

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**POTENCIAL BIOESTIMULANTE DO EXTRATO AQUOSO DE ALGA (*Sargassum cymosum* C. Agardh) EM MUDAS DE COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)**

**Renata Ferreira Galletti Martinez**

**Brasília – DF**

**Dezembro de 2015**

**RENATA FERREIRA GALLETI MARTINEZ**

**POTENCIAL BIOESTIMULANTE DO EXTRATO AQUOSO DE ALGA (*Sargassum cymosum* C.Agardh) EM MUDAS DE COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)**

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Professor Jader Galba Busato

Co-orientador: Professor Marcelo Maraschin

Colaboradora: Eng. Agrônoma M.Sc. Eva Regina de Oliveira Rodrigues

**Brasília – DF**

**Dezembro de 2015**

**RENATA FERREIRA GALLETTI MARTINEZ**

**POTENCIAL BIOESTIMULANTE DO EXTRATO AQUOSO DA ALGA (*Sargassum cymosum* C. Agardh) EM MUDAS DE COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)**

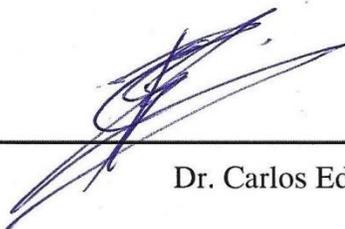
**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Orientador Prof. Dr. Jader Galba Busato

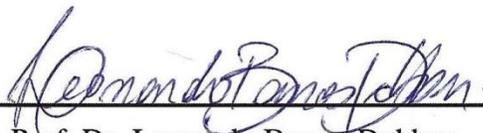
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília



---

Dr. Carlos Eduardo Pacheco Lima

Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq - Embrapa hortaliças)



---

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

**Brasília – DF**

**Dezembro de 2015**

**Folha de aprovação**

**POTENCIAL BIOESTIMULANTE DO EXTRATO AQUOSO DA ALGA (*Sargassum cymosum* C. Agardh) EM MUDAS DE COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)**

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

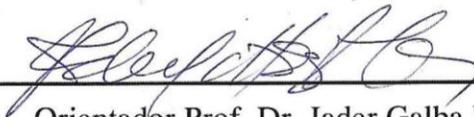
Renata Ferreira Galletti Martinez

Orientador: Jader Galba Busato

Co-orientador: Marcelo Maraschin

**COMISSÃO EXAMINADORA**

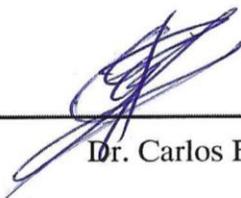
18 de dezembro de 2015



---

Orientador Prof. Dr. Jader Galba Busato

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília



---

Dr. Carlos Eduardo Pacheco Lima

Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH - Embrapa hortaliças)



---

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss (UFVJM)

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à minha musa inspiradora, MÃE, fonte infindável de sabedoria, amorosidade e lucidez.*

*Agradeço ao meu mestre, PAI, pela presença impecável, credibilidade, disposição e auxílio nos momentos essenciais.*

*Agradeço às minhas lindas irmãs Fabíola e Giovanna, por toda ajuda prática e incentivo emocional.*

*Agradeço aos amigos de vida, por existirem em mim todos os dias, e por permitirem que eu exista em vocês.*

*Agradeço à Eva Regina por toda a disponibilidade, dedicação, paciência, por compartilhar comigo seu conhecimento, por tudo que aprendi contigo, e principalmente pelo carinho admirável com que me tratou em todos os momentos.*

*Agradeço ao professor Marcelo Maraschin pelo conhecimento compartilhado, pelas orientações e ajuda necessária, por me abrir as portas do LMBV e junto com isso abrir várias portas e janelas de conhecimentos novos e encantadores.*

*Agradeço ao professor Jader Galba Busato pela orientação e disponibilidade sempre que necessário.*

*Agradeço ao professor Everaldo Pereira por ter sido facilitador na realização deste trabalho, e por ter sido sempre prestativo nas minhas solicitações referentes ao programa de mobilidade acadêmica.*

*Agradeço ao professor Enio Pedrotti por ceder um espaço em seu viveiro para a condução desse experimento.*

*Agradeço a todos os professores que me inspiraram nesse caminho percorrido na graduação. Agradeço a toda equipe do LMBV pela ajuda oferecida sempre com boa vontade e por manterem um ambiente de convivência alegre e agradável.*

*Agradeço a equipe do laboratório de sementes da UFSC, por fornecer o apoio necessário para a condução do experimento, em especial à Marília pelas instruções e ajuda oferecida. Agradeço a Universidade de Brasília e ao programa de mobilidade acadêmica, que possibilitaram a minha experiência em outra instituição federal.*

*Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao funcionário Gilmar Borsoi pela imensa disponibilidade e paciência durante o período em que a UFSC foi minha casa acadêmica.*

*“ Cérebros brilhantes também podem produzir grandes sofrimentos. É preciso educar os corações” Dalai Lama*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Metabolismo vegetal .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Metabolismo primário .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Metabolismo secundário .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.1. Compostos fenólicos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.2. Terpenos .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Couve (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>) .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Uso de bioestimulantes na produção de hortaliças .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.1. Uso de bioestimulantes derivados de algas marinhas na agricultura .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Obtenção do extrato aquoso de <i>Sargassum cymosum</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2. Ensaio I: Germinação de sementes de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> tratadas com extrato aquoso da alga <i>S. cymosum</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Ensaio II: Análises bioquímicas e comprimento do sistema radicular e parte aérea de mudas de <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> submetidas à aplicação foliar do EAA .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.1. Determinação do comprimento do sistema radicular principal e da parte aérea .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3.2. Concentração de açúcares solúveis totais .....</b>	<b>17</b>
<b>4.3.3. Teores de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.4. Concentração de carotenoides .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.5. Conteúdo de compostos fenólicos e de flavonoides totais .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.5.1. Compostos fenólicos totais .....</b>	<b>19</b>

4.3.5.2. Flavonoides.....	20
4.3.6. Potencial antioxidante .....	20
4.3.7. Sólidos solúveis.....	21
4.4. Avaliação estatística .....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
5.1. Percentual de germinação de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> .....	22
5.2. Avaliações da aplicação foliar do extrato aquoso de <i>S. cymosum</i> (EAA).....	26
5.2.1. Métricas do sistema radicular e da parte aérea.....	26
5.2.2. Açúcares solúveis totais.....	28
5.2.3. Teores de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> .....	30
5.2.4. Carotenoides .....	32
5.2.5. Compostos fenólicos e flavonoides .....	33
5.2.6. Potencial antioxidante .....	36
5.2.7. Teor de sólidos solúveis .....	37
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

Martinez, Renata Ferreira Galletti. **Avaliação do potencial bioestimulante do extrato aquoso da alga *Sargassum cymosum* em mudas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*).** 2015. Monografia (Bacharelado em Agronomia). Universidade de Brasília-UnB.

## RESUMO

Bioestimulantes são substâncias que promovem respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas nas plantas. Dentre as substâncias com efeito bioestimulante, as derivadas de algas marinhas têm promovido efeitos positivos sobre diversas culturas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da aplicação foliar de extrato aquoso da alga parda *Sargassum cymosum* (EAA) na germinação, no desenvolvimento e em alguns compostos bioquímicos da cultura da couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). O experimento incluiu dois ensaios, ambos em delineamento inteiramente casualizado. O ensaio I avaliou o efeito do extrato da alga sobre a germinação de sementes (% de germinação e índice de velocidade de germinação – IVG) e no crescimento inicial de plântulas de couve, com dois tratamentos: extrato aquoso de *Sargassum cymosum* a 20% e controle (H<sub>2</sub>O). O ensaio II avaliou o desempenho morfológico e bioquímico das plantas de couve, que receberam aplicações foliares dos tratamentos do extrato de alga nas concentrações de 1%, 5% e 10%, além do controle (H<sub>2</sub>O). Nesse ensaio os seguintes atributos foram analisados: comprimento de raiz e parte aérea, concentração de açúcares solúveis totais, compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, teores de clorofilas *a* e *b*, capacidade antioxidante e o teor de sólidos solúveis. O EAA não provocou efeitos positivos na germinação de sementes, no IVG e no crescimento inicial das plântulas, assim como na concentração de açúcares solúveis totais e no poder antioxidante da couve. No entanto, se mostrou um potente bioestimulante para produção de compostos fenólicos e flavonoides.

**Palavras chave: flavonoides, fenólicos, potencial antioxidante, algas marinhas.**

## ABSTRACT

Bio-stimulants are substances that promote physiological, biochemical and morphological responses in plants. Such effects can be observed when using seaweed treatments in different crops. Among the substances with bio-stimulant effect, those derived from seaweed have promoted positive effects on different cultures. This study's objective is to assess the effects of foliar application of aqueous extract of brown seaweed *Sargassum cymosum* (EAA) in germination, growth, and in some biochemical components of Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Two independent experimental trials were conducted, both in completely randomized design. The first trial evaluated the effect of seaweed extract on seed germination (germination percentage and speed of germination index-SGI) and initial growth of kale seedlings, with two treatments: aqueous extract of *Sargassum cymosum* (20%) and control (H<sub>2</sub>O). The second trial evaluated the physiological performance of kale saplings in the following parameters: root length and shoot, total soluble sugar concentration, starch, phenolic compounds, flavonoids and carotenoids, chlorophyll *a* and *b* content, antioxidant capacity and °Brix of kale saplings that received foliar application of EAA in different treatments: 1%, 5%, 10%, besides the control (H<sub>2</sub>O). Aqueous extract of brown seaweed proved to be a potent bio-stimulant on the production of flavonoids and phenolic compounds. However it did not have positive effects on seed germination, SGI and early seedling growth. Likewise no positive effect was identified in the concentration of total soluble sugar and in the antioxidant activity of kale.

**Keywords: flavonoids, phenolic, antioxidant capacity, seaweed.**

## 1. INTRODUÇÃO

No contexto atual da agricultura é notável o cenário de desequilíbrio ecossistêmico que o uso excessivo de insumos agrícolas associados às práticas de manejo que exaurem os solos tem gerado. Para que a agricultura seja uma atividade que não cause tanto impacto ambiental em âmbito global, várias pesquisas vêm sendo realizadas buscando alternativas com a finalidade de diminuir a quantidade de pesticidas e de fertilizantes utilizados, sem interferir na produtividade. Nos últimos anos, vêm se observando um crescente interesse pelo uso de substâncias bioestimulantes naturais, e dentre a diversidade de fontes dessas substâncias, as algas constituem um grupo que tem apresentado efeitos favoráveis sobre as mais variadas culturas (MATYSIAK et al., 2011).

O uso de extratos de algas marinhas na agricultura tem demonstrado eficiência no controle direto de fitopatógenos, na promoção do crescimento de plantas e na indução de mecanismos de defesa vegetal (DAPPER et al., 2014), potencializando a produção de substâncias que agregam valor nutricional às plantas. A maioria dos produtos comerciais derivados de algas marinhas apresenta em sua formulação extrato de *Ascophyllum nodosum* (DAPPER et al., 2014), uma alga parda com distribuição geográfica restrita à regiões de clima temperado, notadamente no Canadá, França, Islândia, Irlanda, Noruega e Reino Unido (BOZORGI et al., 2012). De outra forma, no litoral brasileiro, é possível encontrar em abundância o gênero de algas pardas *Sargassum*, que é considerado um importante componente da flora marinha com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo (COIMBRA, 2006).

Estudos elucidam a importância ecológica de populações da espécie *S. cymosum* na costa brasileira, e a relevância de outras espécies do gênero *Sargassum* na indústria alimentícia, têxtil,

farmacêutica, ou ainda como fertilizantes em outras regiões do planeta (DUBIASKI-SILVA, 1999; BARROS, 2009; MONTOUCHET, 1979; COIMBRA, 2006). Porém ainda são poucos os estudos com o uso da espécie *S. cymosum* na agricultura. Tendo em vista a presença de compostos químicos considerados bioestimulantes em sua composição (YOKOIAMA & GUIMARÃES, 1975, 1977; ECHAVARRÍA et al., 2009), e sua ampla distribuição geográfica (COIMBRA, 2006), a alga *S. cymosum* se apresenta como uma viável fonte de extratos com efeito bioestimulante sobre os vegetais.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da aplicação do extrato aquoso da alga *Sargassum cymosum* (EAA) sobre a morfologia e fisiologia de mudas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Metabolismo vegetal**

As plantas, assim como outros organismos vivos, desenvolveram evolutivamente estratégias à obtenção da energia necessária às diversas funções biológicas. Todo o processo que envolve a absorção, armazenamento, distribuição e utilização de energia constitui o metabolismo e é realizado através de uma rede de milhares de reações químicas conectadas através de sequências de reações enzimáticas específicas de vias metabólicas inter-relacionadas (MARZZOCO & TORRES, 2007).

