

Giulia Burle Costa

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS METAIS PESADOS
CÁDMIO, CHUMBO, COBRE E MANGANÊS, NA
MORFOLOGIA E NA FISIOLOGIA DA MACROALGA
*Sargassum cymosum***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zenilda Laurita Bouzon

Coorientador: Prof. Dr. Éder Carlos Schmidt

Florianópolis
2015

Costa, Giulia Burtle
Avaliação dos efeitos dos metais pesados cádmio, chumbo, cobre e manganês, na morfologia e na fisiologia da macroalga *Sargassum cymosum* / Giulia Burtle Costa ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon ; coorientador, Éder Carlos Schmidt. - Florianópolis, SC, 2015.
132 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Metais pesados. 3. Ecofisiologia. 4. Ultraestrutura. 5. Microscopia óptica e eletrônica. I. Bouzon, Zenilda Laurita. II. Schmidt, Éder Carlos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Dedico este trabalho a Maria José Melo Rego Burle, por todo amor, carinho, cuidado e (muita) paciência. Amo você mãe!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todas as forças que regem a vida, em todas as suas formas. Agradeço as forças da natureza, que tornam possível a existência de todas as criaturas vivas. Agradeço aos ensinamentos da terra e seus ciclos de renovação, que nos evidenciam que nada é estático, e que tudo está sujeito a constantes processos de aprendizado, recriação e multiplicação. Agradeço aos ciclos perpétuos, que transmitem aos homens a ponderação, e que fazem cumprir neste plano a verdadeira justiça à qual estamos sujeitos. E agradeço as forças espirituais que nos cercam, pela sabedoria adquirida e pelo equilíbrio que me proporcionaram para cumprir minha jornada até aqui. Somos todos filhos da mesma casa, e que a Terra continue a nos nutrir e fortalecer.

Agradeço aos meus orientadores, prof^ª Zenilda Bouzon e Éder Schmidt, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho de pesquisa. Agradeço pela boa acolhida no LabCeV, pelos ensinamentos e pelo auxílio ao longo do mestrado. Obrigada por todo o apoio!

A professora Fungyi Chow, pela disponibilidade e atenção nos ensinamentos, e por contribuir com todo o trabalho desenvolvido ao longo do mestrado. Ao professor Paulo Horta, pela atenção, carinho e boa vontade em me receber para (longas) discussões estatísticas. Ao professor Marcelo Maraschin, pelas contribuições construtivas ao longo das análises bioquímicas. Muito obrigada a vocês por todos os ensinamentos e motivação!

Aos amigos de laboratório, por todo apoio, incentivo, carinho e ajuda nos experimentos. Agradeço ao Rodrigo (Cérebro) pelas ótimas risadas e pela melhor companhia heavy metal; a Carmen, pelo apoio nos experimentos e artigos; a Marthiellen, grande amiga de todas as horas; a Chirle, pelas festinhas da lactose e o apoio incondicional nas análises no LAMEB; a Elisa, pelo carinho; e a Izabela, minha companheira favorita de viagens e pipocas de microondas!

Agradeço aos amigos conquistados no Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal (CCA). Agradeço de todo coração a Fernanda pelas ajudas nos trabalhos, análises, pelos cafés gostosos e todo carinho em me receber. E a Eva Regina e Cláudia, pelo companheirismo e ajuda. Obrigada meninas, não teria conseguido sem vocês!

Agradeço à equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica pelo trabalho realizado e o apoio nas análises. Agradeço especialmente a Eliana de Oliveira, pelo carinho imenso em todos os

momentos do meu trabalho, na confiança depositada em mim e pela alegria de me ajudar. Obrigada! E a equipe dos LAMEBs, por me receberem sempre tão bem, com tanta atenção: Demétrio, Emily, Denis e Vanessa, muito obrigada!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ficologia (BOT, UFSC), pelas boas trocas de experiências e debates ficológicos. Agradeço também ao professor José pelo auxílio e ensinamentos para o uso do Jr. PAM, obrigada pelo apoio!

A minha família, com todo amor. Agradeço aos meus pais, Maria José e Sidney, pelo apoio, carinho, mesmo diante das minhas escolhas e momentos mais difíceis na pós-graduação. Obrigada por tudo, amo vocês! A minha vó Ada, que amo demais. Ao meu irmão querido Gabriel, que mesmo a distância, sempre teve uma palavra de apoio e carinho sempre que precisei.

Ao meu namorado Lucas, por todo carinho, paciência e compreensão, e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis do mestrado.

Aos amigos, que se tornaram parte da minha família, e moram em meu coração. Peço desculpas pelas ausências durante as aulas e experimentos, mas agradeço pela compreensão e carinho durante todo o mestrado, e por continuarem a fazer parte da minha vida. Obrigada a Juliana, Gabriela e Carolina, minhas amigas de coração, minhas irmãs postiças, que estiveram sempre ao meu lado. Obrigada por tudo meninas, adoro vocês demais! As minhas mais queridas amigas de mestrado, Roberta e Rafaela, por me acolherem com tanto carinho e por serem companheiras tão fiéis. Obrigada por bons momentos! A Vanessa, companheira desde a graduação, amiga sempre muito querida! E aos amigos, que não vejo sempre que gostaria, ou nem há algum tempo, mas que sempre me deixam saudades: Alex, Jussara, Cibeli, Elaine, André. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Agradeço a CAPES e a UFSC, pelo fomento, auxílio financeiro e suporte técnico para a conclusão do meu projeto.

E a todos os professores, colegas de laboratório, colegas de outros PPGs, companheiros de análise nos laboratórios multiusuários: agradeço a todos, que de alguma maneira, direta ou indireta, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos por acreditarem que este trabalho seria possível!

Faça uma lista de grandes amigos
Quem você mais via há dez anos atrás
Quantos você ainda vê todo dia
Quantos você já não encontra mais...

Faça uma lista dos sonhos que tinha
Quantos você desistiu de sonhar!
Quantos amores jurados pra sempre
Quantos você conseguiu preservar...

Onde você ainda se reconhece
Na foto passada ou no espelho de agora?
Hoje é do jeito que achou que seria
Quantos amigos você jogou fora?

Quantos mistérios que você sondava
Quantos você conseguiu entender?
Quantos segredos que você guardava
Hoje são bobos ninguém quer saber?

Quantas mentiras você condenava?
Quantas você teve que cometer?
Quantos defeitos sanados com o tempo
Eram o melhor que havia em você?

Quantas canções que você não cantava
Hoje assovia pra sobreviver?
Quantas pessoas que você amava
Hoje acredita que amam você?

Oswaldo Montenegro

RESUMO

Os ambientes marinhos costeiros passam constantemente por alterações de origem antrópica. Estas alterações levam a desestruturação da comunidade marinha bentônica, especialmente das macroalgas, como exemplo do gênero *Sargassum*. Algas pardas são estruturadoras de comunidade, possuem papel ecológico como abrigo alimentar e reprodutivo. Entre as ações humanas, a contaminação por metais pesados merece atenção, por serem elementos persistentes no ambiente e nos organismos, e por serem alteradores dos ciclos biogeoquímicos. O presente estudo teve enfoque nos efeitos dos metais cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e manganês (Mn) sobre a fisiologia e morfologia de *S. cymosum*. As algas foram coletadas nas Praias da Armação do Pântano do Sul (27°44'42" S e 48°30'27" O) e de Ponta das Canas (27°23'34"S e 48°26'11" O). Exemplares foram transferidos para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (BEG, CCB – UFSC), onde foram limpos e aclimatados em condições constantes. Os delineamentos foram aplicados de acordo com os elementos metálicos. Cu e Pb foram aplicados em três concentrações individuais e três concentrações associativas, por 7 dias. Cd e Mn foram aplicados, em cada conjunto experimental, em quatro concentrações metálicas e em dois tempos de exposição (7 e 14 dias). Foram realizadas análises de metabólitos, ultra-estrutura celular, bioacumulação, atividade fotossintética e viabilidade celular, aplicadas de acordo com cada delineamento proposto. Resultados mostraram efeitos danosos dos metais sobre *S. cymosum*. A alga apresentou alta capacidade de acumulação de todos os metais, mas houve interferências e reduções no seu crescimento e viabilidade celular. Os pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *c*) também apresentaram variações em relação aos controles, com variações na eficiência fotossintética de acordo com o metal aplicado no tratamento. Reduções significativas foram observadas no conteúdo de carotenóides totais, acompanhadas de variações no perfil de carotenóides. Compostos fenólicos e compostos similares a flavonóides também sofreram reduções em seus conteúdos totais, relacionado tanto aos metais quanto ao tempo de exposição. As técnicas de microscopia empregadas (microscopia de luz, microscopia de varredura confocal, microscopias eletrônicas de varredura e transmissão) mostraram tendências similares para os metais comparados sob a mesma técnica. Houve migração de fisóides para as células corticais das algas expostas aos tratamentos, evidenciada pela intensidade metacromática da citoquímica Azul de Toluidina. As características de rugosidade superficial dos talos foram

modificadas com os tratamentos, provavelmente associadas às alterações nas paredes celulares, com desorganização de fibrilas e incorporação de componente amorfo. Desestruturações de organelas, como cloroplastos e mitocôndrias, também foram observados nos tratamentos com Cd e Mn. Os maiores efeitos nocivos foram observados para o metal Cu, e o metal Mn também mostrou alta interferência metabólica. Os efeitos de toxicidade variaram de acordo com o metal aplicado, a concentração e o tempo de exposição. Os resultados indicaram que *S. cymosum* é sensível a poluição por metais pesados, relacionado ao tipo de metal, e considerando a concentração e o tempo de exposição ao elemento. Os efeitos foram mensurados isoladamente, mas a associação de metais com parâmetros abióticos (radiação, nutrientes, temperatura, salinidade e pH) podem intensificar os efeitos negativos observados para a espécie. Com isto, sugere-se que os impactos sobre bancos naturais podem comprometer a estrutura da comunidade, bem como afetar outros macroinvertebrados e epífitos associados.

Palavras-chave: Poluição; Ecofisiologia; Morfologia; Metabólitos; Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Coastal marine environment suffer constantly with anthropogenic alterations. These alterations incurs to benthic community destructuration, specially for seaweeds, as *Sargassum* genus example. Brown seaweeds are community structuring, have ecological role as food and reproductive rescue. Between human actions, heavy metal pollution receive attention, for being persistent in environment and living organisms, and for resultant biogeochemical cycling alterations. Present study had focus on effects of copper (Cu), lead (Pb), cadmium (Cd) and manganese (Mn) over physiology and morphology of *S. cymosum*. Samples were collected on Armação do Pântano do Sul beach (27°44'42" S e 48°30'27" O) and Ponta das Canas beach (27°23'34"S e 48°26'11"O). Samples were transferred to Plant Cell Biology Laboratory (BEG, CCB – UFSC), cleaned and acclimated under laboratory conditions. Experimental setup were applied according with metallic element. Cu and Pb were applied in three individual and three associative conditions for 7 days. Cd and Mn were applied, in each experimental series, with four metallic treatments and in two times exposure (7 and 14 days). Were carried out analysis of metabolites, cellular ultrastructure, bioaccumulation, photosynthetic activity and cell viability, in according to each proposed experimental setup. Results showed negative effects of heavy metals treatments over *S. cymosum*. Samples had higher bioaccumulation capacity for all heavy metals, but presented interferences and reduction on growth rates and cell viability. Photosynthetic pigments (chlorophylls a and c) also had variability related to Control samples, and photosynthetic efficiency changed according to metal applied. Significant reductions were observed on total carotenoids, follow for alterations on carotenoids profile. Phenolic compounds and like flavonolic compounds also had reductions on total contents, related both metal and time exposure. Microscopy techniques applied (light microscopy, electron scanning confocal, electron scanning and transmission microscopies) showed similar tendencies for metals as compared under same technic. Physodes suffered migration for cortical cells of all treated samples, evidenced in metachromatic reaction of Toluidine Blue and observed in ultrastructure. Roughness surface characteristics were modified for metal treatments, probably associated with cell walls damages, with fibrils disorganization and amorphous component incorporation. Organelles disruptions, in chloroplasts and mitochondria, were observed for Cd and Mn treatments. Major harmful effects were observed for Cu, and Mn also showed high metabolic

interference. Toxic effects changed in accordance with applied metal, and with concentration and time exposure. Results indicated sensitivity of *S. cymosum* for heavy metal pollution, related to metal and considering its concentration and time exposure. Isolated effects were measured, however metallic associations with abiotic parameters (radiation, nutrients, temperature, salinity and pH) could intensify negative effects previously observed for species. With this, it is suggested that impacts over natural beds incurring on community structure compromising, as well as affected macroinvertebrates and epifaunal associated.

Key-words: Pollution; Ecophysiology; Morphology; Metabolites; Electron Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1: Exemplos de <i>Sargassum cymosum</i> coletados na Praia da Armação do Pântano do Sul, Florianópolis, SC.....	30
Figura 2: Ponto de coleta [I] de <i>Sargassum cymosum</i> . A. Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. B. Praia da Armação do Pântano do Sul, sul da Ilha de Florianópolis. Seta indica local de acesso ao ponto de coleta pela vista aérea de área de estudos. C. Vista do costão rochoso onde foram coletados os exemplares de <i>S. cymosum</i>	39
Figura 3: Ponto de coleta [II] de <i>Sargassum cymosum</i> . A. Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. B. Praia de Ponta das Canas, norte da Ilha de Florianópolis. Seta indica local de acesso ao ponto de coleta pela vista aérea de área de estudos. C. Vista do costão rochoso onde foram coletados os exemplares de <i>S. cymosum</i>	40
Figura 4: Delineamento experimental para exposição aos metais cobre e chumbo, por período de sete dias.....	42
Figura 5: Delineamento experimental para exposição ao metal cádmio, por período experimental de sete e de 14 dias.....	43
Figura 6: Delineamento experimental para exposição ao metal manganês, por período experimental de sete e de 14 dias.....	44
Figura 7: Organograma de análises bioquímicas, ultra-estruturais e de parâmetros abióticos, aplicadas nos delineamentos experimentais dos experimentos aplicados em <i>S. cymosum</i> com os metais pesados cobre, chumbo, cádmio e manganês.....	46
CAPÍTULO I	
Figura 1: Biosorção de metais pesados por <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 µM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb.....	73
Figura Suplementar 1: Fator de bioconcentração de <i>S. cymosum</i> depois de sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 µM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb.....	74
Figura 2: Curvas da taxa de transporte de elétrons (ETR) sob níveis crescentes de PAR. Curvas fotossíntese/irradiância (PI) de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, seguido por recuperação de 24 h.....	76
Figura 3: Máximo rendimento quântico (Fv/Fm) de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, seguido pela recuperação de 24	

horas.....	79
Figura 4: Conteúdo pigmentar e atividade antioxidante de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μ M) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb.....	81
Figura 5: Absorbância média da água do mar a 280-380 nm de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μ M) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb.....	82
Figura Suplementar 2: Aparência do meio de cultura de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações de (Cu), chumbo (Pb), e Cu+Pb (n=4).....	83
Figura 6: Após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, microscopia de luz realizada com amostras de <i>S. cymosum</i> coradas com AT-O.....	84
Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos talos de <i>S. cymosum</i> após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb.....	85

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1: Composição química do meio nutritivo von Stosch, para o preparo de 2 L de solução padrão..... 41

Tabela 2: Sumário executivo das análises realizadas com *S. cymosum*, exposto aos metais cobre, chumbo, cádmio e manganês..... 45

CAPÍTULO I

Tabela 1: Taxas de crescimento de *S. cymosum* depois de sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) e Cu+Pb..... 72

Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos ETR_{máximo}, Alpha, Beta e Ik para *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) e Cu+Pb, seguido por recuperação de 24 h..... 77

Tabela Suplementar 1: ANOVA bifatorial para a concentração do metal (0, 10, 25 e 50 μ M) e tratamentos de exposição/recuperação para os parâmetros fotossintéticos de *S. cymosum*..... 78

DISCUSSÃO

Tabela 1: Sumário dos resultados obtidos para os delineamentos experimentais com os metais cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e manganês (Mn)..... 114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ácido periódico de Schiff – APS (português) e PAS (inglês)
Alpha ou eficiência fotossintética - α
Azul de Toluidina – ATO (português) e TB-O (inglês)
Beta ou fotoinibição - β
Bioconcentração percentual – Bioconcentration %
Brometo 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT
Cádmio - Cd
Célula cortical - CC
Célula subcortical - CS (português) e SC (inglês)
Chumbo - Pb
Clorofila *a* – Chl *a*
Clorofila *c* – Chl *c*
Cobre – Cu
Corpos de Golgi - G
Fator de bioconcentração – BCF
Fisóides – Ph (inglês)
Fluorometria de pulso modulado - PAM
Fotossistema II – FS II (português) e PS II (inglês)
Laboratório de Biologia Celular Vegetal – LabCeV
Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME
Laboratório de Ficologia - LAFIC
Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal – LMBV
Laboratório Multiusuário em Estudos de Biologia I e II – LAMEB I e II
Litro – L
Luz de saturação - I_k
Micromolar - μM
Microscopia eletrônica de transmissão – MET (português) e TEM (inglês)
Microscopia eletrônica de varredura – MEV (português) e SEM (inglês)
Microscopia de luz – ML (português) e LM (inglês)
Miligramas - mg
Mililitros - mL
Mitocôndria – M
Manganês – Mn
Parede celular – PC (português) e CW (inglês)
Plasmodesmas – Pl (português e inglês)
Plastoglôbulis – P (português e inglês)
Pureza analítica – P.A.
Radiação fotossinteticamente ativa – PAR (português e inglês)

Rendimento quântico máximo – F_v/F_m

Rendimento quântico efetivo – $Y [II]$

Santa Catarina - SC

Taxa de crescimento - TC (português) e GR (inglês)

Taxa de transporte de elétrons - ETR

Vacúolo - V

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. ALGAS MARINHAS.....	28
1.2. GÊNERO <i>Sargassum</i> (C. Agardh, 1820).....	29
1.3. METAIS PESADOS.....	30
1.3.1. Cobre	31
1.3.2. Chumbo	32
1.3.3. Cádmio	32
1.3.4. Manganês	33
1.4. APLICAÇÕES DE MACROALGAS.....	33
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
3.2.1. Cobre e chumbo	42
3.2.2. Cádmio	42
3.2.3. Manganês	43
3.3. SUMÁRIO EXECUTIVO.....	44
3.4. PARÂMETROS ABIÓTICOS.....	47
3.5. RETENÇÃO DE METAIS NA BIOMASSA.....	47
3.6. TAXAS DE CRESCIMENTO.....	48
3.7. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	48
3.8. ANÁLISE <i>in vivo</i> DA CLOROFILA <i>a</i>	49
3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS.....	50
3.9.1. Clorofilas <i>a</i> e <i>c</i>	50
3.9.2. Carotenóides	51
3.10. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	52
3.11. FLAVONÓIDES.....	53
3.12. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH).....	53
3.13. AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AÇÚCARES INSOLÚVEIS.....	54
3.14. MICROSCOPIA DE LUZ.....	55
3.15. CITOQUÍMICAS.....	56
3.16. MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL.....	56
3.17. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	57
3.18. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	58

3.19. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
4. CAPÍTULO I: Efeitos da exposição de cobre e chumbo na ecofisiologia da alga parda <i>Sargassum cymosum</i>.....	61
RESUMO.....	63
4.1. INTRODUÇÃO.....	65
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
4.2.1. Material biológico e condições de cultura em laboratório....	67
4.2.2. Desenho experimental.....	67
4.2.3. Biosorção de Cu e Pb.....	68
4.2.4. Taxa de crescimento (TC)	68
4.2.5. Análise <i>in vivo</i> da fluorescência da clorofila <i>a</i>	68
4.2.6. Análise de pigmentos.....	69
4.2.7. Compostos fenólicos.....	69
4.2.8. Capacidade de redução do radical DPPH.....	70
4.2.9. Microscopia de luz (ML)	70
4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
4.2.11. Análise de dados.....	71
4.3. RESULTADOS.....	71
4.3.1. Biosorção de cobre e chumbo.....	71
4.3.2. Taxas de crescimento (TCs).....	72
4.3.3. Análise <i>in vivo</i> da fluorescência da clorofila <i>a</i>	75
4.3.4. Pigmentos, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	80
4.3.5. Microscopia de luz e citoquímica.....	83
4.3.6. Observações em MEV.....	84
4.4. DISCUSSÃO.....	85
4.5. AGRADECIMENTOS.....	90
4.6. REFERÊNCIAS.....	90
5. CAPÍTULO II: A alga parda <i>Sargassum cymosum</i>: mudanças no metabolismo e na organização celular sob exposição prolongada ao cádmio.....	97
RESUMO.....	99
6. CAPÍTULO III: Os efeitos tóxicos do micronutriente manganês na fisiologia e morfologia de <i>Sargassum cymosum</i> (Ochrophyta, Fucales) no contexto de aclimação a exposição prolongada.....	101
RESUMO.....	103
7. DISCUSSÃO.....	105
8. CONCLUSÃO.....	115
9. REFERÊNCIAS.....	117

1. INTRODUÇÃO

O ambiente costeiro é um sistema dinâmico que passa constantemente por transformações físicas (Silva & Horn Filho, 2009). Entretanto, esta dinâmica é constantemente alterada pelo uso e pela ocupação antrópica, sendo por deposição de rejeitos humanos e/ou por atividades industriais (Melville & Pulkownik, 2007; Silva & Horn Filho, 2009; Gouveia et al., 2013).

