mensuradas a partir de amostras de 250 mg de massa fresca (MF) de *G. tenuifrons* coletadas ao fim dos testes piloto e do cultivo experimental, congeladas em nitrogênio líquido e armazenas em ultrafreezer (-80 °C) até sua análise.

As extrações de pigmentos foram realizadas de acordo com o método descrito por KURSAR *et al.* (1983), adaptado por WANDERLEY (2009) com pequenas modificações. Cada amostra foi triturada em microtubo com uso de nitrogênio líquido até obter-se um pó fino. O material foi suspenso em 6 mL de solução tampão de fosfato de sódio (50 mM), gelado (4 °C) com pH 5,5. Após suspensão, o material foi mantido no escuro para evitar a fotodegradação e acondicionado em gelo para reduzir a deterioração dos pigmentos, durante 3 h. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi recolhido e mantido no escuro a 4 °C até leitura da absorbância das ficobiliproteínas e PST. O pellet foi preservado sob temperatura de 4 °C para extração da clorofila *a*.

A análise de ficobiliproteínas foi realizada mediante uma varredura no espectro visível (400 – 700 nm) em espectrofotômetro UV-vis (EPOCH – BioTek), em microplaca com caminho óptico de 1 cm. As concentrações das ficobiliproteínas ficoeritrina (*FE*) e ficocianina (*FC)* foram determinadas de acordo com as **Equações (3)** e **(4)** propostas por BEER & ESHEL (1985):

$$\boldsymbol{FE(\mu g.g\ MF^{-1}) = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592})\ x\ 0,2]\ x\ 0,12} \qquad \textbf{(3)}$$

$$\boldsymbol{FC(\mu g.g\ MF^{-1}) = [(A_{618} - A_{655}) - (A_{592} - A_{645})\ x\ 0,51]\ x\ 0,15} \qquad \textbf{(4)}$$

Onde, A_x = absorbância no comprimento de onda x. Os resultados foram padronizados pela massa fresca e expressos em µg g^{-1}.

A mensuração de PST foi realizada segundo método de BRADFORD (1976). Para tal, uma alíquota de 60 µL do extrato em tampão fosfato de sódio foi adicionada a 900 µL de solução para ensaio proteico Bio-Rad 25% e 40 µL de água ultrapura. A leitura da absorbância em 595 nm foi realizada em espectrofotômetro UV-vis EPOCH (BioTek), utilizando microplaca e a concentração de PST foi determinada usando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações 2, 4, 8 e 16 µg mL^{-1}. Os resultados foram expressos em µg.g^{-1}.

Para a análise de clorofilas, o precipitado obtido da extração com tampão foi ressuspendido em 6 mL de acetona 90% e mantido por 3 h no escuro e a 4 °C. Depois, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000 rpm e 4 °C. Com o sobrenadante, foi realizada uma varredura no espectro do visível (400 e 700 nm) no espectrofotômetro UV-vis (EPOCH – BioTek, EUA), utilizando microplaca de percurso óptico de 1 cm. Para calcular a

concentração de clorofila *a* foi utilizada a **Equação (5)**, modificada de LICHTENTHALER & BUSCHMANN (2001):

$$\boldsymbol{Cl\ a\ (\mu g.g\ MF^{-1}) = A_{665}\ x\ 12,61} \qquad \textbf{(5)}$$

Onde, A_{665} = absorbância no comprimento de onda 665. Os resultados foram padronizados pela MF e expressos em $\mu g.g^{-1}$.

3.5.2. Proteínas totais

Cerca de 500 mg de amostras das algas secas foram submetidas a análises elementares de nitrogênio no analisador PERKIN-ELMER (CHN 2400) na Central Analítica do Instituto de Química da USP. A partir dos valores de porcentagens de nitrogênio, foi estimado o conteúdo de proteína total usando o fator de correção 5,31 sobre a porcentagem de nitrogênio obtida (ANGELL *et al*., 2015).

3.5.2. Carboidratos totais

As determinações de carboidratos totais foram feitas segundo MASUKO *et al*. (2005) pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúricoem microplacas.

Amostras de 250 mg MF foram trituradas com o uso de pistilo e nitrogênio líquido até se tornarem um pó fino, logo foram extraídas em 2 mL de água ultrapura em banho-maria por 3 h a 70 ºC. Posteriormente, foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido em um tubo novo e a leitura das amostras em espectrofotômetro foram realizadas preparado uma microplaca com 50 µL da amostra e 150 µL de ácido sulfúrico concentrado, seguido da adição de 30 µL de fenol 5%. Juntamente, foi feito um branco amostra com 50 µL de amostra, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de água. A microplaca com as amostras e o branco amostra foi então incubada em por 5 minutos a 90 °C em banho-maria, após isso a placa repousou por 5 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente foi feita a leitura no espectrofotômetro UV-vis (EPOCH – BioTek) no comprimento de 490 nm.

3.5.3. Lipídios totais

O material algáceo foi pulverizado (500 mg) e macerado em 10 mL de clorofórmio:metanol (2:1; v/v) sob agitação por 3 h. O extrato foi então filtrado, adicionado 2 mL de uma solução de cloreto de sódio (0,9%), homogeneizado e centrifugado para formar duas fases (2000 rpm por 5 min). A camada inferior foi coletada e seca. A massa resultante foi mensurada e utilizada para o cálculo dos lipídios totais segundo FOLCH *et al.* (1957).

3.5.4. Cinza e umidade

O teor de umidade foi determinado após aquecimento de uma massa conhecida das amostras em estufa a 105 °C até obter massa constante. O teor de cinzas foi determinado em mufla por incineração a 550 ºC (WYCHEN; LAURENS, 2013).

3.5.5. Fibras dietéticas totais

A quantificação das fibras dietéticas totais foi baseada no método não-enzimático gravimétrico (Método oficial da AOAC 993.21). O material algáceo pulverizado (250 mg) foi disperso em 7,5 mL de água. Em seguida, foi mantido em banho-maria a 37 °C por 90 min, adicionado 30 mL de etanol 95%, deixado em repouso por 1 h e o sobrenadante descartado. O resíduo resultante foi lavado com 6 mL de etanol 78% (duas vezes), 3 mL de etanol 95% (duas vezes) e 3 mL de acetona (uma vez), sendo o sobrenadante descartado em cada lavagem. Após esse processo, o resíduo resultante foi seco e liofilizado e a massa mensurada. Para a obtenção dos valores de fibras dietéticas totais foram necessários os valores de proteína total e cinzas anteriormente descritos. O cálculo do teor de fibras dietéticas (%) (TFD) é dado pela **Equação (6)**:

$$\boldsymbol{TFD}\ (\%) = \frac{[\mathbf{100}-(\boldsymbol{TC}+\boldsymbol{TP})]\boldsymbol{xR}}{\boldsymbol{M}} \qquad \textbf{(6)}$$

Onde TC = teor de cinza (%), TP = teor de proteínas (%), R = resíduo resultante (mg) e M = material algáceo inicial (mg).

3.5.6. Valor energético

Os valores energéticos (VE) foram estimados pelos fatores de conversão de ATWATER, ou seja, 4 kcal/g para proteínas totais (P) (g/100 g) e carboidratos disponíveis (C) (g/100 g) e 9 kcal/g para lipídios totais (L) (g/100 g). O cálculo de energia é dado pela **Equação (7)**.

$$\boldsymbol{VE\ \left(\frac{Kcal}{100}g\right) = 4\,x\,(P + C) + 9\,x\,L} \qquad \textbf{(7)}$$

3.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) de um fator. Observadas diferenças entre as médias, os dados foram submetidos à análise *pos-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0{,}05$ (ZAR, 1984). Também foi realizado um teste *t*-Student.

Análise de componentes principais (PCA) foi usado para mostrar a relação entre os parâmetros mensurados nos pontos de cultivos e as variáveis que influenciaram o desenvolvimento das algas.

Todos os dados estatísticos os testes foram realizados utilizando o software Past v. 2.17c.

4. Resultados

4.1. Teste Piloto

4.1.1. Taxa de crescimento

O teste piloto teve como objetivo avaliar os pontos de fixação da *G. tenuifrons* e verificar possíveis problemas no cultivo. As taxas de crescimento das macroalgas cultivadas na superfície, ao longo das quatro semanas do teste piloto, podem ser vistas na Figura 31A. Durante o período de teste, houve grande perda de material devido à herbivoria por tartarugas, impossibilitando a análise dos resultados de forma estatística. Porém, na última semana, as algas cultivadas na superfície não apresentaram sinais de herbivoria, sendo possível a comparação estatística. As taxas de crescimento na última semana de teste (*T4*) foram 4,87 ± 1,28 %.dia^{-1} para *P1*, 3,01 ± 0,27 %.dia^{-1} para *P2* e 2,08 ± 0,75 %.dia^{-1} para *P3*, sendo diferentes entres si (ANOVA $F = 8,18$; $df = 6,149$; $p = 0,01851$).

Na Figura 31B, temos as taxas de crescimento das macroalgas cultivadas no fundo (-1 m). A perda de biomassa foi maior do que na superfície, ocasionada pela grande herbivoria durante todo o período do teste piloto nesta profundidade, não sendo possível fazer nenhuma inferência sobre os resultados.

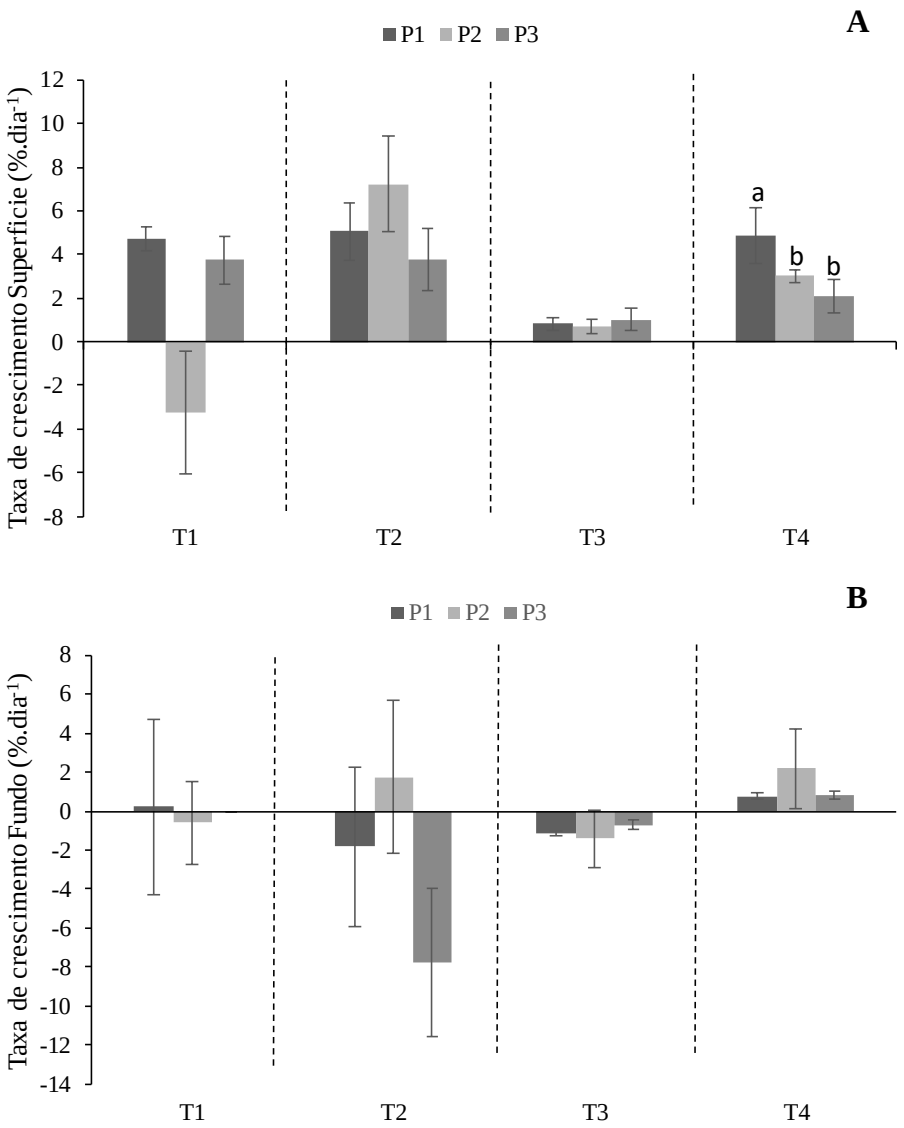


Figura 31 - Taxas de crescimento das macroalgas cultivadas ao longo das semanas do teste piloto (média ± DP, *n* = 5). (A) Algas cultivadas na superfície; (B) Algas cultivadas no fundo (z = -1 m). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. T1, T2, T3 e T4 é o tempo em semanas, *P1, P2* e *P3* são os pontos de cultivo das macroalgas.

4.1.2. Climatologia

A irradiância solar que ocorreu no período do teste piloto está representada na Figura 32A, a irradiância média na superfície foi 227,2 ± 131,58 µmol fótons.m^2.s^{-1} e no fundo foi 184,68 µmol fótons.m^2.s^{-1} sendo estatisticamente diferentes (*t = 2,057; p = 0,03*), com médias de irradiância na superfície 17,8% maior que no fundo.

A temperatura da água (Fig. 32B), não teve grandes oscilações no período de teste, com média de 28,29 ± 1,02 °C, sem diferenças relevantes na temperatura média da superfície e no fundo (*t = 1,57; p = 0,116*).

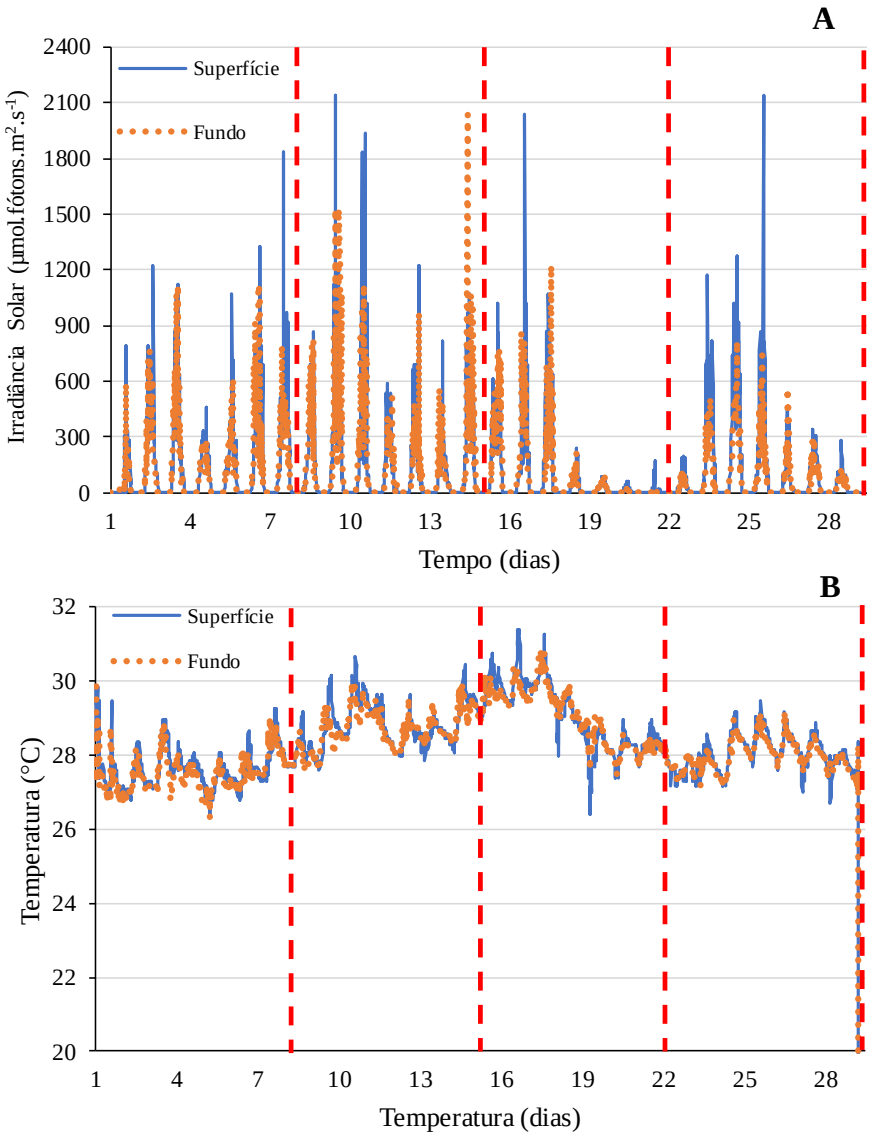


Figura 32 –Variação climatológica no teste piloto. (A) Variação diária da irradiância solar; (B) Variação diária da temperatura na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas, vermelha e paralela ao eixo Y, demarcam as semanas de teste.

4.1.3. Composição algácea (teste piloto)

As análises da composição da macroalga do teste piloto são mostradas nas Figuras 33 –38. A concentração de clorofila *a* é mostrada na Figura 33A, nota-se uma maior concentração nas algas cultivadas na superfície nos pontos *P1* e *P2*, sendo significativamente maior do que as demais amostras (ANOVA $F = 32,19$; $df = 5,294$, $p = 0,0006$). Os pigmentos acessórios não demostraram diferenças entre os pontos e as profundidades de cultivo, ficoeritrina (Fig. 33B; ANOVA $F = 4,92$; $df = 5,224$; $p = 0,05901$) e ficocianina (Fig. 33C; ANOVA $F = 2,948$; $df = 5,512$; $p = 0,1192$).

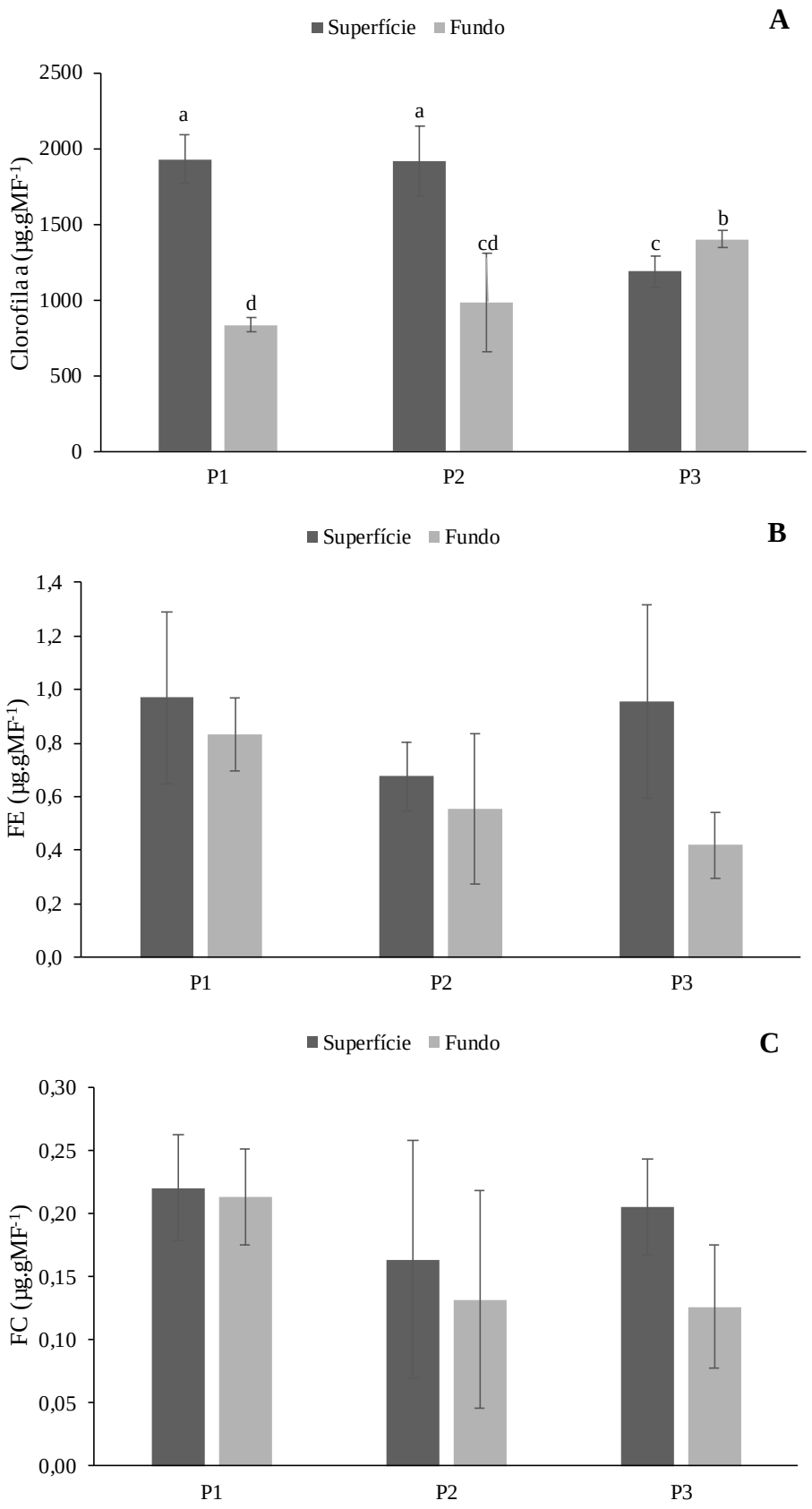


Figura 33 – Concentração de pigmentos nas macroalgas por grama de massa fresca (MF) no teste piloto. (A) Concentração de Clorofila-a. (B) Concentração de Ficoeritrina. (C) Concentração Ficocianina (média ± DP, *n* = 5). As letras minúsculas representam diferenças significativas.