No reino vegetal o metabolismo segue duas vertentes: metabolismo primário e secundário. A síntese de moléculas necessárias ao funcionamento das células essenciais à manutenção da vida é o que se denomina metabolismo primário (GARCÍA & CARRIL, 2009). O metabolismo

secundário representa uma interface química entre a planta e o ambiente que a circunda, sendo regulado por fatores extrínsecos e intrínsecos como disponibilidade de água e nutrientes no solo, luz, temperatura, estágio fenológico, constituição genética, relações inter ou intra-específicas, dentre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

### **2.1.1. Metabolismo primário**

Carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos são macromoléculas que fazem parte do metabolismo primário das plantas (GARCÍA & CARRIL, 2009). Como seres autotróficos, as plantas convertem energia solar em energia química dos compostos orgânicos, (e.g. amido e sacarose) produtos do metabolismo primário, sintetizados a partir de duas rotas metabólicas separadas fisicamente (TAIZ & ZEIGER, 2013). São exemplos desses compostos os polissacarídeos e dissacarídeos, duas das classes de carboidratos mais abundantes no reino vegetal (LEHNINGER et al., 2002).

Além de serem fonte de energia para as células, os carboidratos contribuem para o reconhecimento e a sinalização celular, são componentes de tecidos estruturais tais como a celulose e a quitina e constituem a superfície de membrana em formas conjugadas com lipídios e proteínas (POMIN & MOURÃO, 2015). Os açúcares, moléculas mais notórias desse grupo, são historicamente conhecidos como agentes adoçantes, descritos do século XII pelos alquimistas mouros que faziam referência ao açúcar da uva, hoje conhecido como glicose. Porém, sabe-se que não são todos os compostos do grupo dos carboidratos que apresentam essa propriedade edulcorante (POMIN & MOURÃO, 2015).

### **2.1.2. Metabolismo secundário**

Além das macromoléculas produzidas pelo metabolismo primário, compostos de baixa massa molecular são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário (WINK, 2010). Esses são conhecidos por metabólitos secundários e desempenham funções distintas. Muitos delas fazem parte do sistema de defesa das plantas, algumas são voláteis e têm efeito atrativo de polinizadores ou dispersores de sementes, desempenhando papel na reprodução das plantas (VERPOORTE et al., 2002). Outras moléculas atuam na simbiose planta-microrganismo e na competição planta-planta (TAIZ & ZEIGER, 2013), oferecendo à espécie produtora vantagem ecológica. A produção de metabólitos secundários oferece às plantas características agronômicas, nutricionais, farmacêuticas e químicas importantes (VERPOORTE et al., 2002), sendo de grande interesse econômico e científico.

Uma característica dos metabólitos secundários é a sua síntese em pequenas quantidades e sua distribuição não generalizada, ou seja, não são todos os metabólitos que são produzidos por todas as plantas. A sua produção muitas vezes se restringe à determinado gênero de planta, à uma família, ou mesmo à algumas espécies (CARRIL et al., 2009). Os metabólitos secundários se dividem em grupos quimicamente distintos, dois desses grupos são os compostos fenólicos e os terpenos (TAIZ & ZEIGER, 2013).

#### **2.1.2.1. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos compõem um grupo de aproximadamente 10000 compostos heterogêneos, com uma diversidade de funções nos vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2013). Os fenólicos são divididos em dois tipos: os compostos flavonóides e os não flavonóides (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Atualmente, tem-se dado preferência para

alimentos que contenham compostos desse grupo devido ao seu potencial antioxidante. Um antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação (como rancificação em alimentos), estando presente em pequenas concentrações, quando em comparação ao agente oxidante (SILVA et al., 2010).

Na atual preocupação com hábitos de vida saudáveis, a alimentação tem um espaço de grande importância na saúde das pessoas. Estudos epidemiológicos indicam que a alta ingestão de produtos vegetais está associada à redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer (SILVA et al., 2010). Sabe-se que os compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides são classificados, junto com as vitaminas C e E, como os principais antioxidantes nos vegetais por absorverem radicais livres e inibirem a cadeia de iniciação ou interromperem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007).

De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada à sua atividade anti-inflamatória e inibitória da agregação de plaquetas sanguíneas (SILVA et al., 2010).

#### **2.1.2.2. Terpenos**

Outra classe de metabólitos secundários de grande importância e com propriedades exploradas na terapêutica humana é o grupo dos terpenos, com especial atenção aos carotenoides. Os carotenoides são metabólitos responsáveis pela pigmentação entre amarelo e vermelho de tecidos de organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, algas, fungos, bactérias e alguns animais (UENOJO et al., 2007). São responsáveis por captar a energia luminosa e transferi-la à

clorofila, por isso estão presentes em todos os tecidos fotossintéticos (MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2004). Atuam como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas (SILVA et al., 2010).

Os seres humanos não apresentam a capacidade de sintetizar carotenoides, sendo necessária a inclusão de alimentos ricos nesses compostos na dieta. Nesse contexto, é importante considerar que fontes vegetais contêm carotenoides específicos de acordo com sua espécie (NACHTIGALL et al., 2007).

Os carotenoides são compostos polisoprenóides (n átomos de carbono) e podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos que contêm apenas os elementos carbono e hidrogênio (ex.  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e licopeno) em suas estruturas químicas e as xantofilas: derivados oxigenados dos carotenos e que apresentam pelo menos uma função hidroxil, cetona, epóxido, metoxil ou carboxil em suas estruturas (ex. luteína, zeaxantina e astaxantina) (QUIRÓS & COSTA, 2006).

## **2.2. Couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*)**

A couve caracteriza-se por seu alto teor de luteína nos tecidos foliares (NACHTIGALL et al., 2007); um carotenoide do grupo das xantofilas resultante do processo de hidroxilação de  $\beta$ -caroteno (SILVA, et al., 2010). A luteína reduz em 40% a probabilidade de danos à mácula (pequena área da retina responsável pela visão de detalhes) causados pela radiação solar na faixa do azul (DAGNELIE et al., 2000). Indivíduos com mais de 60 anos e reduzida acuidade visual apresentam baixos níveis de luteína e zeaxantina na região macular (YEUM et al., 1995). Em contraste, indivíduos com a mesma idade e elevada densidade daqueles pigmentos maculares apresentam sensibilidade visual similar à de jovens (NACHTIGALL et al., 2007).

A couve é um dos vegetais de consumo comum na culinária brasileira. Comparativamente a outras hortaliças folhosas, a couve manteiga se destaca por seu maior conteúdo de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, vitamina A, niacina e vitamina C (LORENZ & MAYNARD, 1988). É uma planta de temperaturas amenas, com melhor desenvolvimento no outono e inverno, porém, apresenta boa adaptação a climas variados (FILGUEIRA, 1982).

A couve é uma hortaliça que têm aumentado sua visibilidade no mercado como fornecedora de nutrientes aos sucos verdes, também denominados sucos de clorofila, estimados pelo público que se importa com a saúde do corpo. Associado a essa busca pela saúde, surge um mercado emergente diferenciado, que exige produtos orgânicos, os produtores precisam se adequar às exigências dos consumidores e, para isso, fazer o uso de insumos alternativos tanto para adubação quanto para o controle de pragas. Neste contexto, o uso de produtos naturais com ação bioestimulante e/ou de controle de pragas e moléstias é de crescente interesse.

### **2.3. Uso de bioestimulantes na produção de hortaliças**

Bioestimulantes são definidos como substâncias ou materiais (com exceção de nutrientes e pesticidas) que, quando aplicados as plantas, sementes ou em substratos de crescimento, em específicas formulações, tem a capacidade de modificar processos fisiológicos das plantas de uma maneira que proporcionem benefícios potenciais ao crescimento, desenvolvimento e /ou respostas ao estresse (ERTANI et al.,2014).

É importante ressaltar o fato de que os bioestimulantes são produtos naturais e biodegradáveis, considerados escolha racional que pode conduzir a uma agricultura mais sustentável (CAPELA, 2013). Em revisão realizada por Bulgari et al. (2015), foram identificados

alguns compostos comumente presentes em substâncias bioestimulantes: elementos minerais, substâncias húmicas, vitaminas, aminoácidos, quitina, quitosana, poli e oligossacarídeos. Os mesmos autores relatam a presença de quantidades de hormônios nos bioestimulantes, insuficientes para classificá-los como reguladores de crescimento.

Bioestimulantes diferem de fertilizantes por conterem concentrações insignificantes de nutrientes (BULGARI et. al., 2015). São utilizados via aplicação foliar ou no solo, com ação direta sobre metabolismo das plantas ou sobre a microflora do solo, alterando positivamente as condições do mesmo (BULGARI et. al., 2015). Usualmente, são adicionados aos tratamentos com fertilizantes para aprimorar a eficiência e a qualidade dos produtos.

Diversos trabalhos verificaram o efeito da aplicação via solo ou foliar de bioestimulantes em hortaliças, analisando a melhor via de aplicação (BEZERRA et al., 2007; COSTA et al., 2008; JUNGLAUS, 2007; TAVARES et al., 2015; TANAKA et al., 2008; ZODAPE et al., 2011).

Dentre os bioestimulantes mais estudados destacam-se os derivados de ácidos húmicos e de algas marinhas, com diversas fontes e formas de extração (SCHMIDT et al., 2003).

### **2.3.1. Uso de bioestimulantes derivados de algas marinhas na agricultura**

Os biomas marinhos ocupam 70% da biosfera e os organismos presentes nesses locais são importantes fontes de metabólitos bioativos (HOLDT & KRAAN, 2011). Incluídas nesse grupo destacam-se as macroalgas, que são classificadas, de acordo com os pigmentos que possuem, em algas verdes (divisão Chlorophyta), marrons ou pardas (Phaeophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta). Muitas dessas algas são utilizadas como bioestimulantes na agricultura (KHAN et

al., 2009). A produção de plantas aquáticas, com destaque as algas marinhas, atingiu 24.9 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2012).

Os extratos de macroalgas possuem em sua composição macro e micronutrientes, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, citocininas, auxinas e ácido abscísico (ABA) que atuam como promotores do desenvolvimento vegetal (STIRK et al., 2003; LIMBERGER e GHELLER, 2012). Algumas dessas moléculas são polissacarídeos complexos comumente encontrados na parede celular de algas, os quais podem apresentar diferentes formas de atividade biológica, como aumentar as respostas de defesa da planta (PESSATTI & MARASCHIN, 1998).

No Brasil, o uso de produtos a base de extrato de algas na agricultura é regulamentado pelo Decreto nº 4.954 (BRASIL, 2004). Nesse documento, as algas são enquadradas como agente complexante em formulações de adubos foliares e também utilizado na fertirrigação.

A prospecção de estudos relativos ao uso de extratos/frações de macroalgas marinhas com efeitos bioestimulantes sobre espécies de interesse agrônômico nos últimos anos identificou a preferência pela utilização de algas pardas na agricultura (44,7%), com destaque à espécie *Ascophyllum nodosum*, seguidas pelas algas verdes (36,2%, *Ulva* sp.) e pelas algas vermelhas (29,8%) (DAPPER et al., 2014).

Diversos autores relatam a efetividade do uso de produtos comerciais a base da alga *Ascophyllum nodosum* (MORALES-PAYAN et al., 2013; KOYAMA et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; BOZORGI et al.), uma alga típica de regiões temperadas do hemisfério norte. No Canadá, é a alga marinha de maior importância para exploração comercial, sendo uma alga perene dominante ao longo da costa atlântica, onde forma camadas extensas (BOZORGI et al., 2012).

No Brasil é notável a presença do gênero de algas pardas *Sargassum* em todo o litoral. Considerado um importante componente da flora marinha com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo (COIMBRA, 2006), particularmente nas comunidades de costões rochosos de regiões tropicais e temperadas quentes (VELOSO e DE SZCÉCHY, 2008). Constitui um dos mais representativos, dentre os 41 gêneros da ordem Fucales, possuindo um número estimado de 485 espécies (GUIRY, 2001). Uma das espécies encontradas no litoral brasileiro é a *Sargassum cymosum* (AGARDH, 1820) com produção de grandes quantidades de biomassa. Estudos sugerem a utilização dessa alga como um potencial biomarcador de áreas marinhas afetadas pela contaminação de substâncias derivadas de petróleo (DE OLIVEIRA RODRIGUES, 2014), outros estudos elucidam a importância ecológica de populações dessa espécie na costa brasileira (DUBIASKI-SILVA, 1999; BARROS, 2009; MONTOUCHET, 1979), porém são poucos os estudos atuais com uso de *S. cymosum* na agricultura.