As modificações são mais evidentes na perda das qualidades físicas e químicas das águas costeiras (Arana, 2010). De acordo com o grau de alteração, as águas podem ser enquadradas em diferentes classes de uso, e determinam-se quais atividades econômicas e recreativas serão permitidas ou restringidas em determinada região (Brasil, 2005).

Durante muitos anos, as águas costeiras e seus recursos biológicos foram explorados sem a preocupação com a mitigação dos impactos. Além da exploração de organismos selecionados e direcionados para consumo, o uso preponderante destas águas era o de depósito de rejeitos e aporte de águas continentais, o que acelerou o grau de degradação destes ambientes (Marques Júnior et al., 2009).

Um dos agravantes com relação à introdução de rejeitos é o efeito sobre os organismos aquáticos. Muitas espécies são susceptíveis às alterações antrópicas sobre a qualidade de água, e à toxicidade de potenciais poluentes químicos, introduzidos de maneira indiscriminada no ambiente em efluentes e águas residuais (Fichet et al., 1998; Mamboya et al., 1999). Entre os contaminantes potencialmente tóxicos, os metais pesados desempenham importante papel poluente no ambiente (Sheng et al., 2004). Isto se deve ao fato que estes elementos têm participação, direta e indireta, sobre os ciclos biogeoquímicos, na ciclagem de minerais e a alta persistência sedimentar (Pagliosa et al., 2006).

Diversos organismos aquáticos são capazes de reterem substâncias tóxicas em suas células e tecidos, como mecanismo de defesa aos poluentes. Esta capacidade é denominada de bioacumulação (Davis et al., 2003). Como o grau de bioacumulação é variável entre as espécies, e de acordo com o poluente considerado, os efeitos ecológicos não são facilmente mensuráveis. A partir dos produtores primários, há a possibilidade de bioamplificação dos efeitos tóxicos na cadeia trófica (Ruangsomboona & Wongrat, 2006; Jothinayagi & Anbazhagan, 2009). Algumas espécies de macroalgas marinhas, por exemplo, são capazes de acumular quantidades relativamente elevadas de metais pesados, e estes poluentes podem entrar na cadeia trófica por consumo direto de

macroinvertebrados e peixes (Mamboya et al., 1999; Hu et al., 2010), atingindo níveis elevados de consumidores da cadeia.

1.1. ALGAS MARINHAS

A denominação de macroalgas não possui significado taxonômico *stricto sensu*, o que permite englobar organismos que partilham como características comuns presença da clorofila *a*; a não diferenciação da estrutura do talo em tecidos verdadeiros (como raiz, caule e folha); e sem proteção de suas células reprodutivas (Raven et al., 2007). Ecologicamente as macroalgas estão classificadas como produtores primários, ou seja, junto com outros fotossintetizantes (microalgas, protistas e bactérias), constituem a base das cadeias tróficas aquáticas, e utilizam nutrientes inorgânicos na composição da matéria orgânica (Pinto-Coelho, 2008).

Ao longo da história evolutiva, as macroalgas se diferenciaram em grandes grupos, com caracteres fisiológicos e anatômicos que são utilizados para a sua segregação. Atualmente, são reconhecidas três Divisões para as macroalgas: as Chlorophyta, as Rhodophyta e as Ochrophyta da classe Phaeophyceae (Lee, 2008). Se considerado o ambiente no qual estes organismos evoluíram, é possível perceber que estão intimamente associados ao fluxo de matéria e energia, e oferecem hábitat e substrato para a proteção e nutrição de micro e macroinvertebrados, como refúgio reprodutivo e de desenvolvimento de larvas e juvenis (Nassar et al., 2010).

Uma peculiaridade das macroalgas é a composição de suas paredes celulares, com a presença de diferentes classes de polissacarídeos. Os polissacarídeos que atraem maior interesse do ser humano são os ágaros e as carragenanas, presentes nas algas pertencentes à Divisão Rhodophyta, e o alginato, encontrado nas algas da Classe Phaeophyceae. Estes compostos têm ampla aplicabilidade nas indústrias alimentícia, farmacêutica e têxtil, como espessantes e gelificantes (McHugh, 2003). Já para as algas, estes polissacarídeos possuem grande importância como componente estrutural, pois conferem ao talo resistência mecânica à ação das ondas, e também proteção contra dessecação celular para espécies que ficam expostas ao ar durante as oscilações de maré do mesolitoral inferior e infralitoral superior (Lee, 2008).

As algas pardas, pertencentes à classe Phaeophyceae, são caracterizadas por apresentarem grande quantidade de pigmentos acessórios, os carotenóides (xantofilas e fucoxantinas, características do

grupo), que conferem a estas algas a sua cor marrom típica. São também características deste grupo de algas a presença da clorofila *c*, e o seu produto de reserva na forma de laminarina (Nassar et al., 2010). Suas paredes celulares são compostas por um elemento estrutural, a celulose, e um componente amorfo, formado por ácido alginico e fucoidina, os polímeros de alginato (Oliveira, 2003; Lourenço, 2006). Em relação a sua fisiologia, as algas pardas possuem uma gama de componentes moleculares antioxidantes que despertam a atenção quanto a sua eficiência como mecanismo de defesa. Como exclusividade do grupo, é identificado os florotaninos, um grupo específico de compostos fenólicos estritos a polímeros de floroglucinol. São armazenados em estruturas membranosas, os fisóides, com atuação como agentes antioxidantes intracelularmente e também na composição estrutural extracelular de paredes. São reconhecidos pela sua plasticidade na resposta das algas pardas a fatores de estresse, como herbivoria, exposição à radiação ultravioleta e também a contaminantes e poluentes químicos, como metais pesados (Koivikko, 2008; Sathya et al., 2013).

1.2. GÊNERO *Sargassum* (C. Agardh, 1820)

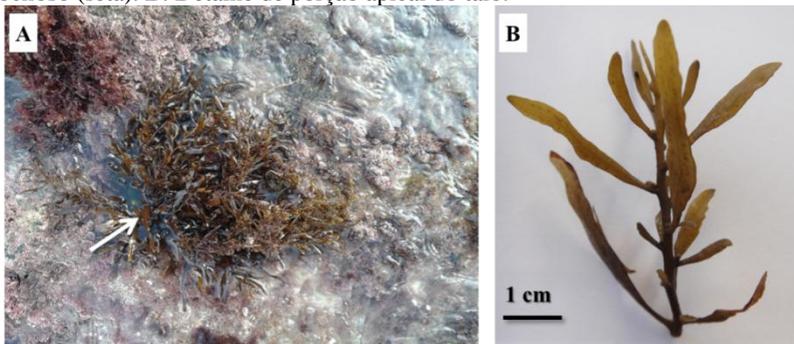
Entre as algas pardas, o gênero *Sargassum* (C. Agardh, 1820), pertencente à ordem Fucales, inclui organismos que estão distribuídos em zonas tropicais e subtropicais. No Brasil, 10 espécies e 12 variedades de *Sargassum* são registradas com distribuição ao longo da costa, onde podem representar a maior parte da comunidade algal em algumas regiões. A sua proporção em extensão de ocupação e importância na estrutura da comunidade variam entre as regiões do litoral brasileiro. Fatores como composição do substrato e a amplitude de variação de ondas e marés são determinantes para a distribuição do gênero (Széchy & De Paula, 2000; Forzza et al., 2010).

Dentre as espécies de *Sargassum* ocorrentes no Brasil, a espécie *Sargassum cymosum* (C. Agardh, 1820) é encontrada do estado do Ceará até o estado do Rio grande do Sul (Forzza et al., 2010). É caracterizada pela coloração marrom a marrom-esverdeada do talo, organizado em eixo cilíndrico ereto e fixo ao substrato por apressório rígido. Filóides distribuídos espiralamente no eixo cilíndrico, com formato lanceolado a linear-lanceolado, raramente bifurcados, com dentições marginais irregulares. Apresentam também vesículas gasosas com função flutuadora ao longo do talo. Podem ser monóicas ou dióicas, com oogônios e anterídeos localizados em conceptáculos individualizados. Sua distribuição se dá em plataformas e costões

rochosos, em zonação que lhes permite ficarem parcial ou completamente submersas em períodos de maré baixa, formando populações densas (Figura 1) (Ouriques, 2011).

Para Santa Catarina, Ouriques (2011), em sua revisão da distribuição de algas pardas, identificou sete espécies de *Sargassum* como ocorrentes no estado. Dentre estas, a espécie *S. cymosum* conta com duas variedades (*S. cymosum* var *cymosum* C. Agardh e *S. cymosum* var *nanum* E. de Paula & E. Oliveira). Sua distribuição é descrita para todo o litoral catarinense, em costões rochosos parcial ou completamente emersos na maré baixa. Com base na chave dicotômica de identificação de Ouriques (2011), determinou-se que a espécie avaliada no presente estudo foi *S. cymosum* var *cymosum*.

Figura 1: Exemplos de *Sargassum cymosum* coletados na Praia da Armação do Pântano do Sul, Florianópolis, SC. **A.** Detalhe da macroalga no costão rochoso (seta). **B.** Detalhe de porção apical do talo.



1.3. METAIS PESADOS

Os metais são elementos encontrados na forma de minerais na crosta terrestre, associados a rochas e a sedimentos. Recebem a denominação de metais pesados pela sua conformação e pesos atômicos, com densidades iguais ou superiores a 5 g.cm^{-3} . Os metais pesados são altamente persistentes na coluna de água e nos sedimentos com formas iônicas livres que possuem alta permeabilidade em tecidos e células. Por esta característica adquirem o potencial tóxico para os mais diversos grupos de organismos (Rai et al., 1981; Duruibe et al., 2007).

Reconhecidamente ao seu potencial tóxico, existem legislações específicas para o controle e o monitoramento da qualidade das águas residuais que são depositadas em corpos hídricos dulcícolas, salobres e

marinhos. No Brasil, observa-se a atuação da Resolução nº 430, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2011), que determina limites permitidos de concentração de compostos químicos inorgânicos e orgânicos contidos em efluentes e águas residuais, para que estes sejam depositados em ambientes naturais sem ocasionar prejuízos na comunidade biológica, nem alterações físicas e químicas significativas na qualidade de água.

Os elementos metálicos se encontram de forma livre sobre a crosta, seja na forma mineral sobre o leito sedimentar, ou na forma iônica livre em suspensão no meio aquático (Popp, 1998). A sua disponibilidade superficial se dá principalmente pela ação antrópica de mineração. Certos metais, como mercúrio (Hg^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cádmio (Cd^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), são mais comumente inseridos no ambiente através das descargas aquáticas continentais. O refino de combustíveis, a produção de tintas, a metalurgia, a produção de ligas metálicas, a fertilização e aplicação de pesticidas agrícolas são atividades responsáveis pelos maiores volumes introduzidos de metais pesados livres e em suspensão no ambiente, lançados de maneira contínua (Sheng et al., 2004; Alahverdi & Savabieasfahani, 2012).

Entre os metais com alta aplicação industrial, o cobre, o chumbo, o cádmio e o manganês são altamente difundidos quanto aos seus usos, pela sua boa trabalhabilidade e facilidade na incorporação de ligas metálicas. Sua entrada e deposição em ambientes aquáticos ocorrem majoritariamente por escoamento e lixiviação superficiais (Lana et al., 2006; Demori, 2008; Brasil, 2009; CETESB, 2012). Estes elementos impactam diretamente organismos fotossintetizantes aquáticos, pela toxicidade que exercem sobre eles quando em concentrações mais elevadas que as requeridas para a manutenção dos processos metabólicos.

1.3.1. Cobre

O cobre é amplamente utilizado nas indústrias metalúrgica, eletroquímica, e na composição de pesticidas agrícolas. É relativamente inerte em condições naturais, e é encontrado em diferentes formas minerais. Possui baixa mobilidade no solo, mas alto dinamismo na forma iônica encontrada em soluções, especialmente em suspensões argilosas. Sua forma iônica mais comum é a forma bivalente (Cu^{2+}) (Popp, 1998; Andrade et al., 2004).

Como micronutriente, reconhece-se o papel do cobre em funções fisiológicas, na composição estrutural de enzimas relacionadas aos

processos fotossintetizantes, e especialmente para a proteína plastocianina. Por outro lado, o excesso do elemento gera uma série de danos anatômicos e estruturais para as algas (Babu et al., 2014). O cobre é relacionado à alteração da permeabilidade de membranas, peroxidação de lipídios, inibição do transporte de elétrons em cadeia da fotossíntese, com sua consequente inibição (Rai et al., 1981; Macêdo & Morril, 2008).

1.3.2. Chumbo

O chumbo é utilizado na metalurgia, na composição de tintas, fertilizantes e pesticidas agrícolas, e em ligas metálicas. Encontra-se na natureza na forma mineral de galena (PbS), sendo um elemento traço inclusive na composição mineral de rochas e do solo (Popp, 1998; Melo et al., 2012).

Sua função como micronutriente não é bem entendida para as algas, e o papel metabólico que desempenha não é esclarecido. São relatadas alterações positivas no crescimento quando em pequenas concentrações, mas os danos celulares e subcelulares são mais evidentes, mesmo em concentrações traço (menores que 1,0 mg de chumbo a cada 1,0 kg de biomassa). O chumbo é associado às alterações na taxa de transporte de elétrons da cadeia fotossintética, redução das taxas respiratórias, diminuição das taxas de crescimento e das divisões celulares mitóticas (Rai et al., 1981; Macêdo & Morril, 2008).

1.3.3. Cádmio

Cádmio é um metal maleável, utilizado em escala industrial na composição de ligas metálicas, para a fabricação de pilhas e células fotoelétricas, corantes na indústria têxtil e especialmente na composição de pesticidas agrícolas, sua principal forma de entrada e deposição na superfície terrestre. É encontrado na natureza em forma inerte e de fácil oxidação, associado aos sulfetos dos minérios de zinco, cobre e chumbo, em baixos percentuais. Como mineral, encontra-se na forma de grenoquita, em proporções muito pequenas da litosfera (Popp, 1998; CETESB, 2012).

Seus efeitos tóxicos sobre organismos fotossintetizantes são amplos e afetam drasticamente o metabolismo. O cádmio é associado à alteração da atividade enzimática, a redução da permeabilidade de membranas, a alteração da conformação das membranas dos tilacóides e mitocôndrias, ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, a inibição

da assimilação do CO₂ para a fotossíntese, as alterações morfológicas com redução de crescimento, e a indução da redução do conteúdo pigmentar (Rai et al., 1981; Macêdo & Morril, 2008).

1.3.4. Manganês

Dentre os metais anteriormente descritos, o manganês é um dos mais abundantes na crosta terrestre. Seus minérios estão associados a rochas basálticas e a minerais ferrosos. É amplamente empregado na composição de ligas metálicas, em especial no preparo do aço, mas com aplicações na indústria química, na composição de fertilizantes e rações, e na fabricação de pilhas (Brasil, 2009; Uren, 2013).

O manganês é um micronutriente de grande importância na manutenção metabólica e enzimática de algas. É relatada a sua utilização nos processos de crescimento, produção de oxigênio, atuação nos sítios ativos das enzimas do ciclo de Krebs. Por outro lado, quando em altas concentrações, o manganês é relacionado a efeitos negativos sobre a fisiologia de algas, como a inibição da formação de gametas, a diminuição das taxas de crescimento e alterações no volume e forma celulares (Rai et al., 1981).

1.4. APLICAÇÕES DE MACROALGAS

Sob a perspectiva biotecnológica, diferentes estudos vêm sendo conduzidos para o uso de materiais biológicos como retentores de metais tóxicos de procedência industrial. Juntamente com bactérias, conchas de moluscos, exoesqueleto de crustáceos, e biomassa de fungos, por exemplo, as macroalgas marinhas tem alto potencial de aplicação (Davis et al., 2003; Jacinto et al. 2009; Ibrahim & Mutawie, 2012).

Para a aplicação da biomassa de macroalgas, duas vertentes de aplicação são propostas. A primeira, com a utilização da biomassa seca, que constitui o processo denominado de biosorção, onde o efluente é carregado por biofiltros de macroalgas e os poluentes neles ficam retidos. A segunda, com a aplicação da biomassa fresca em processo denominado de bioacumulação, que é dependente do metabolismo ativo dos organismos, cultivados no meio aquoso contendo os poluentes que devem ser removidos (Davis et al., 2003).

As macroalgas são um material biológico de baixo custo e relativamente fáceis de manipulação para uso em biosorção (Fourestand & Volesky, 1996; Freitas et al., 2008). Além disso, há a previsibilidade do potencial de retenção dos metais pelos polissacarídeos da parede

celular (Vieira & Volesky, 2000; Kleinübing et al., 2012). Outra vantagem do uso de macroalgas, é que após a sua utilização no tratamento do efluente, os elementos metálicos sequestrados são passíveis de recuperação por tratamento químico da biomassa (Duta et al., 2002). Assim, o uso de macroalgas como biosorventes pode reduzir os custos operacionais para o tratamento quando os metais estão em baixa concentração no efluente, em comparação aos métodos tradicionais empregados na indústria (Brinza et al., 2009).

Nas macroalgas, diferentes mecanismos são identificados e reconhecidos como capazes de reterem metais pesados, sendo mecanismos independentes metabolicamente, como a adsorção física e química, interação eletrostática, troca iônica, complexação, redução, quelação e microprecipitação (Jacinto et al., 2009). Todos estes mecanismos ocorrem ao nível da superfície celular, de acordo com os diferentes grupos funcionais disponíveis para a associação e interação com os cátions metálicos. Neste processo de biosorção, os metais dissociados no sistema aquoso são retidos no material biológico, através das reações com os grupos funcionais da parede celular das algas (Romera et al., 2007).