A Figura 34A mostra os valores de porcentagem de proteína total por material seco das macroalgas. Os valores mais altos foram em *P1* e *P2*, que foram cultivados na superfície, 15,78 ± 0,22% e 15,77 ± 0,22%, respectivamente. Sendo significativamente diferente entre as amostras (ANOVA *F = 67,43; df = 5,109; p = 0,00011*).

A proteína solúvel total (Fig. 34B) teve maiores concentrações em *P1* na superfície, sendo significativamente maior do que todas as outras amostras (ANOVA *F = 7,914; df = 5,097; p = 0,01929*).

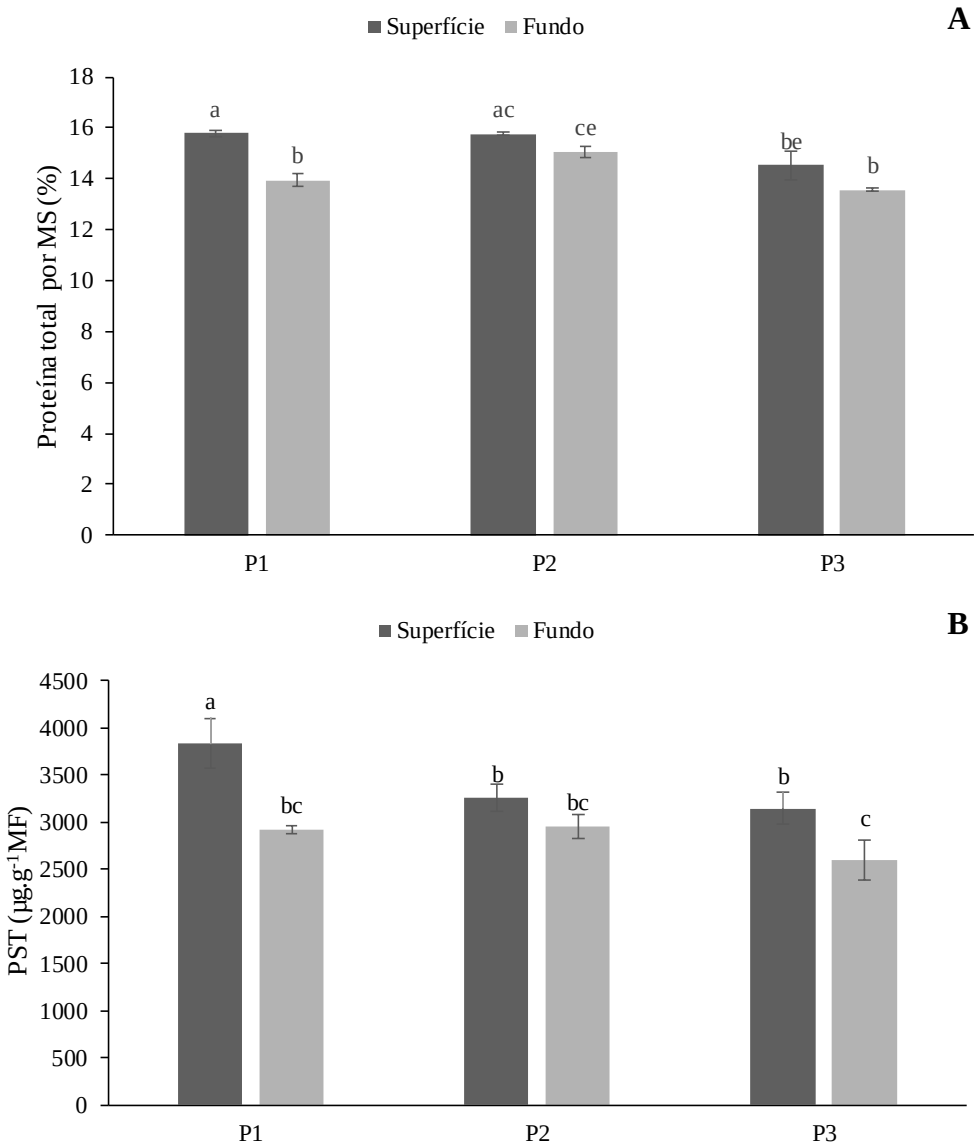


Figura 34 – (A) Porcentagem de proteína total por massa seca (MS) de macroalga do teste piloto. (B) Concentração de proteína solúvel total por massa fresca (MF) de macroalga do teste piloto (média ± DP, *n* = 5). As letras minúsculas representam as diferenças significativas.

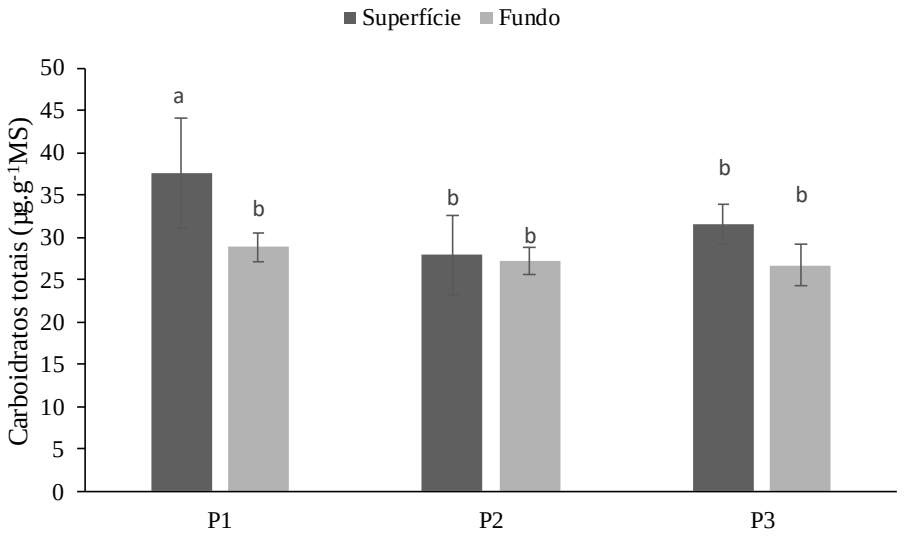
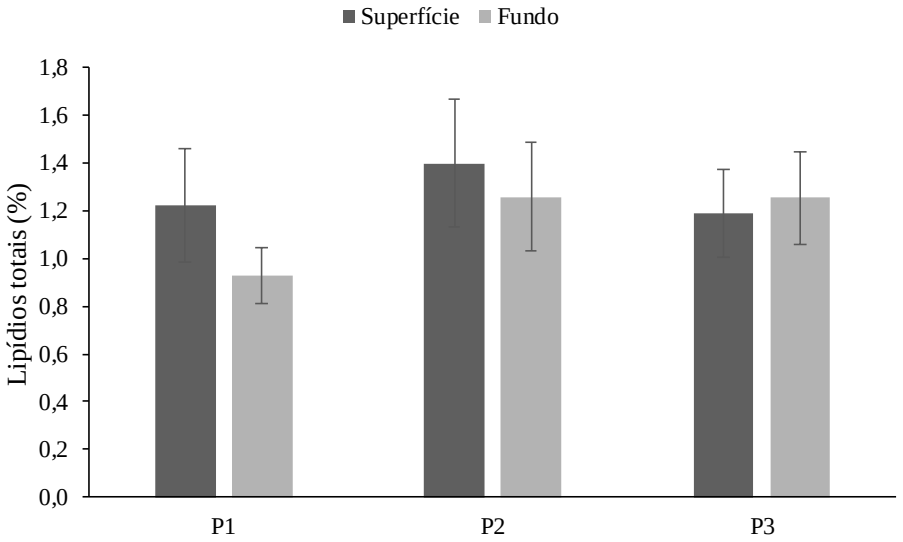


Figura 35 – Concentração de carboidratos totais por massa fresca (MF) da macroalga do teste piloto (média ± DP, *n* = 5). Letras representam diferenças significativas.

As concentrações de carboidratos totais podem ser vistas na Figura 35. Pode-se notar que *P1* na superfície apresenta as maiores concentrações, 37,55 ± 6,52 µg.g^{-1} (ANOVA *F = 1,874; df = 5,49; p = 0,2429*).



.

Figura 36 - Porcentagem de lipídios (por biomassa seca de macroalga) do teste piloto (média ± DP, *n* = 5).

Os lipídios (Fig. 36), não apresentaram valores significativamente diferentes entre as amostras, tendo valores muito próximos de 1% (ANOVA *F = 2,119; df = 5,471; p = 0,2041*).

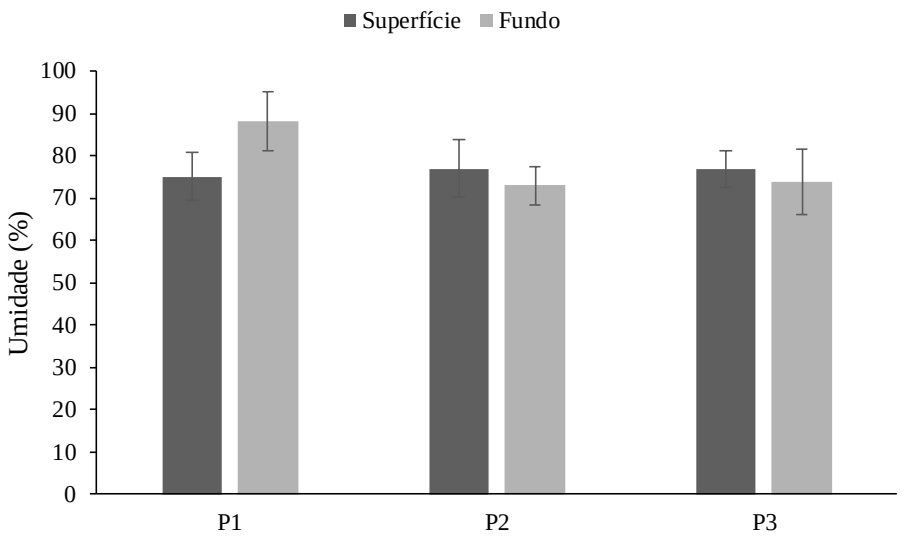


Figura 37 - Porcentagem de umidade das macroalgas do teste piloto (média ± DP, *n* = 5).

A umidade (Fig. 37) também não apresentaram valores significativamente diferentes entre as amostras, tendo valores entorno de 77% (ANOVA *F = 13,32; df = 8,138; p = 0,496*).

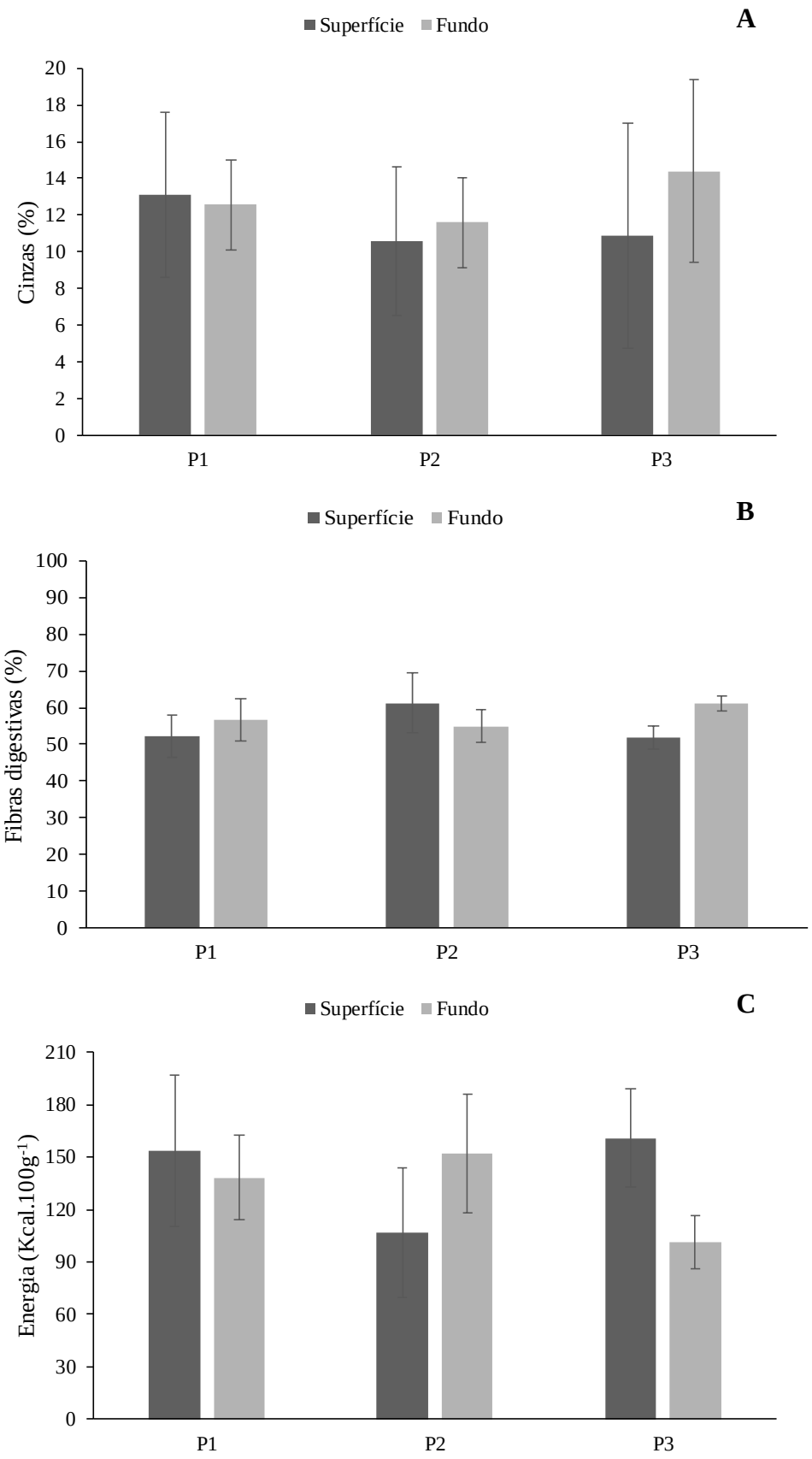


Figura 38 – (A) Porcentagem de cinzas (da massa seca (MS) da macroalga) do teste piloto; (B) Porcentagem de fibras digestivas (da massa seca (MS) da macroalga) do teste piloto; (C) Quantidade de energia por 100 g de biomassa seca de macroalga do teste piloto (média ± DP, n = 5).

Cinzas (Fig. 38A), fibras digestivas (Fig. 38B) e energia (Fig. 38C) não apresentaram diferenças significativas, sendo cinzas (ANOVA $F = 0,3554; df = 8,215; p = 0,8655$), fibras digestivas (ANOVA $F = 4,469; df = 8,116; p = 0,2988$) energia (ANOVA $F = 5,052; df = 5,495; p = 0,0427$).

4.2. Cultivo experimental

4.2.1. Taxa de crescimento

No cultivo experimental, foram usados quatro pontos de cultivo, sendo três fixados no próprio *long-line* dos mexilhões (*P1*, *P2* e *P3*) e um ponto fora do *long-line* (~20 m de distância) paralelo a *P2*. As taxas de crescimento das macroalgas cultivadas na superfície do cultivo experimental são mostradas na Figura 39A. Na primeira semana (*T1*), foram observadas as maiores taxas para todos os pontos, com 14,11 ± 0,52 %.dia^{-1} para *P1*, 7,53 ± 1,38 %.dia^{-1} para *P2*, 7,61 ± 1,38 %.dia^{-1} para *P3* e 14,40 ± 1,06 %.dia^{-1} para *P4*, sendo significativamente diferentes (ANOVA $F = 93,98; df = 8,314; p < 0,0001$). Na segunda semana (*T2*), foram registradas taxas de crescimento de 5,07 ± 0,64 %.dia^{-1} para *P1*, 3,45 ± 1,00 %.dia^{-1} para *P2*, 3,52 ± 0,65 %.dia^{-1} para *P3* e 5,06 ± 0,65 %.dia^{-1} para *P4*, tendo diferença significativa entre eles (ANOVA $F = 8,354; df = 8,619; p = 0,0063$). Na terceira semana (*T3*), as taxas demostraram uma tendência similar a *T2*, com diferença significativa entre os pontos (ANOVA $F = 11,68; df = 8,791; p = 0,002$). Dentre as três semanas do experimento, um padrão entre as taxas de crescimento se mostrou constante, onde *P1* e *P4* tiveram taxas de crescimento superiores que *P2* e *P3*.

As taxas das macroalgas cultivadas no fundo são mostradas na Figura 39B. Assim como foi observado para as macroalgas cultivadas na superfície, as macroalgas cultivadas no fundo também apresentaram as maiores taxas na primeira semana (*T1*), para todos os pontos, com 9,33 ± 0,54 %.dia^{-1} para *P1*, 7,43 ± 0,42 %.dia^{-1} para *P2*, 6,35 ± 0,63 %.dia^{-1} para *P3* e 9,23 ± 1,27 %.dia^{-1} para *P4*, sendo diferentes entre eles (ANOVA $F = 21,74; df = 8,56; p = 0,000239$). Nas demais semanas do experimento, o padrão nas taxas de crescimento se mostrou semelhante ao observado nas algas cultivadas na superfície, onde as taxas em *P1* e

P4 foram maior do que em *P2* e *P3* (ANOVA $F = 10,36$; $df = 7,949$; $p = 0,004$) para a segunda semana e para a terceira semana (ANOVA $F = 11,68$; $df = 8,791$; $p = 0,002$).