Outras espécies do gênero *Sargassum* têm contribuído economicamente na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, ou ainda como fertilizantes em outras regiões do planeta (COIMBRA, 2006), dados que confirmam a relevância de pesquisas com esse gênero de algas.

A composição da espécie *S. cymosum* foi descrita em alguns estudos com variados valores dos compostos bioquímicos: 0,211% de potássio, 0,634% de sódio, 0,063% de fósforo, 14,187% de proteína e valores que variaram conforme a época de coleta de 8,0 – 10,7% de proteínas, 0,18 – 0,78% de fósforo, 10,12 – 29,9% de cinzas, 7,0 – 28,8% de ácido algínico (YOKOYAMA & GUIMARÃES, 1975, 1977). A concentração média de compostos fenólicos totais em *S. cymosum* foi de 0,822 mg g<sup>-1</sup> de extrato (como equivalentes de ác. gálico) (ECHAVARRÍA et al., 2009). Os conteúdos médios encontrados de β-caroteno, vitamina A

(retinol equivalente) e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) nessa mesma alga foram de 6,651, 1,109 e 5,110  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco (DE SOUSA et al.,2008).

Nesse contexto, fica evidente o potencial bioestimulante dos compostos identificados na alga *Sargassum cymosum* encontrada em abundância no litoral brasileiro. Ainda assim, especialmente no âmbito agrônômico, é importante destacar a importância dos estudos quali-quantitativos referentes à magnitude da contribuição dessa alga para mitigar o impacto do uso de agroquímicos na agricultura brasileira.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito bioestimulante da aplicação de extrato aquoso da alga marinha *Sargassum cymosum* (EAA) em sementes e mudas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Determinar o efeito do EAA sobre percentual e velocidade de germinação e os comprimentos da parte aérea e da radícula de plântulas de couve;
- Avaliar os efeitos de concentrações de EAA nas métricas: comprimento de raiz e da parte aérea de mudas de couve;
- Determinar a concentração de açúcares solúveis, fenólicos, flavonoides e carotenoides, bem como poder antioxidante e o teor de sólidos solúveis de mudas de couve tratadas com concentrações do EAA.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Dois ensaios independentes foram conduzidos, em delineamento inteiramente casualizado, com o uso do extrato aquoso da alga *S. cymosum* (EAA) em couve (*B. oleracea* var. *acephala*). O primeiro experimento avaliou os efeitos da aplicação do EAA sobre percentual e velocidade de germinação, comprimento da radícula e da parte aérea das plântulas de couve. O segundo ensaio determinou os efeitos da aplicação foliar do EAA sobre o comprimento das raízes, altura das plantas, concentrações de açúcares solúveis totais, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, teores de clorofilas *a* e *b*, potencial antioxidante e teor de sólidos solúveis. No experimento I para as métricas comprimento de radícula e da parte aérea foram avaliadas 23 plântulas por tratamento. No experimento II, para o comprimento de raiz e da parte aérea foram avaliadas 25 plantas por tratamento, e para as demais análises, 4 repetições.

### 4.1. Obtenção do extrato aquoso de *Sargassum cymosum*

Espécimes da alga parda *S. cymosum* (Figura 1) foram coletados na praia da Armação, localizada na cidade de Florianópolis, Estado de Santa Catarina, entre os meses de maio e junho do ano de 2014. O material coletado foi acondicionado em caixas com água do mar e imediatamente transportado ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - LMBV-UFSC).

Inicialmente impurezas e epibiontes foram manualmente removidos das amostras coletadas, seguido de dessalinização com formiato de amônio ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e secagem da biomassa ( $45^\circ\text{C}$ , estufa com ventilação, peso constante). A partir do material desidratado e moído

(micro moinho tipo Willye TE-648, TECNAL), preparou-se uma solução estoque de extrato, a partir de uma relação de 120 g da alga desidratada L<sup>-1</sup> de água destilada (12%). O material permaneceu incubado em banho-maria à 70°C, por 1 h (KUMAR & SAHOO, 2011), recuperando-se o sobrenadante por filtração, i.e., a solução foi duplamente filtrada em papel filtro e triplamente filtrada sob vácuo em suporte de filtro whatman nº 40. O extrato filtrado foi armazenado ao abrigo da luz, à - 20 °C.

Para uso neste trabalho, uma solução com concentração de 20% da solução estoque inicial foi utilizada para o teste de germinação de sementes de couve. Soluções de tratamento com concentrações de 1%, 5% e 10% (v/v) da solução estoque inicial foram utilizadas em aplicações foliares para os testes métricos (comprimento de raiz e parte aérea) e bioquímicos (concentrações de açúcares solúveis totais, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, teores de clorofilas *a* e *b*, potencial antioxidante e teores de sólidos solúveis totais).



**Figura 1** - *Sargassum cymosum*. Foto: Eva Regina Oliveira.

#### **4.2. Ensaio I: Germinação de sementes de *Brassica oleracea* var. *acephala* tratadas com extrato aquoso da alga *S. cymosum***

Foi realizado utilizando-se sementes da cultivar couve manteiga da Geórgia (ISLA, lote 32259-S2, germinação 86%) obtidas no comércio especializado. De acordo com as regras para análise de sementes (Brasil, 1992) à realização de testes de germinação, o teste teve duração de 10 dias e foi realizado em sala de crescimento do LMB-UFSC, à 25°C e fotoperíodo 16 h. Foram utilizados recipientes de germinação do tipo “gerbox” (Figura 2), contendo 100 sementes para cada recipiente, totalizando 200 sementes por tratamento, que consistiram em germinação em H<sub>2</sub>O deionizada (controle) e germinação em EAA a 20% de concentração. As sementes foram semeadas sobre papel germiteste umedecido com volume equivalente à 2,5 vezes o peso do papel seco, dispostos em gerbox (Figura 2). A assepsia das sementes consistiu na imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio (comercial) a 4%.

A avaliação visual da germinação foi realizada diariamente para realização do cálculo de índice de velocidade de germinação (IVG), tendo como parâmetro de germinação a emissão de radícula com 1 mm de comprimento. No décimo dia, foram coletados os resultados finais de germinação de toda a população, com contagem de sementes que emitiram radículas e sementes que emitiram cotilédones, totalizando 200 observações por tratamento. Para a análise das condições métricas das plântulas de couve foram avaliadas 23 plântulas em cada duplicata para determinação do comprimento de radícula e de parte aérea (Figura 5). Nas avaliações da porcentagem de germinação e IVG a população inteira foi avaliada.

O índice de velocidade de germinação foi obtido pelo somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962):

$$IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + (G3 / N3) + \dots + (Gn / Nn), \text{ onde:}$$

- IVG = índice de velocidade de germinação,
- G1, G2, G3, ..., Gn = número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem,
- N1, N2, N3, ..., Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

#### **4.3. Ensaio II: Análises bioquímicas e comprimento do sistema radicular e parte aérea de mudas de *B. oleracea* var. *acephala* submetidas à aplicação foliar do EAA**

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, utilizando mudas de couve com aproximadamente 20 dias propagadas por semente que foram adquiridas de um produtor comercial de hortaliças. Quatro dias após realizou-se o transplante das mudas de bandejas com 200 células (aproximadamente 12 cm<sup>3</sup>/célula) para bandejas de 128 células (aproximadamente 25 cm<sup>3</sup>/célula). As bandejas foram previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio à 10% seguido de lavagem em água deionizada e exposição à luz UVC (20 min, câmara de fluxo laminar). As células foram então preenchidas com terra preta adquirida em floricultura, totalizando 88 mudas transplantadas para cada tratamento e 352 observações para todo o experimento (88 mudas x 4 tratamentos).

As mudas foram submetidas a aplicações foliares do EAA em concentrações de 1%, 5% e 10%, e para o controle H<sub>2</sub>O deionizada, utilizando-se borrifador manual, até o ponto de

gotejamento. Ao todo, foram realizadas quatro aplicações de 50 mL de cada solução (quantidade suficiente para cobrir a superfície foliar, sem gotejar), totalizando 200 mL finais aplicados. As aplicações foram realizadas 6, 18, 24 e 36 dias após o transplante das mudas. Após a última aplicação, as mudas permaneceram 6 dias sob ação dos tratamentos, e então colhidas aos 42 dias.

O experimento foi realizado entre os meses de maio e julho de 2015, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC (27°50'S 48°25'W), sendo conduzido em viveiro com sombreamento de 50%, utilizando-se canteiros de concreto como suporte para as bandejas. O sistema de irrigação utilizado baseia-se na simulação da evapotranspiração, a partir da perda de água pelo substrato e planta, o que provoca uma mudança em sua massa que aciona o conjunto de irrigação automaticamente. É um sistema elaborado especificamente para esse viveiro, sem referências previamente descritas.

As análises se iniciaram no 6<sup>o</sup> dia após a última aplicação do EAA, sendo determinados o comprimento do sistema radicular principal e da parte aérea, as concentrações de açúcares solúveis totais, os teores de clorofilas *a* e *b*, a concentração total de carotenoides, de compostos fenólicos e de flavonoides, a atividade antioxidante total e o teor de sólidos solúveis no tecido foliar.

#### **4.3.1. Determinação do comprimento do sistema radicular principal e da parte aérea**

Ao término do período experimental, 25 plantas/tratamento foram coletadas aleatoriamente e submetidas à lavagem em água corrente para eliminar o substrato aderido ao sistema radicular. Dessas plantas, obtiveram-se as medidas métricas do sistema radicular

principal, desconsiderando raízes adventícias, e da parte aérea, com o auxílio de um paquímetro universal com escala milimétrica.

#### **4.3.2. Concentração de açúcares solúveis totais**

A análise dos conteúdos de açúcares solúveis totais utilizou protocolo adaptado da metodologia proposta por Shannon (1968).

Para as determinações, inicialmente 60 mg da biomassa de couve fresca foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, 2 mL de solução MCW (metanol: clorofórmio: H<sub>2</sub>O - 12:5:3, v/v/v) foram adicionados à biomassa macerada, seguido de centrifugação (10 min, 4000 rpm). O sobrenadante foi coletado por aspiração com micropipeta e do precipitado obtido após centrifugação procedeu-se uma segunda extração com a adição de 2 mL de MCW seguida por outra centrifugação (10 min, 4000 rpm). Utilizou-se os sobrenadantes da extração para as análises de açúcares solúveis totais.

Os sobrenadantes da primeira e segunda extrações foram reunidos e o volume final ajustado para 4 mL com MCW. A 1 mL deste extrato adicionou-se 3 mL de MCW, 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de H<sub>2</sub>O, seguido de centrifugação (5 min, 4000 rpm), resultando em uma fração solúvel e outra precipitada. Uma alíquota de 1 mL da fase aquosa foi recuperada e adicionada de 2 mL de antrona 0,2% (m/v, 200 mg antrona diluídos em 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95% - v/v). O material foi agitado (vórtex), aquecido (100°C, 3 min) em banho-maria, resfriado à temperatura ambiente, procedendo-se à leitura das absorvâncias das amostras (630 nm) em espectrofotômetro Instrutherm mod. UV 2000 A (Umbreit & Burris, 1964). A quantificação dos açúcares solúveis totais baseou-se em curva padrão de glucose (Sigma Chemical Company,

Oakville, ON, Canada) (10 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $r^2= 0,99$ ;  $y = 0,014x$ ), sendo os resultados expressos como equivalente em glucose (mg glucose  $\text{g}^{-1}$  massa fresca).

#### **4.3.3. Teores de clorofilas *a* e *b***

Para a extração e posterior quantificação das clorofilas *a* e *b*, 100 mg de biomassa das folhas (estabeleceu-se a segunda folha mais nova da planta como padrão às análises) da couve permaneceram 2 h em banho-maria, à 65°C, em 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). O extrato foi coletado e completado para 10 mL com aquele reagente, procedendo-se à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro Bel SPECTRO LGS53, na janela espectral de 480 a 670 nm. Para determinação dos conteúdos de clorofilas *a* e *b*, os valores de absorvâncias em 649 nm e 665 nm foram aplicados às equações (protocolo adaptado de JEFFREY et al., 1975):

$$\text{- Clorofila } a: (12,19 \times A_{665\text{nm}}) - (3,45 \times A_{649\text{nm}})$$

$$\text{- Clorofila } b: (21,99 \times A_{649\text{nm}}) - (5,32 \times A_{665\text{nm}})$$

#### **4.3.4. Concentração de carotenoides**

A análise da concentração de carotenoides nas amostras seguiu os procedimentos descritos por Kuhnen (2009), com adaptações. À 1 g de amostra fresca de couve triturada em N<sub>2</sub> líquido, adicionou-se 10 mL de metanol seguido de incubação ao abrigo de luz por 1 h e centrifugação (4000 rpm, 5 min). O sobrenadante foi recolhido e as leituras das concentrações de carotenoides realizadas registrando-se em espectrofotômetro Bel SPECTRO LGS53 as absorvâncias no comprimento de onda de 450 nm. Determinaram-se os valores de concentração total de carotenoides utilizando-se a curva padrão de  $\beta$ -caroteno (Sigma Chemical Company,

Oakville, ON, Canada) ( $25$  a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $r^2= 0,99$ ;  $y= 0,005x$ ). Os resultados foram expressos como equivalente em  $\beta$ -caroteno ( $\text{mg } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$  massa fresca).