Nos estudos *in vitro*, a biomassa das algas pardas mostrou-se altamente eficiente para a remoção de metais de águas residuais em baixas concentrações do poluente no efluente (Kaewsarn, 2002; Freitas et al., 2008; Luna et al., 2010). O alginato, presente nas paredes celulares, apresenta agrupamentos carboxílicos reativos, com alta afinidade iônica pelos cátions bivalentes, como cádmio (Cd^{2+}), cobalto (Co^{2+}), cobre (Cu^{2+}), ferro (Fe^{2+}), níquel (Ni^{2+}) e chumbo (Pb^{2+}) (Davis et al., 2003). Entretanto, esta afinidade também é dependente dos fatores abióticos do meio considerado. Experimentalmente, demonstra-se que fatores como pH, salinidade, temperatura e a presença de um ou mais componentes metálicos em solução, são responsáveis pela maior ou menor afinidade de ligação, além de existirem diferentes afinidades e potencial de biosorção de acordo com o tipo de metal e considerando a interação competitiva entre eles pelos sítios de ligação (Liu et al., 2009; Jesus, 2010; Souza et al., 2013).

Simultaneamente, estudos podem ser conduzidos para a melhor compreensão da dinâmica metabólica das algas, e dos mecanismos celulares de defesa que lhes proporcionam a sobrevivência quando em contato com compostos tóxicos com efeito de estresse oxidativo (Davis et al., 2003). Além disso, a investigação dos limites tóxicos, e das alterações fisiológicas e metabólicas pode contribuir positivamente aos estudos de aplicação biotecnológica na aplicação de biomassa para a

bioacumulação de compostos de interesse, e para o uso em medidas de biorremediação e obtenção de compostos metabólicos secundários de interesse (Hall, 2002; Dummermuth et al., 2003; Pinto et al., 2011).

Do ponto de vista ecológico, estudos recentes apontam que as atividades humanas em zonas costeiras têm alto potencial de acarretar o declínio de populações naturais (Sala & Knowlton, 2006). A comunidade bentônica é altamente influenciada pelos padrões de qualidade física e química da coluna de água, e as alterações neste compartimento podem acarretar mudanças nos padrões espaço-temporais da comunidade (Lisboa et al., 2011).

As macroalgas marinhas, como organismos bentônicos e com diversas espécies como representantes perenes na comunidade, são apontadas como bons indicadores da qualidade das águas e da presença de contaminantes. Neste contexto, elas podem ser usadas tanto como biomonitoras quanto bioindicadoras. O uso como biomonitoras se aplica quando as algas acumulam os poluentes em suas células, e permitem a quantificação da fração biodisponível. Por outro lado, a denominação de bioindicadores se dá as espécies que, pela sua presença ou ausência no ambiente e pelo seu estado fisiológico, permitem a especulação sobre a presença de um ou mais poluentes (Melville & Pulkownik 2007). Ainda assim, o uso de uma determinada macroalga como biomonitor ou bioindicador respeita as variações e flutuações, regionais e sazonais, da zona costeira de onde são procedentes as amostras (Karez et al., 1994).

Existem relatos (Thibaut et al., 2005) de que os impactos antrópico têm levado à extinção de algumas espécies de algas marinhas mediterrâneas dos gêneros *Cystoseira* spp. e *Sargassum* spp. Associativamente, os autores apontam que no estudo, a compilação e a análise de dados populacionais históricos são citadas como boas estratégias de compreensão da dinâmica das comunidades de fitobentos marinhos, e para a quantificação dos impactos antrópico no ambiente.

No Brasil, foram realizados estudos com a contaminação ambiental de águas costeiras e dos impactos sobre comunidades aquáticas resultantes da introdução de metais pesados. De maneira semelhante ao observado para as espécies mediterrâneas anteriormente citadas, as populações algáceas bentônicas brasileiras também vêm sofrendo com a ação antrópica, especialmente próximas a centros urbanos e áreas portuárias. Entre as interferências antrópicas que, direta ou indiretamente afetam as macroalgas ao longo da costa brasileira, está a introdução de químicos e poluentes vindos das atividades industriais e da navegação (Brito et al., 2002; Faveri et al., 2010).

Na costa catarinense, Demori (2008) realizou um levantamento histórico de dados sobre os impactos industriais por químicos no ambiente da Baía da Babitonga, indicando o aumento na deposição de metais pesados no sedimento ao longo das décadas, desde a instalação de parques industriais no entorno da baía. Na Ilha de Santa Catarina, é apontado por Bouzon et al. (2006) as variações na diversidade de macroalgas bentônicas em relação ao grau de urbanização da costa. Por sua vez, Batista (2012) relata a variação temporal na diversidade, possível indicativo de mudanças nos parâmetros abióticos, como caracterização do substrato e da turbidez aparente, associativamente ao aumento da urbanização no entorno dos ambientes amostrados.

Desta maneira, a quantificação dos efeitos advindos da toxicidade de metais pesados visa à contribuição no conhecimento sobre os danos sofridos pelas algas em ambiente natural, com embasamento ao biomonitoramento de zonas costeiras, para a mitigação de impactos antrópico e melhor compreensão da dinâmica da comunidade fitobêntica (Brito et al., 2002). Com isto, é possível a proposição de metodologias novas para avaliação da acumulação tecidual destes elementos nos organismos e o grau de permanência das substâncias nocivas no ambiente (Lana et al., 2006; Demori, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos metais cádmio, chumbo, cobre e manganês em *Sargassum cymosum*, por meio de observações das alterações morfológicas e fisiológicas em a resposta à toxicidade destes metais sobre a macroalga.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar comparativamente as taxas de crescimento e possíveis alterações morfológicas de *S. cymosum* quando cultivado com os metais individualmente e em associação (todos os metais);

-Avaliar o potencial de bioacumulação e bioconcentração dos metais em *S. cymosum* (todos os metais);

-Verificar a viabilidade celular, pela presença de enzimas mitocondriais antioxidantes (ensaio com Cd e Mn);

-Avaliar as variações nos padrões de eficiência fotossintética de *S. cymosum* exposto aos metais pesados e a viabilidade de recuperação dos exemplares quando cultivados em condições controladas de laboratório (ensaio com Cu, Pb e Cd);

-Analisar e quantificar os pigmentos fotossintetizantes clorofilas *a* e *c* (todos os metais), os carotenóides totais (todos os metais), o perfil de carotenóides (fucoxantina, luteína e β -caroteno) (ensaio com Cd e Mn), os compostos fenólicos totais (todos os metais), flavonóides (ensaio com Cd e Mn) e a atividade antioxidante (DDPH) (ensaio com Cu e Pb), em resposta aos fatores de estresse;

-Quantificar os conteúdos de carboidratos totais solúveis e insolúveis (ensaio com Cd e Mn);

- Identificar e quantificar as alterações pigmentares no meio de cultura, pela liberação de compostos fenólicos pelas algas (ensaio com Cu e Pb);

-Analisar as alterações morfológicas em *S. cymosum* decorrentes da aplicação dos tratamentos (todos os metais);

-Analisar alterações na autofluorescência de cloroplastos e dos compostos fenólicos, e marcação de fluorescência nas paredes celulares (ensaio com Mn).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

A macroalga *Sargassum cymosum* foi coletada em dois bancos naturais dos costões rochosos de Florianópolis, Ilha de Santa Catarina. Este procedimento foi adotado pela acessibilidade aos bancos, e pela disponibilidade de biomassa para os ensaios experimentais. Na Praia da Armação do Pântano do Sul ($27^{\circ}44'42''$ S e $48^{\circ}30'27''$ O), foram realizadas coletas nos meses de Maio, Julho e Agosto de 2013 (Figura 2), para os ensaios com cobre e chumbo; enquanto que na Praia de Ponta das Canas ($27^{\circ}23'34''$ S e $48^{\circ}26'11''$ O) as coletas ocorreram nos meses de Julho, Agosto e Novembro de 2014, e em Janeiro, Fevereiro e Maio de 2015 (Figura 3), para os ensaios com cádmio e manganês.

Figura 2: Ponto de coleta [I] de *Sargassum cymosum*. **A.** Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **B.** Praia da Armação do Pântano do Sul, sul da Ilha de Florianópolis. Setas indica local de acesso ao ponto de coleta pela vista aérea de área de estudos. **C.** Vista do costão rochoso onde foram coletados os exemplares de *S. cymosum*.

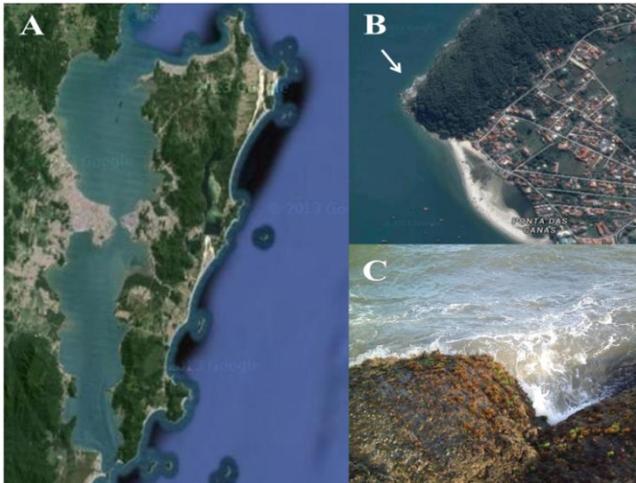


As coletas foram realizadas manualmente, com o auxílio de espátulas, durante a maré baixa (entre 0,0 e 0,3 metros de amplitude). Após a coleta, os exemplares foram acondicionados em sacos plásticos, refrigerados, e transportados ao Laboratório de Biologia Celular

Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas (CCB), na Universidade Federal de Santa Catarina.

O material foi triado, lavado com água marinha esterilizada, para remoção de epífitas e contaminantes. Após a limpeza, foram aclimatados em câmara de cultivo.

Figura 3: Ponto de coleta [II] de *Sargassum cymosum*. A - Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. B- Praia de Ponta das Canas, norte da Ilha de Florianópolis. Seta indica local de acesso ao ponto de coleta pela vista aérea de área de estudos. C-Vista do costão rochoso onde foram coletados os exemplares de *S. cymosum*.



3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O material triado foi acondicionado em recipientes plásticos de cinco litros, e mantido em câmara de cultivo por um período de sete dias para aclimação. Neste ambiente, as algas foram submetidas às condições controladas de laboratório, mantidas sob aeração constante, temperatura de 24 ± 2 °C, e fotoperíodo de 12 h (iniciando as 8 h da manhã). A iluminação foi proporcionada por lâmpadas fluorescentes (Philips C-5 Super 84 16W/840), com uma irradiância de 70 ± 5 e 80 ± 5 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As medições da irradiância foram feitas com o uso de um quantâmetro Solar Light PMA 2100 (Glenside, PA, USA) e o sensor plano Solar Light 2132 (Glenside, PA, USA).

Foi utilizada água do mar esterilizada por filtração mecânica e passagem por radiação ultravioleta, com salinidade de 35 unidades padrão de salinidade (ups). O enriquecimento foi feito com meio nutritivo von Stosch (Tabela 1; Edwards, 1972), na concentração de $4,0 \text{ mL.L}^{-1}$ (VS 50% ou VS/2). O meio de cultura foi adaptado para as condições experimentais, não sendo realizada a adição do componente ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que por sua ação quelante poderia reduzir ou não permitir a disponibilidade dos íons metálicos dos tratamentos pretendidos no meio de cultura.

Após o período de aclimação, os exemplares foram novamente lavados em água do mar esterilizada. Segmentos do talo, correspondentes e porções apicais de $2,0 \pm 0,1 \text{ g}$, foram obtidos após pesagem em balança para aplicação nos tratamentos. Foram selecionados preferencialmente talos nos quais não se constatou visualmente a presença de estruturas reprodutivas.

Tabela 1: Composição química do meio nutritivo von Stosch, para o preparo de 2 L de solução padrão. Reagentes utilizados: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), nitrato de sódio (NaNO_3), fosfato de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$), sulfato de ferro (FeSO_4), e cloreto de manganês hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$).

Reagentes	Soluções padrão em água destilada	Concentração dos reagentes
EDTA	-	0,93 g
NaNO_3	-	10,625 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	-	2,0112 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	-	0,1738 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	-	0,0248 g
Tiamina	0,100 g/100 mL	25 mL
Biotina	0,0125 g /100 mL	1,0 mL
Cianocobalamina	0,0125 g /100 mL	1,0 mL

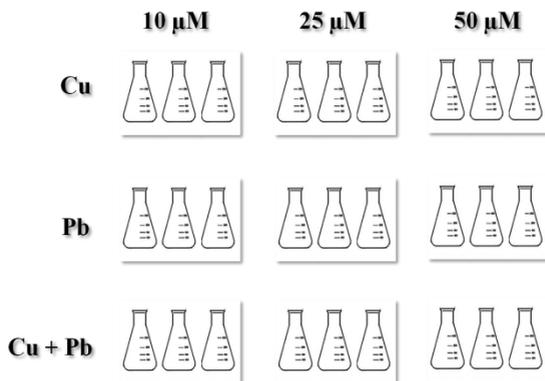
Fonte: Adaptado de Edwards (1972).

No presente estudo, foram aplicados tratamentos com os metais pesados cobre, chumbo, cádmio e manganês, na forma química de cloretos (CuCl_2 , PbCl_2 , CdCl_2 e MnCl_2 , respectivamente). Os metais foram aplicados em diferentes delineamentos experimentais, de acordo com o ensaio pretendido.

3.2.1. Cobre e chumbo

Para os metais cobre e chumbo, os tratamentos avaliados englobaram três concentrações do metal cobre (Cu a 10, 25 e 50 μM), três concentrações do metal chumbo (Pb a 10, 25 e 50 μM), além da combinação dos metais, nas mesmas concentrações (Cu + Pb a 10, 25 e 50 μM de cada elemento) (Figura 4). O tratamento controle compreendeu o cultivo em meio de água marinha esterilizada, sem a adição de metais. Todos os tratamentos foram enriquecidos com o meio von Stosch, na concentração de 4,0 mL.L^{-1} , sem adição do sal EDTA, responsável por quelar os metais presentes no meio, e interferente sobre os tratamentos aplicados. O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, e conduzido em triplicata, por período de sete dias, contando-se com o número amostral total de trinta unidades experimentais.

Figura 4: Delineamento experimental para exposição aos metais cobre e chumbo, por período de sete dias.

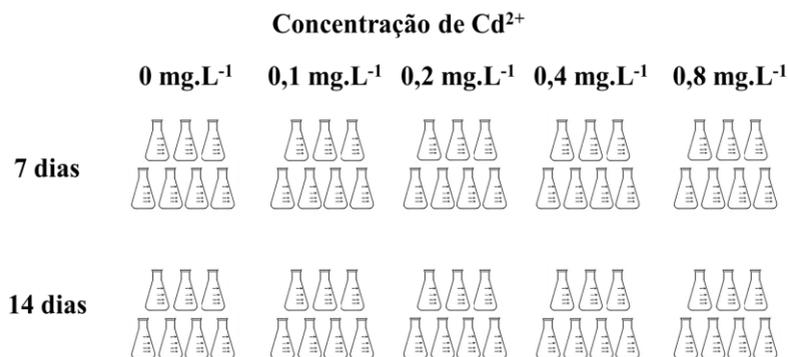


3.2.2. Cádmio

O ensaio com o metal cádmio foi conduzido aplicando-se quatro concentrações do metal (0,1; 0,2; 0,4; e 0,8 mg.L^{-1}), além do tratamento controle, composto apenas de água marinha esterilizada e sem adição de metais. Este delineamento foi baseado no trabalho de Rovai et al. (2013), com concentrações do metal similares as encontradas naturalmente em ambientes de manguezal de Florianópolis, SC. Similarmente, todos os tratamentos foram enriquecidos com o meio nutritivo von Stosch sem EDTA, na concentração de 4,0 mL.L^{-1} (VS/2).

O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, e conduzido em duas etapas. A primeira, correspondente à exposição ao metal por período de sete dias, e a segunda, a exposição ao metal por período de quatorze dias. Em ambas as séries experimentais, os tratamentos foram aplicados em septuplicata, contando um número amostral total de setenta unidades experimentais (Figura 5). Neste experimento, também foram procedidas análises com o material fresco, obtido diretamente do campo.

Figura 5: Delineamento experimental para exposição ao metal cádmio, por período experimental de sete e de 14 dias.

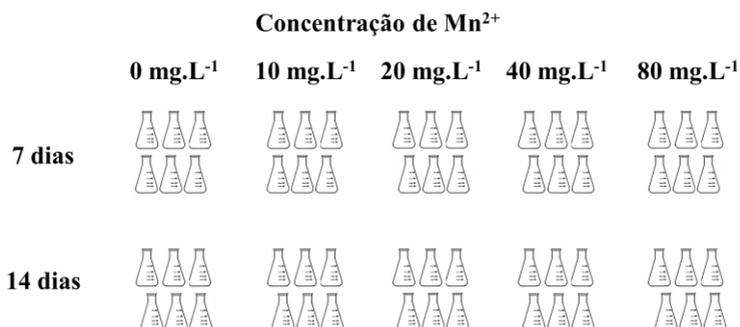


3.2.3. Manganês

Na avaliação de toxicidade ao manganês, que além de metal pesado é um elemento micronutriente, foram realizados ensaios de toxicidade, para determinação dos níveis de tolerância da espécie e do cálculo de IC₅₀. No primeiro ensaio, foram aplicadas concentrações crescentes de Mn (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mg.L⁻¹), em ensaio de toxicidade crônica (n=3 por concentração). A seleção das concentrações experimentais foi determinada com base nos parâmetros de taxa de crescimento e viabilidade celular (MTT). No segundo ensaio, foram aplicadas quatro concentrações do metal (10, 20, 40, e 80 mg.L⁻¹), além do tratamento controle, composto apenas de água marinha esterilizada e sem adição de metal. Os tratamentos foram enriquecidos nas mesmas condições dos dois ensaios anteriormente descritos, acondicionados em frascos Erlenmeyer de 500 mL. O experimento foi realizado setuplicata, contando um número amostral total de sessenta unidades experimentais. A condução de ambos os experimentos se deu similarmente ao ensaio

com cádmio, com a primeira etapa correspondente à exposição ao metal por período de sete dias, e a segunda, a exposição ao metal por período de catorze dias (Figura 6). Também foram procedidas análises com o material fresco, obtido diretamente do campo.

Figura 6: Delineamento experimental para exposição ao metal manganês, por período experimental de sete e de 14 dias.



3.3. SUMÁRIO EXECUTIVO

Os delineamentos experimentais para cada metal analisado foram modificados ao longo da condução experimental. Tais mudanças foram embasadas em fatores teóricos e práticos, que justificassem as alterações propostas. Em todos os trabalhos conduzidos, objetivou-se a análise de toxicidade aos efeitos dos metais com relação ao seu efeito crônico, ou seja, em concentrações toleráveis pelo organismo em estudo por período prolongado de tempo (mínimo de sete dias de exposição). Sendo assim, os metais com nível menor de toxicidade relatado em literatura foram adicionados por períodos prolongados.