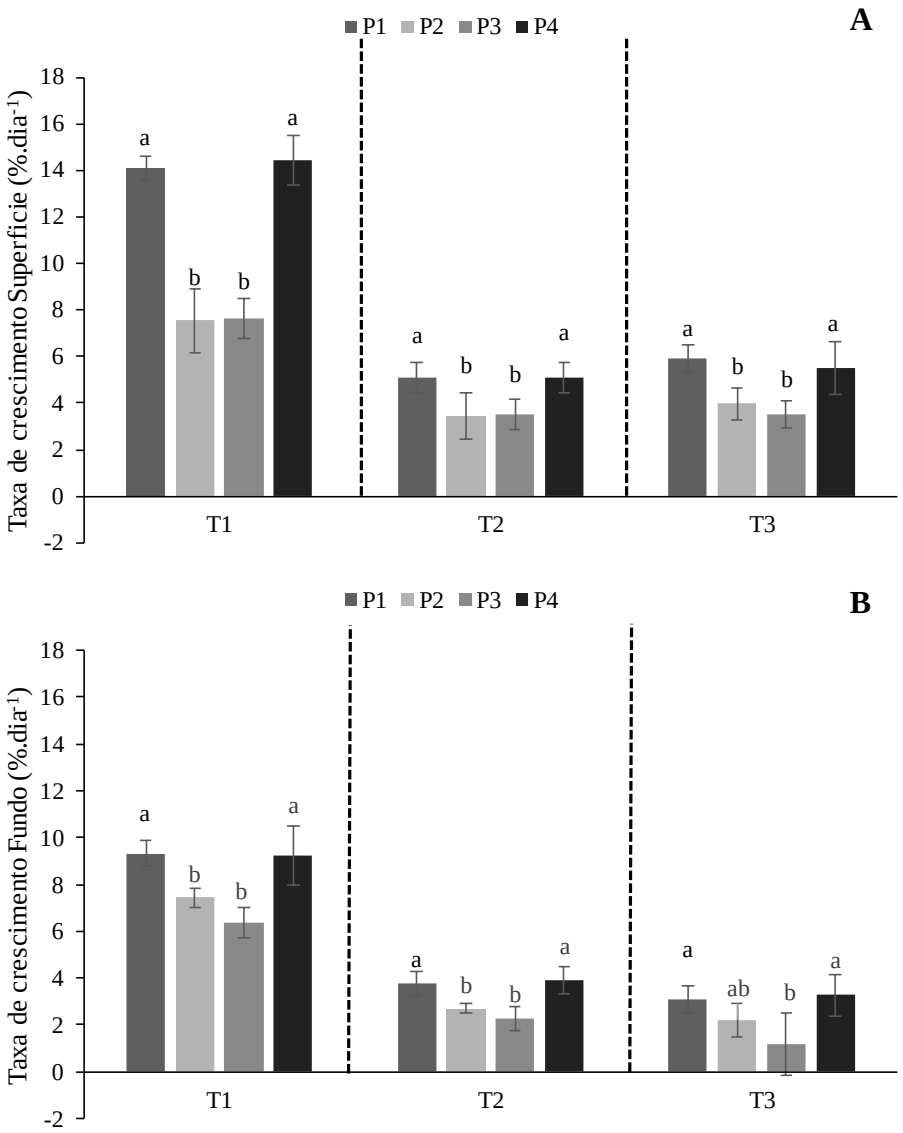
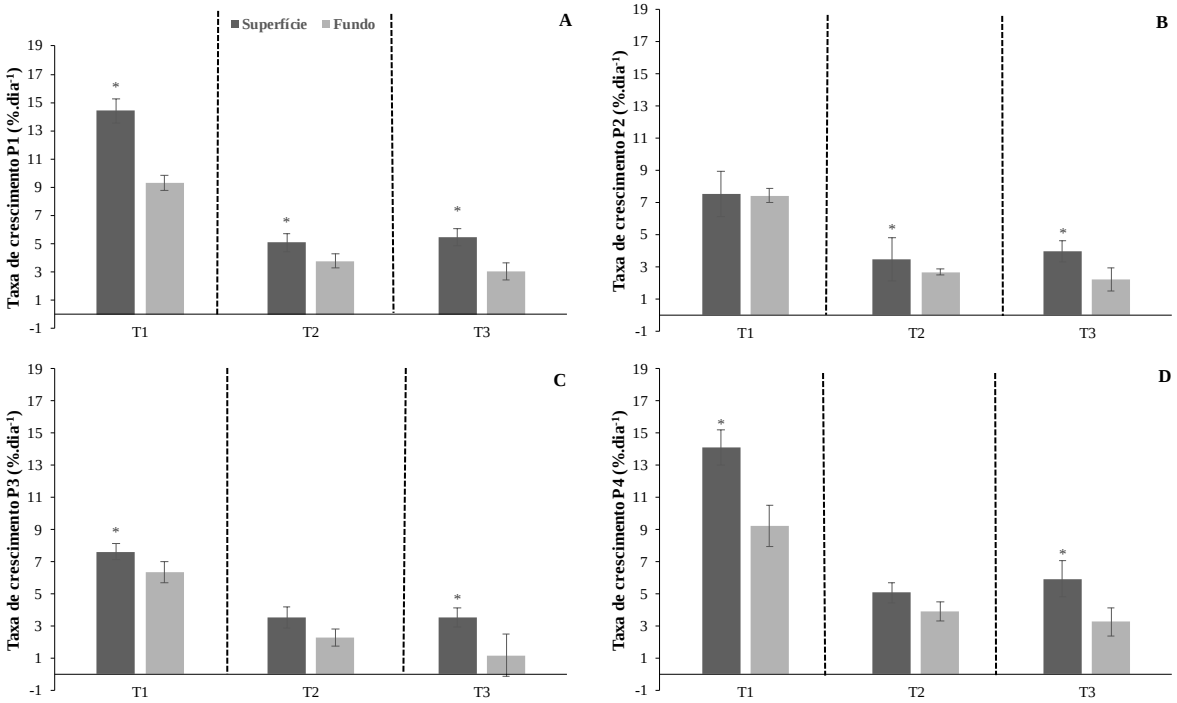


Figura 39 – Taxas de crescimento das macroalgas ao longo das semanas do cultivo experimental. (A) Algas cultivadas na superfície. (B) Algas cultivadas no fundo (média ± DP, n = 5). As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada semana e as letras minúsculas representam as diferenças significativas.

A comparação entre as taxas de crescimento da superfície e do fundo em cada ponto é representada na Figura 40. As taxas de crescimento de *P1* (Fig. 40A) mostram que as algas cultivadas na superfície tiveram maiores taxas de crescimento ao longo de todo o experimento. Os valores do teste *t*-Student para *T1* são $t = 3,451$; $p = 0,00867$, para *T2* são $t = 1,835$; $p = 0,010$ e para *T3* são $t = 5,8513$; $p = 0,0003$. Na Figura 40B mostra a

comparação entre as taxas de crescimento de superfície e fundo para *P2*. Nesta área, as taxas da primeira semana não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre as duas profundidades, porém, nas demais semanas, as algas da superfície tiveram melhores resultados de crescimento. Os valores do teste *t*-Student para *T1*, *T2* e *T3* são $t = 0,1683$; $p = 0,8705$, $t = 2,7977$; $p = 0,0232$ e $t = 6,6614$; $p = 0,00015$, respectivamente. Para *P3* (Fig. 40C) as taxas de crescimento na superfície foram significativamente maiores em *T1* e *T3*, não tendo diferença em *T2*. Os valores do teste *t*-Student para *T1*, *T2* e *T3* são $t = 11,094$ ($p < 0,00001$), $t = 3,499$ ($p = 0,0876$) e $t = 18,381$ ($p < 0,00001$), respectivamente. Para *P4* (Fig. 36D), as taxas foram significativamente maiores em *T1*e *T3*, não tendo diferença estatística



em *T2*. Os valores do teste *t*-Student para *T1*, *T2* e *T3* são $t = 6,564$ ($p = 0,00017$), $t = 1,365$ ($p = 0,2093$) e $t = 24,167$ ($p > 0,00001$), respectivamente.

Figura 40 - Comparação das taxas de crescimento entre superfície e fundo das macroalgas cultivadas ao longo das semanas do cultivo experimental. (A) Taxa de crescimento em *P1*. (B) Taxa de crescimento em *P2*. (C) Taxa de crescimento em *P3*. (D) Taxa de crescimento em *P4* (média ± DP, $n = 5$). As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada semana e o símbolo "*" representa a diferença significativamente entre as profundidades.

4.2.2. Climatologia

Na Figura 41A são apresentadas as variações da temperatura da água na superfície e no fundo, próximo ao ponto *P1*. Não foram observadas grandes variações de temperatura durante o experimento. Na primeira semana observou-se média de temperatura de 24,78 ± 0,7 °C na superfície e 24,55 ± 0,78 °C no fundo. Na segunda semana foram registradas médias de 24,07 ± 1,09 °C na superfície e 23,91 ± 0,87 °C no fundo. Na terceira semana, as médias de temperatura na superfície e no fundo foram de 24,99 ± 1,42 °C e 24,37 ± 1,02 °C, respectivamente. No ponto *P3* (Fig. 41A), as médias de temperatura também não tiveram grandes variações. Na primeira semana, observou-se médias de 25,03 ± 0,61 °C na superfície e 24,81 ± 0,58 °C no fundo. Na segunda semana foram registradas temperaturas médias de 23,87 ± 0,85 °C na superfície e 23,76 ± 0,62 °C no fundo. Na última semana, foi observada temperatura média de 25,06 ± 1,50 °C na superfície e 24,25 ± 1,05 °C no fundo. Não houve diferença significativa entre os locais de amostragem de temperatura ou as profundidades (ANOVA $F = 0,9005$, $df = 41,81$, $p = 0,449$).

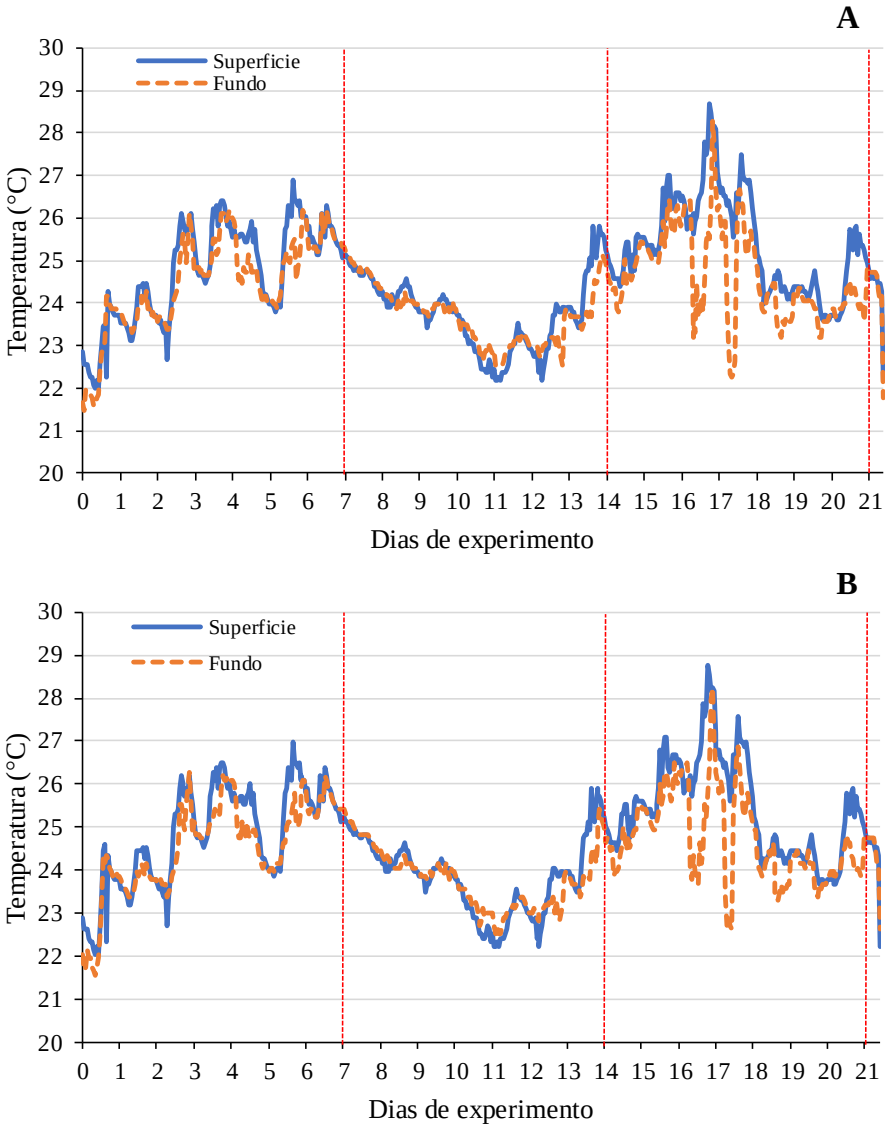


Figura 41 - Variação da temperatura no cultivo experimental. (A) Variação diária de temperatura em *P1*. (B) Variação diária da temperatura em *P3*. Temperatura na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas, vermelhas e paralelas ao eixo Y, demarcam as semanas.

As variações de irradiância solar na superfície e no fundo no ponto *P1* são mostradas na Figura 42A. A primeira e a terceira semana apresentaram valores mais altos de irradiância solar em relação à segunda semana. Entre a superfície e o fundo observou-se valores distintos, na primeira semana obteve-se médias de 206,98 ± 133,45 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} para a superfície e 98,03 ± 61,85 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} para o fundo. Na segunda semana, observou-se média de 104,13 ± 96,49 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} para a superfície e 32,01 ±44,59 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} para o fundo. Na terceira semana, registrou-se irradiância solar média de 209,13 ± 138,90 µmol

fótons.m^{-2}.s^{-1} e 82,62 ± 68,50 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1} para a superfície e o fundo, respectivamente. Na Figura 42B, as variações de irradiância solar na superfície e no fundo no ponto *P3* são muito semelhantes as observadas em *P1*. Ouve diferença estatística apenas entre as profundidades (ANOVA *F = 30,218, df = 840,43, p = 0,000218*).

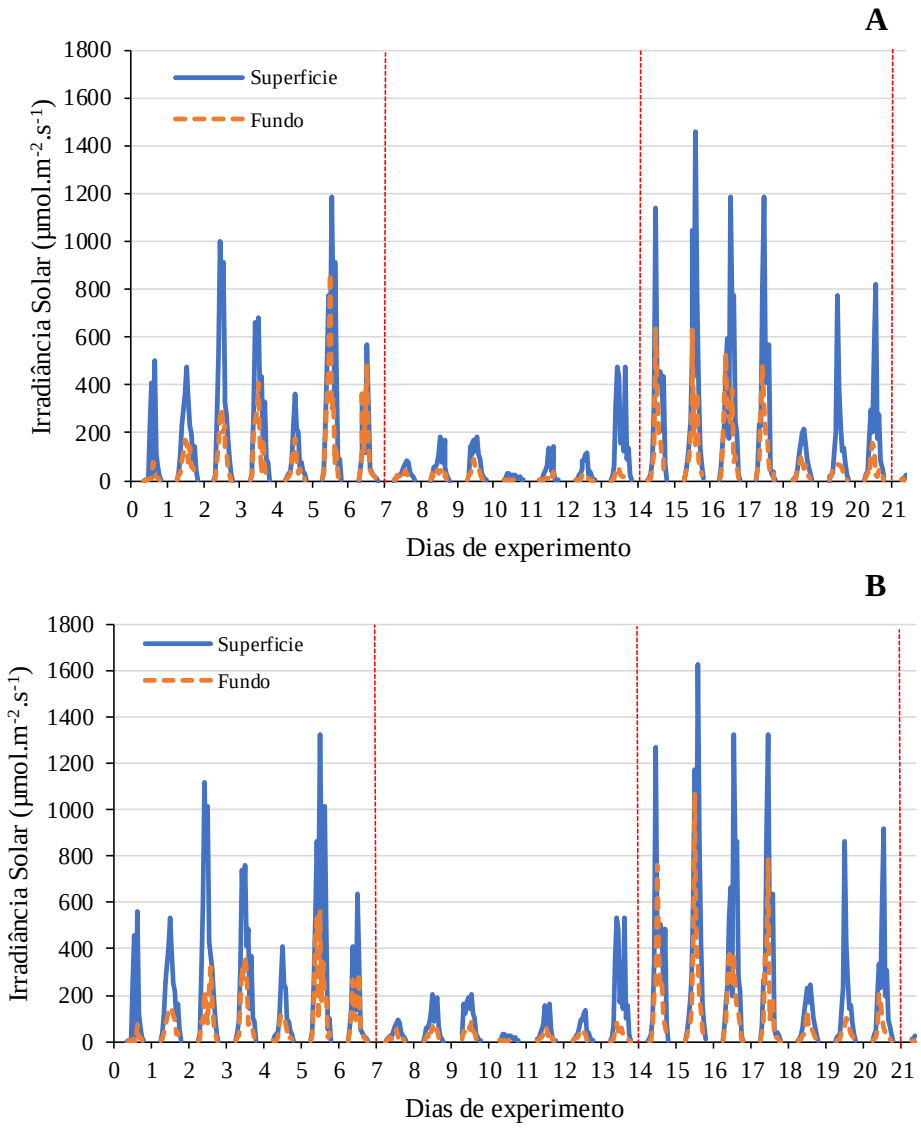


Figura 42 - Variação da irradiância solar no cultivo experimental. (A) Variação diária de irradiância solar em *P1*. (B) Variação diária da irradiância solar em *P3*. Irradiância solar na superfície (linha continua azul) e no fundo (linha pontilhada laranja). As linhas pontilhadas, vermelhas e paralelas ao eixo Y, demarcam as semanas.

Na Figura 43 observa-se a precipitação no período do cultivo experimental, um maior acúmulo de precipitação ocorreu na segunda semana.

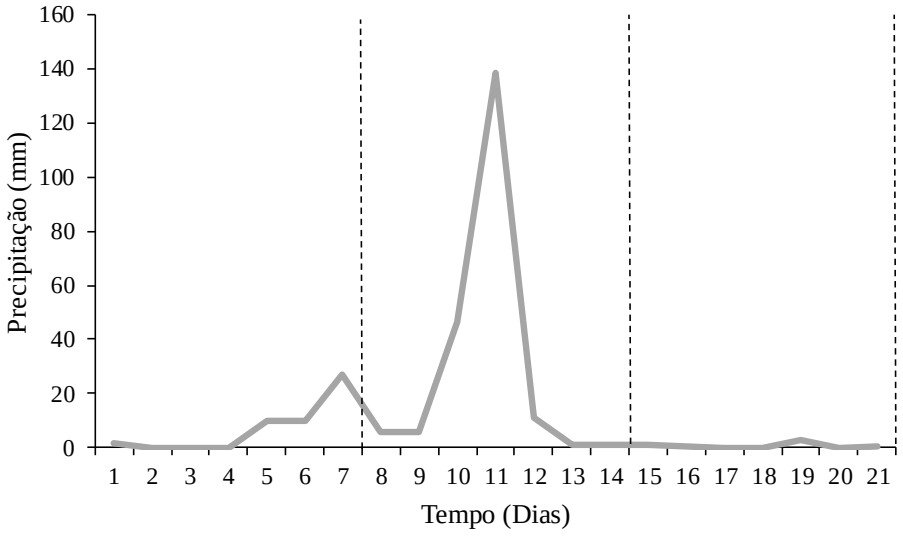


Figura 43 – Precipitação diária durante o cultivo experimental. As linhas pontilhadas, paralelas ao eixo Y, demarcam as semanas.

A vazão média do rio Lagoinha é mostrada na Figura 44. É um rio de pouca vazão, porém teve um aumento do seu fluxo, devido ao aumento das chuvas.

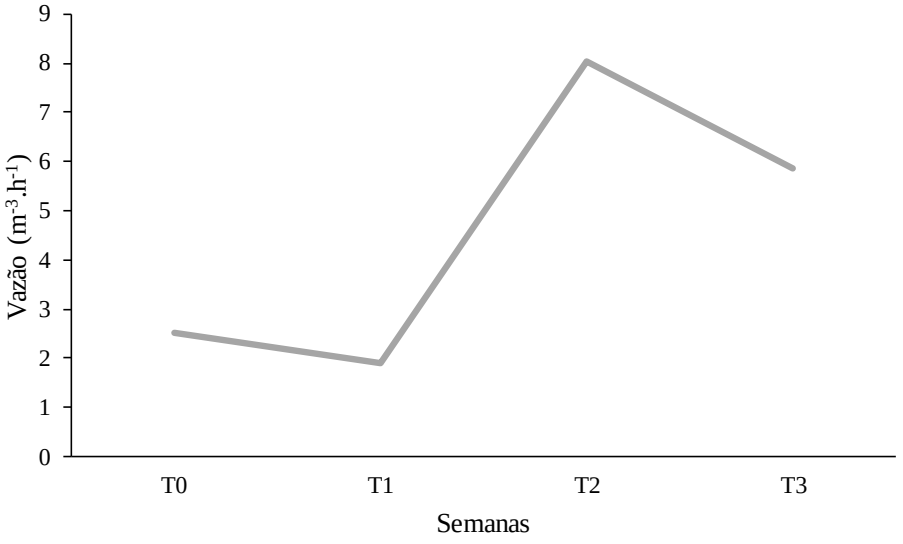


Figura 44 - Média semanal de vazão do rio Lagoinha, durante o a realização do cultivo piloto. T0 corresponde a vazão do rio no início do experimento, T1, T2 e T3 são as semanas decorrentes.