#### **4.3.5. Conteúdo de compostos fenólicos e de flavonoides totais**

Para extração e quantificação de fenólicos e de flavonoides,  $10 \text{ mL}$  de MEOH  $80\%$  (v/v) foram adicionados a  $1\text{g}$  de biomassa foliar fresca de couve macerada em  $\text{N}_2$  líquido, seguido por incubação à temperatura ambiente por  $1 \text{ h}$ , ao abrigo da luz e centrifugação ( $5 \text{ min}$ ,  $4000 \text{ rpm}$ ). O sobrenadante foi recolhido e armazenamento à  $-80^\circ\text{C}$ , para posteriores análises.

##### **4.3.5.1. Compostos fenólicos totais**

Em  $300 \mu\text{L}$  do extrato obtido em MEOH  $80\%$  foram acrescentados  $225 \mu\text{L}$  do reativo de Follin Ciocalteau e  $2475 \mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $2\%$  (v/v). Após repouso de  $1 \text{ h}$  ao abrigo da luz, leu-se a absorbância ( $750 \text{ nm}$ ) em espectrofotômetro Instrutherm mod. UV 2000 A (RANDHIR et al., 2004). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (Sigma Chemical Company, Oakville, ON, Canada) ( $5$  a  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $r^2= 0,99$ ;  $y= 0,0102x$ ) e os resultados expressos em equivalente em ácido gálico ( $\text{mg } \text{ác. gálico g}^{-1}$  massa fresca).

#### 4.3.5.2. Flavonoides

Para a determinação do conteúdo total de flavonoides, uma alíquota (500 µL) do extrato MEOH 80% foi acrescida de 2,5 mL de Etanol e 500 µL de AlCl<sub>3</sub> à 2% em metanol (m/v), seguida de agitação em vórtex e incubação por 1 h ao abrigo da luz. O meio de reação teve sua absorbância (420 nm) determinada em espectrofotômetro Bel SPECTRO LGS53, conforme protocolo adaptado de Zacarias et al. (2007). A quantificação dos flavonoides foi baseada na curva padrão de quercetina (Sigma Chemical Company, Oakville, ON, Canada) (10 a 200 µg mL<sup>-1</sup>,  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,0108x$ ) e os resultados expressos em equivalente em quercitina (mg quercitina g<sup>-1</sup> massa fresca).

#### 4.3.6. Potencial antioxidante

A determinação do potencial antioxidante dos extratos foliares das amostras foi realizada pelo método DPPH (modificado de Kim et al., 2002), que se baseia na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie de radical, o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que possui cor púrpura, é reduzido formando a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO et al., 2011).

Nesta determinação, preparou-se uma solução com 0,0079 g de DPPH diluídos em 2,5 mL de MEOH (v/v), seguidos por 10 min de agitação (em agitador). Uma alíquota (500 µL) desse material recebeu 49,5 mL de MEOH 80%, seguidos de agitação manual, formando a solução de DPPH diluído. O preparo do extrato amostral seguiu o mesmo protocolo utilizado às análises de compostos fenólicos e flavonoides totais. Para a leitura da absorbância (530 nm - Instrutherm

mod. UV 2000 A), 0,1 mL de extrato amostral foi adicionado de 2,9 mL da solução de DPPH diluído, seguido de incubação ao abrigo de luz por 30 min. A amostra nomeada “branco” continha apenas a solução de DPPH diluída e o valor de sua leitura foi utilizado na equação abaixo para determinar o valor: % de atividade inibitória da oxidação das amostras:

$$\% \text{ de INIBIÇÃO: } [(Abs \text{ “branco”} - Abs \text{ final da amostra}) / Abs \text{ “branco”}] \times 100$$

#### **4.3.7. Sólidos solúveis**

Coletaram-se aleatoriamente 12 folhas (segunda folha da planta) por tratamento, as quais foram maceradas em cadinhos de porcelana com pistilos, cobertas com papel filme e incubadas em estufa (40 °C) por 1 h. O extrato foi recuperado por aspiração com micropipeta e a biomassa residual foi novamente extraída. Os extratos obtidos foram reunidos, centrifugado (4000 rpm, 10 min) e o sobrenadante utilizado à leitura do teor de sólidos solúveis (°Brix), em refratômetro óptico portátil ATC (Automatic Temperature Compensation, modelo RZ- 113), com capacidade de leitura de 0 a 32%.

#### **4.4. Avaliação estatística**

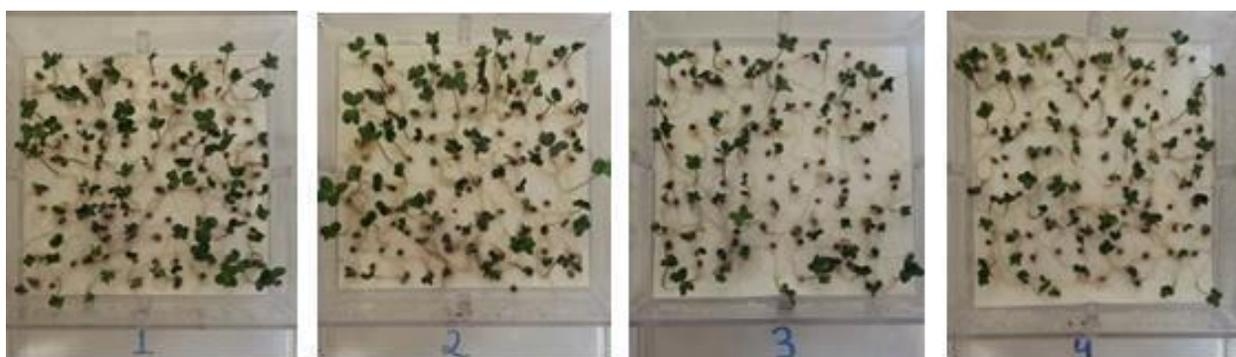
Os dados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk test) e a homogeneidade das variâncias foi verificada (Levene tests) à significância de 5%. Para as métricas de comprimento da parte aérea e radícula (ensaio I) foi realizado o teste T-student ( $p < 0,05$ ), empregado quando se avalia diferença de dois grupos independentes (ZUBIA et al., 2008). Os dados do ensaio II (comprimento de raiz e parte aérea, concentrações de açúcares solúveis totais, compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, teores de clorofilas *a* e *b* e potencial antioxidante) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias foi realizado o teste

Tukey com nível de probabilidade de 95% ( $p < 0.05$ ). Os dados de teor de sólidos solúveis não passaram nos testes de normalidade e homogeneidade e foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As análises de variância foram realizadas com o programa estatístico SAS versão 9.2.

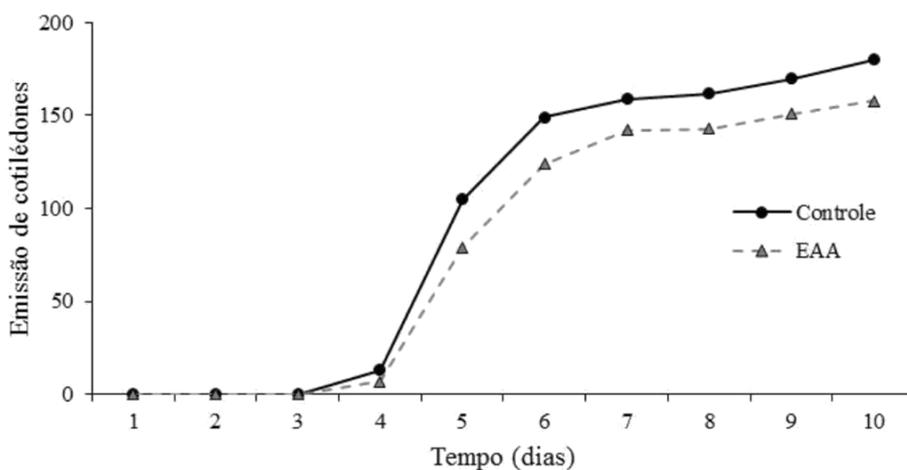
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Percentual de germinação de *Brassica oleracea* var. *acephala*

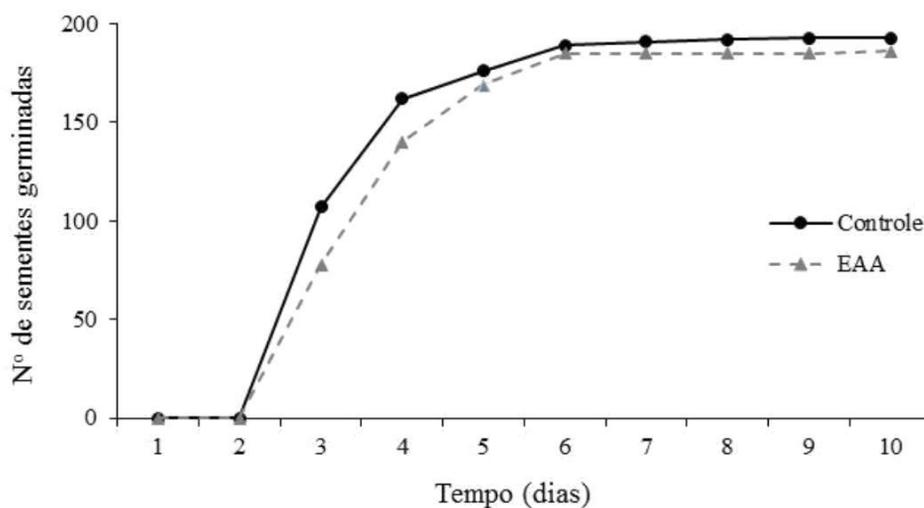
Ao final dos 10 dias do teste de germinação, o tratamento controle apresentou maior porcentagem de sementes germinadas (96,5% de emissão de radícula; 87,5% de emissão de plúmulas) em relação ao tratamento com EAA 20 % (93% emissão de radículas; 79% emissão de plúmulas), conforme apresentado nas Figuras 2, 3 e 4. A aparência da população de sementes germinadas também diferiu entre os tratamentos, com plântulas aparentemente mais vigorosas no tratamento controle (Figura 2 e 5).



**Figura 2** - Plântulas de couve manteiga da Geórgia (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Oitavo dia do teste de germinação. Cada número representando 1 gerbox (G): G1 e G2 com H<sub>2</sub>O ; G3 e G4 com extrato aquoso de *S. cymosum* a 20%.



**Figura 3** - Tempo de emissão de cotilédones de sementes de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) em substratos umedecidos com H<sub>2</sub>O (Controle) ou em extrato aquoso de *S. cymosum* (EAA -20%).



**Figura 4** - Tempo de germinação de sementes de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) em substrato umedecido com H<sub>2</sub>O (Controle) ou com extrato aquoso de *S. cymosum* (EAA). A avaliação da emissão de radículas considerou o interregno de 10 dias após o início do experimento. O início da germinação foi considerado quando da emissão de radículas a 1 mm.

Em todos os testes realizados nesta etapa, o desempenho do tratamento controle foi superior ao EAA (Figuras 3 e 4; Tabela 1), sugerindo a presença de algum fator de inibição no extrato de alga.

Experimentos realizados com semente de alface constataram que a presença de compostos fenólicos pode provocar a inibição da germinação e do crescimento da raiz primária (TOKUHISA et al., 2007). Sabe-se que a alga *S. cymosum* apresenta elevado teor de compostos fenólicos (DE SOUSA et al., 2008), fato que pode ter afetado negativamente a germinação das sementes submetidas a substratos umedecidos com EAA, resultando no menor desempenho das sementes.

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o comprimento da parte aérea também foram superiores estatisticamente no tratamento controle em relação ao tratamento com EAA (Tabela 1), enquanto o comprimento das radículas não diferiu entre os tratamentos. Hernández-Herrera et al. (2014) observaram em testes com sementes de tomate que a redução na germinação e crescimento de plúmulas e radículas em tratamentos de extrato aquoso de algas marinhas podem estar associados à elevada salinidade dos extratos.