Em relação às análises realizadas, a inclusão ou exclusão de algumas técnicas foram feitas em acordo com: 1) disponibilidade de recursos (reagentes, espaço físico e equipamentos) para sua realização; 2) acoplamento de técnicas para corroborar ou refutar a hipótese de trabalho, em consonância com os demais testes realizados; e 3) viabilidade executiva sem comprometimento de tempo hábil para realização das análises principais propostas.

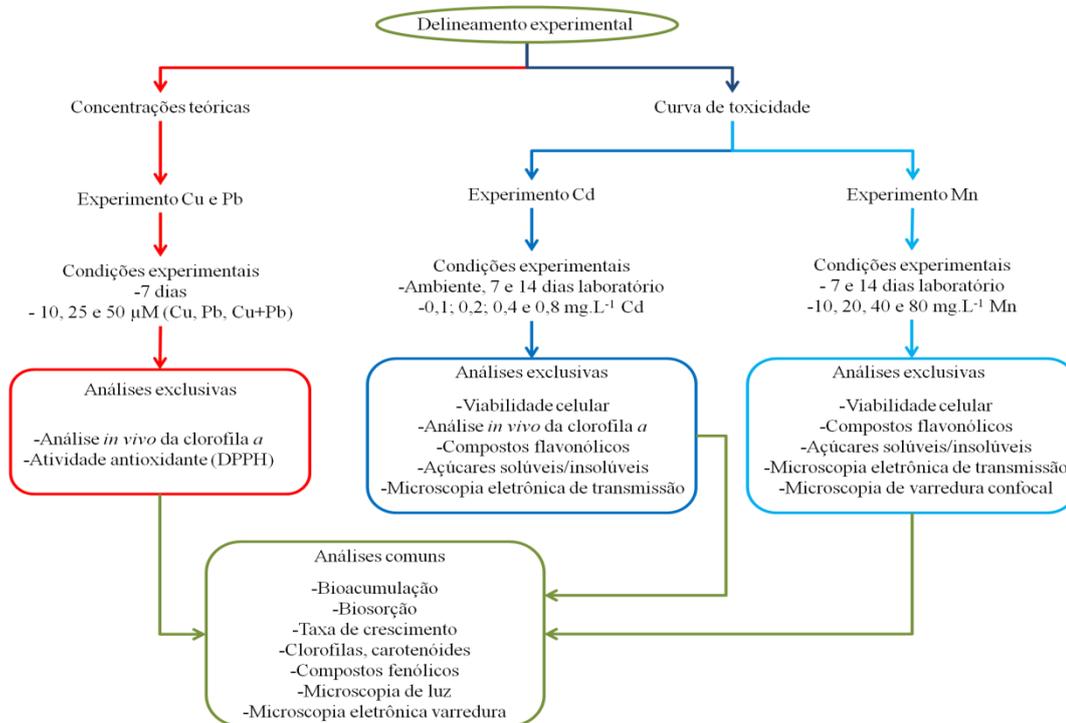
Para melhor visualização das análises realizadas em todas as séries experimentais, foi elaborado um sumário, comparando os diferentes resultados obtidos em cada delineamento proposto (Tabela 2). E para a melhor visualização das etapas experimentais realizadas, os

trabalhos analíticos estão descritos e representados em organograma de atividades (Figura 7). Nos capítulos seguintes, estão destacadas diferenças pontuais aplicadas nos protocolos analíticos em cada um dos delineamentos experimentais. Estas pequenas alterações foram decorrentes das propriedades das amostras analisadas, e das necessidades de ajustes de diluições. Os valores das curvas padrões foram ajustados em cada procedimento, e seus respectivos valores são apresentados nos escopos dos artigos.

Tabela 2: Sumário executivo das análises realizadas com *S. cymosum*, exposto aos metais cobre, chumbo, cádmio e manganês.

Delineamento experimental			
Análise	Cobre e Chumbo	Cádmio	Manganês
Oxigênio dissolvido		X	X
pH		X	X
Bioacumulação	X	X	
Biosorção	X	X	X
Taxa de crescimento	X	X	X
Viabilidade celular		X	X
Análise in vivo de clorofila <i>a</i>	X	X	
Quantificação de clorofilas	X	X	X
Quantificação de carotenóides totais	X	X	X
Perfil de carotenóides		X	X
Compostos fenólicos	X	X	X
Compostos flavonóides		X	X
Atividade antioxidante (DPPH)	X		
Açúcares solúveis / insolúveis		X	X
Microscopia de luz	X	X	X
Microscopia eletrônica (varredura)	X	X	X
Microscopia eletrônica (transmissão)		X	X
Microscopia de varredura confocal			X

Figura 7: Organograma de análises bioquímicas, ultra-estruturais e de parâmetros abióticos, empregadas nos delineamentos experimentais dos experimentos aplicados em *S. cymosum* com os metais pesados cobre, chumbo, cádmio e manganês.



3.4. PARÂMETROS ABIÓTICOS

Durante os ensaios com os metais cádmio e manganês, foi mensurado o parâmetro abiótico de pH, e para cádmio, também foi observada a concentração de oxigênio dissolvido (OD; mg.L^{-1}). Estes parâmetros foram mensurados para acompanhamento das condições de cultura e manutenção dos padrões estabelecidos. No início de cada ensaio, foi mensurado o pH de todos os tratamentos com adição de metais (pHmetro Ion pHB 500, com precisão de duas casas decimais) incluindo o controle (n=4). As medições foram realizadas periodicamente a cada dois dias de intervalo. Após o início dos ensaios de cádmio, em intervalos de dois dias, foi mensurada a concentração de OD, usando um oxímetro portátil (Lutron DO-5519), para todos os tratamentos, incluindo o controle (n=4; calibração em 35 ups).

3.5. RETENÇÃO DE METAIS NA BIOMASSA

As concentrações de metais na água da cultura e na biomassa das algas (no início e término dos ensaios) foram analisadas por espectrometria induzida de emissão atômica com plasma acoplado (ARCOS ICP-OES; SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Alemanha). As análises foram conduzidas no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (CTC, UFSC). As concentrações foram mensuradas através de reagentes com os seguintes graus analíticos: 324,754 ηm para Cu; 220,353 ηm para Pb; 214,244 ηm para Cd; e 257,610 ηm , com limite de detecção de 0,001 ppm para cada um dos elementos.

Para a quantificação dos metais foram adotados os procedimentos descritos por Felix et al. (2014). As amostras de alga ($1,0 \pm 0,1$ g), tanto do início quanto do término dos experimentos, foram lavadas em água destilada, secas a 65°C e digeridas em ácido nítrico concentrado (n=4). As amostras de água (50 mL; n=4) foram digeridas usando ácido nítrico concentrado. A absorção total dos metais foram expressas em valores percentuais, calculadas com base na massa (mg) dos metais em 500 mL de água, e por massa de metais (mg) em 1,0 g de biomassa fresca. Por sua vez, o fator de bioconcentração foi calculado com a concentração de metal na biomassa fresca (expressa em ppm), dividida pela concentração inicial de metais adicionados no meio de cultura.

3.6. TAXAS DE CRESCIMENTO

Na avaliação do efeito dos tratamentos sobre *S. cymosum*, a determinação das taxas de crescimento foi feita pela pesagem da biomassa úmida, no início e ao final do experimento. A diferença entre os valores de biomassa observados foi expressa como percentual de crescimento diário, de acordo com a equação de Lignell & Pedersén (1989) [1]:

$$TC = \left[\frac{M_{\text{final}}}{M_{\text{inicial}}} \right]^{1/t} - 1 \cdot 100 \quad [1]$$

Onde:

TC: taxa de crescimento médio, em %. dia^{-1} ;

M_{final} : biomassa úmida, em gramas, no tempo final t;

M_{inicial} : biomassa úmida, em gramas, no tempo inicial;

t: duração do experimento, em dias.

3.7. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A atividade da viabilidade celular foi mensurada, baseada no potencial de redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para a forma hidrofóbica de formazano púrpura, pela enzima mitocondrial desidrogenase, presente em células vivas. O protocolo adotado foi baseado e adaptado segundo os procedimentos descritos por Mendes et al. (2013). A solução de MTT (Sigma-Aldrich) foi preparada diluindo-se 0,017 g em 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), e mantido congelado até o uso.

Seções das porções apicais das algas tratadas foram lavadas com água destilada, pesadas ($6,0 \pm 0,1$ mg para ensaio com cádmio e $12,5 \pm 0,1$ mg para ensaio com manganês), e acondicionadas em tubos de ensaio com 3 mL de água marinha e 30 μL de solução de MTT ($n=2$). As amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C , sendo em seguida lavadas novamente com água destilada. As seções foram então transferidas para Eppendorfs contendo 1,0 mL de dimetil-sulfóxido P.A. (Synth), e levados à centrífuga (4 minutos, 4.000 rpm). O sobrenadante foi então recolhido, e alíquotas de 250 μL foram subdivididas e dispostas em microplaca ($n=8$). A concentração de formazan foi determinada por espectrofotometria, com absorbância pontual no comprimento de onda de 570 nm, usando a Multileitora Infinite M200

(Tecan, Suíça) do Laboratório Multiusuário em Biologia I (LAMEB I, CCB – UFSC). O resultado foi expresso em percentual de viabilidade, utilizando o tratamento controle de cada delineamento como valor comparativo absoluto (100%).

3.8. ANÁLISE *in vivo* DA CLOROFILA *a*

O desempenho fotossintético foi estimado através da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* no fotossistema II (FSII). Para as análises do ensaio com os metais cobre e chumbo, foi utilizado um fluorímetro portátil de pulsos modulados PAM-2500 (Walz, Alemanha), enquanto que para as análises do ensaio com o metal cádmio foi utilizado o fluorímetro portátil Jr. PAM (Walz, Alemanha). No primeiro ensaio citado, foram feitas medições após sete dias de exposição aos metais, e também, após 24 h em tratamento de recuperação (aclimatação dos exemplares expostos aos metais pesados em meio de cultura sem adição de metais, enriquecido com solução nutritiva). Já para o ensaio com cádmio, as análises foram realizadas no início do experimento, com as amostras recém-coletadas no campo, e após cada período experimental de exposição.

O máximo rendimento quântico (Fv/Fm) foi mensurado após a adaptação das algas por 10 minutos no escuro (n=3), e calculado segundo protocolo de Schreiber et al. (1986). O rendimento quântico efetivo (Y [II]) foi mensurado com as algas acondicionadas a exposição à luz (n=3), e calculado segundo Schreiber e Neubaer (1990). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi estimada pela curva de fotossíntese-irradiância (PI), com irradiação dos talos em série crescente de intensidade actínica da radiação fotossinteticamente ativa (PAR, E; 0, 24, 61, 108, 236, 456 e 752 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para ensaio de cobre e chumbo; e E; 0, 66, 90, 125, 190, 285, 420, 625 and 820 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para ensaio com cádmio), fornecida pelo dispositivo de PAM (n=3). A ETR foi calculada de acordo com a equação [2]. Os protocolos adotados seguiram as metodologias descritas por Platt et al. (1980) e Figueroa et al. (2003).

$$\text{ETR} = \text{Y(II)} \times \text{E} \times \text{A} \times 0,8 \quad [2]$$

Onde A: absorv\u00eancia do talo;

0,8: fra\u00e7\u00e3o da clorofila associada ao fotossistema II (correspondente ao coeficiente das algas pardas)

A absorbância dos talos foi mensurada usando um medidor de luz PAR (LI-COR LI -250, EUA), incidindo os talos com luz branca e medindo-se a luz que atravessa o talo com o uso de sensor PAR (LI-COR Quantum LI -1000, EUA). A transmissão da luz foi calculada de acordo com Ramus e Rosenberg (1980) e Betancor et al. (2014), pela equação [3] (n=4).

$$A = 1 - \frac{E_t}{E_0} \quad [3]$$

Onde E_t : irradiância abaixo do talo da alga;
 E_0 : irradiância inicial.

A partir das curvas PI foram estimados os seguintes parâmetros (n=4): 1) ETR máximo (máxima taxa de transporte de elétrons); 2) α ou eficiência fotossintética (inclinação inicial da curva PI que indica a eficiência no transporte de elétrons); 3) I_k ou saturação da luz (intensidade de luz na proximidade da saturação fotossintética); e 4) β ou fotoinibição (declive da curva PI ao final da saturação luminosa). Estes parâmetros seguem o modelo de tangente hiperbólica da curva com fotoinibição descrito por Platt et al. (1980).

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

3.9.1. Clorofilas *a* e *c*

A determinação do conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes, clorofilas *a* e *c*, foi baseada na metodologia descrita por Jeffrey & Humphrey (1975). Nas análises, foram utilizadas $0,50 \pm 0,01$ mg de biomassa (n=3), de cada um dos tratamentos.

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido, com posterior adição de 1,5 mL de acetona com pureza analítica (P.A). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante recolhido para leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 630, 647 e 664 nm. As concentrações das clorofilas foram calculadas, utilizando-se as equações [4] e [5], ainda de acordo com Jeffrey & Humphrey (1975). Os resultados obtidos na análise foram expressos em μg de clorofila. g^{-1} de alga (ensaio com cobre e chumbo) e mg de clorofila. g^{-1} de alga (ensaio cádmio) (biomassa fresca).

$$\text{Clorofila } a = (11,85.A_{664}) - (1,50.A_{647}) - (0,08.A_{630}) \quad [4]$$

$$\text{Clorofila } c = (1,67.A_{664}) - (7,60.A_{647}) - (24,52.A_{630}) \quad [5]$$

Onde:

A_{664} : absorvância da amostra no comprimento de onda de 664 nm;

A_{647} : absorvância da amostra no comprimento de onda de 647 nm;

A_{630} : absorvância da amostra no comprimento de onda de 630 nm.

3.9.2. Carotenóides

Na determinação de carotenóides, foram utilizadas amostras de $0,50 \pm 0,01$ mg de biomassa ($n=3$), de cada um dos tratamentos. A metodologia adotada foi realizada de acordo com Aman et al. (2005).

A trituração das amostras foi realizada em nitrogênio líquido, e a maceração, em 10 mL de solução de hexano:acetona (50:50, v/v) e butilhidroxi-tolueno (BHT, concentração de 100 mg.L^{-1}). As soluções obtidas foram filtradas a vácuo, com evaporação do solvente em fluxo de nitrogênio gasoso. O extrato obtido foi ressuspenseo em 3,0 mL de hexano e saponificado com solução metanólica de hidróxido de potássio (concentração de 10%). A determinação do conteúdo de carotenóides totais foi realizada através de espectrofotometria.

A leitura espectrofotométrica foi pontual, e utilizou o comprimento de onda de 450 nm. A determinação do conteúdo de carotenóides foi realizada com base nas curvas padrões de luteína e fucoxantina. As concentrações da solução padrão utilizadas foram 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g de luteína.mL}^{-1}$, e . A curva padrão obtida é expressa pela equação [6], e os resultados expressos em $\mu\text{g de carotenóides.g}^{-1}$ de alga (ensaio com cobre e chumbo) e em mg de carotenóides.g⁻¹ de alga (ensaio com cádmio e manganês) (biomassa fresca).

$$y = 0,0077x + 0,0721 \quad (r^2 = 0,9958) \quad [6]$$

Onde y: absorvância da amostra (450 nm);

x: concentração de carotenóides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ ou mg.g^{-1}).

Nos ensaios com cádmio e com manganês, foram realizadas as análises do perfil de carotenóides por cromatografia líquida de fase reversa, de acordo com Kuhnen et al. (2009). Alíquotas do extrato

metanólico bruto de carotenóides (10 μL , $n=3$) foram injetadas na coluna (Vydac 218TP54; 250 mm x 4.6 mm, $\text{Ø}5 \mu\text{m}$, 30°C) do cromatograma líquido (Shimadzu LC-10A). A eluição foi feita a uma taxa de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando uma solução de metanol e clorofórmio ($\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}$, 90:10, v/v). A identificação dos carotenóides presentes, p. ex. fucoxantina, luteína e carotenos, foram baseados nos tempos de retenção dos compostos na coluna do cromatograma e comparação com os compostos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A quantificação das classes de carotenóides foi baseada na curva padrão de fucoxantina. As concentrações utilizadas foram de 0-300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e descritas pela equação [7]:

$$y = 122,583x \quad (r^2 = 0,9981) \quad [7]$$

Onde y: área do tempo de retenção da amostra;
x: concentração de carotenóides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.10. COMPOSTOS FENÓLICOS

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se amostras de $1,0 \pm 0,1\text{g}$ de biomassa de cada um dos tratamentos. O protocolo adotado foi baseado em Rhandir et al. (2002) e Huang et al. (2005). As amostras foram preparadas pela trituração em nitrogênio líquido, imersas em metanol (concentração de 80%), durante 1 h. Seguidamente, procedeu-se a centrifugação dos tratados, e o sobrenadante foi recuperado.

Aos sobrenadantes obtidos, foram adicionados 200 μL de Folin Cicalteau e 600 μL de carbonato de sódio (concentração de 20%), com agitação mecânica em vórtex. Após a adição dos reagentes, foi realizada a leitura pontual em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 750 nm.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com a curva padrão de floroglucionol. As concentrações das soluções padrões utilizadas foram de 100, 250, 500, 750, 1000 e 1250 μg de floroglucionol. mL^{-1} , e a curva padrão obtida é expressa pela equação [8]. Os resultados obtidos na análise foram expressos em μg de fenólicos. g^{-1} de alga (ensaio com cobre e chumbo) e mg de fenólicos. g^{-1} de alga (ensaio cádmio) (biomassa fresca).

$$y = 0,0004x \quad (r^2 = 0,9848) \quad [8]$$

Onde y: absorvância da amostra (750 nm);
 x: concentração de fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ou $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.11. FLAVONÓIDES

A preparação das amostras para a determinação de compostos flavonóides foi realizada seguindo os mesmos procedimentos para a determinação de compostos fenólicos. O protocolo adotado foi baseado em Zacarias et al. (2007). Após a recuperação do sobrenadante, todas as amostras foram acrescidas de 2,5 ml de Etanol com pureza analítica (P.A.) e 500 μl de cloreto de alumínio (concentração de 2%).

A quantificação dos compostos flavonóides foi realizada pela leitura espectrofotométrica pontual, no comprimento de onda de 420 nm. A determinação foi feita utilizando-se curva padrão de quercetina. As concentrações das soluções padrão utilizadas foram de 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 μg de quercetina. mL^{-1} , e a curva padrão obtida é expressa pela equação [9]. Os resultados obtidos na análise foram expressos em mg de flavonóides. g^{-1} de alga (ensaios com cádmio e manganês) (biomassa fresca).

$$y = 0,3131 x - 0,3421 \quad (r^2 = 0,9685) \quad [9]$$

Onde y: absorvância da amostra (420 nm);
 x: concentração de flavonóides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.12. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

A presença de compostos antioxidantes foi determinada pela presença do azo-radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). A metodologia utilizada foi baseada em Kim et al. (2002) e utilizou o método espectrofotométrico, através da diferença de absorvância das amostras em relação à solução padrão. A absorvância foi medida pontualmente no comprimento de onda de 517 nm, sendo medida para a solução de butilhidroxi-tolueno (BHT), utilizada como padrão para a solução metanólica da amostra (metanol 80%). O percentual de DPPH na amostra foi calculado pela equação [10], e o resultado, expresso em valor percentual (ensaio com cobre e chumbo).