A salinidade também foi mensurada, sendo medidas nos pontos descritos da Figura 24. A salinidade se manteve em torno do 33-34‰ nos pontos amostrados no mar, ao longo de todo experimento, sem diferença significativa (ANOVA $F = 0{,}02601$; $df = 7{,}473$; $p = 0{,}9984$).

4.2.3. Concentração de nutrientes

Durante a realização do cultivo experimental foram coletadas amostras de água em seis pontos: nos locais onde foram cultivadas as macroalgas (*P1*, *P2*, *P3* e *P4*), um ponto fora da baia, onde fica a fazenda marinha, que foi usado como ponto controle, sem a influência do cultivo de mexilhões (*P5*), e outro na desembocadura do rio Lagoinha (*P6*) (Fig. 24). As amostras foram coletadas semanalmente, *T0* corresponde as concentrações de nutrientes no momento do início do experimento, *T1*, *T2* e *T3*, são as semanas decorrentes do experimento.

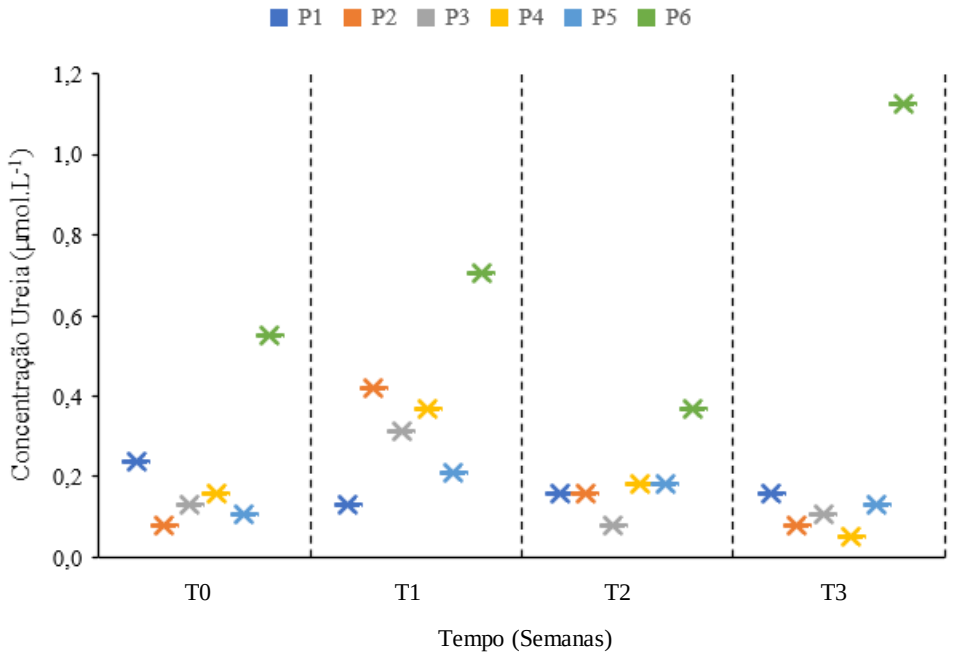


Figura 45 – Concentração de ureia nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1*, *T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

A concentração de ureia (Fig. 45) nos pontos do mar (*P1* até *P5*) são menores que os valores da concentração em *P6*. Os pontos do mar apresentam médias de 0,16 ± 0,08 µmol.L^{-1}, enquanto as concentrações na desembocadura têm médias de 0,68 ± 0,32 µmol.L^{-1}. Não

tendo uma tendência clara entre o aumento da concentração de ureia na desembocadura do rio e os pontos no mar, uma vez que se têm períodos em que a concentração do rio se eleva e nos pontos do mar a concentração de ureia diminui.

As concentrações de N-amoniacal (Fig. 46) nos pontos no mar (*P1* a *P5*) mostraram uma tendência em que *P1* apresenta as maiores concentrações durante todo o cultivo experimental, com média de 0,40 ± 0,16 µmol.L^{-1}. Os demais pontos que estavam fixos ao *long-line* apresentaram 0,27 ± 0,18 µmol.L^{-1} (*P2*) e 0,25 ± 0,19 µmol.L^{-1} (*P3*). Dos pontos onde as macroalgas foram cultivadas, *P4* foi que apresentou as menores concentrações 0,18 ± 0,09 µmol.L^{-1}. *P5* apresentou as concentrações mais baixas dentre todos os pontos, sendo em média quatro vezes menor que os pontos na fazenda de mexilhões. A desembocadura do rio (*P6*) apresentou valores maiores de concentração que os outros pontos amostrados, chegando a 10,16 µmol.L^{-1}.

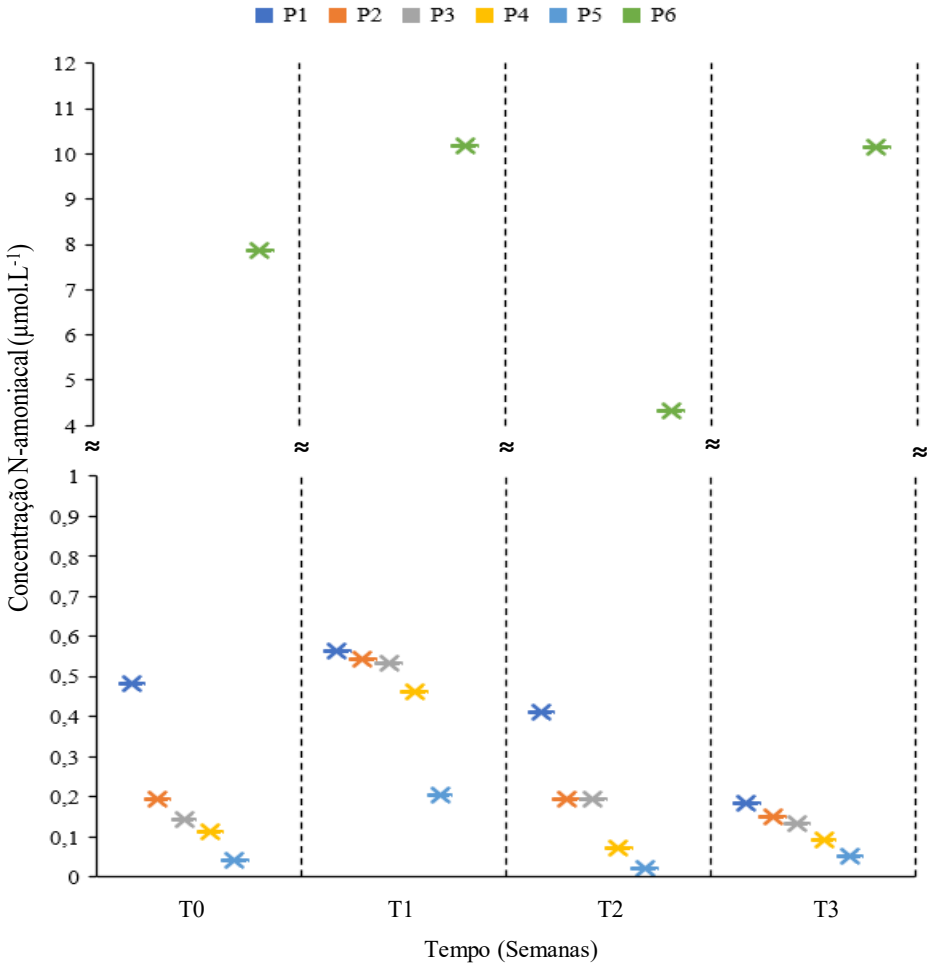


Figura 46 - Concentração de N-amoniacal nas amostras de água. *P1*, *P2*, *P3*, *P4*, *P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1*, *T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

Na Figura 47 são apresentadas as concentrações de nitrito. Pode se notar que, em relação aos pontos que se localizam no *long-line*, a tendência observada nas concentrações de N-amoniacal se repetem, onde *P1* foi maior que *P2* e *P3* durante todo o período do experimento, porém as concentrações de nitrito no ponto *P4* são maiores que o demais pontos no mar, tendo médias de 0,12 ± 0,09 µmol.L^{-1}, enquanto *P1* teve 0,09 ± 0,07 µmol.L^{-1}, *P2* 0,07 ± 0,05 µmol.L^{-1} e *P3* 0,07 ± 0,06 µmol.L^{-1}. *P1* e *P4* tiveram concentrações em média 83% maiores que *P5* e 57% maiores que *P2* e *P3*.

A concentração de nitrato pode ser vista na Figura 48, assim como nitrito, o nitrato apresentou o mesmo perfil de distribuição das concentrações, tendo *P1* e *P4* as maiores concentrações em relação aos pontos no mar.

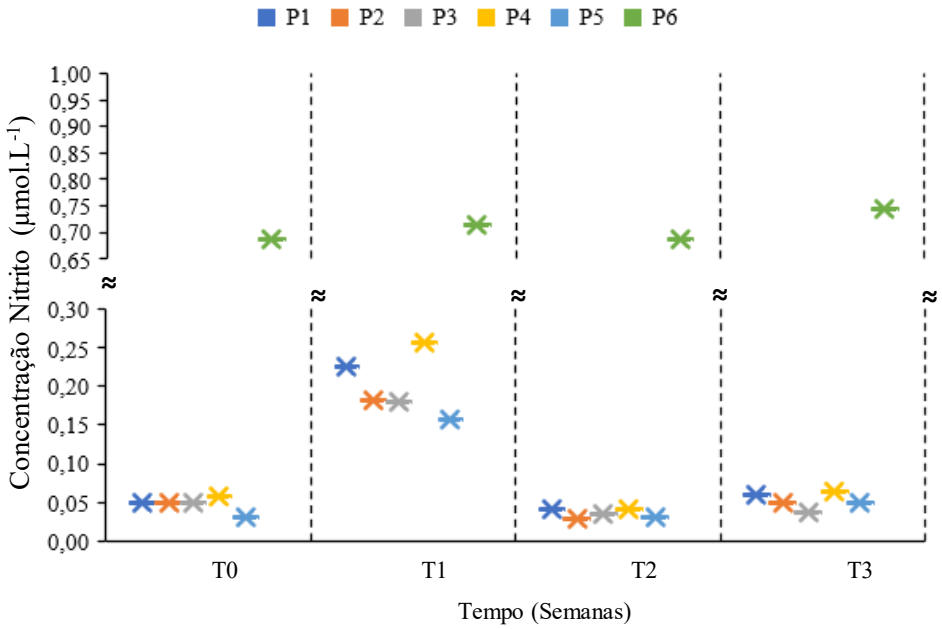


Figura 47 - Concentração de nitrito nas amostras de água. *P1*, *P2*, *P3*, *P4*, *P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1*, *T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

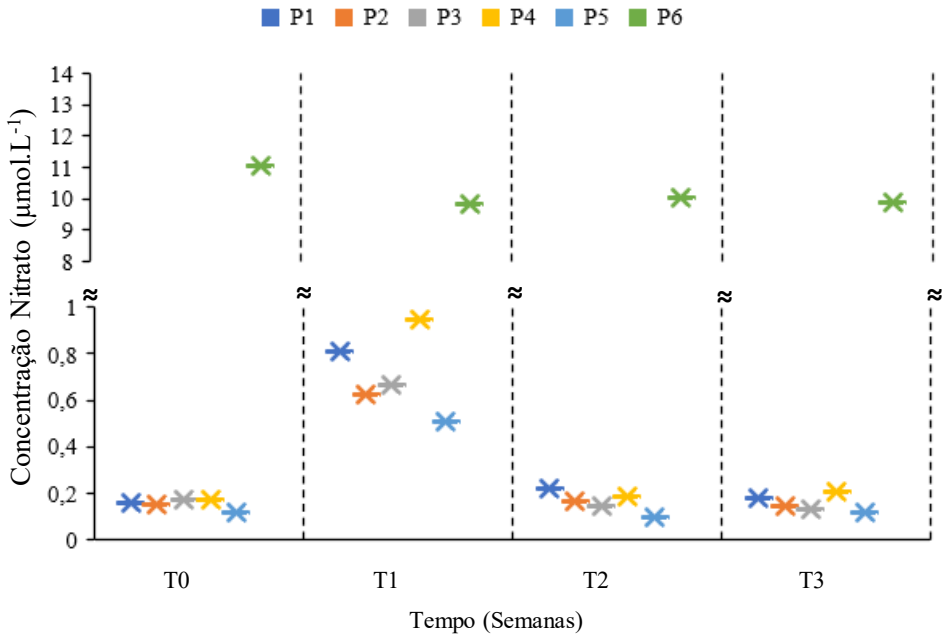


Figura 48 - Concentração de nitrato nas amostras de água. *P1*, *P2*, *P3*, *P4*, *P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1*, *T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

A concentração de fosfato (Fig. 49) apresentou uma tendência similar à observada para nitrato e nitrito, sendo que *P1* e *P4* tiveram valores mais altos que os demais pontos no mar, tendo em média uma concentração 11% maior do que *P2*, 14% maior do que *P3* e 21% maior do que as médias em *P5*.

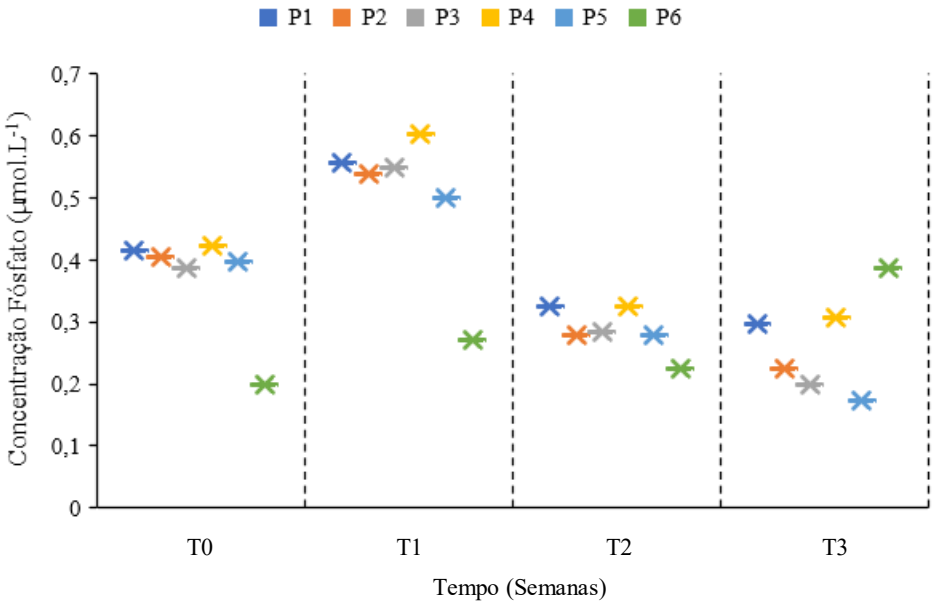


Figura 49 - Concentração de fosfato nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

A concentração de silicato (Fig. 50) não apresentou um padrão semelhante aos demais nutrientes. Nas amostragens em *T0*, *T1* e *T2*, as concentrações foram bem próximas entre os pontos no mar 10,7 ± 1,0 µmol.L^{-1}. Na última semana, a concentração de silicato apresentou uma queda em todos os pontos do mar 4,70 ± 0,81 µmol.L^{-1}. As concentrações em *P6* tiveram média de 58,90 ± 24,89 µmol.L^{-1}.

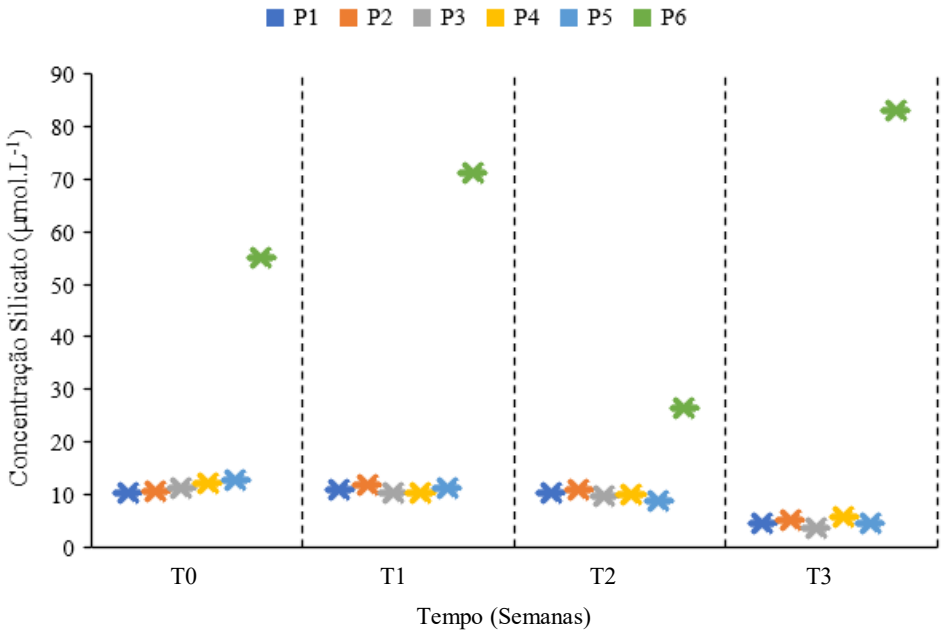


Figura 50 - Concentração de silicato nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

A concentração de clorofila *a* (Fig. 51) apresentou as maiores concentrações em *P2, P3* e *P5*. Os pontos *P1* e *P4* mostraram, no geral, valores menores que os demais pontos no mar, esse padrão se mostrou constante durante todo o período do cultivo experimental.

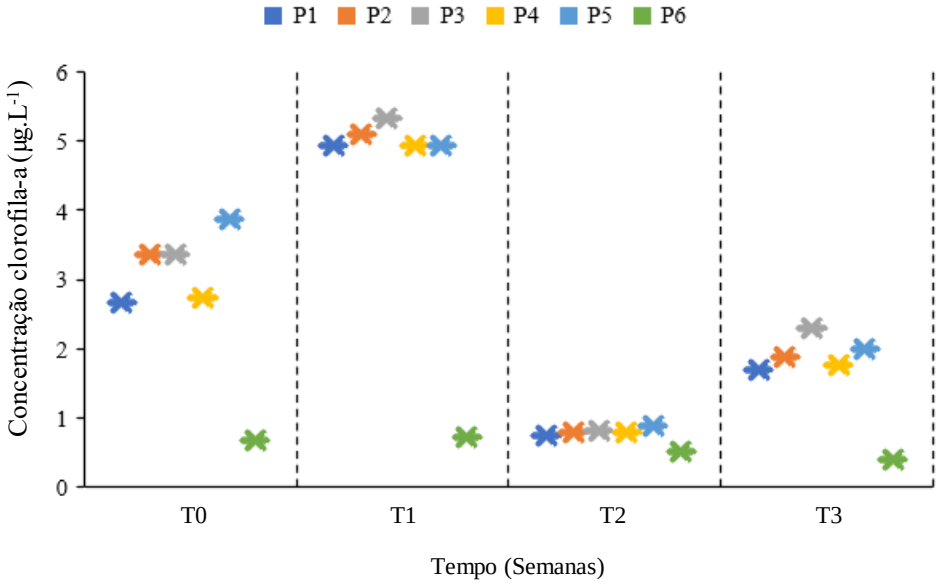


Figura 51 - Concentração de clorofila *a* nas amostras de água. *P1, P2, P3, P4, P5* e *P6* são os pontos de amostragem, *T0* corresponde inicial do experimento, *T1, T2* e *T3* são as semanas decorrentes.