O contraste entre os resultados estimulantes e inibitórios de germinação e desenvolvimento com a aplicação de extratos de algas marinhas pode também ser explicado parcialmente pelo tipo de extração a que o material é submetido. Nesse trabalho, utilizou-se extração aquosa da alga, enquanto, Craige (2010) relatou que extratos obtidos com soluções alcalinas resultam em maior potencial estimulante da germinação. O mesmo autor verificou que soluções não alcalinas podem conter maior quantidade de substâncias inibitórias da germinação (CRAIGE, 2010).

Baseado no princípio de que lotes de semente que possuem maior velocidade de germinação e que produzem indivíduos mais vigorosos são relevantes à sobrevivência da população (Oliveira et al., 2009), pode-se sugerir que o tratamento com o EAA a 20% reduziu o vigor do lote de sementes de couve.

**Tabela 1** - Índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento da parte aérea e radicular de plântulas de couve (*B. oleracea* var. *acephala*) tratadas com o EAA a 20%.

Variável	Controle	EAA
IVG	27,45	25,03
Comprimento da parte aérea (mm)	11,58 (5,11) A	8,88 (2,70) B
Comprimento da radícula (mm)	61,42 (28,43) A	48,21 (20,30) A
Porcentagem de germinação	96,5	93

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste *t*-student ( $P < 0.05$ ). Médias de comprimento de radículas não diferiram significativamente (ANOVA). Números entre parênteses representam o desvio-padrão.



**Figura 5** - Detalhe do fenótipo de plântulas de couve (*B. oleracea* var. *acephala*), semeadas em substrato umedecido com H<sub>2</sub>O, 10 dias após a semeadura.

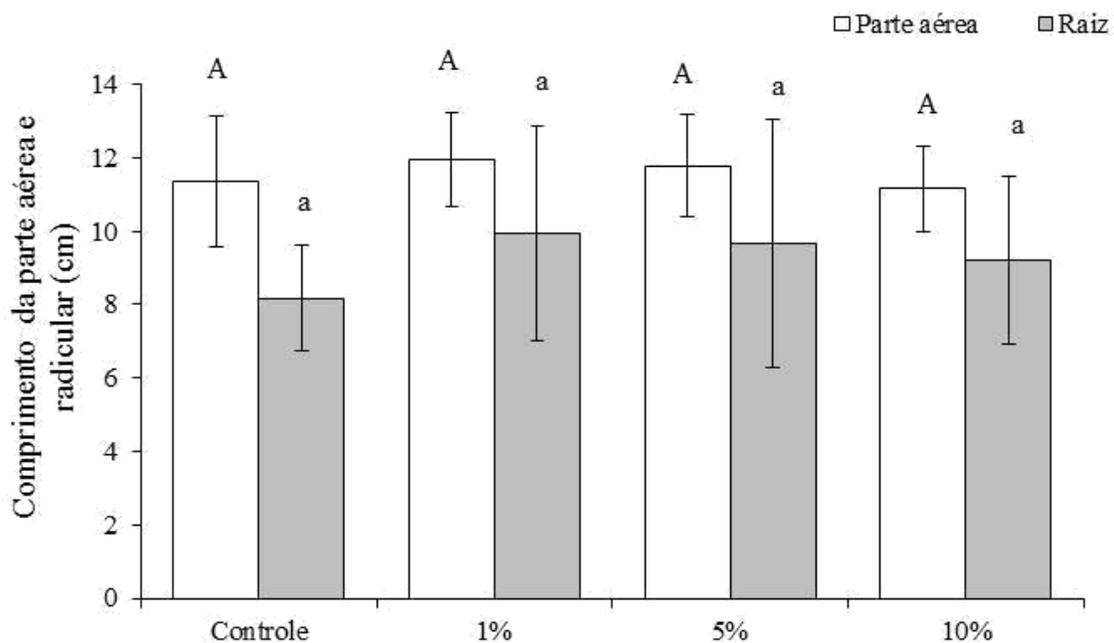
## **5.2. Avaliações da aplicação foliar do extrato aquoso de *S. cymosum* (EAA)**

### **5.2.1. Métricas do sistema radicular e da parte aérea**

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos valores médios de comprimento do sistema radicular principal e altura da parte aérea, que variaram de 8,18 ( $\pm 1,45$ ) à 9,94 ( $\pm 2,95$ ) cm e de 11,16 ( $\pm 1,17$ ) à 11,95 ( $\pm 1,29$ ) cm, respectivamente (Figura 6), com as diferentes concentrações do EAA. Plantas pulverizadas com produtos a base de *A. nodosum* costumam apresentar aumento da atividade da nitrato redutase, uma enzima do metabolismo do nitrogênio, estimulando o crescimento de plantas em condições adversas, principalmente em deficiência de nitrogênio (DURAND et al., 2003). No entanto, esse fenômeno não foi avaliado no presente estudo, e até o momento da

avaliação, 66 dias após o plantio, não foram observados efeitos do EAA no crescimento das plantas.

Esse resultado assemelha-se ao observado com a utilização de extrato de alga marinha *A. nodosum* em couve, o qual não observou-se incremento no comprimento do sistema radicular e da parte aérea de populações que receberam aplicações do extrato (0; 2; 4; 6 mL L<sup>-1</sup> da solução) aos 6, 12 e 18 dias após a semeadura, e foram avaliadas no 23<sup>o</sup> dia (Silva et al., 2012). Porém, os resultados aqui apresentados, e os resultados do presente estudo, diferem dos obtidos por Carvalho et al. (2014), que detectaram incremento significativo na altura de plantas de trigo irrigadas com extrato da mesma alga *A. nodosum* (5 mL L<sup>-1</sup>) aos 14, 28 e 42 dias após a semeadura, e foram avaliadas semanalmente, de 30 à 51 dias após semeadura. Esses resultados indicam que o efeito estimulante de extratos de macroalgas marinhas pode ser um fenômeno espécie-específica, ou as concentrações de EAA utilizadas não foram adequadas para o estímulo desse atributo analisado.



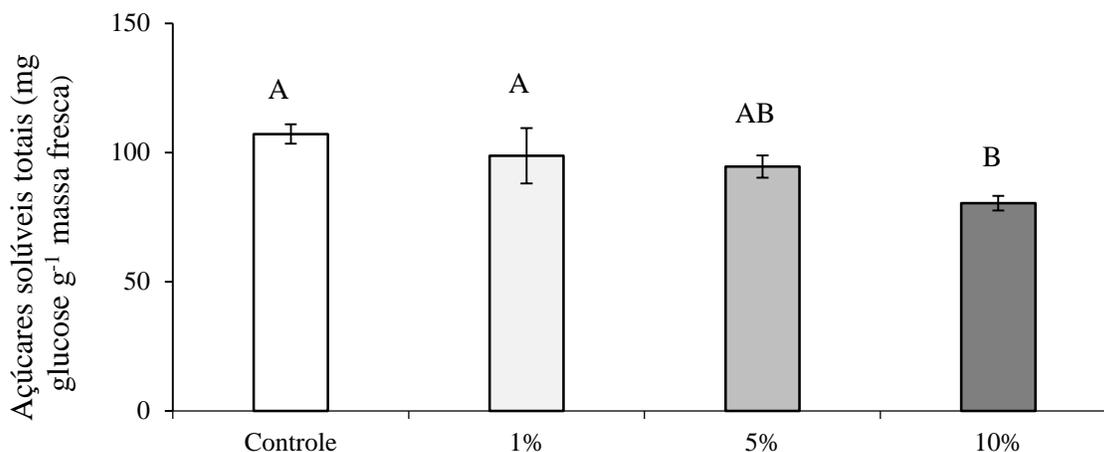
**Figura 6** - Comprimento do sistema radicular principal e da parte aérea de plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) consonante aos tratamentos com EAA. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras maiúsculas comparam o comprimento da parte aérea nas diferentes doses de EAA e as minúsculas comparam o comprimento do sistema radicular pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.2.2. Açúcares solúveis totais

Os resultados das análises de concentração de açúcares solúveis totais nas folhas das plantas de couve nos diferentes tratamentos estão apresentados na Figura 7. Houve decréscimo nos teores de açúcares com o aumento da concentração do EAA. Os teores de açúcar nas plantas sob adição de EAA a 10% foram inferiores ao controle e à 1% de concentração, indicando que a alga pode estar inibindo o acúmulo de açúcares solúveis nesse estágio de desenvolvimento das mudas. No entanto, Kalaivanan et al. (2012) utilizando-se grãos de feijão-preto (*Vigna mungo*), observaram que a aplicação de extrato da alga *Caulerpa scalpelliformis* a 10% aumentou o teor de açúcares totais em relação ao controle e

a concentrações de até 5% de extrato. Os autores sugeriram que esse aumento foi estimulado pela absorção de elementos essenciais (Ca, Na, K, Mg, N e Zn) presentes no extrato da alga em questão.

Sabe-se que alguns compostos presentes nos extratos de algas marinhas tem efeito indutor de resistência sobre as plantas (STADNIK et al., 2014), o que provoca uma cadeia de reações bioquímicas, dentre elas uma elevação na atividade respiratória (CARNELOSSI, 2000), promovendo um decréscimo nas reservas energéticas do tecido, visto que, açúcares, são os principais substratos utilizados na respiração. Como foi observado um acréscimo nas concentrações de compostos fenólicos nos tecidos foliares analisados no presente experimento (Figura 11), e esses compostos estão envolvidos no sistema de defesa das plantas (STADNIK et al., 2014), sugere-se que pode ter ocorrido algum tipo de efeito indutor de resistência do EAA sobre as folhas de couve, o que pode ter aumentado o consumo de açúcares nesse tecido, e provocado esse efeito decrescente nas concentrações (Figura 7).

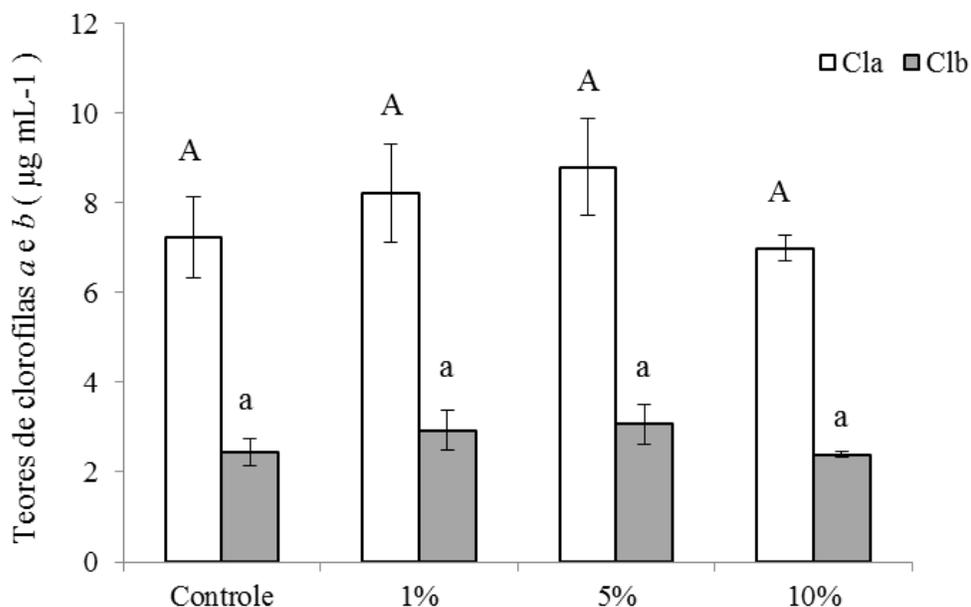


**Figura 7** - Teores de açúcares solúveis totais em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S. cymosum* (0% - controle, 1%, 5% e 10%). Barra vertical referente ao desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.2.3. Teores de clorofilas *a* e *b*

Os resultados das análises quantitativas das clorofilas *a* e *b* nas folhas das plantas de couve submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de EAA estão apresentados na Figura 8. Não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de clorofilas *a* e *b* para os tratamentos avaliados. Resultados similares foram encontrados por Koyama et al. (2012) na cultura de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), em que a aplicação via foliar de concentrações distintas do extrato da alga *Ascophyllum nodosum* (3 e 5 mL L<sup>-1</sup>) não interferiram no teor de clorofila das folhas, houve diferença apenas com relação à época de avaliação, apresentando um aumento no teor de clorofila a medida que as plantas foram se desenvolvendo. Em contraposição,

Morales-Payan (2013) registrou elevação nos teores de clorofila em folhas de mangueiras (*Mangifera indica*) que receberam distintas concentrações do extrato da alga *Ascophyllum nodosum* (1, 2, 3, 4 e 5 mL L<sup>-1</sup>) via solo, o aumento na concentração do extrato promoveu um correspondente aumento nos teores de clorofila, resultado relacionado à presença de betaína no extrato da alga, uma substância que aumenta a tolerância da planta ao estresse e tem efeito semelhante ao de citocininas (VERNIERI et al., 2006). Além disso, extratos de alga adicionados ao solo têm mostrado uma redução da lixiviação e um aumento da disponibilidade de nitrogênio para as plantas (LEACH et al., 1999), mineral que favorece o aumento no conteúdo de clorofila nas folhas (VIANA & KIEHL, 2010). Sugerindo-se que aplicações via solo podem ser uma alternativa viável para o aumento na produção de clorofilas, em comparação com aplicação via foliar, utilizada nesse experimento.