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. final da amostra})}{\text{Abs. controle}} \cdot 100 \quad [10]$$

3.13. AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AÇÚCARES INSOLÚVEIS

Para a quantificação de açúcares solúveis totais foram usadas amostras de $1,0 \pm 0,1$ g de biomassa. O protocolo adotado para extração seguiu a metodologia descrita por Shannon (1968). As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas com 2 mL da solução MCW (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 (v/v). A solução foi centrifugada, o sobrenadante recolhido e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL de MCW. Aos sobrenadantes recolhidos e reunidos, foi acrescido 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água, seguindo-se de centrifugação e recolhimento da fase superior.

A dosagem dos açúcares solúveis totais seguiu a metodologia de Umbreit et al. (1964). Foram subdivididas alíquotas de 1 mL da fase superior do centrifugado ($n=4$), e a eles foi acrescido o volume de 2 mL de antrona (200 mg de antrona : 100 mL de ácido sulfúrico P.A.). Após agitação em vórtex, as soluções foram aquecidas em banho-maria (100°C por 3 minutos). Realizou-se a leitura espectrofotométrica pontual no comprimento de onda de 630 nm. A determinação foi feita a partir da curva padrão de glucose. As concentrações padrões utilizadas foram de 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e a curva padrão obtida é expressa pela equação [11]. Os resultados foram expressos em mg de glucose.g⁻¹ (ensaios com cádmio e manganês) (biomassa fresca).

$$y = 0,0139x \quad (r^2 = 0,9906) \quad [11]$$

Onde y: absorbância da amostra (630 nm);
x: concentração de açúcares solúveis totais (mg.g⁻¹).

Para a determinação do conteúdo de açúcares insolúveis, utilizou-se o resíduo da centrifugação para extração de açúcares solúveis totais. Adotou-se a metodologia de extração descrita por McCready et al. (1950). A biomassa residual acrescentou-se 2 mL de ácido perclórico (concentração de 30%, v/v), seguindo-se de centrifugação. O sobrenadante foi recolhido e repetiu-se a extração, reunindo-se os sobrenadantes ao final. A quantificação foi feita de acordo com o descrito por Umbreit et al. (1964). Foram utilizadas alíquotas de 1 mL do sobrenadante recolhido ($n=4$), acrescidos de 2 mL de antrona (200 mg de antrona : 100 mL de ácido sulfúrico P.A.). Após agitação em vórtex, estas soluções também foram aquecidas em banho-maria, nas mesmas condições descritas para a quantificação de açúcares solúveis totais. Realizou-se a leitura espectrofotométrica pontual no

comprimento de onda de 630 nm. A determinação foi feita a partir da curva padrão de glicose. As concentrações padrões utilizadas foram 0,025; 0,1; 0,25 e 0,50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e a curva padrão obtida é expressa pela equação [12]. Os resultados foram expressos em mg de glicose.g⁻¹ (ensaio cádmio) (biomassa fresca).

$$y = 0,1695x \quad (r^2 = 0,9993) \quad [12]$$

Onde y: absorbância da amostra (630 nm);

x: concentração de açúcares insolúveis (mg.g⁻¹).

3.14. MICROSCOPIA DE LUZ

Fragmentos dos talos de todos os tratamentos foram separados e preparados para análises em microscopia de luz. A preparação do material seguiu o protocolo descrito por Schmidt et al. (2009).

Foram fixados secções de aproximadamente 5,0 mm de espessura. Os cortes foram feitos em material fresco, manualmente e utilizando-se lâminas metálicas para as secções. Estes foram acondicionados individualmente, de acordo com o tratamento analisado, em Eppendorfs (2 mL), e acrescidos com solução de paraformaldeído (2,5 %) em tampão fosfato (0,1 M), mantidos *overnight* sob refrigeração. Após este período, as amostras foram lavadas em tampão fosfato a 0,1 M, por duas vezes, com duração de vinte minutos em cada lavagem.

A desidratação das amostras foi realizada em série etanólica com pureza analítica, em concentrações crescentes de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. As trocas foram realizadas em períodos de trinta minutos, para cada concentração de álcool.

A pré-infiltração das amostras foi realizada com historesina glicolmetacrilato (GMA), preparada na proporção de 1:1 (v/v), em etanol à concentração de 100%. A pré-infiltração ocorreu por um período de 24 horas. Finalmente, procedeu-se a infiltração das amostras com historesina pura, mantendo-se as amostras neste preparado por 24 h. Os cortes foram então polimerizados, utilizando-se uma mistura de 3,0 mL da solução de infiltração e 0,2 mL polimerizador, acondicionadas em histomoldes e secagem em estufa a 70 °C.

Após a polimerização, as amostras foram seccionadas em micrótopo manual, com navalha de tungstênio, em espessura de secção de 5,0 μm . As secções foram dispostas em lâminas para microscopia, e posteriormente coradas com reagentes citoquímicos. As lâminas foram

então fotografadas no microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), em sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América), pertencente ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II (LAMEB II, CCB – UFSC).

3.15. CITOQUÍMICAS

As lâminas com as secções de todos os tratamentos foram coradas para observação em microscópio óptico. Foram utilizadas duas citoquímicas: azul de Toluidina (AT-O) e Ácido Periódico de Shiff (PAS).

A citoquímica com o AT-O objetivou a coloração de polissacarídeos ácidos. A solução de AT-O foi utilizada na concentração de 0,5%, e disposta sobre os cortes citológicos por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, e dispostas para secagem ao ar à temperatura ambiente. Já a citoquímica com PAS objetivou a coloração de polissacarídeos neutros. As lâminas foram imersas em ácido periódico por 30 minutos, e lavadas em água corrente por 15 minutos. Em seguida, foram imersas em reativo de Schiff por 30 minutos, posteriormente lavadas em água corrente também por 15 minutos e dispostas para secagem ao ar em condições ambientes. Todas as lâminas coradas com citoquímicas foram montadas permanentemente com bálsamo do Canadá.

3.16. MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL

Fragmentos dos talos de *S. cymosum* tratados com manganês foram seccionados a mão livre, usando lâminas metálicas, em aproximadamente 5 mm de espessura. As secções foram acondicionadas individualmente em Eppendorfs (2 mL), e a fixação foi realizada com solução de paraformaldáido (2,5%) em tampão fosfato (0,1 M), e mantidos sob refrigeração até a análise.

Previamente a montagem das lâminas, as secções foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M. O material disposto sobre as lâminas foi recoberto com lamínula e selados com esmalte comercial para unhas incolor. As análises foram conduzidas sob o microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS (SP-5, Wetzlar, Alemanha), com lente objetiva para imersão em óleo Leica HCX PL APO lambda 63x/1,4-0,6 montada em microscópio de fluorescência invertido. As análises foram realizadas de acordo com Bouzon et al. (2006) e Bouzon et al. (2012).

A autofluorescência dos cloroplastos foi observada pela com a excitação do laser de argônio no comprimento de onda de 550-700 nm. A observação dos compostos fenólicos se deu pela excitação com o laser ultravioleta e laser de argônio no comprimento de onda de 730-800 nm. Por fim, a observação das paredes celulares se deu com a marcação do fluóforo calcoflúor, imergindo as secções por 30 minutos no composto. Para processamento das imagens, foi utilizado o programa LAS-AF Lite (Leica). Todas as análises de microscopia de varredura confocal foram conduzidas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC).

3.17. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Seguindo o mesmo procedimento de fixação adotado para a microscopia de luz e de acordo com Schmidt et al. (2009), os fragmentos dos talos de todos os tratamentos foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizados cortes transversais de aproximadamente 5,0 mm de espessura, com a secção manual dos filóides da alga fresca, utilizando lâmina metálica para a sua obtenção. Estas secções foram acondicionadas em Eppendorfs, individualmente de acordo com o respectivo tratamento. A fixação foi feita em solução de glutaraldeído (2,5%), sacarose (0,2 M), e cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) nas mesmas proporções volumétricas.

Após a fixação, foram realizadas quatro lavagens sequenciais, de 10 minutos de duração cada, com solução de cacodilato a 0,1 M. Seguidamente, procedeu-se a desidratação em série etanólica, nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com duração de 30 minutos para cada solução. A secagem das amostras foi feita com o uso de ponto crítico, substituindo-se o etanol por gás carbônico (CO₂); este procedimento foi realizado no Laboratório de Preparo de Amostras Biológicas (LCME - UFSC).

Após a secagem, os cortes foram colados em suportes metálicos cilíndricos (stubs), e recobertos com carbono. O material foi armazenado em estufa e mantido a vácuo, até a realização da observação em microscópio eletrônico de varredura. Este equipamento, do modelo Jeol 6390 LV, encontra-se no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME - UFSC), e através dele foram realizadas as fotografias das amostras, bem como as microanálises de raios-X (EDS, aceleração de elétrons de 10 kV).

3.18. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos dos talos de *S. cymosum* submetidos aos tratamentos com cádmio e manganês foram preparados para a microscopia eletrônica de transmissão (MET). O protocolo adotado para o ensaio com o metal cádmio seguiu os procedimentos descritos por Ouriques et al. (2012), com adaptações do protocolo para as amostras tratadas com manganês. Foram utilizadas secções transversais de aproximadamente 5,0 mm, obtidas manualmente pela secção dos filóides da alga fresca com lâminas metálicas. Após a secção, as amostras foram acondicionadas individualmente, de acordo com o tratamento, em Eppendorfs (2,0 mL) e pré-fixadas em solução de glutaraldeído (2,5 %), tamponada com cacodilato (0,1 M, pH 7,2), e sacarose (0,2 M). As amostras foram mantidas *overnight* sob refrigeração.

Após a pré-fixação, procederam-se três lavagens com tampão cacodilato (0,1 M), com duração de vinte minutos cada. Seguiu-se o processamento com a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4 a 1%), diluído em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2), por período de quatro horas no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado três vezes com tampão cacodilato (0,1 M), com duração de 30 minutos para cada lavagem.

As amostras foram então desidratadas em soluções de acetona em concentrações crescentes de 30%, 50%, 70%, 90% e duas desidratações em acetona 100%, com duração de 30 minutos para cada solução.

O material desidratado foi infiltrado com resina Spurr, em séries crescentes de diluição em acetona com pureza analítica P.A., totalizando-se seis diluições e duas infiltrações em resina pura. Cada infiltração teve duração de 24 horas, mantidas em temperatura ambiente. As amostras foram acondicionadas em histomoldes horizontais, e polimerizadas com resina pura em estufa a 70 °C por 24 h.

As secções semifinas foram feitas com navalha de vidro, e as secções ultrafinas, com navalha de diamante, ambas em ultramicrotomo do Modelo Power Tome XL (EUA). A contrastação dos grids com as amostras foi realizada com acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo as amostras expostas por dez minutos para cada uma das soluções. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (TEM) 1011, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC).

3.19. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos em todos os experimentos foram avaliados sob a Análise de Variância Bifatorial (ANOVA), com condução das análises no Programa Statistica (versão 10.0). Foram utilizados como fatores preditivos para o delineamento com cobre e chumbo o caractere qualitativo do metal e as concentrações; para os delineamentos com cádmio e manganês, foram considerados a concentração de metal e o tempo de exposição. Os dados foram verificados *a priori* quanto a sua normalidade de distribuição em relação à curva normal de Gauss. Para a determinação da significância das diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos com metais e dos tratamentos controle, foi realizado *a posteriori* o teste de Tukey, no delineamento com cobre e chumbo, e o teste de Newman-Keuls nos delineamentos com cádmio e manganês. Os dados foram testados quanto a sua normalidade de distribuição dos resíduos, com adequação dos dados via transformação logarítmica quando necessário. Para o delineamento com manganês, foi ainda utilizada a análise de componente principal (PCA), desenvolvida no software Multivariate Statistical Package (MVSP) para determinação da similaridade entre as variáveis fisiológicas.

4. CAPÍTULO I: Efeitos da exposição de cobre e chumbo na ecofisiologia da alga parda *Sargassum cymosum*

Protoplasma

Artigo sob doi: 10.1007/s00709-015-0795-4

Histórico de publicação:

Artigo recebido: 27 de Outubro de 2014

Artigo aceito: 2 de Março de 2015

Artigo publicado online:

Giulia Burle Costa¹; Marthiellen R. de L. Felix¹; Carmen Simioni¹; Fernanda Ramlov³; Eva Regina Oliveira³; Débora T. Pereira²; Marcelo Maraschin³; Fungyi Chow⁴; Paulo Antunes Horta⁵; Cristina Moreira Lalau⁶; Cristina H. da Costa⁶; William Gerson Matias⁶; Zenilda L. Bouzon¹; Éder C. Schmidt^{7*}

¹Laboratório de Biologia Celular Vegetal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

²Bolsista de iniciação-científica PIBIC-CNPq, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

³Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88010-970, Florianópolis, SC, Brasil.

⁶Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-970, CP476, Florianópolis, SC, Brasil.

⁷Programa de pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Os efeitos dos metais pesados cobre (Cu) e chumbo (Pb) em *Sargassum cymosum* foram avaliados para determinar a capacidade de retenção, taxa de crescimento, eficiência fotossintética, conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes e compostos fenólicos, capacidade antioxidante pelo radical DPPH, e mudanças morfológicas e celulares. *Sargassum cymosum* foi cultivado com Cu e Pb individualmente e em associação nas concentrações de 10, 25 e 50 μM durante sete dias e sob condições controladas de laboratório. Algas sobre tratamento de Cu mostraram a mais alta capacidade de biosorção, e as taxas de crescimento foram significativamente reduzidas quando comparadas ao controle. A curva de fotossíntese/irradiância mostrou alterações no padrão cinético nos exemplares tratados com metais. Especificamente, tratamentos com Cu individualizado inibiram a resposta de ETR, enquanto Pb individualizado induziu a resposta. Contudo, exemplares tratados com Cu e Pb (Cu+Pb) mostrou inibição em ETR. A quantidade total de pigmentos aumentou relativo ao controle. Microscopia de luz mostrou aumento nos compostos fenólicos, com migração de fisóides para as células corticais. Microscopia eletrônica de varredura mostrou alterações no padrão de rugosidade superficial do talo, quando comparado com o controle, especialmente para os tratamentos com Pb. Baseado nesses resultados, pode ser concluído que Cu e Pb são fatores estressantes para *S. cymosum*, promovendo alterações no metabolismo da alga e estímulo de mecanismos defensivos contra o estresse oxidativo. Contudo, a alta capacidade de bioacumulação de ambos os metais indica a possível aplicação de *S. cymosum* como biosorvente para águas residuais contaminadas com metais em baixas concentrações.

Palavras-chave: *Sargassum cymosum*; ecofisiologia; biosorção; retenção de metais; eficiência fotossintética; estrutura celular.

4.1. INTRODUÇÃO

Os ambientes costeiros são sistemas dinâmicos, amplamente modificados pelos impactos da ocupação humana e das atividades industriais (Melville & Pulkownik, 2007; Gouveia et al., 2013). Mudanças tornam-se mais evidentes na qualidade de água, especialmente pela introdução de compostos tóxicos (Fichet et al., 1998; Martins et al., 2012; Scherner et al., 2013). Entre os poluentes, os metais pesados desempenham importante papel pela sua participação nos ciclos biogeoquímicos, alta persistência sedimentar e efeitos ecológicos (Pagliosa et al., 2006). Estes metais também levam a preocupação com os efeitos de toxicidade sobre a flora e fauna aquática (Jothinayagi & Anbazhagan, 2009; Rovai et al., 2013).

Entre os metais pesados poluentes, o chumbo (Pb) e cobre (Cu) são particularmente tóxicos e, algumas vezes, abundantes em diferentes ambientes marinhos. Mesmo em pequenas concentrações, estas substâncias exercem fortes efeitos sobre os organismos marinhos (Fichet et al., 1998). Entretanto, algumas algas têm a habilidade de reterem quantidades relativamente elevadas de metais (Mamboya et al., 1999; Hu et al., 2010), e então exercem importante papel na bioacumulação de metais pesados (Davis et al., 2000). Portanto, estes organismos são considerados como potenciais biomonitores, ou bioindicadores, da qualidade de água e da presença de contaminantes (Karez et al., 1994; Melville & Pulkownik, 2007).

A poluição resultante das atividades humanas é considerada por possuir alto potencial de contribuir com o declínio de populações naturais, e até mesmo levar à extinção de algumas espécies de algas (Thibaut et al., 2005; Martins et al., 2012; Scherner et al., 2013). O aumento de poluentes tem, em diferentes escalas, causado uma mudança na fisionomia das comunidades bentônicas (Martins et al., 2012; Scherner et al., 2013), e levado a extinções locais (Scherner et al., 2012a e 2012b).

Ao nível celular, as algas possuem muitos mecanismos de retenção de íons potencialmente poluentes presentes na água marinha. Algas são bem reconhecidas pelo mecanismo de biosorção, processo em que metais pesados são absorvidos na forma iônica da solução aquosa. Além disso, metais podem ser retidos na forma iônica através de ligações passivas com componentes estruturais, como polissacarídeos das paredes celulares e membranas plasmáticas (Romera et al., 2007; Brinza et al., 2009; Jacinto et al., 2009; Kleinübing et al., 2012). Outros mecanismos intracelulares são empregados na bioacumulação destes íons, como ligações com proteínas ricas em cisteína, atividade

antioxidante de flavonóides, carotenóides e compostos fenólicos, assim como da maquinaria enzimática, que pode resultar na imobilização de íons em vesículas e vacúolos (Pinto et al., 2003).

Ao longo das últimas décadas, estudos com algas têm sido conduzidos para diferentes aplicações biotecnológicas (Fourestand & Volesky, 1996; Davis et al., 2000; Davis et al., 2003; Jacinto et al., 2009). Resultados sugerem a aplicação de algas em fitorremediação, para remoção de metais pesados de efluentes industriais, fazendo uso da propriedade de sequestro dos metais pela biomassa (Vieira & Volesky, 2000).

Algas pardas, em particular, são resistentes a poluição ambiental e podem suportar altas concentrações de poluentes (Davis et al., 2003; Luna et al., 2010). Por outro lado, exposições prolongadas podem resultar em danos metabólicos, especialmente nas taxas de crescimento e eficiência fotossintética. Estas alterações são explicadas pelo redirecionamento energético para rotas metabólicas de defesa, redução do número de organelas e síntese de componentes estruturais, bem como da oxidação de pigmentos (Collén et al., 2003; Pinto et al., 2003; Polo et al., 2014). Mudanças estruturais adicionais foram observadas ao nível celular para algas vermelhas, com variações nos padrões de superfície celular (Santos et al., 2014; Felix et al., 2014).