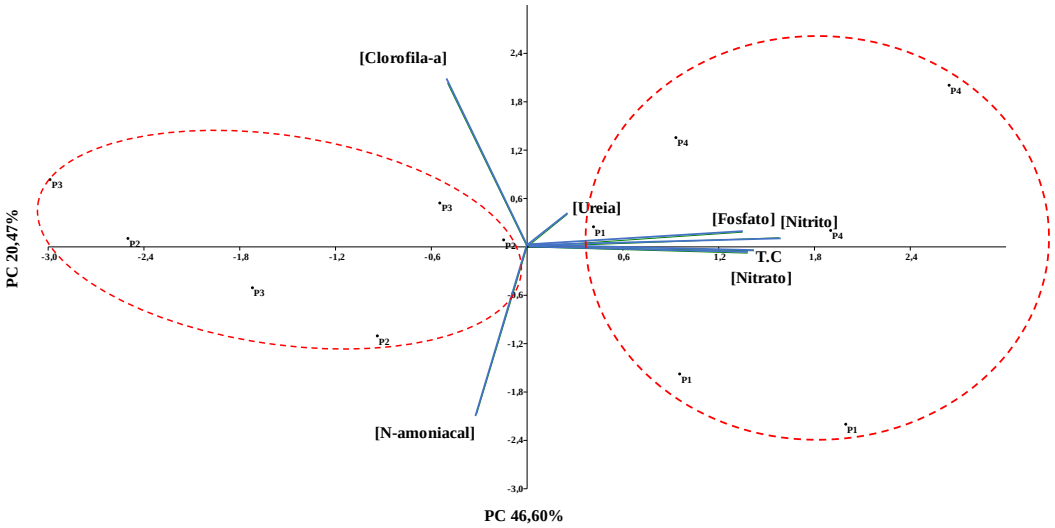


Figura 52 – Analise das componentes principais (PCA) das algas no cultivo experimental (*P1, P2, P3* e *P4*), sobe a influência dos nutrientes inorgânicos (exceto o silicato), ureia, clorofila-a e TC (taxa de crescimento).

Foi feita uma PCA (Fig. 52) com as concentrações dos nutrientes (exceto silicato), clorofila *a*, ureia e as taxas de crescimento. O primeiro componente principal (PC1) representou 46,60% da variação dos dados e o segundo componente principal (PC2) representou 20,47%, tendo formado dois grupos, um formado por *P1* e *P4*, que tiveram maior influência de fosfato, nitrito, nitrato e TC, e um grupo formado por *P2* e *P3*. Os pontos *P2, P3* e *P4* tiveram uma maior influência do N-amoniacal. A ureia apresentou pouca influência em relação aos demais nutrientes para a formação dos grupos. A clorofila *a* apresentou uma correlação negativa com os nutrientes.

4.2.4. Modelagem numérica da circulação

Para entender a dinâmica da circulação na área da fazenda marinha, foi feito um modelo numérico, e para validar este modelo, usamos a variação do nível do mar. A Figura 54, mostra uma boa similaridade entre a variação do nível do mar coletada com o *in situ* e a

produzida no modelo numérico. Na avaliação quantitativa, o valor obtido em RMAE foi 0,476 (Classificado como Razoável), e para Skill 0,930 (Classificado como Excelente).

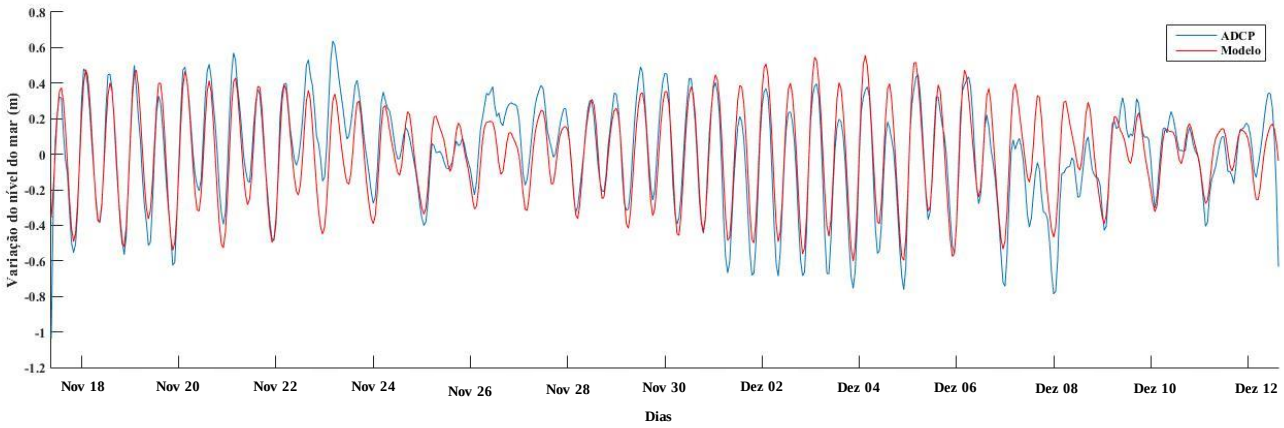


Figura 53 -Comparação dos valores observados *in situ* coletado com um ADCP, com os valores obtidos no modelo numérico.

O padrão de circulação na maré de quadratura, da área de estudo pode ser visto na Figura 55, é uma área com um fluxo médio bem baixo, não ultrapassando 1,2 $cm.s^{-1}$. A circulação preferencial é no sentido horário, a corrente entra paralela ao sistema de cultivo *long-line* no sentido *P3* para *P1* (Fig. 55A), em seguida a direção da corrente muda no sentido horário da direção do *long-line* para *P4* (Fig. 55B), em seguida o fluxo se inverte, na maré vazante, em um sentido quase paralelo ao *long-line*, indo de *P4* para o cultivo de mexilhões (Fig. 55C e D). Pode-se notar que a velocidade do fluxo é sempre mais baixa na área próxima a *P1* e *P4*. Na Figura 56, observa-se o padrão de circulação na maré de sizígia, que é muito semelhante ao observado na a Figura 55, porém a velocidade do fluxo é mais elevada neste período.

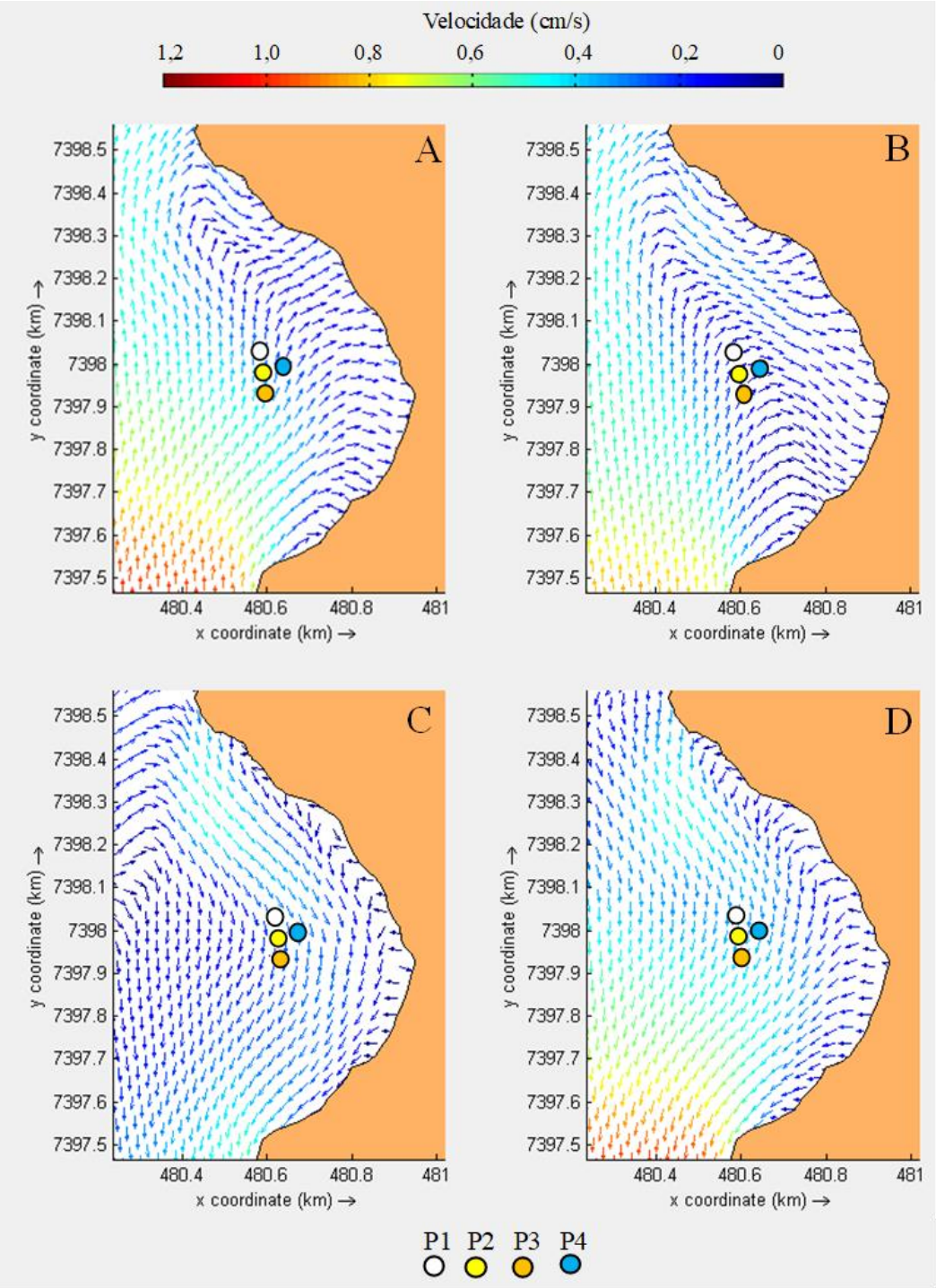


Figura 54 – O padrão de circulação na maré de quadratura, da área de estudo. A circulação preferencial é no sentido horário, (A) a corrente entra paralela ao sistema de cultivo *long-line* no sentido *P3* para *P1*, (B) a direção da corrente muda no sentido horário da direção do *long-line* para *P4*; (C e D) o fluxo se inverte, na maré vazante, em um sentido quase paralelo ao *long-line*, indo de *P4* para o cultivo de mexilhões.

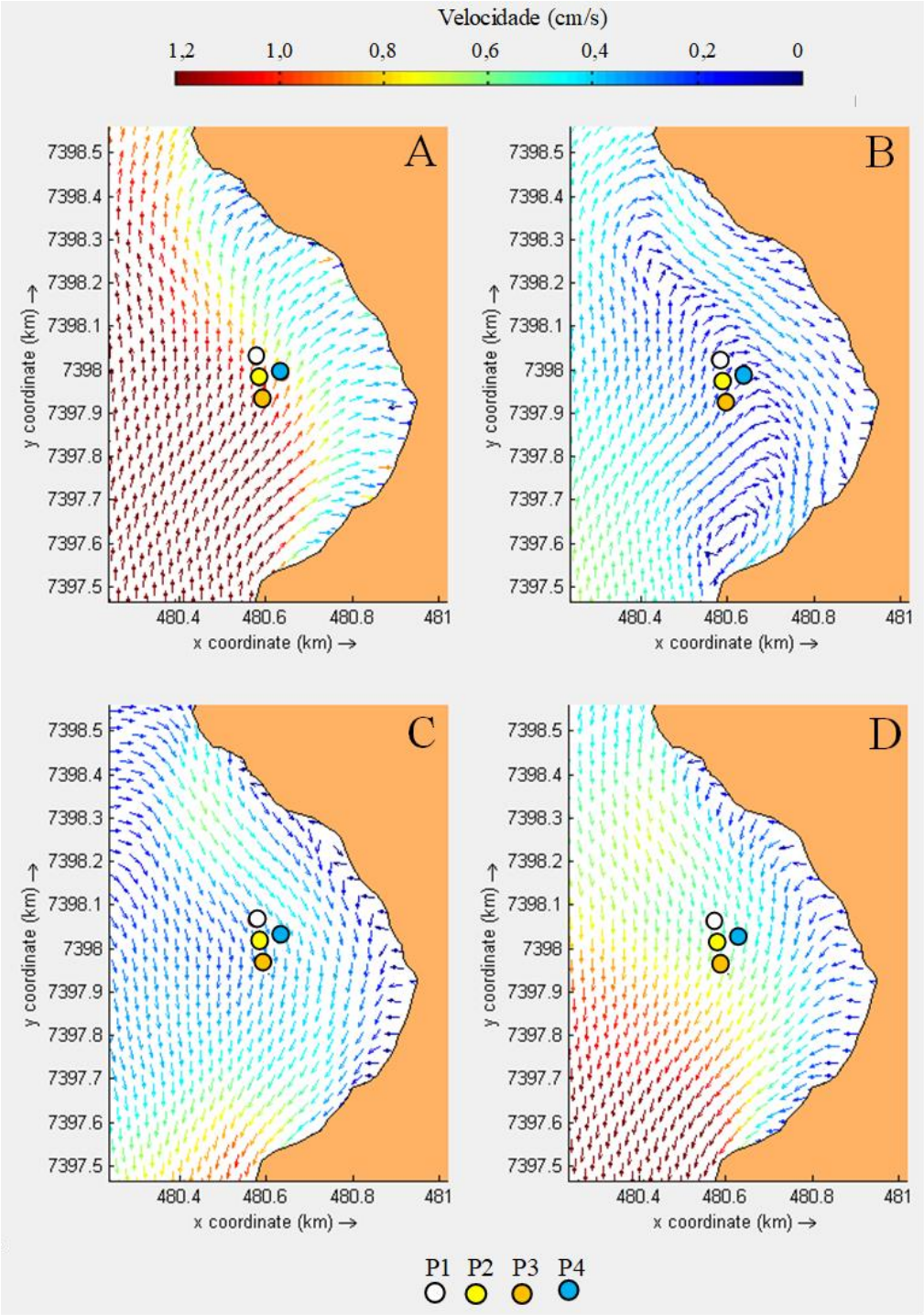


Figura 55 - O padrão de circulação na maré de sizígia, da área de estudo. A circulação preferencial é no sentido horário, (A) a corrente entra paralela ao sistema de cultivo *long-line* no sentido *P3* para *P1*, (B) a direção da corrente muda no sentido horário da direção do *long-line* para *P4*; (C e D) o fluxo se inverte, na maré vazante, em um sentido quase paralelo ao *long-line*, indo de *P4* para o cultivo de mexilhões.

Com o uso de derivadores no modelo numérico, estimou-se uma área de influência direta do cultivo. Na Figura 57A, observa-se a área de influência do cultivo durante a maré de quadratura, podendo-se notar que a porção da área entre o *long-line* e o lado interno da baia é menor do que a porção voltada para o mar. Como vimos nas Figuras 55 e 56, a velocidade do fluxo na área onde estão localizados os pontos *P1* e *P4* é mais baixa, o que resulta em um tempo de residência maior dos efluentes vindos dos mexilhões, em comparação à região voltada para o mar. Na Figura 57B, temos a área de influência do cultivo durante a maré de sizígia. Os resultados apresentam uma tendência semelhante à observada por ocasião da maré de quadratura, porém com uma área de influência bem maior no decorrer das 6 horas de percurso do derivador, devido à velocidade média mais elevada do fluxo nesse período.

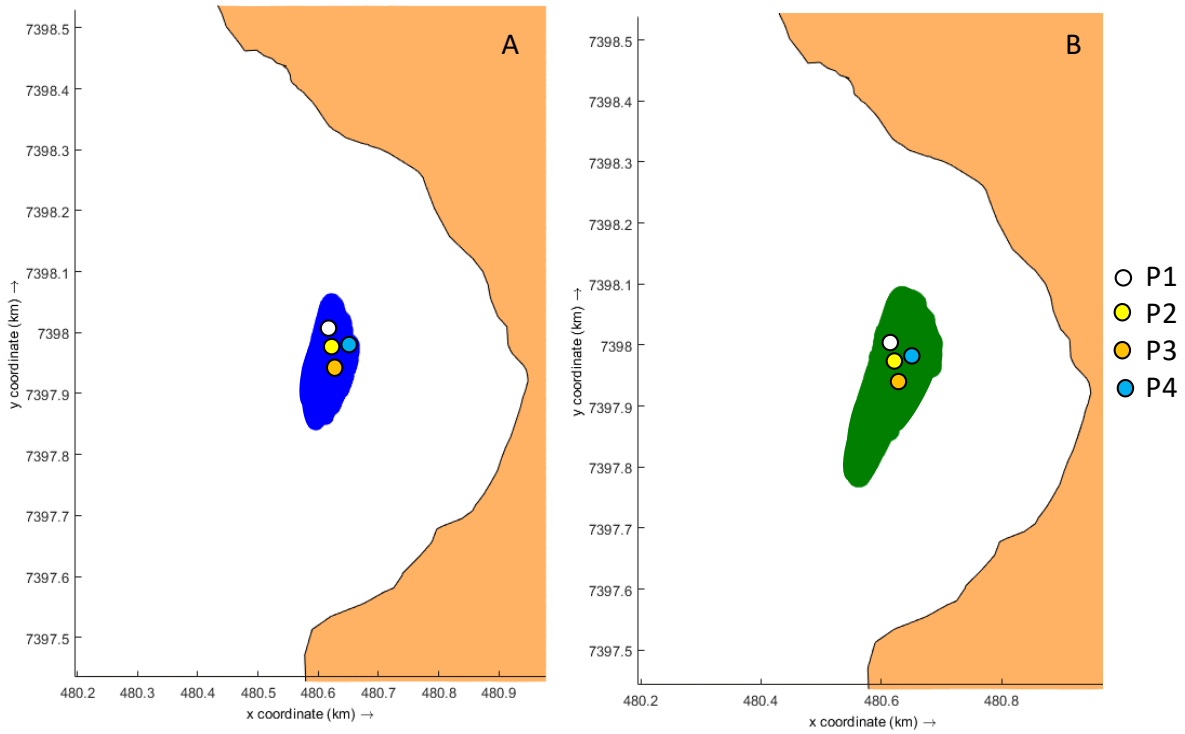


Figura 56 -Mapa probabilístico de percurso de derivadores, oriundo do modelo numérico, lançados em diferentes momentos de maré. (A) Maré de quadratura. (B) Maré de sizígia.

Também foi verificada a influência direta do rio Lagoinha sobre o cultivo. Foram lançados vários derivadores na embocadura do rio no período da segunda semana do experimento, quando o fluxo do rio foi mais elevado. Na Figura 58, observasse o caminho que os derivadores percorreram em uma semana. Nota-se que o rio tem muito pouca velocidade no sentido do cultivo, levando quase seis dias para chegar próximo ao cultivo.