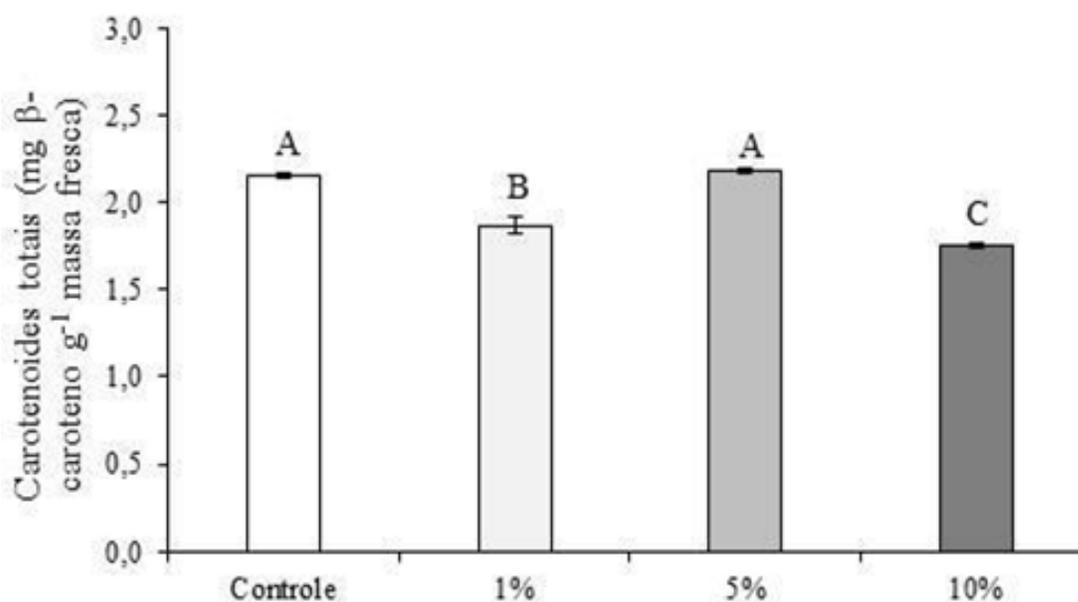


**Figura 8** - Teores de clorofilas *a* (Cla) e *b* (Clb) em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S. cymosum* (0% - controle, 1%, 5% e 10%). Médias seguidas pela mesma letra acima dos pontos não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.4. Carotenoides

Carotenoides variaram de 1,76 à 2,16 mg  $\beta$ -caroteno g<sup>-1</sup> massa fresca, diferindo em função do tratamento (Figura 9). A aplicação de EAA a 10% reduziu o teor daqueles pigmentos, comparativamente aos demais tratamentos. Com relação às médias do controle, essa redução foi de 18,5%. De outra forma, a aplicação de EAA a 1% resultou em concentração de carotenoides superior ao observado no tratamento com EAA a 10%, porém inferior aos demais tratamentos.

Em estudo similar realizado com a aplicação do extrato aquoso da alga *Sargassum polysystem* em feijão guandu (*Cajanus cajan*) constatou-se aumento de concentração de carotenoides nas sementes com o EAA a 0,5%, porém redução para maiores concentrações do EAA, e.g., 1,5% (ERULAN et al., 2009). Em outro experimento com análise da concentração de carotenoides em feijão-preto (*Vinga mungo*) submetido à aplicação de extrato de *Sargassum myriocystum* em concentrações mais elevadas, a concentração de 10% teve o melhor resultado, e concentrações superiores a 25% promoveram um decréscimo progressivo de valores (KALAIVANAN et al., 2012). Esses resultados sugerem que os tecidos foliares e as sementes apresentam alguma sensibilidade com relação à concentração do extrato aplicado, podendo explicar os valores encontrados no presente trabalho.



**Figura 9** - Concentrações de carotenoides totais em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S. cymosum* (0% - controle, 1%, 5% e 10%). Barra vertical referente ao desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

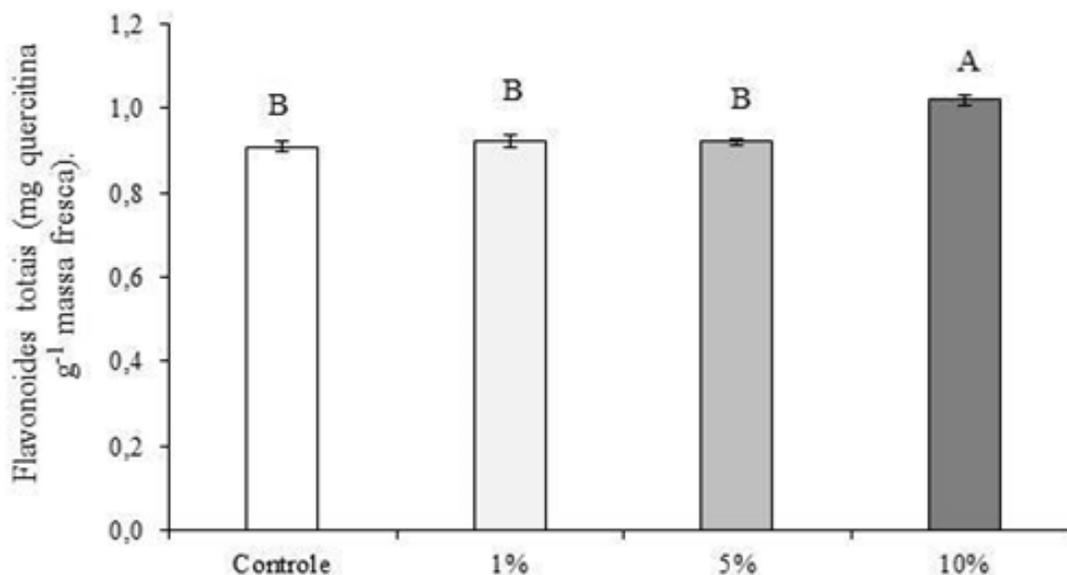
### 5.2.5. Compostos fenólicos e flavonoides

Os resultados para os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. As amostras tratadas com EAA na concentração de 10% apresentaram as maiores concentrações de flavonoides e de compostos fenólicos. Os demais tratamentos não diferiram entre si. Observa-se que, em relação ao tratamento controle, a utilização do EAA a 10% proporcionou aumento de até 11% e 13% na produção de flavonoides e fenólicos totais, respectivamente. Tomados em conjunto os resultados de fenólicos e flavonoides observa-se que este último representa em média 45% dos fenólicos,

variando de 44 a 48% nesse experimento (Figuras 11 e 12). Esses resultados apontam para a necessidade de maiores estudos com testes de concentrações superiores a 10% do EAA, para se verificar o padrão de resposta da planta de couve quanto às alterações na produção de fenólicos totais e flavonoides, e ainda conferir se altas concentrações do EAA colocam a planta em uma condição de estresse que estimula a produção desses compostos referidos anteriormente.

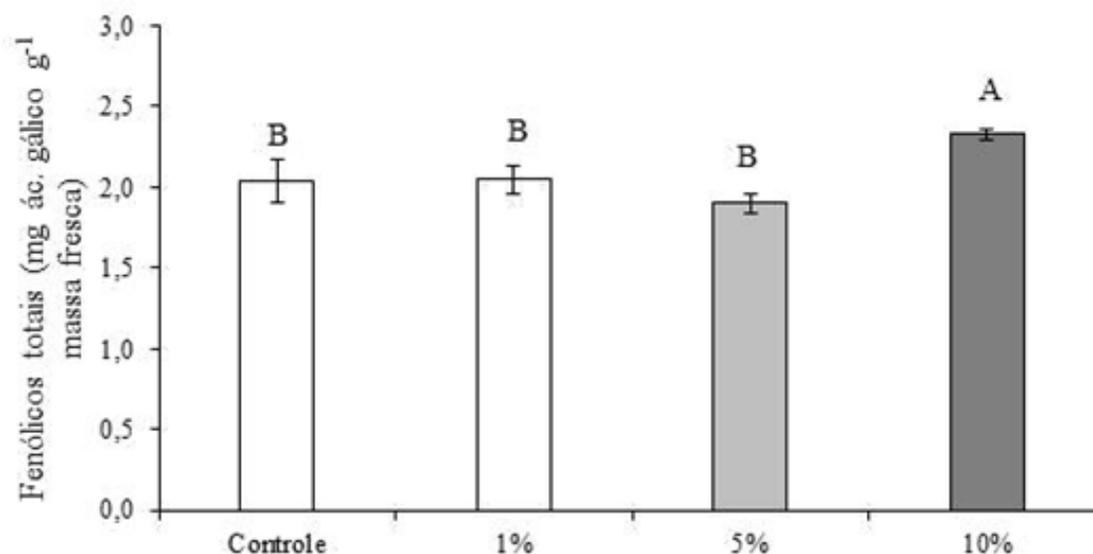
Em relação à produção de substâncias bioestimulantes por algas marinhas, relata-se que hormônios isolados em extratos de algas marinhas podem ser equivalentes àqueles encontrados em plantas superiores (CROUCH & VAN STADEN, 1993).

A sazonalidade da produção de compostos bioestimulantes pelas algas também parece ser significativa. As variações da atividade antioxidante, da produção de hormônios (citoquininas e auxinas), bem como da atividade antimicrobiana de extratos de alga estão sujeitas a variabilidade em função da sazonalidade, do estágio fisiológico e das condições ambientais (ZUBIA et al., 2008). Em um estudo na Polinésia com *S. manarevense*, foi encontrado o dobro da produção de fenólicos no inverno em relação ao verão (ZUBIA et al., 2008). Essas variações sazonais na concentração de compostos bioquímicos pode interferir nos efeitos bioestimulantes dessas algas sobre plantas superiores já que os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos (ANGELO et al., 2007). Tal fator não foi avaliado no presente experimento, mas possivelmente teve interferência nos resultados relatados.



**Figura 10** - Teor de flavonoides totais em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), conforme o tratamento com EAA de *S. cymosum*. Barra vertical referente ao desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Mais especificamente, os flavonoides apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica e são produzidos em resposta a agentes indutores de resistência. São moléculas disruptoras do metabolismo ou da estrutura celular do patógeno, mas costumam ser patógeno-específicos em relação a toxicidade (FREEMAN & BEATTIE, 2008). Lola-luz et al. (2013) relataram resultados similares ao presente trabalho, onde a aplicação mensal de extratos da alga *Ascophyllum nodosum* (com dois métodos de extração - alta pressão em baixa temperatura; alta temperatura com soluções alcalinas) na cultura da couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), promoveu aumento do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides nos tecidos das plantas.



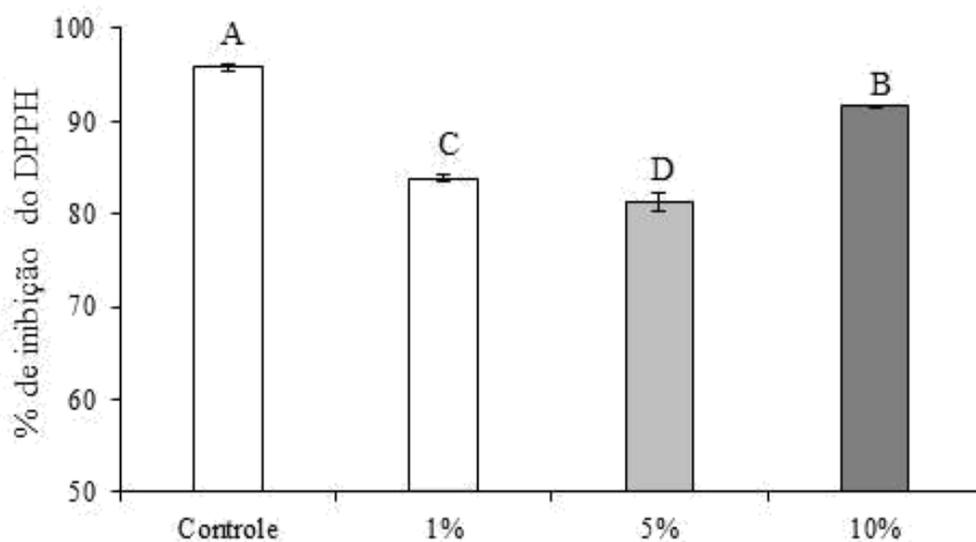
**Figura 11** - Concentração de compostos fenólicos totais em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S. cymosum* (0% - controle, 1%, 5% e 10%). Barra vertical referente ao desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

### 5.2.6. Potencial antioxidante

O tratamento controle apresentou superior capacidade antioxidante perante os outros tratamentos ( $95,56\% \pm 0,70$ ), seguido pelos tratamentos com EAA a 10% ( $91,56\% \pm 0,17$ ), 1% ( $83,84\% \pm 0,37$ ) e 5% ( $81,29\% \pm 0,89$ ) (Figura 13). Pesquisas recentes revelam que a associação de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides com as vitaminas C e E pode ser responsável pelos principais efeitos antioxidantes dos vegetais (PODSEDEK, 2007).