Distribuído em zonas tropicais e subtropicais, o gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyceae, Fucales) tem 10 espécies reconhecidas nas águas costeiras brasileiras, e representam a maior parcela da biomassa de algas de algumas regiões (Széchy & Paula, 2000). A espécie *Sargassum cymosum* C. Agardh é encontrada do Ceará (05° S e 39° O) ao Rio Grande do Sul (30° S e 53° O), distribuída na região entre marés de costões rochosos, onde forma densas populações (Pupo et al., 2011). Baseado nesta ampla distribuição espera-se que populações naturais de *Sargassum* possam ser afetadas pela introdução de poluentes e químicos de amplos usos múltiplos nas águas costeiras brasileiras.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos metais pesados cobre e chumbo, individualmente e em combinação, na alga *S. cymosum*, analisando a capacidade de retenção de metais, taxas de crescimento, eficiência fotossintética, pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos, capacidade de redução do radical DPPH e mudanças morfológicas e celulares. É hipotetizado que Cu e Pb alteram as respostas fisiológicas, composição química e estrutura celular de *S. cymosum*, acionando rotas metabólicas específicas para a síntese de

compostos de defesa contra estresse dos metais pesados, induzidas mudanças por danos oxidativos.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material biológico e condições de cultura em laboratório

Indivíduos de *Sargassum cymosum* foram coletados na praia da Armação do Pântano do Sul (27°44'42" S e 48°30'27" O), Florianópolis – SC, em Maio, Julho e Agosto de 2013. Os exemplares (100 g de talos, peso úmido) foram coletados manualmente na zona entre marés e transportados em sacos plásticos escuros para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC). Macroepífitas foram removidas cuidadosamente pela limpeza com pincel e lavadas com água do mar filtrada. A água do mar foi filtrada mecanicamente (10 e 20 μM) e em seguida esterilizada em fluxo contínuo irradiado com lâmpada UV. Porções apicais foram mantidas em meio de cultura com água do mar enriquecida com solução de von Stosch a meia concentração (VSES/2 sem EDTA; Edwards, 1972) e cultivada sob condições controladas de laboratório, incluindo 24°C, 35 ups, aeração contínua, $\sim 80 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840), e fotoperíodo de 12 h (início as 8 h), durante sete dias para aclimação antes da aplicação nos tratamentos experimentais com Cu e Pb. A intensidade luminosa foi medida com quantômetro Solar Light PMA 2100 (Glenside, PA, USA) e o sensor esférico Solar Light 2132 (Glenside, PA, USA).

4.2.2. Desenho experimental

Porções apicais dos talos foram selecionadas (~ 2.0 g peso úmido; dois indivíduos por Erlenmeyer) da biomassa aclimatada de *S. cymosum* e cultivada por sete dias sob as mesmas condições de cultura da aclimação em tratamentos experimentais com Cu e Pb, em Erlenmeyers contendo 500 mL de água do mar esterilizada enriquecida com VSES/2 (sem EDTA). Tratamentos experimentais foram conduzidos com o controle (sem adição de metais), Cu, Pb ou Cu+Pb, adicionados como CuCl_2 e PbCl_2 (10, 25 e 50 μM para ambos os tratamentos individuais e 10+10, 25+25 e 50+50 para combinação de metais), totalizando quatro tratamentos com metais. Soluções estoque de 500 mL dos metais foram preparadas em Erlenmeyers. Quatro réplicas foram feitas de cada grupo experimental (dezesseis Erlenmeyers). Concentrações propostas foram baseadas em dados recentes de Rovai et al. (2013) e concentrações de metais pesados observados em águas naturais da área de estudo.

4.2.3. Biosorção de Cu e Pb

As concentrações de Cu e Pb na água do mar e nas amostras de alga foram analisadas no início e no fim dos experimentos, por espectrometria de emissão atômica acoplado à indução por plasma (ICP-AES, ARCOS de M/s. Spectro, Alemanha), usando as seguintes linhas analíticas: Cu 324,754 nm e Pb 220,353 nm de vista axial de plasma, com limite de detecção de 0,001 ppm para Cu e Pb. Amostras de alga (1 mg peso úmido) foram primeiro expostas a Cu e Pb por período de sete dias. Antes do início das análises, as amostras foram lavadas com água destilada, secas a 65 °C, e digeridas em ácido nítrico concentrado. Amostras de água (50 mL) foram digeridas usando ácido nítrico concentrado. Absorção total de metais foi expressa em %, calculado com base em mg de Cu ou Pb em 500 mL de água por mg de metais em 1 g de peso úmido (Felix et al., 2014). O fator de bioconcentração (BCF) foi calculado como a concentração remanescente de metal e peso da biomassa de alga (expresso como ppm) dividido pela concentração inicial de metal adicionado no meio de cultura (Felix et al., 2014). Todas as análises foram realizadas em quadruplicata.

4.2.4. Taxa de crescimento (TC)

Taxas de crescimento (TCs) foram calculadas seguindo a seguinte equação: $TC [\% \cdot \text{dia}^{-1}] = [(W_t/W_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde W_i = peso úmido inicial, W_t = peso úmido após sete dias, e t = tempo experimental em sete dias (Lignell & Pedersén, 1989).

4.2.5. Análise *in vivo* da fluorescência da clorofila *a*

A performance fotossintética foi estimada sob a fluorescência *in vivo* da clorofila *a* do fotossistema II (FS II) usando um fluorômetro portátil de Pulso de Amplitude Modulada (PAM-2500, Walz, Alemanha). Máximo rendimento quântico (Fv/Fm) foi medido após a adaptação das algas por 10 minutos no escuro e calculado segundo Schreiber et al. (1986). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi estimada através da curva de irradiância-fotossíntese (P-I), irradiando os talos com sete intensidades de radiação fotossinteticamente ativa (E; 0, 24, 61, 108, 236, 456 e 752 $\mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) proveniente do dispositivo de PAM e calculada como $ETR = Y(\text{II}) \times E \times A \times 0,8$, onde $Y(\text{II})$ é o rendimento quântico efetivo, A é a absorv\u00eancia do talo, e 0,8 é a fra\u00e7\u00e3o da clorofila *a* associada com o FS II (Platt et al., 1980; Figueroa et al., 2003). Absorv\u00eancia foi determinada seguindo Ramus & Rosenberg (1980) e Betancor et al. (2014). Os seguintes par\u00e2metros foram determinados atrav\u00e9s da curva P-I (n = 4): 1) ETR m\u00e1ximo

(máximo ETR sob a irradiância de saturação), 2) eficiência fotossintética (α , inclinação inicial da curva P-I que indica a eficiência de transporte de elétrons), 3) luz de saturação (I_k , intensidade de luz aproximada do início da saturação fotossintética), e 4) fotoinibição (β , declive inicial da curva P-I na fase de saturação) adequando as curvas P-I para o modelo de tangente hiperbólica com saturação, seguindo Platt et al. (1980). Adicionalmente, recuperação fotossintética foi avaliada pela incubação das amostras por 24 h em meio de cultura com água do mar esterilizada (sem metais) enriquecida com VSES/2 (sem EDTA), e sob as mesmas condições controladas de laboratório.

4.2.6. Análise de pigmentos

Pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *c*; Chl *a* e Chl *c*) de *S. cymosum* foram analisados de exemplares congelados úmidos ($n = 4$) e mantidos congelados a -40°C até o uso. Clorofilas foram extraídas de aproximadamente 0,5 g (peso úmido) em 3 mL de acetona pura P.A. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 min. em gelo e protegidas da luz. Os extratos foram então centrifugados por 5 min. a 1.990 g, e os pigmentos foram quantificados espectrofotometricamente a 630, 640 e 664 nm (Hitachi, Model 100-20; Hitachi Co., Japão). Concentrações de pigmentos foram calculadas de acordo com Jeffrey & Humphrey (1975).

Carotenóides foram extraídos de acordo com Aman et al. (2005) por extração exaustiva de 0,5 g (peso úmido) ($n = 4$) em 10 mL em metanol puro P.A. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os extratos metanólicos foram evaporados para concentrar os extratos. A absorbância específica foi determinada espectrofotometricamente (Hitachi, Model 100-20) a 450 nm. Concentração de carotenóides totais foi calculada baseada na curva padrão do β -caroteno ($0-300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $y = 0,0077x + 0,0721$, $r^2 = 0,9958$).

4.2.7. Compostos fenólicos

As análises de compostos fenólicos foram feitas usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, baseado em Rhandir et al. (2002) e Huang et al. (2005). Este método permite a determinação de diferentes compostos fenólicos, como fenóis totais e taninos hidrolisados, em Phaeophyceae. Compostos fenólicos foram extraídos de 0,5 g (peso úmido) ($n = 4$), usando 4 mL de solução aquosa de metanol 80%. Os extratos foram centrifugados por 10 min. a 750 g. Alíquotas de 50 μL do sobrenadante do extrato bruto foram adicionadas a 180 mL de água destilada, 10 mL de reagente Folin e 30 mL de carbonato de sódio 20% m/v e incubados a temperatura ambiente por 1

h. Absorbância da reação foi medida a 750 nm, usando um espectrofotômetro (Hitachi, Model 100-20). Floroglucinol foi usado como padrão nas concentrações de 100 a 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($y = 0,0004x$; $r^2 = 0,999$). Adicionalmente, a absorbância UV dos compostos extrusados pela alga nos respectivos tratamentos foram avaliados ($n=4$) medindo a absorbância do espectro (280-380 nm) na água do mar, também utilizando floroglucinol como padrão.

4.2.8. Capacidade de redução do radical DPPH

Para determinar a capacidade de redução, foi usado o método descrito por Kim et al. (2002). Brevemente, 2,9 mL de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) a 0,1 mM em solução aquosa de metanol a 80% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados a uma alíquota de extrato da alga (0,1 mL de extrato metanólico) e incubados por 30 min. A absorbância da reação antioxidante foi medida a 517 nm usando uma microplaca de espectrofotômetro (TP Reader NM, Thermoplate). O percentual de inibição (%) foi determinado ($n = 3$) usando a seguinte fórmula: $\text{Inibição (\%)} = ((\text{Abs}_{\text{Controle}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) / \text{Abs}_{\text{Controle}}) \times 100\%$, onde $\text{Abs}_{\text{Controle}}$ é a absorbância do controle DPPH e $\text{Abs}_{\text{Amostra}}$ é a absorbância das amostras. O antioxidante sintético tert-butil hidroxitolueno (BHT) foi usado como controle positivo.

4.2.9. Microscopia de luz (ML)

Amostras de aproximadamente 5 mm em espessura foram fixadas em paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) *overnight* seguindo o descrito por Schmidt et al. (2009). Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em série crescente de soluções etanólicas e infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Então, seções de 5 μm em espessura foram coradas com Azul de Toluidina (AT-O) 0,5%, pH 3,0 (Merck Darmstadt, Alemanha), como descrito por Schmidt et al. (2012), e investigados com microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41) equipado com Image Q Capture Pro 5.1 software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA). Similaridades baseadas na comparação dos tratamentos individuais com as réplicas sugerem que as análises de ML foram confiáveis.

4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as observações sob microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras de aproximadamente 5 mm em espessura foram fixadas *overnight* com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) e sacarose 0,2 M (Schmidt et al., 2009).

Amostras foram desidratadas em série etanólica, secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha), e então recobertas com ouro antes de serem analisados, como descrito por Schmidt et al. (2012). As amostras (n = 4) foram examinadas sob MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japão) a 10 kV. As paredes celulares dos tratados com cobre e chumbo foram analisados sob MEV (NORAN System 7, Thermo Scientific Instruments) associado a espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS), sem pós-fixação com tetróxido de ósmio ou recobrimento com ouro.

4.2.11. Análise de dados

Dados dos diferentes parâmetros mensurados foram analisados por análise de variância bifatorial (ANOVA), considerando os metais e as concentrações como variáveis independentes, e o teste *a posteriori* de Tukey com $p \leq 0.05$. Para a análise *in vivo* da fluorescência da clorofila *a*, dados de exposição/recuperação e concentração foram considerados como variáveis independentes, e o teste *a posteriori* de Tukey foi realizado com $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica (Versão 10.0).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Biosorção de cobre e chumbo

Depois de sete dias em cultura com Cu e Pb individuais ou combinados (Cu+Pb), amostras de *S. cymosum* mostraram diferentes capacidades de biosorção relacionadas com o respectivo controle (Figura 1). A mais alta biosorção foi obtida para 10 μM Cu (Figura 1A), seguido por 10 μM Pb e Cu+Pb 10 μM (Cu) (Figura 1B e C), indicando alta dinâmica de biosorção em soluções de Cu monometálico. Em geral, amostras tratadas com Cu mostraram maior biosorção que as tratadas com Pb, enquanto menor biosorção foi observada para os tratamentos com Cu+Pb.

Bioconcentração de metais seguiu uma tendência similar a observada para bioacumulação. Amostras tratadas com Cu mostraram maior fator de bioconcentração que os tratados tanto com Pb quanto Cu+Pb (Figura Suplementar 1). O tratamento com maior fator de bioconcentração foi 10 μM Cu (Figura Suplementar 1A). Para os tratamentos com Cu+Pb, Cu mostrou o maior fator de bioconcentração que Pb sob as mesmas concentrações (Figura Suplementar 1C e D).

4.3.2. Taxas de crescimento (TCs)

Depois de sete dias em cultura, *S. cymosum* exibiram diferenças significativas nas TCs (Tabela 1). Amostras sob os tratamentos de 50 μM Cu e 50 μM Cu+Pb apresentaram reduções significativas nas TCs quando comparadas ao controle. Não foram observadas diferenças para os tratamentos com Pb. Curiosamente, quando expostas a Cu+Pb, concentrações mais baixas não mostraram diferenças estatísticas do controle. Ao contrário, todos os tratamentos com Cu, tanto individualmente quanto combinado com Pb (Cu+Pb), mostraram menores médias quando comparados ao controle.

Tabela 1: Taxas de crescimento de *S. cymosum* depois de sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) e Cu+Pb. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste *a posteriori* de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

Tratamentos	Taxa de crescimento (%.dia ⁻¹)
Controle	2.41 \pm 0.47 ^a
Cu 10 μM	0.79 \pm 0.80 ^{abc}
Cu 25 μM	0.56 \pm 0.97 ^{abc}
Cu 50 μM	-1.75 \pm 1.03 ^c
Pb 10 μM	2.62 \pm 1.00 ^a
Pb 25 μM	1.88 \pm 1.00 ^a
Pb 50 μM	1.86 \pm 0.90 ^a
Cu+ Pb 10 μM	1.66 \pm 0.57 ^{ab}
Cu+ Pb 25 μM	0.58 \pm 0.97 ^{abc}
Cu+ Pb 50 μM	-1.55 \pm 2.81 ^{bc}

Figura 1: Biosorção de metais pesados por *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb. A. Biosorção de Cu. B. Biosorção de Pb. C. Biosorção de Cu no tratamento Cu+Pb. D. Biosorção de Pb no tratamento Cu+Pb. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste *a posteriori* de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

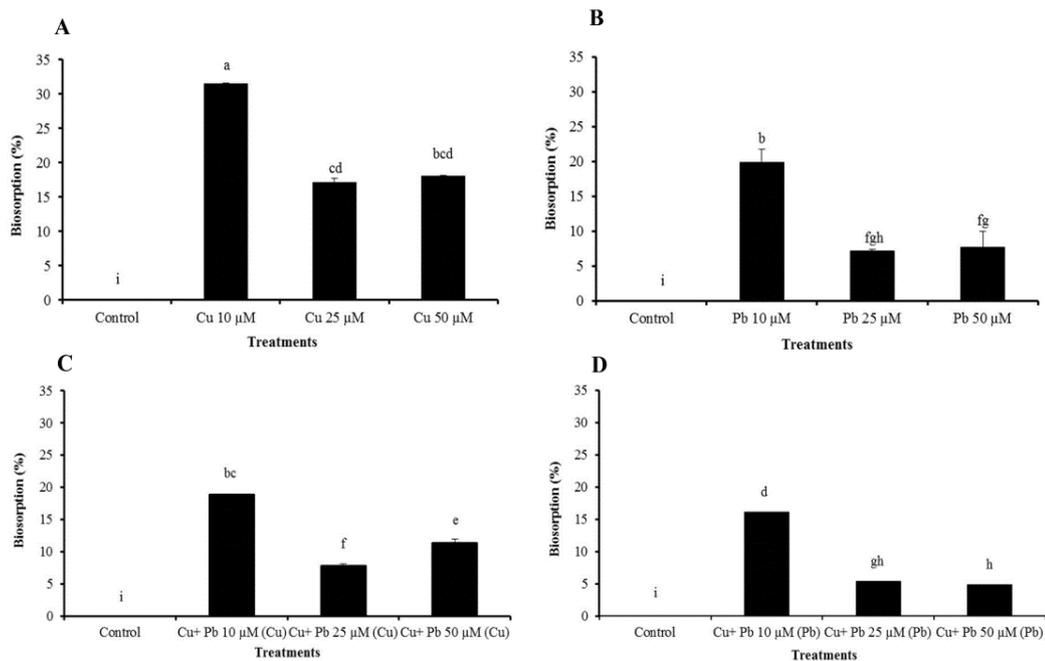
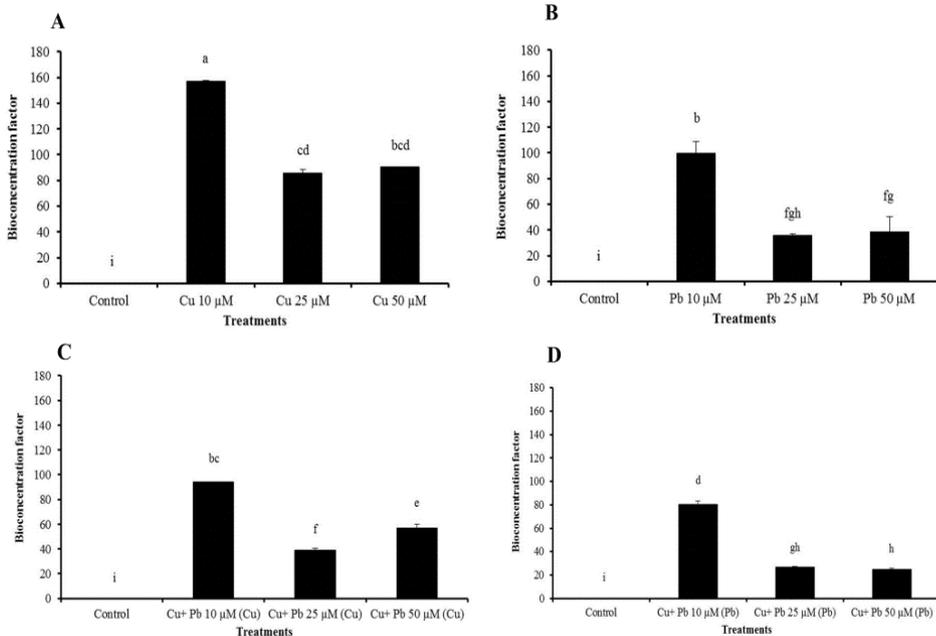


Figura Suplementar 1: Fator de bioconcentração de *S. cymosum* depois de sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb. A. Fator de bioconcentração de Cu. B. Fator de bioconcentração de Pb. C. Fator de bioconcentração de Cu no tratamento Cu+Pb. D. Fator de bioconcentração de Pb no tratamento Cu+Pb. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste *a posteriori* de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).



4.3.3. Análise *in vivo* da fluorescência da clorofila *a*

Tratamentos com Cu, Pb e Cu+Pb modificaram a magnitude dos padrões das curvas de fotossíntese/irradiância (P-I) relacionados ao tipo e a concentração de metal, quando comparados ao respectivo controle (Figura 2). Tratamentos com Cu mostraram significativa fotoinibição da cinética de ETR, e nenhum aumento nas curvas sob o tratamento com Cu foi observado após 24 h em recuperação (Figura 2A-B), exceto para o controle. Exposição aos tratamentos com Pb aumentaram as curvas de ETR (Figura 2C), e nenhuma variação foi observada após a recuperação, exceto para o controle. Por último, tratamentos com 25 e 50 μM Cu+ Pb afetaram negativamente as cinéticas de ETR durante a exposição (Figura 2E), enquanto uma pequena recuperação foi observada para os mesmos tratamentos após 24 h (Figura 2F). Aumento na curva P-I do controle também foi observado (Figura 2F).