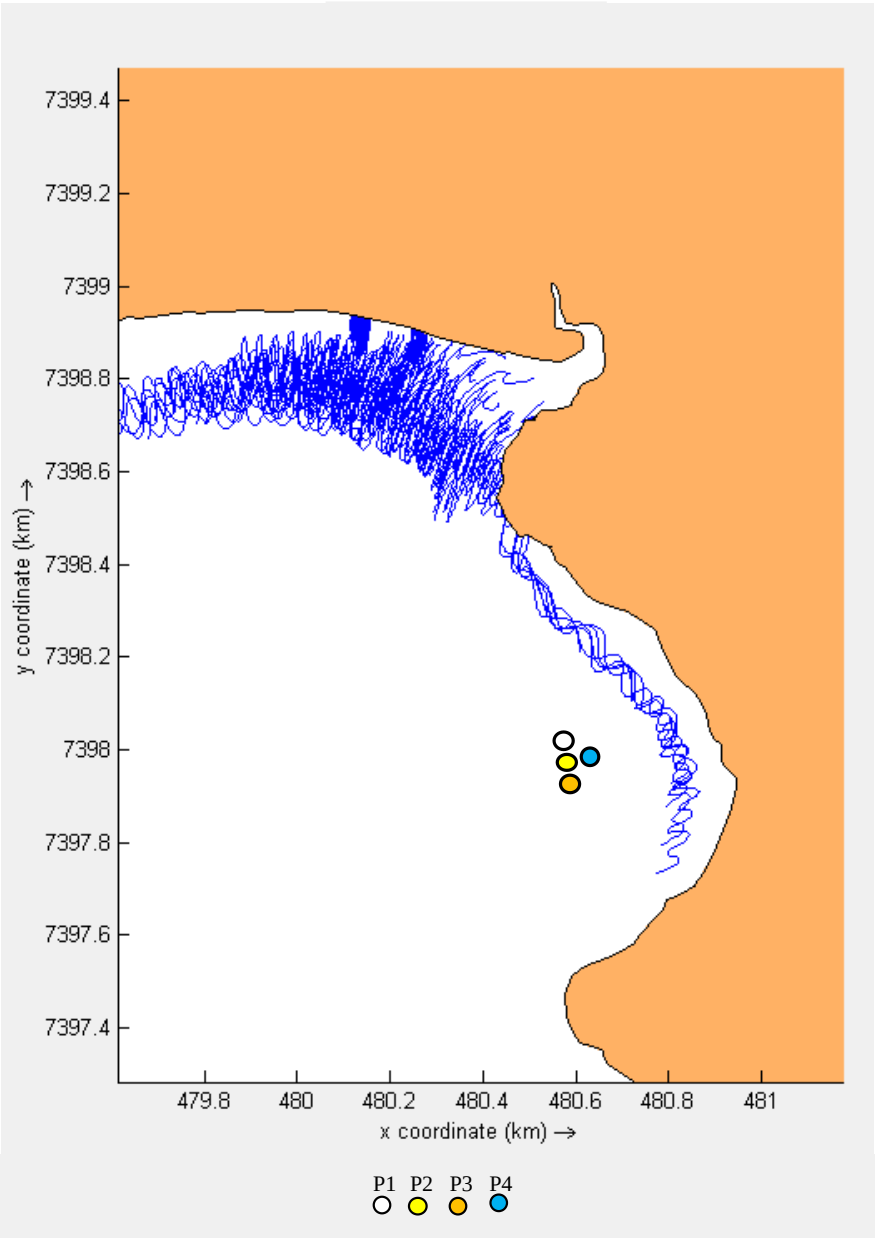


Figura 57 – As linhas azuis representam o caminho percorrido pelos derivadores que foram lançados na embocadura do rio Lagoinha, durante um período de sete dias.

4.2.5. Composição algácea (cultivo experimental)

As análises do material algáceo do cultivo experimental são mostradas nas Figuras 59 - 64.

A concentração de clorofila *a* é mostrada na Figura 59A, nota-se uma maior concentração nas algas cultivadas na superfície nos pontos *P1* e *P4*, sendo significativamente maior do que as demais amostras (ANOVA $F = 54,98$; $df = 6,325$; $p < 0,0001$).

Os pigmentos acessórios demostraram uma tendência similar à clorofila *a*, com valores significativamente mais altos em *P1* e *P4* para superfície: ficoeritina (Fig. 59B; ANOVA $F = 9,646$; $df = 6,526$; $p = 0,00503$) e ficocianina (Fig. 59C; ANOVA $F = 10,62$; $df = 6,794$; $p = 0,00329$).

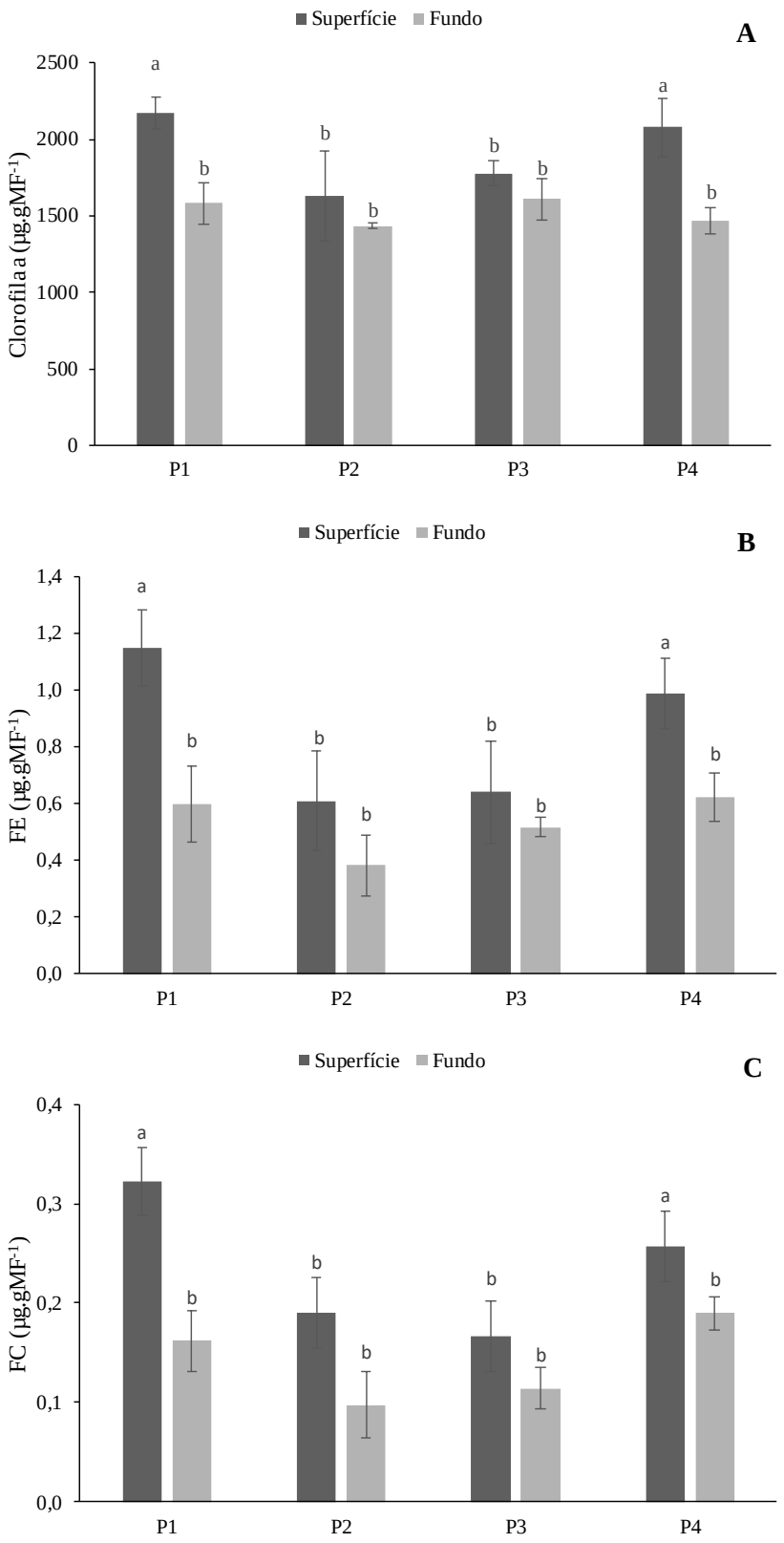


Figura 58 - Concentração de pigmentos nas macroalgas por grama de massa fresca (MF) no cultivo experimental. (A) Concentração de clorofila *a*. (B) Concentração de ficoeritrina. (C) Concentração de ficocianina (média ± DP, *n* = 5). As letras minúsculas representam diferenças significativas.

As proteínas totais (Fig. 60A) se diferenciaram entre os tratamentos, sendo encontrada as maiores porcentagens em *P1* e *P4* da superfície: 16,15 ± 0,15% e 15,9 ± 0,12%, respectivamente. *P2* foi o que apresentou os menores valores tanto na superfície como no fundo ($F = 229; df = 6,587; p < 0,0001$). A concentração de proteínas solúvel (Fig. 60B) não apresentou diferenças significativa dentre os tratamentos (ANOVA $F = 2,343; df = 6,78; p = 0,1455$).

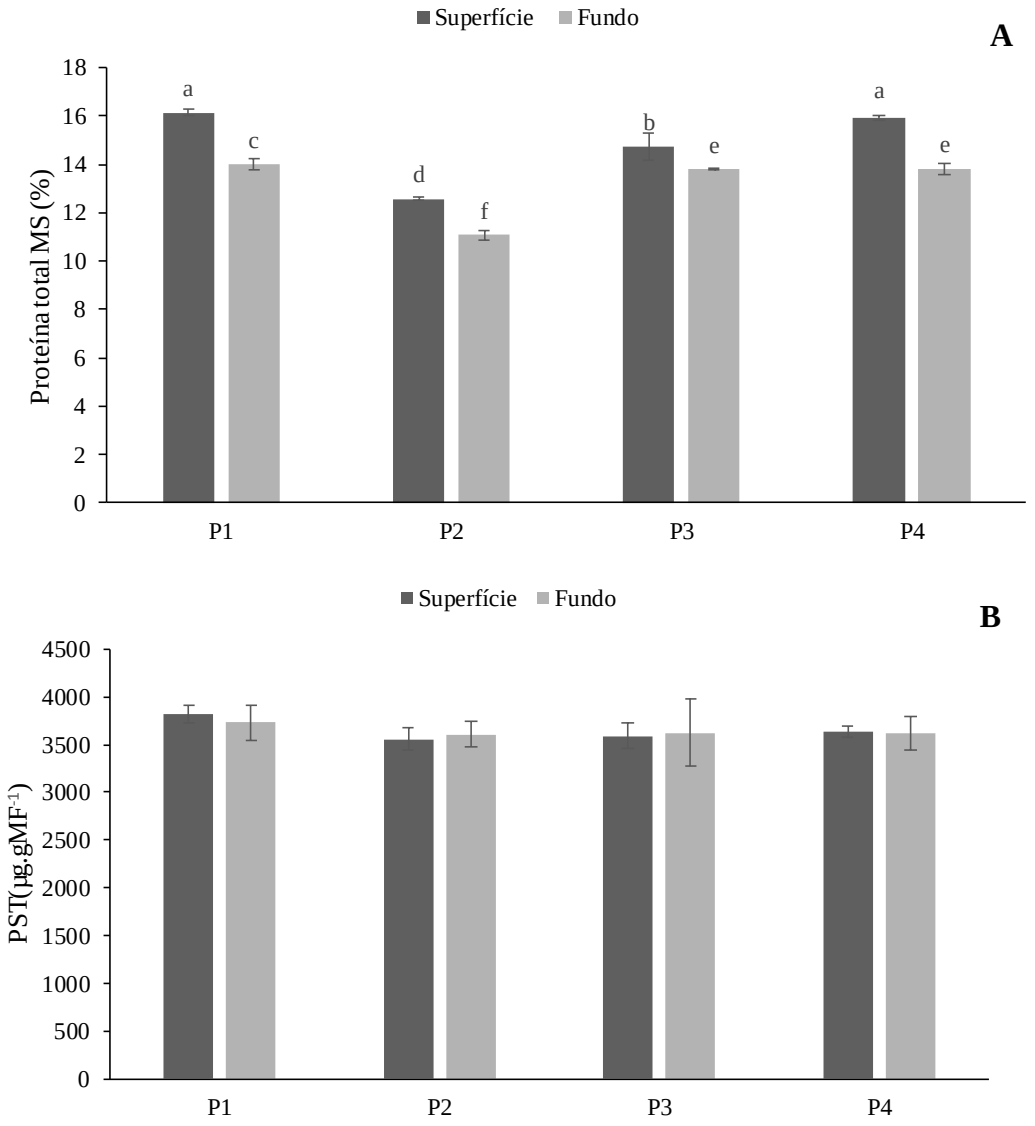


Figura 59 - (A) Porcentagem de proteína total por massa seca (MS) de macroalga do cultivo experimental. (B) Concentração de proteína solúvel total por massa fresca (MF) de macroalga do cultivo experimental (média ± DP, *n* = 5). As letras minúsculas representam diferenças significativas.

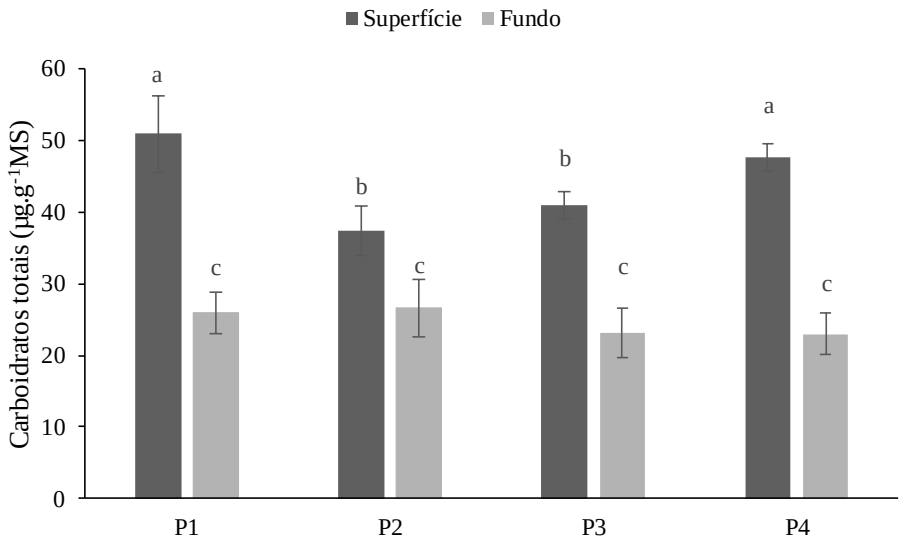


Figura 60 - Concentração de carboidratos totais por massa fresca (MF) da macroalga do cultivo experimental (média ± DP, *n* = 5). Letras representam diferenças significativas.

As concentrações de carboidratos podem ser vistas na Figura 61. Pode- se notar que os pontos *P1* e *P4* apresentam as maiores concentrações: 43,37 ± 6,70 µg.g^{-1} e 38,80 ± 13,22 µg.g^{-1}, respectivamente (ANOVA *F = 9,13; df = 6,611; p = 0,005615*). As algas cultivadas no fundo apresentaram concentrações bem mais baixas do que as na superfície, sendo significativamente diferentes.

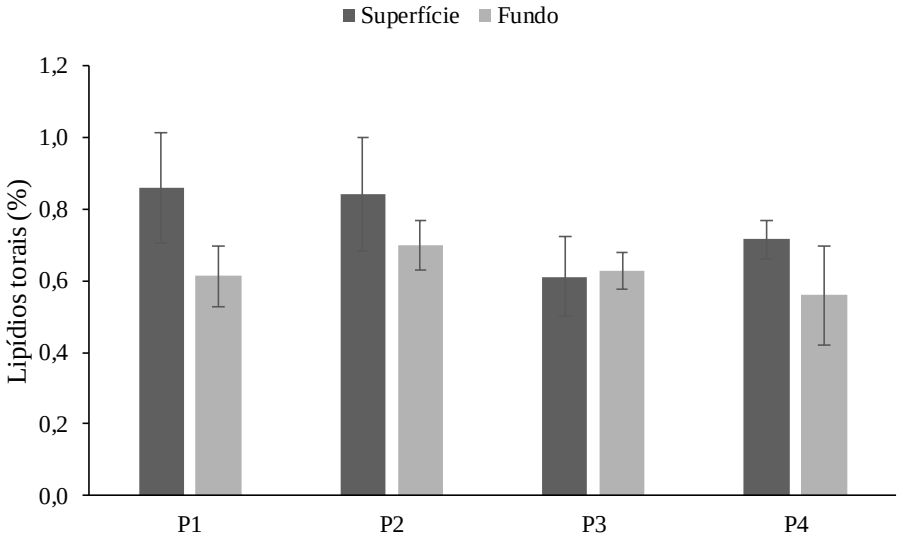


Figura 61 - Porcentagem de lipídios (por biomassa seca de macroalga) do cultivo experimental, (média ± DP, *n* = 5).

A porcentagem de lipídios (Fig. 62) não apresentou valores significativamente diferentes entre as amostras, tendo valores abaixo de 1% (ANOVA *F = 1,12; df = 6,766; p = 0,444*).

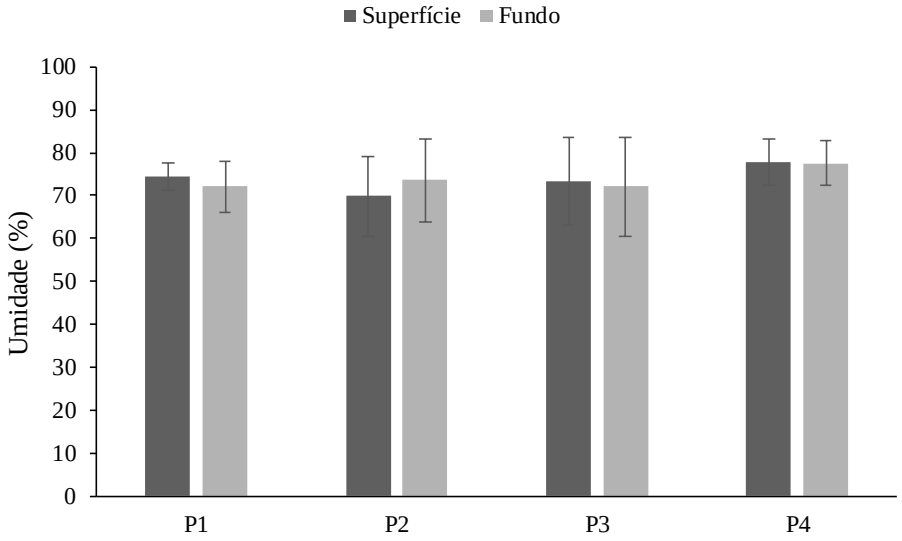


Figura 62 - Porcentagem de umidade (por biomassa seca de macroalga) do cultivo experimental (média ± DP, *n* = 5).

A porcentagem de umidade (Fig.63) também não apresentou valores significativamente diferentes entre as amostras, tendo valores entorno de 77% (ANOVA *F = 0,7074; df = 13,47; p = 0,667*).