No presente estudo, as concentrações superiores de flavonoides e compostos fenólicos nas amostras de couve sob aplicação do EAA a 10% não foram suficientes para superar o potencial antioxidante do tratamento controle. Esse efeito pode estar ocorrendo

devido à presença de substâncias antioxidantes não avaliadas nesse estudo em quantidades superiores nas amostras do tratamento controle. O mesmo vale para as plantas tratadas com EAA a 5%, que evidenciaram teores de carotenoides totais similares ao controle, porém menor capacidade antioxidante entre os tratamentos. Este contraste sugere que a produção de compostos antioxidantes não analisados nesse experimento pode ter sido inibida nos tratamentos com EAA. Outra provável justificativa está nas concentrações do EAA utilizadas no presente experimento, que podem não ser adequadas para o efeito esperado pelo EAA.



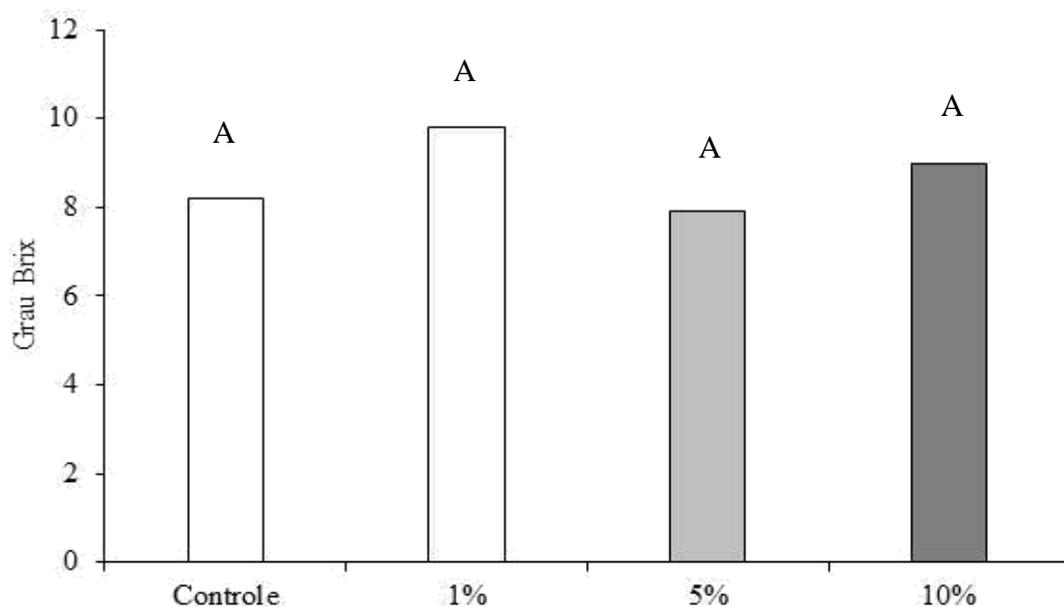
**Figura 13** - Potencial antioxidante (%) de folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S. cymosum* (0% - controle 1%, 5% e 10%). Barra vertical referente ao desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.2.7. Teor de sólidos solúveis

A Figura 14 apresenta o valor do teor de sólidos solúveis, através do °Brix, de folhas de couve submetidas aos tratamentos com o EAA. Segundo o teste não paramétrico de

Kruskal-Wallis, os valores não diferiram entre si. A aplicação foliar de EAA nas concentrações de 1, 5 e 10% não promoveram diferenças na concentração de compostos solúveis no tecido foliar da couve. Um experimento similar realizado por Filho et al. (2007), com aplicação de extrato etanólico da alga *Ulva fasciata* (2%) em cebola (*Allium cepa*) analisando os intervalos de aplicação (7, 15 e 21 dias) sobre os compostos solúveis dos bulbos, ressaltou a queda dos valores de teor de sólidos solúveis nas populações que receberam aplicações semanais, essa diferença não foi observada no presente experimento pois os intervalos de aplicação foram os mesmos para todas as populações estudadas, o que diferiu foi a concentração do EAA.

Esses resultados sugerem que intervalos das aplicações dos extratos de algas devem ser devidamente estabelecidos, bem como o efeito da aplicação sobre as distintas estruturas morfológicas da planta.



**Figura 14** - Teor de sólidos solúveis, dado em Grau Brix de folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tratadas com EAA de *S.cymosum* (0% - controle, 1%, 5% e 10%).

Os resultados observados nesse estudo prospectivo sugerem que a concentração do EAA é uma variável relevante para os resultados bioquímicos da concentração de carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, açúcares solúveis totais e potencial antioxidante do tecido foliar. Nas demais análises (comprimento radicular e da parte aérea e comprimento de radícula), a alta variabilidade dos dados dentro de cada tratamento contribuiu para a não diferenciação entre os tratamentos.

Além do mais, verificou-se que logo após as pulverizações, as folhas de couve apresentavam gotículas em sua superfície, devido à alta tensão superficial das soluções aquosas, o que reduziu a área de contato do EAA com a superfície foliar. Essa característica pode ser justificada pela função hidro-repelente das folhas dessa espécie (MARTINS et al., 2010), e pode ter provocado interferência na capacidade das plantas de absorção de alguns

compostos bioestimulantes do EAA. Sugere-se que a ausência de efeito do EAA em algumas variáveis analisadas no presente estudo possa ser relacionada à dificuldade de absorção de compostos bioestimulantes presentes no EAA, devido à camada serosa característica das folhas de couve, visto que o extrato da alga foi extraído em base aquosa, e não se agregou nenhum outro produto para aumentar a eficiência da aplicação. Estudos relatam o uso de bioestimulantes associados à espalhantes adesivos ou a substâncias surfactantes para aplicações foliares em espécies de *Brassicac*s (TANAKA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2011). Essas substâncias exercem papel fundamental no sistema líquido-folha, pois, a modificação no comportamento interfacial entre a solução aspergida e a folha evita que áreas fiquem descobertas, aumentando a aderência e a eficiência da aplicação (GONÇALVES et al., 2011; ZODAPE et al., 2011).

Esse estudo corroborou com uma série de outros similares, por evidenciar a amplitude de variáveis a serem consideradas para se avaliar o potencial bioestimulante de extratos de algas marinhas, dentre elas destaca-se as concentrações de diluição dos extratos, época e intervalo de aplicações, e via de aplicação (foliar, solo, semente).

Sabe-se que substâncias bioestimulantes só exercem essa função quando penetraram o tecido das plantas, e que a permeabilidade dos tecidos aos bioestimulantes varia de espécie para espécie (BULGARI et al., 2015). Além disso a absorção também depende das condições de cultivo das plantas, como substrato, disponibilidade de água, questões climáticas e de sazonalidade e demais fatores extrínsecos (PECHA et al., 2012).

A produção de hormônios e de demais substâncias com função bioestimulante pelas algas marinhas varia em função da sazonalidade, do estágio fisiológico e das condições

ambientais em que são coletadas, e está associada as respostas variadas das culturas, devido à fatores extrínsecos e intrínsecos. Esse sinergismo de fatores muitas vezes impede a generalização da utilização dos extratos de algas para diferentes espécies (BULGARI et al., 2015; ZUBIA et al., 2008).

Quanto a produção do extrato, em estudos exploratórios verificou-se a existência de uma ampla variabilidade nos métodos de extração, diluição, aplicação e análise dos efeitos. É interessante que seja realizada uma padronização dos procedimentos, com elaboração de protocolos que sejam de fácil replicação para que os estudos ofereçam dados comparativos suficientes a elaboração de um produto comercial viável, a base de *Sargassum cymosum*, tendo em vista a quantidade de biomassa que essa alga oferece, a distribuição geográfica e o potencial bioestimulante da mesma. Portanto é necessário ampliar os estudos com o uso dessa espécie de *Sargassum* na agricultura.

## 6. CONCLUSÕES

- O uso do EAA não produziu efeitos positivos na germinação de sementes, no IVG e desenvolvimento inicial das plântulas, bem como nos parâmetros bioquímicos de concentração de açúcares solúveis totais e poder antioxidante da couve.
- O EAA na concentração de 10% é um potencial bioestimulante para produção de compostos fenólicos e flavonoides em couve;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARDH, C. A. **Species algarum rite cognitae: cum synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis.** sumtibus E. Mavritii, 1823. Disponível em: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=821](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=821). Acesso em: 28/11/15.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

BARROS-ALVES, S. **Biodiversidade de caranguejos Branquiúros (Crustacea, Decapoda) associada a bancos da alga Sargassum cymosum (C. Agardh, 1820) na região da Ubatuba, Litoral Norte Paulista, 2009.** 89 f. (Dissertação mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência de Botucatu.

BEZERRA, P. S. G.; GRANJEIRO, L. C.; NEGREIROS, M. L. **Utilização de bioestimulante na produção de mudas de alface.** Científica, v. 35, n. 1, p. 46-50, 2007.

BRASIL. **Decreto nº. 4.954, de 14 de Janeiro de 2004.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 de jan. 2004. Seção 1, p. 2.

BRASIL, L. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BOZORGI, H. R.; BIDARIGH, S.; BAKHSHI, D.; SAMAK, B.; MOHAMMADI, E. A.; MORADITOECHAE, M. **Effects of Marine Brown Alga Extract (Ascophyllum nodosum) Under Foliar Spraying of Methanol and Iron Fertilizers on Flower Tube Length of Saffron (Crocus sativus L.) in North of Iran.** Intl J Agri Crop Sci. Vol., 4, p. 1512-1518, 2012.

BULGARI, R.; COCETTA, G.; TRIVELLINI, A.; VERNIERI, P.; FERRANTE, A. **Biostimulants and crop responses: A review.** Biological Agriculture e Horticulture, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2015.

CAPELA, R. R. G. **Efeito de um extrato de algas nas actividades da nitrato redutase e da glutamina sintetase em oliveira (Olea europaea L.) Galega vulgar e Cobrançosa.** Lisboa: ISA, 2013, 121 p.

CARNELOSSI, M.A.G. **Fisiologia pós-colheita de folhas de couve (Brassica oleracea cv. acephala) minimamente processadas.** Viçosa: UFV, 2000, 81p.

CARRIL, E. P. U. **Fisiología Vegetal: aspectos básicos.** REDUCA, v. 2, n. 3, p. 1-47, 2009.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. de C. e; GALLO, L. A.; JUNIOR, M. V. de C. F. **Seaweed extract provides development and production of wheat.** Revista Agrarian, v. 7, n. 23, p. 166-170, 2014.

COIMBRA, C. S. **Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero Sargassum C. Agardh do Atlântico Sul.** ), 2006,71f. (Tese de doutorado)–Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo- Departamento de Botânica.

COSTA, C. L. L.; DA COSTA, Z. V. B.; JÚNIOR, C. D. O. C.; ANDRADE, R.; DOS SANTOS, J. G. R. **Utilização de bioestimulante na produção de mudas de melancia.** Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, v. 3, n. 3, 2008.

CROUCH, I. J.; VAN STADEN, J. **Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products.** Plant growth regulation, v. 13, n. 1, p. 21-29, 1993.

CRAIGIE, J. S. **Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture.** Journal of Applied Phycology, v. 23, n. 3, p. 371-393, 2011.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I. S.; MCDONALD, T. M. **Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the Internet.** Optometry (St. Louis, Mo.), v. 71, n. 3, p. 147-164, 2000.