Exposição aos tratamentos com metais pesados e a recuperação mostraram impacto significativo na performance fotossintética (Tabela 2 e Tabela Suplementar 1). Entre todos os parâmetros, ETR_{máximo} foi o mais afetado pela exposição ao Cu quando comparado com o respectivo controle ($p \leq 0.05$), enquanto tratados com Pb não mostraram efeitos tanto para a exposição quanto para a recuperação (Tabela 2). Durante a exposição e recuperação, a eficiência fotossintética, p. ex., o parâmetro Alpha, mostrou uma redução significativa para os exemplares tratados com altas concentrações de Cu e Cu+Pb (Tabela 2). Contudo, o parâmetro Beta mostrou diferenças significativas apenas entre a exposição e a recuperação dos tratados com Cu (Tabela Suplementar 1). Finalmente, I_k foi mais intensamente afetado durante a exposição e recuperação dos tratados com Cu (Tabela 2).

Figura 2: Curvas da taxa de transporte de elétrons (ETR) sob níveis crescentes de PAR. Curvas fotossíntese/irradiação (PI) de *S. cymosum* após sete dias de exposição a cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, seguido por recuperação de 24 h. **A.** Tratamentos de exposição a Cu. **B.** Recuperação de Cu. **C.** Tratamentos de exposição a Pb. **D.** Recuperação de Pb. **E.** Tratamento de exposição a Cu+Pb. **F.** Recuperação de Cu+Pb.

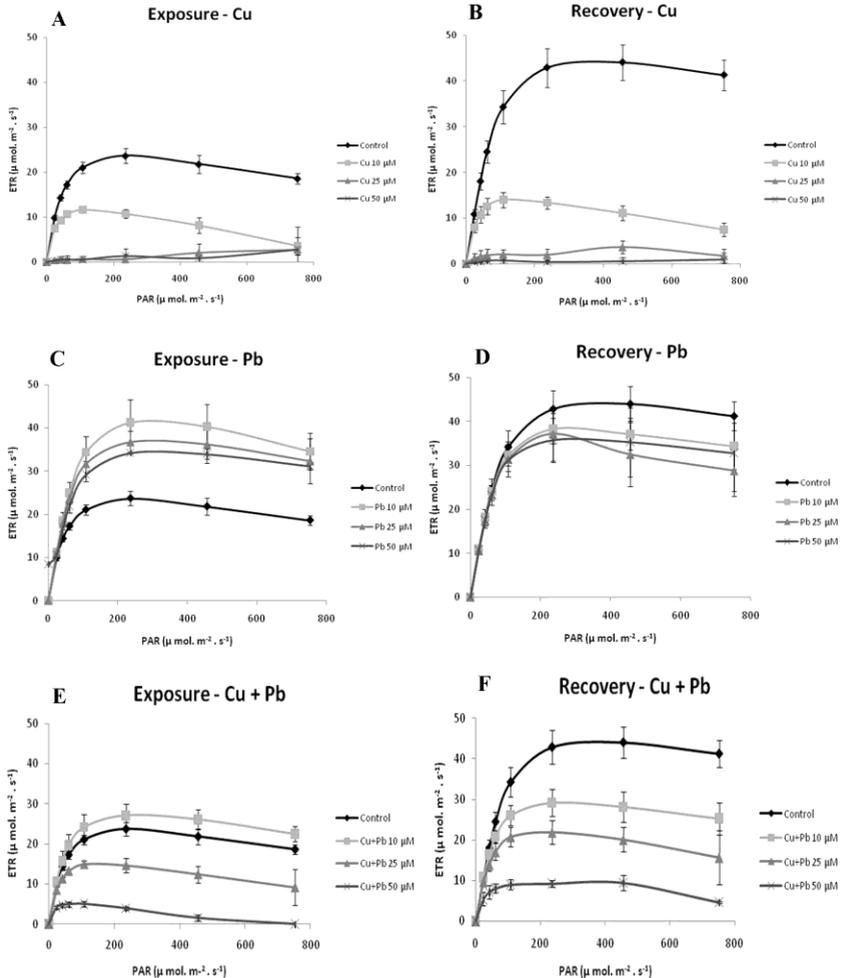


Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos ETRmáximo, Alpha, Beta e Ik para *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) e Cu+Pb, seguido por recuperação de 24 h. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, incluindo comparações entre os dados de exposição e recuperação para o mesmo tratamento, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste *a posteriori* de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

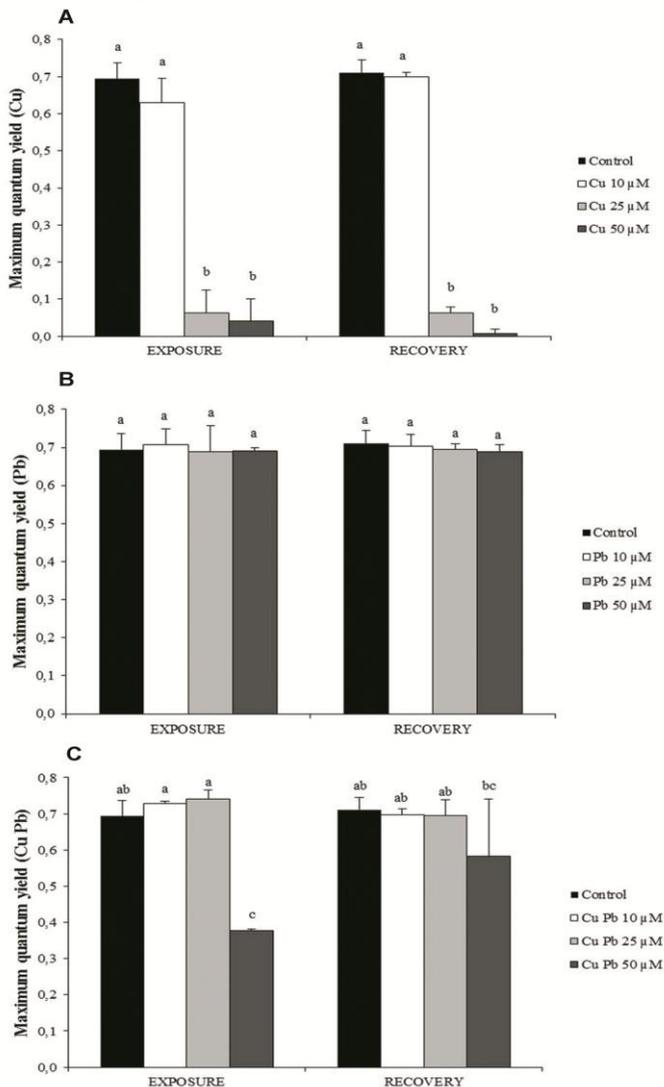
Treatments	ETRmax	Alpha	Beta	Ik
Exposure				
Control	26.22 \pm 2.21 ^b	0.49 \pm 0.01 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	53.08 \pm 3.02 ^{ab}
Cu 10 μ M	15.51 \pm 0.66 ^{bc}	0.39 \pm 0.02 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	39.28 \pm 0.79 ^b
Cu 25 μ M	4.17 \pm 0.34 ^c	0.33 \pm 0.00 ^{ab}	0.51 \pm 0.00 ^a	11.70 \pm 0.00 ^b
Cu 50 μ M	0.93 \pm 0.00 ^c	0.09 \pm 0.00 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b
Recovery				
Control	50.18 \pm 8.99 ^a	0.56 \pm 0.08 ^a	0.01 \pm 0.01 ^b	91.25 \pm 25.54 ^a
Cu 10 μ M	17.15 \pm 2.53 ^{bc}	0.44 \pm 0.08 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	39.39 \pm 7.96 ^b
Cu 25 μ M	3.43 \pm 2.55 ^c	0.07 \pm 0.07 ^{bc}	0.00 \pm 0.00 ^b	57.59 \pm 20.38 ^{ab}
Cu 50 μ M	50.86 \pm 0.0 ^a	0.03 \pm 0.03 ^c	0.62 \pm 0.14 ^a	9.62 \pm 0.00 ^b
Exposure				
Control	26.22 \pm 2.21 ^a	0.49 \pm 0.01 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	53.08 \pm 3.02 ^a
Pb 10 μ M	50.46 \pm 7.03 ^a	0.57 \pm 0.05 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	87.20 \pm 4.42 ^a
Pb 25 μ M	42.27 \pm 2.18 ^a	0.55 \pm 0.04 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	73.68 \pm 8.45 ^a
Pb 50 μ M	33.98 \pm 7.40 ^a	0.49 \pm 0.09 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	68.77 \pm 8.66 ^a
Recovery				
Control	50.18 \pm 8.99 ^a	0.56 \pm 0.08 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	91.25 \pm 25.54 ^a
Pb 10 μ M	37.00 \pm 10.778 ^a	0.54 \pm 0.08 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	66.84 \pm 12.73 ^a
Pb 25 μ M	46.20 \pm 9.142 ^a	0.55 \pm 0.07 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	83.77 \pm 17.71 ^a
Pb 50 μ M	40.29 \pm 5.308 ^a	0.57 \pm 0.04 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	70.15 \pm 13.50 ^a
Exposure				
Control	26.22 \pm 2.21 ^{bcd}	0.49 \pm 0.01 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	53.08 \pm 3.02 ^{ab}
Cu + Pb 10 μ M	19.96 \pm 6.62 ^{bcd}	0.53 \pm 0.05 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a	38.20 \pm 16.77 ^b
Cu + Pb 25 μ M	17.84 \pm 0.29 ^{cde}	0.46 \pm 0.04 ^a	0.01 \pm 0.01 ^a	38.25 \pm 3.30 ^b
Cu + Pb 50 μ M	7.62 \pm 1.48 ^e	0.25 \pm 0.04 ^b	0.02 \pm 0.00 ^a	30.90 \pm 10.21 ^b
Recovery				
Control	50.18 \pm 8.99 ^a	0.56 \pm 0.08 ^a	0.01 \pm 0.01 ^a	91.25 \pm 25.54 ^a
Cu + Pb 10 μ M	32.15 \pm 4.19 ^b	0.56 \pm 0.02 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	57.31 \pm 5.46 ^{ab}
Cu + Pb 25 μ M	26.43 \pm 1.63 ^{bc}	0.49 \pm 0.07 ^a	0.01 \pm 0.01 ^a	54.71 \pm 11.63 ^{ab}
Cu + Pb 50 μ M	11.65 \pm 5.67 ^{de}	0.26 \pm 0.12 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	28.07 \pm 1.21 ^b

Tabela Suplementar 1: ANOVA bifatorial para a concentração do metal (0, 10, 25 e 50 μM) e tratamentos de exposição/recuperação para os parâmetros fotossintéticos de *S. cymosum*. ETR_{máximo} ($\mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); α (eficiência fotossintética [$\mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$] [$\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$]-1); β (inibição fotossintética [$\mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$] [$\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$]-1); I_k (irradiância de saturação, $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Source of variation	ETRmax			Alpha			Beta			Ik		
Copper (Cu)	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio
Concentration (C)	3	0.00	44.56	3	0.00	38.88	3	0.00	35.30	3	0.01	9.36
Exposure/Recovery (E/R)	1	0.00	59.75	1	0.15	2.48	1	0.32	1.13	1	0.04	6.10
C x E/R	3	0.00	19.38	3	0.03	4.93	3	0.00	58.52	3	0.15	2.35
Lead (Pb)	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio
Concentration (C)	3	0.33	1.23	3	0.83	0.29	3	0.09	2.83	3	0.70	0.48
Exposure/Recovery (E/R)	1	0.14	2.40	1	0.27	1.31	1	0.83	0.05	1	0.26	1.39
C x E/R	3	0.01	5.26	3	0.43	0.98	3	0.03	4.61	3	0.04	3.77
Copper + Lead (Cu+Pb)	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio	DF	p	F-ratio
Concentration (C)	3	0.00	30.77	3	0.00	21.46	3	0.12	2.31	3	0.00	8.52
Exposure/Recovery (E/R)	1	0.00	34.59	1	0.32	1.07	1	0.96	0.00	1	0.01	9.62
C x E/R	3	0.03	3.89	3	0.90	0.19	3	0.51	0.80	3	0.17	1.94

Máximo rendimento quântico (Fv/Fm) mostrou ampla variação de resultados entre os tratamentos (Figure 3). Tratados com Cu mostraram as mais altas reduções do parâmetro de Fv/Fm, mas apenas a 25 e 50 μM , durante tanto para a exposição quanto para recuperação (Figura 3A). Tratamentos com Pb mostraram diferenças estatísticas comprado ao Fv/Fm do controle, tanto para exposição e recuperação (Figura 3B). Para os tratamentos com Cu+Pb, apenas 50 μM Cu+Pb na exposição registrou reduções significativas de Fv/Fm (Figura 3C), e total recuperação foi observada (Figura 3C).

Figura 3: Máximo rendimento quântico (Fv/Fm) de *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, seguido pela recuperação de 24 horas. **A.** Fv/Fm para exposição e recuperação com Cu. **B.** Fv/Fm para exposição e recuperação com Pb. **C.** Fv/Fm para exposição e recuperação com Cu+Pb. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste a posteriori de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).



4.3.4. Pigmentos, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

O conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *c* e carotenóides totais) de *S. cymosum* foi significativamente afetada por 1) os diferentes tratamentos com metais e 2) gradiente crescente de metais (Figura 4A-C). Uma tendência geral de aumento no conteúdo pigmentar foi observada para os tratados com metais quando comparados ao controle; contudo, não foram identificados padrões de influência. Amostras tratadas com 10 μM Cu e 25 μM Pb mostraram os mais altos níveis de pigmentos, analisando Cu e Pb separadamente (Figura 4A-C).

Compostos fenólicos apresentaram variações significativas entre os tratamentos comparados ao controle (Figura 4D). Com exceção de 10 μM Pb, todos os tratamentos apresentaram aumento no conteúdo de fenólicos totais, independente da concentração do metal.

Efeito significativo do efeito dos metais na capacidade de redução do radical DPPH foi observado em todos os tratamentos. Os resultados mostraram aumento de DPPH, várias vezes, para os tratamentos com Cu, Pb e Cu+Pb, quando comparados ao controle. Entretanto, não foi identificada uma tendência entre os metais e o seu efeito na capacidade de redução do radical DPPH, e nenhuma relação entre os metais e a capacidade de redução relacionada à concentração dos metais (Figura 4E). Apesar do tratamento com 10 μM Cu ter induzido a atividade antioxidante do radical DPPH comparado ao controle, a magnitude foi menor que a dos demais tratamentos.

O espectro de absorbância da água do mar (280 a 380 nm) foi avaliado para determinar a absorção de radiação UV pelos compostos extrusados pela alga. Tratamentos com Cu mostraram maior aumento da absorbância, e o aumento na absorbância foi relacionado ao aumento na concentração do metal (Figura 5A). Em oposição, redução na absorbância foi observada para os tratamentos com chumbo (Figura 5B). Para os tratamentos com Cu+Pb, a presença de Cu aparentemente levou ao aumento na absorbância da água do mar com o aumento das concentrações de Cu+Pb (Figura 5C). Estas medidas foram coincidentes com a coloração da água do mar dos meios de cultura, como observado para 7 dias de exposição de metais quando, particularmente, os tratamentos com Cu mostraram uma mudança na aparência inicial de coloração (Figura Suplementar 2).

Figura 4: Conteúdo pigmentar e atividade antioxidante de *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb. A. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso úmido). B. Concentração de clorofila *c* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso úmido). C. Concentração de carotenóides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso úmido). D. Concentração de compostos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso úmido). E. Concentração da capacidade de redução do radical DPPH (inibição %). Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste *a posteriori* de Tukey ($p \leq 0.05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

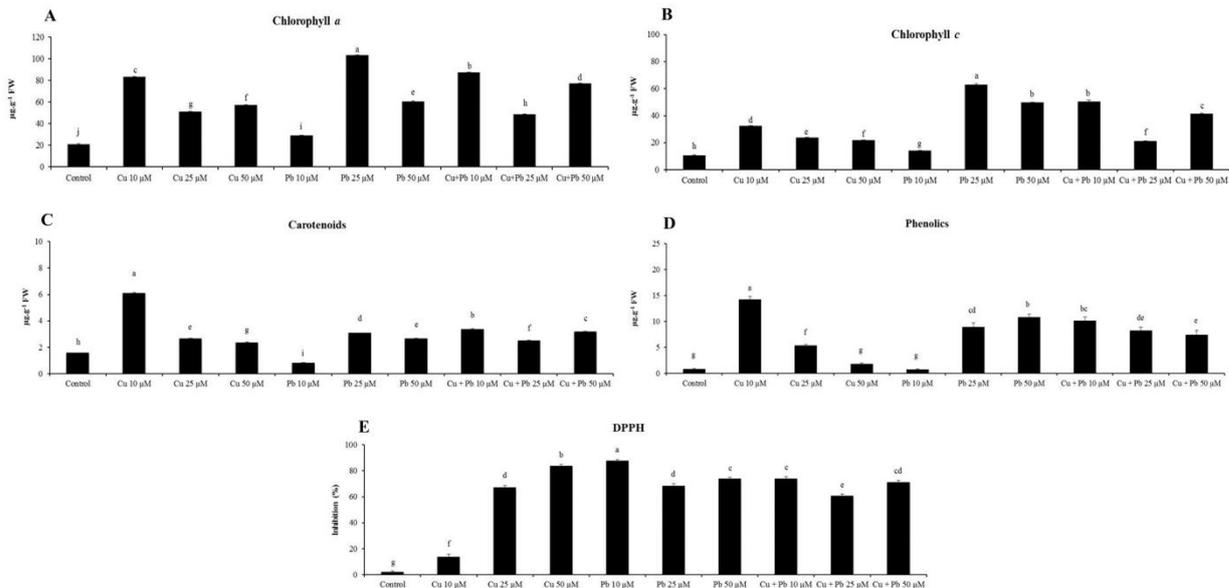


Figura 5: Absorbância média da água do mar a 280-380 nm de *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações (10, 25 e 50 μM) de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb. A. Absorbância para tratamentos com Cu. B. Absorbância para tratamentos com Pb. C. Absorbância para tratamentos com Cu+Pb. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com a ANOVA bifatorial e teste a posteriori de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados são médias \pm desvio padrão ($n = 4$).