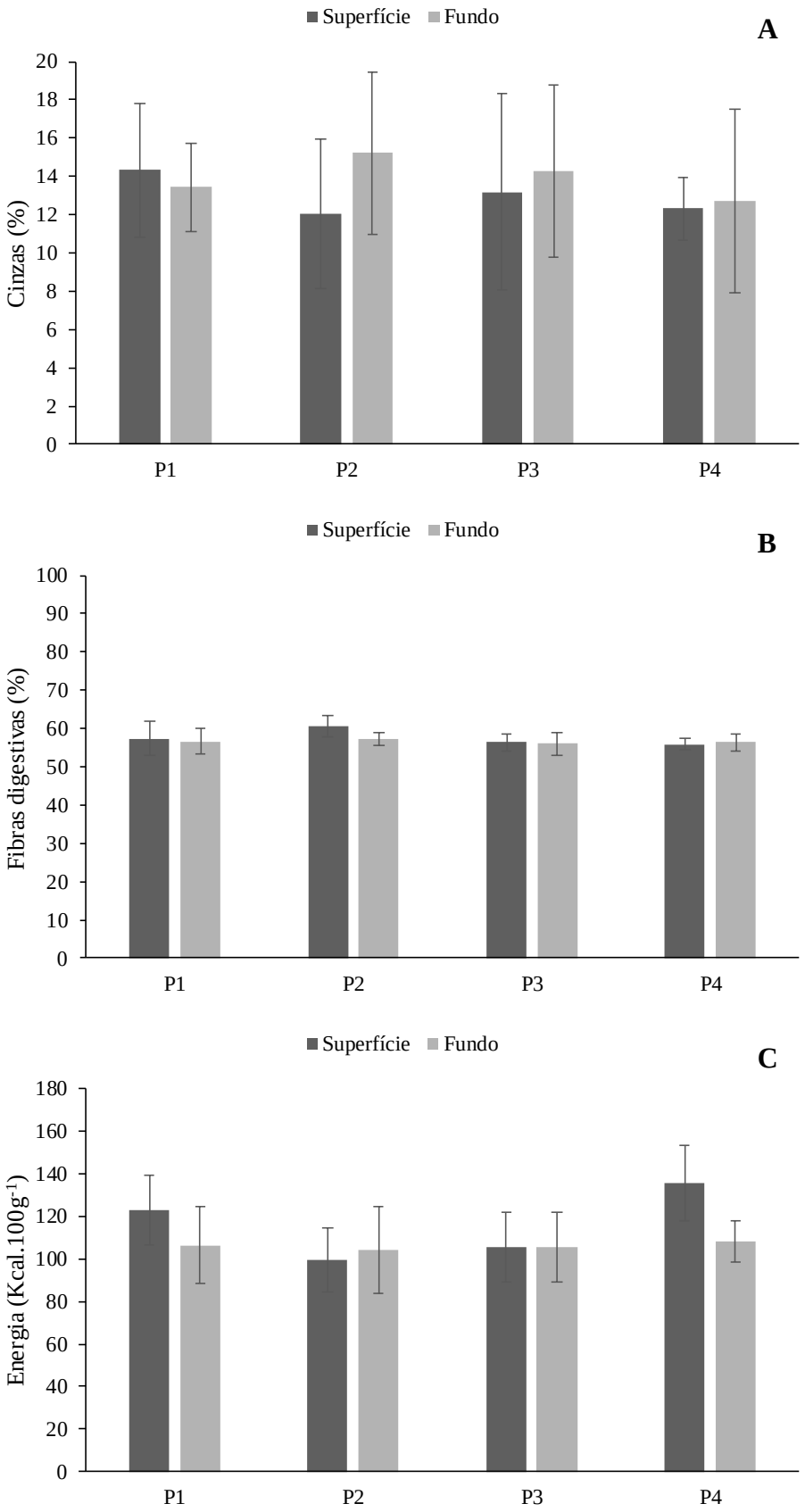


Figura 63 - (A) Porcentagem de cinzas (da massa seca (MS) da macroalga) do cultivo experimental; (B) Porcentagem de fibras digestivas (da massa seca (MS) da macroalga) do cultivo experimental; (C) Quantidade de energia por 100 g de biomassa seca de macroalga do cultivo experimental (média ± DP, *n* = 5).

A porcentagem de cinzas (Fig. 64A), fibras digestivas (Fig. 64B) e a quantidade de energia (Fig. 64C) não apresentaram diferenças significativas: cinzas (ANOVA *F = 0,3892; df = 13,52; p = 0,893*), fibras digestórias (ANOVA *F = 1,818; df = 13,65; p = 0,1633*), energia (ANOVA *F = 15,96; df = 6,399; p = 0,061282*).

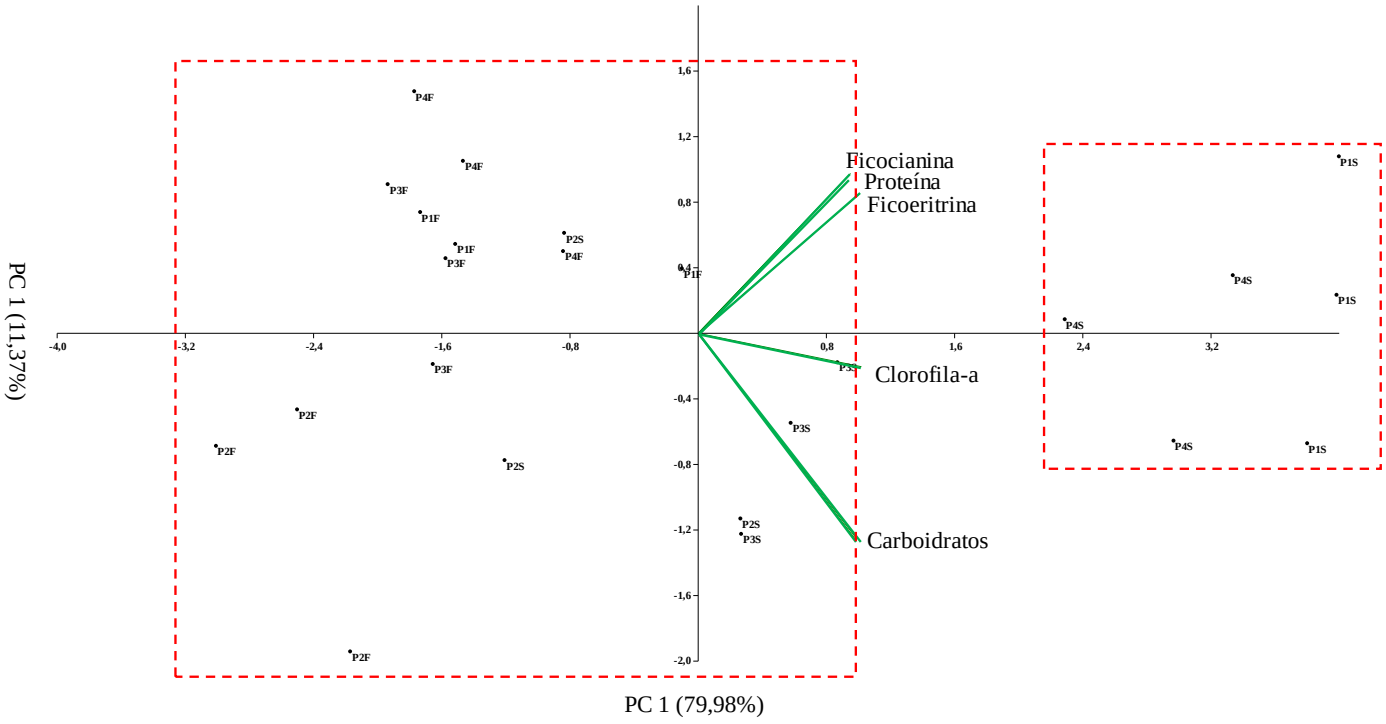


Figura 64 - Análise das componentes principais (PCA) das algas no cultivo experimental (*P1, P2, P3* e *P4*) (superfície e fundo), sobre os dados de proteína, ficocianina, ficoeritrina, clorofila *a* e carboidratos.

Foi feita uma PCA (Fig. 65) com as concentrações dos compostos das macroalgas: proteína, ficocianina, ficoeritrina, clorofila *a* e carboidratos. O primeiro componente principal (PC1) representou 79,98% da variação dos dados e o segundo componente principal (PC2) representou 11.37%, tendo formado dois grupos, um formado por *P1* e *P4* da superfície, que tiveram maior influência de todos os maiores vetores, e um grupo formado por *P1, P2, P3* e *P4* do fundo e *P2* e *P3* da superfície.

5. Discussão

Para o desenvolvimento de um sistema de produção aquícola integrado eficiente, é necessário que os recursos que não foram assimilados por um determinado nível trófico, como por exemplo nutrientes, cheguem de forma adequada para os outros níveis tróficos. Em ambientes de cultivo em terra, como tanques, esse controle do fluxo de nutrientes é facilmente realizado com o uso de infraestruturas, como bombas. Nos cultivos em águas abertas, porém, o uso de efluentes de uma cultura para enriquecer a nutrição de outra é mais complexo, devido à grande quantidade de variáveis que controlam a dispersão dos nutrientes. Conhecer as características bióticas e abióticas é fundamental para compreender os processos locais que possibilitem o melhor aproveitamento dos recursos que cada ambiente dispõe e avaliar a eficiência de remoção de resíduos potencialmente prejudiciais (TROELL *et al.*, 2009). O conhecimento aprofundado das variáveis ambientais, incluindo os processos oceanográficos, constitui uma ferramenta de grande eficiência para o manejo da produção e da qualidade do cultivo, permitindo, inclusive, prever e evitar problemas.

Neste estudo, observou-se que na área onde foi feito o experimento, existiam duas regiões que apresentaram taxas de crescimento algáceo distintas. As algas mantidas nos pontos *P1* e *P4* tiveram as maiores taxas de crescimento ao longo de todo o experimento, sendo estas aproximadamente 70% maior do que as taxas das algas cultivadas em *P2* e *P3*.

Ao analisarmos as variáveis que mensuramos neste trabalho, podemos descartar a influência da temperatura como um dos fatores que explicariam essas diferenças nas taxas de crescimento, pois esta variável teve pouca diferença entre os pontos e as profundidades. Já a irradiância solar apresentou diferenças consideráveis entre as profundidades (superfície e fundo), e é possivelmente um dos fatores que explica as diferenças entre as taxas de crescimento em cada profundidade. TORRES *et al.* (2015) demostraram em laboratório que *G. tenuifrons* tem taxas de crescimento consideravelmente mais elevadas com alta irradiância, tendo 12,6 ± 1,75 %.dia^{-1} (com 1000 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) e 6,40 ± 0,08 %.dia^{-1} (com 60 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}). Em nosso cultivo experimental, tivemos média de irradiância na superfície de 189 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} e 78 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} no fundo, o que mostra um rápido decréscimo da irradiância com o aumento da profundidade. Os resultados com outras algas vermelhas, mostraram um decréscimo das taxas de crescimento à medida que as algas foram cultivadas em profundidades maiores: *Gracilaria bursa-pastoris* teve crescimento

de 4,95 ± 0,29 %.dia^{-1} (1 m de profundidade) e 4,45 ± 0,33 %.dia^{-1} (2 m de profundidade), e em menos de 4 m de profundidade a taxa de crescimento não ultrapassou 2 %.dia^{-1} (Marinho-Soriano, 2012). *Gracilaria chilensis* também apresentou melhores respostas quanto ao crescimento quando cultivadas na superfície em relação ao cultivo em maiores profundidades (WESTERMEIER *et al.*, 1993). Para *Hypnea musciformis*, obtiveram-se valores de 7,0 ± 0,6 %.dia^{-1} na profundidade de 0 m e 1,3 ± 0,6 %.dia^{-1} a 1,2 m (GANESAN *et al.*, 2006); *Kappaphycus alvarezii* também demonstrou a mesma tendência de maior crescimento na superfície, com taxas 6,8 ± 0,5 %.dia^{-1} na superfície e de 5,2 ± 0,2 %.dia^{-1} na profundidade de 1 m (HAYASHI *et al.*, 2007).

Dentre os poucos trabalhos que estudaram a produção de *G. tenuifrons* em sistemas de cultivo de águas abertas, os resultados de crescimento obtidos por GÓMEZ &MILLÁN (1997) foram de 3.63 ± 0.50 %.dia^{-1} na Ilha Margarita na Venezuela. RINCONES & MORENO (2011) obtiveram 0,59 ± 0,39 %.dia^{-1} cultivando essa espécie na península de Guajira, Colômbia. Em ambos os casos, os valores são inferiores aos encontrados em nosso estudo.

As concentrações dos nutrientes na desembocadura do rio Lagoinha foram elevadas em relação às concentrações encontradas nos demais pontos de coleta. Porém, como se trata de um rio pequeno de baixa vazão e como a distância dele para o cultivo é de mais de 900 m, a influência direta do rio é provavelmente muito pouco relevante. Como podemos ver na Figura 58, o tempo médio que uma partícula lançada na desembocadura do rio leva para chegar ao cultivo é de cerca de uma semana. Por se tratar de uma área costeira rasa e estando a desembocadura do rio ao lado da praia da Lagoinha, diversos fatores (como ondas, vento e maré) colaboram para o processo de mistura e diluição das águas do rio com as águas marinhas oligotróficas, devido a geração de fluxos turbulentos induzidos pelo atrito entre a coluna de água e o fundo (SVENDSEN; PUTREV, 1996; XING; DAVIES, 2003).

Os rios podem ser importantes fontes de silicatos para o meio marinho (RAGUENEAU *et al.*, 2005) e, por esse motivo, os silicatos podem ser usados como um sinal biogeoquímico para indicar a influência dos rios no mar (BASTO; BRAGA, 2018). Analisando os dados de concentração de silicatos amostrados nas áreas marinhas deste estudo, pode-se notar uma baixa similaridade entre elas e a variação das concentrações de silicato na desembocadura do rio, o que reforça a afirmação de que o rio não tem influência direta nos pontos do cultivo.

A salinidade, como uma propriedade conservativa, evidencia o processo de mistura das águas do rio em direção ao mar. Do mesmo modo, os nutrientes dissolvidos nas águas do rio podem apresentar um comportamento similar ao da salinidade, ao sofrerem influência de fluxos fluviais e marinhos (LISS, 1976). Nas regiões de cultivo das macroalgas, a salinidade esteve sempre em torno de 33‰ durante todo o experimento.

Os mexilhões são organismos altamente atrativos para produção marinha, principalmente por não necessitarem de alimentação artificial, como ração (GIBBS, 2004). Além disso, eles podem colaborar com a redução da eutrofização na zona costeira (BUCK *et al.*, 2017), embora o cultivo de mexilhões também possa produzir certos níveis de impacto (FERREIRA *et al.*, 2007). Os recursos nutricionais dos mexilhões e das algas são distintos (nutrientes orgânicos e inorgânicos, respectivamente), o que torna o cultivo integrado dessas duas espécies muito vantajoso. A interação entre as macroalgas e os mexilhões, como a que ocorreu no sistema de cultivo deste trabalho, se dá principalmente pelo enriquecimento de compostos inorgânicos das águas próximas ao *long-line*, provenientes da ação metabólicas dos bivalves filtradores (JANSEN, 2012). De um modo didático, podemos imaginar os mexilhões como um conversor de material orgânico em inorgânico, captando compostos orgânicos dispersos na coluna d'água e remineralizando parte desse material em formas mais atrativas para as macroalgas. Segundo PESSATTI *et al.* (2002), cada indivíduo do mexilhão *Perna perna* pode filtrar até 1,04 $L.h^{-1}.g^{-1}$ de água do mar. Sendo assim, estima-se que a fazenda de mexilhões usada nesse experimento é capaz de filtrar cerca de 780 $m^3.h^{-1}$. Essa capacidade de filtração da água do mar pelos mexilhões pode ser inferida pelos dados de clorofila *a* em nosso trabalho. Nos pontos *P1* e *P4*, as concentrações de clorofila *a* são menores, apesar de que os nutrientes são maiores. Esses dados podem ser explicados pelo sentido da corrente de maré na área do cultivo e pela presença dos mexilhões. O fluxo de maré é preferencialmente no sentido de *P3* para *P1*, localizados no *long-line*, e depois a corrente gira no sentido horário em direção a *P4*, fora do *long-line* (Figs. 55 e 56). Dessa forma, *P1* e *P4* recebem com maior intensidade a influência dos mexilhões, o que promove o acúmulo de nutrientes levados pela maré e o maior crescimento das macroalgas neste estudo. Entretanto, nesses locais, a baixa concentração de clorofila *a* na coluna d'água é provavelmente devido ao consumo das microalgas pelos mexilhões. Essas são consumidas ao longo do *long-line* e por isso diminuem em *P1*. Já em *P4*, apesar de estar fora do *long-line*, a água trazida pela corrente é pobre em clorofila devido ao consumo na fazenda.

Em suma, o direcionamento da circulação favorece o transporte da água proveniente do *long-line* na direção de *P1* e *P4*, o que gera um maior enriquecimento dessas localidades pelos efluentes dos mexilhões, beneficiando o crescimento das algas cultivadas nesses pontos. As concentrações de N-amoniacal foram maiores sobre o *long-line*, com os maiores valores em *P1*. Em *P4*, por sua vez, tivemos os maiores valores de nitrito e nitrato. A presença de maiores concentrações de nitrito e nitrato em *P4* pode ser devido à ação de bactérias que oxidam amônia para nitrito e este para nitrato, durante o percurso da corrente (BEMAN; SACHDEVA; FUHRMAN, 2010). Alguns trabalhos demonstram as taxas de nitrificação da amônia na região costeira, 0,001 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$ (NEWELL *et al.*, 2011), 0,002-0,005 $\mu mol.L^{-1}.h^{-1}$ (ZHENG *et al.*, 2017) e 0,5 $\mu mol.m^{-2}.h^{-1}$ (HEISS; FULWEILER, 2016). Esses valores mostram a rápida ação oxidativa desse composto no ambiente costeiro.

Como já é sabido, o desenvolvimento das macroalgas está intimamente ligado à disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos na água. Além da quantidade dos nutrientes presentes no meio aquoso, a qualidade também é um fator de influência no crescimento. Formas menos oxidadas de nitrogênio são cineticamente mais interessantes para as vias de assimilação de nitrogênio e conversão em compostos orgânicos (HAINES; WHEELER, 1978). Essas formas menos oxidadas de nitrogênio entram na via metabólica sem a necessidades de produção de enzimas. As macroalgas desenvolveram um complexo sistema de assimilação de nitrogênio, evoluindo para absorver o nitrato, que é uma das formas mais abundante de nitrogênio nos oceanos. O nitrato, para ser absorvido, precisa ser reduzido a nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase e depois o nitrito é reduzido para amônia pela enzima nitrito redutase (CHOW; PEDERSÉN; OLIVEIRA, 2013). Todo esse ciclo de produção enzimática requer um grande gasto energético. Em meios onde há concentrações apreciáveis de amônia e nitrito, há um ganho na eficiência de assimilação de nutrientes, o que favorece o crescimento das macroalgas (HAINES; WHEELER, 1978; TOPINKA, 1978; RYTHER *et al.*, 1981; CHOW; PEDERSÉN; OLIVEIRA, 2013). Nesse sentido, observa-se que em *P1* houve favorecimento do crescimento das algas devido ao enriquecimento com N-amoniacal, nitrato e nitrito. Em *P4*, o maior crescimento está associado às concentrações de nitrito e nitrato que foram carregados do cultivo de mexilhões pelas correntes.

O fósforo tem grande importância na constituição celular algácea e sua principal função está associada ao transporte de energia pelo ATP, tanto no processo de fotossíntese quanto na respiração (LEE *et al.*, 2005). Por isso, o fornecimento de quantidades que garantam a manutenção do desenvolvimento da macroalga é essencial. O fosfato apresentou

médias maiores de concentrações nos pontos *P1* e *P4*, devido ao transporte preferencial no sentido desses pontos. Esse nutriente tem uma boa assimilação por algumas rodófitas. MARINHO-SORIANO *et al.* (2009) verificaram que a rodófita *Gracilaria birdiae* tem uma grande inclinação para a retenção deste nutriente, retendo mais de 90% de seu conteúdo em efluentes da carcinicultura. *Gracilaria lemaneiformis* mostrou bons resultados na retenção de fósforo e nitrogênio de efluentes da piscicultura em cultivo de águas abertas (WEI *et al.*, 2018).

Compostos orgânicos compõem uma grande fração do total de nitrogênio dissolvido disponível em águas costeiras, mas são pouco considerados com uma fonte de nutrição para as macroalgas (TYLER; MCGLATHERY; MACKO, 2005). Existem dúvidas se o nitrogênio da ureia é assimilado diretamente, ou indiretamente via degradação do composto por ação microbiana (MULHOLLAND; LOMAS, 2008; SOLOMON *et al.*, 2010). Alguns trabalhos propõem que a ureia pode ser assimilada diretamente pelas macroalgas (TYLER; MCGLATHERY; MACKO, 2005; SMITH *et al.*, 2018). Neste trabalho, constatamos uma variação grande da ureia nos pontos de coleta ao longo das semanas, não apresentando uma tendência de concentração mais elevada em nenhum dos locais. Não é possível, portanto, afirmar o real papel desse composto no desenvolvimento das macroalgas.