DAPPER, T. B.; PUJARRA, S.; OLIVEIRA, F. G. de; PAULERT, R. **Potencialidades das Macroalgas Marinhas na Agricultura: Revisão.** Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 7, n. 2, p. 295-313, 2014.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Antioxidants properties of phenolic compounds.** Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DE OLIVEIRA RODRIGUES, E. R. **Respostas bioquímicas e na organização celular da alga parda Sargassum cymosum var. stenohyllum (Martius) Grunow (Heterokontophyta, Fucales) á exposição à gasolina e ao óleo diesel.** 2014. (Tese de Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina- Centro de Ciências Biológicas.

DE SOUSA, M. B.; DOS SANTOS PIRES, K. M.; DE ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S.  **$\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em algas marinhas in natura.** Ciênc. Tecnol. Aliment, v. 28, n. 4, p. 953-958, 2008.

DUBIASKI-SILVA, J.; MASUNARI, S. **Ontogenetic and seasonal variation in the diet of marimbá, Diplodus argenteus (Valenciennes, 1830)(Pisces, Sparidae) associated with the beds of Sargassum cymosum C. Agardh, 1820 (Phaeophyta) at Ponta das Garoupas, Bombinhas, Santa Catarina.** Journal of Coastal Research, p. 1190-1192, 2006.

DURAND, N.; BRIAND, X.; MEYER, C. **The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in Arabidopsis thaliana.** Physiologia Plantarum, Lund, v. 119, n. 4, p. 489-493, 2003.

ECHAVARRÍA B., FRANCO A., MARTÍNEZ A. **Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano.** Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia. v. 16. n 1. p.126-131, 2009.

ERTANI, A.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; SAMBO, P.; SANCHEZ-CORTES, S.; NARDI, S. **Capsicum chinensis L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomics approaches.** Frontiers in plant science, v. 5, 2014.

ERULAN, V.; SOUNDARAPANDIAN, P.; THIRUMARAN, G.; ANANTHAN, G. **Studies on the effect of Sargassum polycystum (C. Agardh, 1824) extract on the growth and biochemical composition of Cajanus cajan (L.) Mill Sp.** American Eurasian J Agric Environ Sci, v. 6, p. 392-399, 2009.

[FAO] Food and Agricultural Organization. 2012. **Yearbook of fishery statistics. Rome: Food and Agricultural Organization of United Nations.** Disponível em <http://www.fao.org/3/478cfa2b-90f0-4902-a836-94a5d5ddd6730/i3740t.pdf>. Acesso em: 29/11/2015

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura.** 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 50-53, 1982.

FILHO, J. A. W.; MARTINS, D. A.; STADNIK, M. J. **Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola.** Hortic. bras, v. 25, n. 4, 2007.

FREEMAN, B.C.; G.A. BEATTIE. **An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores.** The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01. Disponível em <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>. Acesso em: 03/12/2015

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. **Metabolismo secundario de plantas.** Reduca (Biología), v. 2, n. 3, 2011.

GUIRY, M.D. **Macroalgae of Rhodophycota, Phaeophycota, Chlorophycota, and two genera of Xanthophycota,** in: Costello, M.J. et al. (Ed.) (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels, v 50, p. 20-38, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GONÇALVES, K. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; CAVALIERE, S. D.; MARTINS, I. S. B.; VELINI, E. D. **Seletividade de herbicidas aplicados em pós-emergência em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Revista Brasileira de Herbicidas, v. 10, n. 2, p. 110-120, 2011.

HERNÁNDEZ-HERRERA, R. M.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; RUIZ-LÓPEZ, M. A.; NORRIE, J.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. **Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.)**. Journal of applied phycology, v. 26, n. 1, p. 619-628, 2014.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. **Bioactive compounds in seaweed functional food applications and legislation**. Journal of Applied Phycology, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

JEFFREY, SW, T.; HUMPHREY, G. F. **New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton**. Biochem Physiol Pflanz BPP, 1975.

JUNGLAUS, R.W. **Aplicação de bioestimulante vegetal sobre o desenvolvimento de pepineiro (*Cucumis sativus*) enxertado e não enxertado**. 2008. 56p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciência Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

KALAIVANAN, C.; VENKATESALU, V. **Utilization of seaweed *Sargassum myriocystum* extracts as a stimulant of seedlings of *Vigna mungo* (L.) Hepper**. Spanish Journal of Agricultural Research, v. 10, n. 2, p. 466-470, 2012.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; PRITHIVIRAJ, B. **Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development**. Plant Growth Regulation, v. 28, p. 386-399, 2009.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. **Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts**. Toxicology, v. 172, n. 2, p. 149-156, 2002.

KOYAMA, R.; BETTONI, M. M.; RODER, C.; DE ASSIS, A. M.; ROBERTO, S. R. **Extrato da alga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis no desenvolvimento vegetativo e na produção do tomateiro**. Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, v. 55, n. 4, p. 282-287, 2012.

KUHNEN, S.; LEMOS, P.M.M.; CAMPESTRINI, L.H.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. **Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food**. Journal of Functional Foods, v. 1, n. 3, p. 284-290, 2009.

KUMAR, G.; SAHOO, D. **Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold**. Journal of applied phycology, v. 23, n. 2, p. 251-255, 2011.

LEACH, W. R.; PLUNKETT, B. A.; BLUNDEN, G. **Reduction of nitrate leaching from soil treated with an *Ascophyllum nodosum* based soil conditioning agent.** Journal of Applied Phycology, v. 11, n. 6, p. 593-594, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. & COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** São Paulo, Sarvier, 2002.

LIMBERGER, P. A.; GHELLER, J. A. **Efeito da aplicação foliar de extrato de algas, aminoácidos e nutrientes via foliar na produtividade e qualidade de alface crespa.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v. 1, n. 1, 2012.

LOLA-LUZ, T.; HENNEQUART, F.; GAFFNEY, M.. **Enhancement of phenolic and flavonoid compounds in cabbage (*Brassica oleraceae*) following application of commercial seaweed extracts of the brown seaweed, (*Ascophyllum nodosum*).** Agricultural and Food Science, v. 22, n. 2, p. 288-295, 2013.

LORENZ, O.A.; MAYNARD D.N. **Handbook for vegetable growers.** 3a ed. New York: John Wiley-Interscience Publication. 1988, 456p.

MAGUIRE, J. D. **Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor.** Crop science, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARTINS, R. A. C.; PEREIRA, H. S.; REIS, E. F. dos. **Lecitina, silicone e amido na adubação foliar de couve (*Brassica oleracea* L.).** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 34, n. 6, p. 1470-1476, 2010.

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

MARZZOCO, A. E TORRES, B. B. (2007), **Bioquímica Básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.; VICARIO, I.; HEREDIA, F. **Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos.** Arch. latinoam. nutr, v. 54, n. 2, p. 209-215, 2004.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aplicação foliar de extrato de alga, ácido l-glutâmico e cálcio em feijoeiro.** Horticultura Brasileira (2008).

MONTOUCHET, P. G. **Sur la communauté des animaux vagiles associés à *Sargassum cymosum* C. Agardh, à Ubatuba, Etat de São Paulo, Brésil.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v. 14, n. 1, p. 33-64, 1979.

MORALES-PAYAN, J. P. **Effects of an agricultural extract of the brown algae, *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), on mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), grown for transplants in the nursery.** Life: The Excitement of Biology, v. 1, n. 2, p. 111-117, 2013.

NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C.; FIDELIS, P. C.; NACHTIGALL, F. M.

**Determinação do teor de luteína em hortaliças.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento, Curitiba, v.25, n.2, 2007.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

OLIVEIRA, A. C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. **Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas.** Inter Ciencia Place, v. 2, n. 4, p. 1-21, 2009.

PECHA, J.; FÜRST, T.; KOLOMAZNÍK, K.; FRIEBROVÁ, V.; SVOBODA, P. **Protein biostimulant foliar uptake modeling: The impact of climatic conditions.** AIChE Journal, v. 58, n. 7, p. 2010-2019, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of biotechnology and biodiversity, v. 3, n. 4, p.146-152, 2012.

PESSATTI, M. L.; MARASCHIN, M. **Atividades biológicas e aspectos estruturais de carboidratos de origem marinha.** In: JORNADA CATARINENSE DE 36 PLANTAS MEDICINAIS – saúde e sustentabilidade para o 3º milênio, Anais.Tubarão: Unisul, 183p. p. 47-51. 1998.

PODSEDEK, A. **Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review.** LWT-Food Sci. Technol, v. 40, p. 1-11, 2007.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. **Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans.** Glycobiology, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

QUIRÓS, A. R. B. de; COSTA, H. S. **Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, n. 2, p. 97-111, 2006.

RANDHIR, R.; LIN, Y.-T.; SHETTY, K. **Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors.** Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, v. 13, n. 3, p. 295-307, 2004.

RAYIRATH, P.; BENKEL, B.; HODGES, D. M.; ALLAN-WOJTAS, O.; MACKINNON, S.; CRITCHLEY, A. T. **Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** Planta, v. 230, n. 1, p. 135-147, 2009.

SILVA, C. P. da; GARCIA, K. G. V.; SILVA, R. N. OLIVEIRA, L. A. A.; TOSTA, M. S. **Desenvolvimento inicial de mudas de couve-folha em função do uso de extrato de alga (*Ascophyllum nodosum*)**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, Mossoró – RN, Brasil, v. 6, n. 1, p. 07-11, 2012.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. **Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SCHMIDT, R. E.; ERVIN, E. H.; ZHANG, X. **Questions and answers about biostimulants**. Golf Course Manage, v. 71, n. 6, p. 91-94, 2003.

SHANNON, J.C. **A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels**. Research Bulletin, v.842, p.1-8, 1968.

STADNIK, M. J.; FREITAS, M. B. de. **Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers**. Tropical Plant Pathology, v. 39, n. 2, p. 111-118, 2014.

STIRK, W. A.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; VAN STADEN, J. **Cytokinins in macroalgae**. Plant growth regulation, v. 41, n. 1, p. 13-24, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 2013. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 918.

TANAKA, M. T.; SENGIK, E.; SCAPIM, C. A.; SANTOS, H. S.; PINTRO, J. C. **Influência de bioestimulantes orgânicos e uréia na absorção foliar de boro em couve-flor**. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 22, p. 1115-1118, 2008.

TAVARES, S.; de C.; P. R.; AMBROSANO, E. J.; CATO, S. C.; FOLTRAN, D. E. **Efeitos de Bioestimulante no Desenvolvimento de Frutos de Tomateiro ‘Carmen’**. Cadernos de Agroecologia, v. 9, n. 4, 2015.

TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. DOS S.; AIVERENGA, E. M., HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. **Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.)**. Revista Brasileira de Sementes, V.29, N.3, P. 180-188, 2007.

UENOJO, M.; MAROSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. **Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma**. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 616, 2007.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F. **Manometric technics**. Burgess Publi Co, Min-neapolis Minnesota, 1964.

VELOSO, A. P. A.; DE SZCÉCHY, M. T. M. **Variações temporais no desenvolvimento vegetativo reprodutivo macroalga sargassum c. Agardh (fucales, phaeophyceae)-síntese do conhecimento**. Oecologia Brasiliensis, v. 12, n. 2, p. 9, 2008.

VERNIERI, P.; BORGHESI, E.; TOGNONI, F.; SERRA, G.; FERRANTE, A.; PIAGESSE, A. **Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floatingsystem.** In: III International Symposium on Models for Plant Growth, Environmental Control and Farm Management in Protected Cultivation 718, p. 477-484, 2006.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. **Engineering secondary metabolite production in plants.** Current opinion in biotechnology, v. 13, n. 2, p. 181-187, 2002.

VIANA, E. M.; KIEHL, J. DE C. **Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo.** Bragantia, v. 69, n. 4, p. 975-982, 2010.

WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism / edited by Michael Wink. – 2nd ed. p. cm. Annual plant reviews ; Blackwell Publishing Ltd, v.40, 2010.

YEUM, K.-J. TAYLOR, A., TANG, G.; RUSSELL, R. M et al. **Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses.** Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 36, n. 13, p. 2756-2761, 1995.

YOKOYAMA, M. Y.; GUIMARÃES, O. **Determinação dos teores de Na, K, P e proteínas em algumas algas marinhas.** Acta Biológica Paranaense, v. 4, 1975.

YOKOYAMA, M. Y.; GUIMARÃES, O. **Variação na composição química de algumas algas marinhas da Ilha do Saí, Paraná, Brasil.** Acta Biológica Paranaense, v. 6, 1977.

ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I. M. C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. **Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*,** v. 30, 2007.

ZUBIA, M.; PAYRI, C.; DESLANDES, E. **Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia).** Journal of applied phycology, v. 20, n. 6, p. 1033-1043, 2008.

ZODAPE, S. T.; GUPTA, A.; BHANDARI, S. C.; RAWAT, U. S.; CHAUDHARY, D. R.; ESWARAN, K.; CHIKARA, J. **Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).**J Sci Ind Res, v. 70, p. 215-219, 2011.