A composição química nas macroalgas é fortemente influenciada pelo ambiente. Variações na oferta de nutrientes e irradiância solar são fatores que têm grande influência. Neste trabalho, tivemos um aumento das concentrações da clorofila *a* e pigmentos acessórios nos locais onde houve maior disponibilidade de nutrientes e luz, e, por isso, as algas cultivadas em *P1* e *P4* na superfície tiveram as maiores concentrações de pigmentos. McGLATHERY & PEDERSEN (1999) observaram um aumento das concentrações de clorofila em algas cultivadas em ambiente que apresenta alta irradiância luminosa e que tenha um estoque de nitrogênio que supra as necessidades algácea. As ficobiliproteínas também demostram uma resposta semelhante à apresentada pela clorofila *a*. Alguns trabalhos mostram que existe uma correlação positiva entre o aumento da oferta de nitrogênio e a elevação da concentração de ficoeritrina e ficocianina (ANDRIA; VERGARA; PEREZ-LLORENS, 1999). *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em alta irradiância e com suplemento de nutrientes demostrou elevação das suas concentrações de pigmentos (ZUBIA; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2014). No trabalho de SERRA (2013), *G. tenuifrons* demonstrou uma queda na concentração de pigmentos com o aumento da irradiância luminosa, porém nesse estudo, o estoque de nutrientes pode ter sido limitante com o aumento da luz, o que pode ter gerado um

resultado diferente do encontrado por ZUBIA; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO (2014) e no presente trabalho. Aparentemente, o fósforo não tem uma influência considerável da produção de clorofila nas algas, sendo o nitrogênio o principal nutriente (CHOPIN; GALLANT; DAVISON, 1995; MENÉNDEZ; HERRERA; COMÍN, 2002).

A concentração de proteína solúvel na biomassa algal não apresentou diferenças significativas entre os pontos de cultivo e as profundidades. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por MARTINS; NECCHI; COLEPICOLO (2011), que testaram várias concentrações e tipos de nutrientes para *Hypnea musciformis*, que também não apresentou diferenças nas concentrações de proteínas solúveis totais. Possivelmente, apesar de termos diferenças de disponibilidades de nutrientes nesses ambientes, não houve concentrações de nutrientes baixas o suficiente para diminuir a produção de proteínas solíveis. Segundo ANDRIA *et al.* (1999), as proteínas solúveis são importantes fontes de reserva nutricional nas macroalgas, sendo requerido quando a oferta de nutriente do meio externo é deficiente.

As proteínas demostraram uma diferença significativa entre quase todas as amostras. As amostras provenientes dos pontos *P1* e *P4* possuíam as maiores concentrações, o que provavelmente está relacionado às maiores ofertas de compostos nitrogenados, que são essenciais na formação de aminoácidos. SHPIGEL *et al.* (1999) observaram que *Ulva lactuca*, quando cultivada em meio com altas concentrações de nitrogênio, tem seus teores de proteínas elevados, em comparação com o cultivo pobre em fontes de nitrogênio. Quando comparado com os valores de outras espécies de rodófitas, como *Gracilaria birdiae* 12,21 ± 0,04 g/100g, *Gracilaria birdiae* (amostra comercial) 9,56 ± 0,53 g/100g, *Gracilaria domingensis* 11,15 ± 0,22 g/100g e *Gracilaria caudata* 13,13 ± 0,53 g/100g (TORRES. 2017), constata-se que as algas do ponto *P1* (16,15 ± 0,15 g/100g) e *P4* (15,90 ± 0,12 g/100g) (superfície), onde houve maior disponibilidade de nitrogênio, apresentaram valores expressivamente mais elevados.

Os carboidratos também demostraram um padrão semelhante ao encontrado para proteínas totais (SHPIGEL *et al.*, 1999). Isto é, nas algas cultivadas em meio com altas concentrações de nutrientes, a concentração de carboidratos nas células se eleva em comparação a meio de cultura com baixas quantidades de nutrientes.

6. Conclusão

O cultivo integrado de mexilhões *Perna perna* e da alga *Gracilariopsis tenuifrons* mostrou-se eficiente para promover a produção de biomassa algácea.

O conhecimento de variáveis biológicos e oceanográficos pode colaborar para otimizar a produtividade de uma área de aquicultura, devido ao uso eficiente dos benefícios que ambiente pode oferecer.

Gracilariopsis tenuifrons apresentou melhores resultados de crescimento na superfície, mostrando uma preferência por maiores valores de irradiância solar.

Nos pontos de cultivo das macroalgas que se localizavam na direção que recebia um maior fluxo de nutrientes, provenientes do cultivo de mexilhões, houve maiores taxas de crescimento.

Os nutrientes da fazenda de mexilhões promoveram não só uma melhor produtividade, mas também colaboraram para a produção de uma biomassa nutricionalmente de melhor qualidade, com concentrações mais altas de compostos que possuem inúmeras aplicações.

O ganho ambiental decorrente da AMTIM foi evidenciado pois os nutrientes produzidos pelos mexilhões foram sequestrados pelas macroalgas e a produção de biomassa algal contrapõem o excesso de componentes eutrofizantes gerados pelo cultivo.

O aprofundamento dos estudos nessa linha de pesquisa é recomendado, afim de se aproveitar ao máximo as vantagens que um sistema de produção integrado pode oferecer.

7. Referências

AMINOT, A.; KEROUEL, R. Automatic-determination of urea in sea-water - A sensible method using diacetilmonoxime. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, p. 174-183, 1982.

ANDRIA, J. R.; VERGARA, J, J, PEREZ-LLORENS, J. L. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur J Phycol 34*: p. 497-504, 1999.

ANGELL, A. R; MATA, L; NYS, R; PAUL, N. A. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. Journal of Applied Phycology 2015. DOI 10.1007/s10811-015-0650-1

BASTOS, A.; CORDEIRO, T. C.; BRAGA, E. S. Different silicon forms sinalize an input of urbanized river and indicate the presence of phytoplankton with silicon structures in the tropical coastal area of Recife (PE-Brazil). *Braz. j. oceanogr.*[online],.66, p.104-114, 2018.

BEER, S.; ESHEL, A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. Marine and Freshwater Research, 36, n. 6, p. 785, 1985.

BERMAN, J. M., R. SACHDEVA, J.; FURHRMAN A. Population ecology of nitrifying Archaea and Bacteria in the Southern California Bight, Environ. Microbiol., 12, p.1282–1292, 2010.

BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the qualification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: p.248-254, 1976.

BRAGA, E.S. Determinação automática de nitrato. In: WAGENER, A.R.L. & CARREIRA, R. Métodos analíticos de referência em Oceanografia Química. Rio de Janeiro, MMA/SMA. Cap. 6, p. 27-29. 1997a.

BRAGA, E.S. Determinação automática de nitrito. In: WAGENER, A.R.L. & CARREIRA, R. Métodos analíticos de referência em Oceanografia Química. Rio de Janeiro, MMA/SMA. Cap. 7, p. 31-35. 1997b.

BURTON, J. D.; LISS, P. S. Estuarine chemistry. Academic Press, London, 1976.

BURCK, B.H.; NEVEJAN, N.M.; WILLE, M.; CHAMBERS, M. D.; CHOPIN, T. Chapter 2 Offshore and Multi-Use Aquaculture with Extractive Species: Seaweeds and Bivalves, 2007.

CHOPIN, T.; GALLANT, T.; DAVISON, I. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production, and photosynthetic pigments and metabolism. *J Phycol 31*: p.283-293, 1995.

CHOPIN, T. ROBINSON, S.; SAWHNEY, M.; BASTARACHE, S.; BELYEA, E.; SHEA, R.; ARMSTRONG, W.; STEWART, I.; FITZGERALD, P. The AquaNet Integrated Multi-Trophic Aquaculture Project: Rationale of the Project and Development of Kelp

Cultivation as the Inorganic Extractive Component of the System. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 2004.

CHOPIN, T. Integrated Multi-Trophic Aquaculture: What it is, and why you should care.....and don't confuse it with polyculture. Aquaculture North America, n. July/August, p. 4, 2006.

CHOW, F.; MACCHIAVELLO, J.; SANTA CRUZ, S.; FONCK, E.; OLIVARES, J. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta: Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. Journal of the World Aquaculture Society, Estados Unidos, 32, n.1, p. 215-220, 2001.

CHOW, F.; PEDERSÉN, M.; OLIVEIRA, M. C. Modulation of nitrate reductase activity by photosynthetic electron transport chain and nitric oxide balance in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology, 00, p. 1-7, 2013.

CLAUZET, M. Conflitos e Soluções no Uso de Recursos Marinhos do Espaço de Pesca Artesanal na Enseada do Mar Virado, Ubatuba/SP. Multiciência, 8, n. C, p. 15–21. 2006.

CLAUZET, M.; RAMIRES, M.; BARRELLA, W. Pesca artesanal e conhecimento local de duas populações caiçaras (Enseada do Mar Virado e Barra do Una) no litoral de São Paulo, Brasil. Multiciência, 4, p. 1–22, 2005.

DELTARES. User Manual Delft3D-RGFGRID. Generation and manipulation of curvilinear grids for Delft3D-FLOW and Delft3d-WAVE. Deltares, Delft, The Netherlands. 128p, 2014.

DUARTE, P.; MENESES, R.; HAWKINS, A. J. S.; ZHU, M.; FANG, J.; GRANT, J. Mathematical modelling to assess the carrying capacity for multi-species culture within coastal waters. Ecol. Model. 168, p.109–143, 2003.

EMÍLSON, I.; GARCIA-OCCHIPINTI, A.; KUTNER, A. S.; MINIUSSI, I. C.; VANNUCCI, M. Levantamento oceanográfico-meteorológico da Enseada do Mar Virado – Ubatuba, Estado de São Paulo. Contribuições avulsas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, série Oceanografia Física.5, p. 26-40, 1963.

ERTÖR, I.; ORTEGA-CERDÀ, M. Political lessons from early warnings: Marine finfish aquaculture conflicts in Europe. Marine Policy, 51, p. 202–210, 2015.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2016.

FAO. The global status of seaweed production, trade and utilization. Globefish research Programme 124, p120, 2018.

FERREIRA, J. G.; HAWKINS, A. J. S.; BRIKER, S. Management of productivity, environmental effects and profitability of shellfish aquaculture — the Farm Aquaculture Resource Management (FARM) model. Aquaculture 264, p.160–174, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry n.226, p.497–507, 1957.

GANESAN, M.; THIRUPPATHI, S.; BHAVANATH, J. Mariculture of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux in South east coast of India. *Aquaculture 256*: p.201-211, 2006.

GIBBS, M.T. Interactions between bivalve shellfish farms and fishery resources. Aquaculture, 240 (1–4): p267 – 296, 2004.

GRASSHOF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. Methods of Seawater Analysis. 3. ed. Verlag Chemie, 1999.

GRASSHOFF, K. Determination of oxygen. *In.* GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. Methods of Seawater Analysis. 2nd ed. Weinheim: Verlag Chemie, p 419. 1983.

GÓMEZ, A.; MILLÁN, J. Cultivo experimental de Gracilaria dentata Agardh y de Gracilariopsis tenuifrons (Bird et Oliveira) (Rhodophyta: Gigartinales) en la isla de Margarita, Venezuela. Ver Biol Mar Ocean 32: p137–144, 1997.

HAINNES, K. C.; WHEELER, P. A.; Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). J. Phycol. 14, p. 319– 324, 1978.

HAYASHI, L.; OLIVEIRA, E. C. BLEICHER-LHONNEUR, G.; BOULENGUER, P.; PEREIRA, R. T. L.; SECKENDORFF, R.; SHIMODA, V. T.; LEFLAMAND, A.; VALLÉE, P.; CRITCHLEY, A. T. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. J Appl Phycol 19: p. 505-511, 2007.

HEISS, E. M.; FULWEILER, R. W. Coastal water column ammonium and nitrite oxidation are decoupled in summer, Estuar. Coast. Shelf S., 178, p.110–119, 2016.

JANSEN, H. M. Bivalve nutrient cycling-nutrient turnover by suspended mussel communities in oligotrophic fjords, PhD-thesis. Wageningen University, The Netherlands. 2012.

KENSLEY, B; PENRITH, M. L. New records of Mytilidae from the northerm south west african coast. Annals of the South African Museum 57: p. 15-24, 1970.

KLAPPENBACH, M.A. Lista preliminar de los Mytilidae brasilefíos con claves para su determinación y notas sobre su distribuicion. An. Acad. Bras. Ciênc. 37, p.327-352, 1964.

KURSAR, T. A; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. Light-harvesting system of the red alga Gracilaria tikvahiae. Plant physiology, 73, 2, p. 361–369, 1983.

LABORATÓRIO DE MOLUSCOS MARINHOS – UFSC. Manual do Produtor de Moluscos Assentamento remoto de larvas de mexilhão. p.24, 2014.

LEE, T. M.; TSAI, P. F.; SHYU, Y. T.; SHEU, F. The effects of phosphite on phosphate starvation responses of *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta), J. Phycol: 41, p. 975–982, 2005.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, n. Supplement 1, p. 1–8, 2001.

LIGNELL, A; PEDERS, M. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of Gracilaria secundata and Gracilaria verrucosa (Rhodophyta). Botanica Marina 32 p, 219-227, 1989.

MAHIQUES, M. M. Dinâmica sedimentar atual nas enseadas da região de Ubatuba, Estado de São Paulo. Boletim do Instituto Oceanográfico, 43, n. 2, p. 111–122, 1995.

MARINHO-SOREANO, E.; NUNES, S. O.; CARNEIRO, M. A.; PEREIRA, D. C. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae Gracilaria birdiae Biomass Bioenergy, 33, p. 327-331, 2009.

MARINHO-SOREANO, E. S.O. Effect of depth on growth and pigment contents of the macroalgae *Gracilaria bursapastoris*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22: p.730-735, 2012.

MARTINS, A. P.; NECCHI JUNIOR, O.; COLEPICOLO, P. YOKOYA, N.; NAIR, S. Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). Rev. bras. farmacogn., 21, p.340-348, 2011.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S-I., LEE, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Anal. Biochem. 339, p.69-72, 2005.

MCGLATHEY, K.J.; PEDERSEN, M. F. The effect of growth irradiance on the coupling of carbon and nitrogen metabolism in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). J. Phycol., 35: p.721-731, 1999.

MENÉNDEZ, M; HERRERA, J; COMÍN, F.A. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O.F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon SCI. MAR., 66 (4): p.355-364, 2002.

MULHOLLAND, M. R.; LOMAS, M. W. Nitrogen uptake and assimilation, In D. G. Capone, D. A. Bronk, M. R. Mulholland, and E. J. Carpenter [eds.], Nitrogen in the marine environment. Academic Press. p. 303–384, 2008.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (Bivalve, Mytilidae). Revista Brasileira de Zoologia,. 14, p. 135–168, 1997.

NEWELL, S. E.; BABBIN, A. R., JAYAKUMAR, D. A.; Ward, B. B. Ammonia oxidation rates and nitrification in the Arabian Sea, Global Biogeochem. Cy., 25 p.4016, 2011.

PESSATTI, M. L.; RESGALLA, J. R. C.; REIS, F, R. W.; KUEHN, J.; SALOMÃO, L. C.; FONTANA, J. D. Variabilidade das taxas de filtração, assimilação e respiração e do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) no mexilhão *Perna perna* sob influência do chumbo. *Braz. J. Biol.*62, , p. 651-656, 2002.

RAGUENEAU, O.; SAVOYE, N.; AMO, Y. D.; COTTON, J.; TARDIVEAU, B.; LEYNAERT, A. A new method for the measurement of biogenic silica in suspended matter of coastal waters: using Si:Al ratios to correct for the mineral interference. *Continental Shelf Research*, 25, p. 697-710, 2005.

RINCONES, E. R.; MORENO, D. A. Technical and economical aspects for the commercial establishment of seaweed mariculture in Colombia: experiences in the Guajira Peninsula. Amb Desarr 15: p.123–144, 2011.

RYTHER, J. H.; CORWIN, N., DEBUSK, T. A.; Williams, L. D. Nitrogen uptake and storage by the red algae *Gracilaria tikvahiae* McLachlan 1979, Aquaculture 26: p.107–115, 1981.

SAWAYA, P. Mitilicultura (*Mytilus perna*) no litoral do estado de São Paulo. Ciênc. Cult, São Paulo, v. 17 p. 312-313, 1965.

SERRA, D. R. Resposta de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales - Rhodophyta) a estímulos de irradiância *in vitro*. Dissertação de mestrado. Programa de Botânica, Universidade de São Paulo, p. 97, 2012.

SHIPIGEL, M.; N. L. RAGG, L.; LAPATSCH, A.; NEORI, A. Protein content determines the nutritional value of the seaweed Ulva lactuca L. for the abalone Haliotis tuberculata L. and H. discus hannai. J. Shellfish Res., 18: p. 227-233, 1999.

SMITH, J. M.; BRZEZINSKI, M. A.; MALACK, J. A.; MILLER, R. J.; REED, D. C. Urea as a source of nitrogen to giant kelp (Macrocystis pyrifera) Limnology and Oceanography letters 00, 2018.

SOLOMON, C. M.; COLLIER, J. L.; BERG, G. M.; GLIBERT, P. M. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: A biochemical and molecular review. Aquat. Microb. Ecol. 59: p.67–88, 2010.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, p293, 1968.

Svendsen I. A. & Putrevu U., 1996, 'Surf-Zone Hydrodynamics', in Advances in Coastal and Ocean Engineering, ed Liu, P. L-F., World Scientific, Singapore, p1-78.

TORRES, P. B.; CHOW, F.; SANTOS, D. Y.; Growth and photosynthetic pigments of Gracilariopsis tenuifrons (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light in vitro culture. Journal of Applied Phycology. 27(3): p.1243-1251, 2015.

TORRES, P. B. Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de Gracilaria de importância econômica, Tese de doutorado, Instituto de Biociências, departamento de botânica, Universidade de São Paulo, 2017.

TRÉGUER, P.; LE CORRE, P. Manuel d"analysis des sels nutritifs dans l"eau de mer. 2ème éd. Brest, Université de Bretagne Occidentale. p.110, 1975.

TROELL, M. JOYCE, A.; CHOPIN, T.; NEORI, A.; BUSCHMANN, A. H.; FANG, J. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. Aquaculture, 297, n. 1–4, p. 1–9, 2009.

TYLER, A. C.; MCGLATHERY, K. J.; MACKO, S. A. Uptake of urea and amino acids by the macroalgae Ulva Lactuca (Chlorophyta) and Gracilaria Vermiculophylla (Rhodophyta). Mar. Ecol. Prog. Ser. 294: p.161–172, 2005.

VAKILY, J. M. The Biology and Culture of Mussels of the Genus *Perna*. ICLARM Stud. Rev. 17: p.63, 1989

WANDERLEY, A. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. p. 140, 2009.

WANG, X.; OLSEN, M. L.; REITAN, K. L.; OLSEN, YNGAVAR. Discharge of nutrient wastes from salmon farms: Environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. Aquaculture Environment Interactions .2(3): p.267–283, 2012.

WESTERMEIER, R.; GÓMEZ I.; RIVERA, P. Suspended farming of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maullín, Chile. *Aquaculture 113*: p215-229, 1993.

WYCHEN, S; VAN LAURENS, L. M. L. Determination of total solids and ash in algal biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL) 303, p .275–3000, 2013.

WOOD, E.D.; ARMSTRONG, F.A.; RICHARDS, F.A. Determination of nitrate in seawater by cadmium-cooper reduction nitrite. Jour. Mar. Biol. Ass. U. K.,47, p. 23-31. 1967.

WEI, O. Y.; WANG, Y. D.; LIN, C. Y.; HE, M. C.; HAO, F. H.; LIU, H. B.; ZHU, W. H. Heavy metal loss from agricultural watershed to aquatic system: a scientometrics review Sci. Total Environ., 637–638, p. 208-220, 2018.

XING, J.; DAVIES, A. M. 'A model study of tidally induced suspended sediment transport in the Iberian shelf region', Estuarine, Coastal and Shelf Science, 58, p. 321-333, 2003.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 1984.

ZHENG, Z. Z.; X. WAN, M. N.; XU, S. S.; HSIAO, Y.; ZHANG, L.; W. ZHENG, Y. WU, W. ZOU, AND S.-J. KAO (2017), Effects of temperature and particles on nitrification in a eutrophic coastal bay in southern China, J. Geophys. Res. Biogeosci, 9 p.122, 2017.

ZUBIA, M.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. – J. Phycol. 26: p. 2001-2010, 2014.