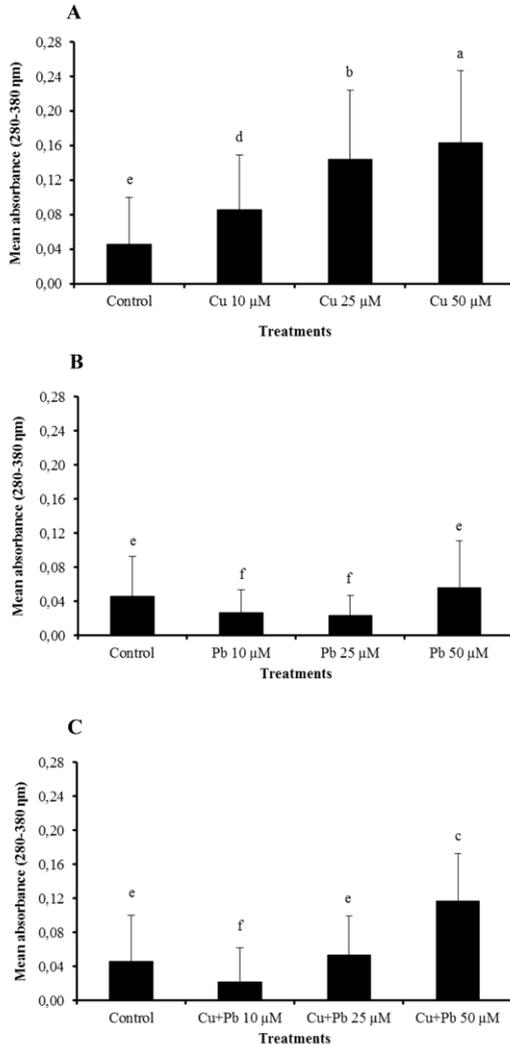
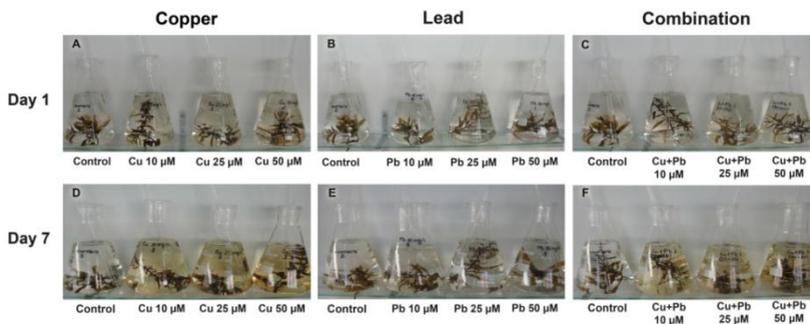


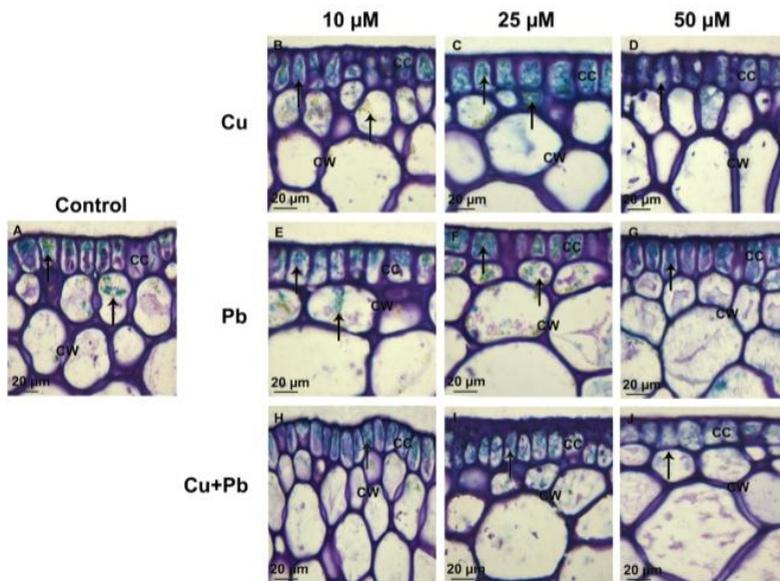
Figura Suplementar 2: Aparência do meio de cultura de *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações de (Cu), chumbo (Pb), e Cu+Pb (n=4). A-C. Meio de cultura no primeiro dia. D-F. Meio de cultura após sete dias. Cada imagem mostra, em sequência, tratamento controle e tratamentos com metais em ordem crescente de concentração (10, 25 e 50 μM).



4.3.5. Microscopia de luz e citoquímica

Amostra controle de *S. cymosum* corada com Azul de Toluidina (AT-O) mostrou reação metacromática nas paredes celulares, indicando a presença de polissacarídeos ácidos sulfatados (Figura 6A). Coloração das amostras tratadas com metais mostrou reações nas paredes celulares similares às observadas para o controle (Figura 6B-J). No citoplasma das células corticais do controle, fisíodes corados em azul escuro e amarelo foram observados (Figura 6A). Para as amostras tratadas com metais, o citoplasma das células corticais mostrou um aumento na quantidade de fisíodes (Figura 6B-J). Migração de fisíodes para a superfície de todas as amostras tratadas com metais mostrou maior reação metacromática correspondente ao aumento na concentração de metais (Figura 6B-J).

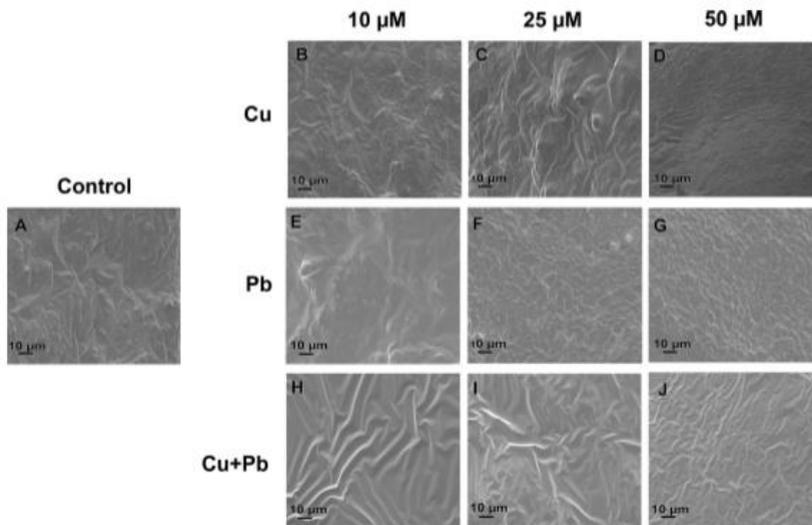
Figura 6: Após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb, microscopia de luz realizada com amostras de *S. cymosum* coradas com AT-O. A. Tratamento controle. Observe as células corticais (CC) mostrando reação metacromática nas paredes celulares (CW), indicando a presença polissacarídeos ácidos e fisíodes corados em azul e amarelo (setas). B-D. Tratamentos com Cu. Observe o aumento na quantidade de fisíodes nos tratados com metal e a migração para as células corticais (setas). E-G. Tratamentos com Pb. H-J. Tratamentos com Cu+Pb. Note a presença de fisíodes (setas).



4.3.6. Observações em MEV

Observações sob microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostraram superfícies de talo rugosas para o controle de *S. cymosum*, com rugosidade similar a superfície das paredes celulares das células corticais (Figura 7A). Para os tratamentos com Cu a 10 e 25 μM , as amostras mostraram um aumento gradual na rugosidade superficial (Figura 7B-J); entretanto, o mesmo padrão não foi observado para o tratamento a 50 μM Cu (Figura 7D). Por outro lado, tratamentos com Pb e Cu+Pb (Figura 7 E-J) mostraram uma redução na rugosidade superficial, provavelmente associada à absorção de metais pesados.

Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos talos de *S. cymosum* após sete dias de exposição a diferentes concentrações de cobre (Cu), chumbo (Pb) ou Cu+Pb. A. Tratamento controle. Note a rugosidade da superfície das paredes celulares das células corticais. B-D. Tratamentos com Cu. Note o aumento na rugosidade superficial das paredes celulares dos tratados a 10 e 25 μM . E-G. Tratamentos com Pb. H-J. Tratamentos com Cu+Pb. Observe a redução na rugosidade da superfície das paredes celulares do talo com o aumento na concentração dos metais.



4.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, *S. cymosum* exposto aos tratamentos com Cu, Pb ou Cu+Pb mostraram diferentes respostas físicas e metabólicas associadas aos mecanismos defensivos contra a toxicidade dos metais pesados. Estes resultados mostram respostas dependentes da dose. A habilidade de *S. cymosum* em reter cátions divalentes de Cu e Pb foi avaliada com base na análise de biosorção, p. ex., na retenção de metais nas paredes celulares através da ligação passiva com componentes estruturais, e a bioacumulação, relacionada ao metabolismo intracelular, p. ex., pela habilidade de incorporação de metais nas rotas metabólicas (Davis et al., 2003). Para capacidade de biosorção, *S. cymosum* mostrou maior retenção de Cu do que Pb, tanto individualmente quanto em combinação. A retenção de cátions divalentes tem sido estudada em diferentes gêneros de algas pardas, como *Sargassum* sp., *Padina* sp., *Laminaria* sp., *Bifurcaria* sp., *Fucus* sp., *Macrocystis*, *Lessonia* e

Durvillaea (Sheng et al., 2004; Freitas et al., 2008; Huovinen et al., 2010). Outros autores sugerem a maior retenção de metais em algas, como cobre, zinco, chumbo e cádmio, mas sem diferenciação entre a eficiência de bioacumulação e biosorção, e sem considerar o pré-tratamento alcalino da biomassa para maximizar a viabilidade de sítios de ligação com alginato nas paredes celulares (Romera et al., 2007; Aлахverdi & Savabieasfahani, 2012). Mesmo assim, espécies de *Sargassum* têm sido reconhecidas pela sua alta eficiência de capacidade de bioacumulação para metais pesados (Jothinayagi & Anbazhagan, 2009). Considerando as possíveis aplicações industriais no tratamento de água e remediação ecológica de águas marinhas costeiras, estes resultados podem ser considerados como economicamente importantes (Vijayaraghavan et al., 2009; Luna et al., 2010).

Taxas de crescimento (TCs) de *S. cymosum* fora alteradas pelos tratamentos com Cu e Pb, e quando comparado ao tratamento controle, exposição aos metais pesados reduziram as TCs. Estes resultados indicam mudanças no metabolismo, baseado no aumento do uso de energia para a produção de compostos de função antioxidante ao nível intracelular com a correspondente divergência de gasto energético para rotas metabólicas que são empregadas na síntese de proteínas e organelas celulares, necessárias para a duplicação celular e crescimento (Santos et al., 2014). No entanto, tratamento a 10 μM Pb mostrou a maior TC entre todos os tratamentos, indicando a tolerância para este metal em baixa concentração. Por outro lado, tratamentos com Cu mostraram TCs negativas, baseadas na perda de filóides e branqueamento das porções apicais. Estudos prévios com algas vermelhas expostas a Cu e Pb também mostraram reduções em TCs associadas com danos nas porções apicais (Gouveia et al., 2013).

Amostras de *S. cymosum* tratadas com metais mostraram efeitos divergentes na performance fotossintética quando comparadas com a amostra controle. Tratados com Cu mostraram forte redução nas curvas ETR, mesmo após 24 h em recuperação, enquanto tratados com Pb mostraram aumento nas curvas de ETR durante a exposição, bem como manutenção de altos níveis de ETR após a recuperação. Tratamentos com Cu+Pb mostraram reduções em ETR a 25 e 50 μM , mas com pequeno aumento nas ETRs após a recuperação. Baseado nesses resultados pode ser concluído que Cu reduz significativamente a eficiência fotossintética de *S. cymosum*, independente do conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Outros autores também reportam efeitos negativos do Cu na eficiência fotossintética das algas pardas *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* e *F. serratus* (Nielsen &

Nielsen, 2010; Connan & Stengel, 2011). O efeito das altas concentrações de Pb na fotossíntese tem sido descrito como o aumento no gradiente de prótons nas membranas dos tilacóides, e possível manutenção do fluxo de elétrons e do processo fotossintético (Kastori et al., 1998). De fato, enquanto resultados de máximo rendimento quântico (Fv/Fm) evidenciaram efeitos de fotoinibição, com forte redução observada para os tratamentos com Cu, sem sinais de efeito de recuperação, tratamentos com Pb, em contraste, indicaram um possível efeito fotoprotetor, e nenhuma diferença foi observada tanto para a exposição quanto recuperação.

Estudando os efeitos dos metais pesados na atividade fotossintética, pesquisadores encontraram redução induzida pela luz na capacidade fotossintética da alga parda *Padina boergesenii* exposta a Cu (Mamboya et al., 1999) e *F. vesiculosus* exposto a Cd (Brinza et al. 2009). Mesmo assim, resultados do presente estudo indicam certo grau de tolerância de *S. cymosum* exposto a Pb, e pode ser considerado que este poluente incorre em menor impacto sobre populações naturais do que os danos provocados por Cu.

Neste estudo, diferenças no conteúdo de clorofilas *a* e *c* foram observadas como consequência do efeito dos metais pesados. Tratamentos com Cu e Pb mostraram efeito de influência positiva na concentração de pigmentos fotossintéticos em todas as concentrações. Compostos tóxicos, como metais pesados, promovem estresse oxidativo, e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resultam em danos a estruturas celulares (Dummermuth et al., 2003). *S. cymosum* mostrou alta capacidade de sintetizar pigmentos, tornando possível que a clorofila *c* atuasse como fotoprotetor do aparato fotossintético. Variações no conteúdo de clorofila *a* podem ser relacionadas à biossíntese metabólica de compostos antioxidantes, como encontrado em outras algas, onde os conteúdos de clorofilas foram reduzidos na presença de compostos tóxicos, como consequência da interferência na biossíntese de enzimas e cloroplastos (Han et al., 2008; Santos et al., 2012). Para explicar o aumento no conteúdo de clorofila *a* de *S. cymosum*, como determinado no presente estudo, é hipotetizado que a alga é capaz de preservar a capacidade de síntese de clorofilas independentemente das rotas de síntese de compostos antioxidantes. Não obstante este aumento nos pigmentos fotossintéticos sugere-se que a eficiência fotossintética basal não pode ser mantida, o que representa uma desvantagem ecológica pelo alto gasto energético da síntese de clorofilas. Comportamento similar foi observado por Nielsen & Nielsen

(2005), que reportaram que altas concentrações de Cu induziram o conteúdo de clorofilas de *F. serratus*, e resultaram em fotoinibição.

Nossos resultados evidenciaram um aumento de carotenóides sob os tratamentos com metais, um composto de baixo peso molecular e reconhecido na defesa contra EROs (Collén et al., 2003), assim como compostos fenólicos, outro composto com função antioxidante contra estresse por EROs. Isto sugere que exposição a Cu e Pb induzem a biossíntese de carotenóides e compostos fenólicos como mecanismo de defesa antioxidante. O nível de efeitos foi diferente entre Cu e Pb e sustentam nossa hipótese que Pb em baixas concentrações não exerce o mesmo efeito tóxico sobre *S. cymosum* que Cu. Compostos fenólicos estão presentes em algas pardas como maior mecanismo antioxidante contra o estresse oxidativo, e têm sido descritos como responsáveis na prevenção de danos por radiação UV, bem como danos provocados pela toxicidade de metais pesados (Dummermuth et al., 2003; Balboa et al., 2013).

Outro mecanismo antioxidante avaliado em *S. cymosum* foi a capacidade de redução do radical DPPH. Todos os tratamentos com metais mostraram significativa atividade antioxidante, exceto para 10 μM Cu. Estes resultados são diferentes dos observados para carotenóides e compostos fenólicos, porque mesmo os tratamentos com menores concentrações de carotenóides e compostos fenólicos mostraram altos níveis de capacidade de inibição do radical DPPH. Esta diferença pode ser explicada pela defesa antioxidante adicional, desencadeada pelo estresse provocado pelo metal, do que as rotas de síntese de carotenóides e compostos fenólicos. Como monitor de reações químicas envolvendo radicais, é possível que medidas de DPPH em reações oxidativas não estejam associadas com o potencial antioxidante de carotenóides e compostos fenólicos. Alta capacidade de redução de radicais também foi observada por Dummermuth et al. (2003) para a alga ártica *Polysiphonia arctica* exposta ao estresse oxidativo de EROs, como peróxido de hidrogênio. Em geral, os presentes resultados indicam que cada metal induziu uma resposta antioxidante diferente e que as concentrações do metal podem afetar *S. cymosum* de diferentes formas.

Observações sob ML identificaram alta concentração de fisóides nas células corticais das amostras tratadas com metais comparadas com as amostras controle. Algas pardas armazenam florotaninos em fisóides, e estas substâncias são responsáveis pela detoxificação intracelular de metais (Thot & Pavia, 2000). Exsudados de algas também são responsáveis por quelar metais pesados na água próxima à superfície da

alga, ajudando a reduzir seus efeitos tóxicos (Gledhill et al., 1999). Estudos prévios com *S. cymosum* mostraram a migração de compostos fenólicos em fisóides para as células corticais como mecanismo celular de defesa contra estresse (Polo et al., 2014). Alta exsudação de compostos é corroborada pela coloração marrom-amarelada da água do meio de cultura ao final do experimento, com alta absorvância UV detectada nos tratados com Cu. Em oposição, para *A. nodosum*, Thot & Pavia (2000) não encontraram correlação entre o aumento de fisóides e o aumento da concentração de metais. No entanto, é bem documentado que a maioria das espécies de algas pardas aumenta a sua produção de florotaninos como mecanismo de defesa (Ragan & Glombitza, 1986; Thot & Pavia, 2000). Então, a migração cortical de fenólicos via fisóides é provavelmente relacionada à extrusão de compostos fenólicos como mecanismo de defesa em *S. cymosum* contra o estresse oxidativo, como o observado para estresse por radiação UV (Shoenwaelder, 2002, 2008; Polo et al., 2014).

Análises de MEV mostraram mudanças na superfície de *S. cymosum* após a exposição a metais pesados. Diferente dos resultados obtidos em ML, tratamentos com Pb e Cu+Pb mostraram a maior interferência, com perda da rugosidade superficial comparado ao controle. Esses resultados podem ser associados com a retenção de metais nas paredes celulares das células corticais. Por outro lado, é possível que a afinidade com os polissacarídeos das paredes celulares resultem em mudanças na sua conformação estrutural por alterações nos sítios de ligação e rearranjo espacial, o que leva ao aumento da capacidade de retenção do metal como observado neste trabalho (Santos et al., 2014). Pinto et al. (2003) também descreveram mudanças induzidas por metais pesados em algas, através de proteínas de canal para entrada na célula via transporte ativo que pode, por sua vez, refletir em mudanças na conformação superficial da parede celular. Estudos com *Gracilaria domingensis* (Gouveia et al., 2013) mostraram alterações na superfície do talo nas observações de MEV, com aumento na rugosidade superficial. Embora estes resultados difiram dos do presente estudo, eles corroboram o efeito dos metais pesados nas características naturais da superfície dos talos.

Em resumo, os resultados do presente estudo levam à conclusão que os metais pesados Cu e Pb são tóxicos para *S. cymosum* e que Cu individualizado tem a maior toxicidade do que Pb em termos de pigmentos e eficiência fotossintética. Análises mostraram crescimento limitado, mas aumento nos pigmentos fotossintéticos, causados pela biossíntese de antioxidantes não enzimáticos, como resposta ao estresse

por metais. Isto ficou evidente com a análise de microscopia de luz, em que o aumento na concentração de fisóides nas células corticais foi observado, provavelmente como defesa contra a bioacumulação de metais pesados. Além disso, reduções no máximo rendimento quântico indicam o possível dano no aparato fotossintético e a baixa capacidade de recuperação. Por causa das mudanças fisiológicas, *S. cymosum* pode ser considerado como um bom bioindicador por causa das suas propriedades reativas relativas ao metal pesado estressor no ambiente e por sua sensibilidade a poluentes. Além disso, o entendimento dos mecanismos defensivos da espécie torna mais fácil a predição e os estudos das conseqüências da introdução de poluentes em ambientes naturais. Mesmo assim, *S. cymosum* mostrou uma alta capacidade de bioacumulação e biosorção para estes metais pesados. Resultados como estes estimulam novos estudos e perspectivas para a aplicação de *Sargassum* spp. como biosorventes naturais para águas residuais, independente dos intensos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo desenvolvidos por esta alga.

4.5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao apoio técnico do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, pelo uso do microscópio eletrônico de varredura. Éder C. Schmidt possui bolsa de pós-doutorado financiada pela CAPES. Giulia B. Costa possui bolsa de mestrado financiada pela CAPES. Zenilda L. Bouzon é apoiada pelo CNPq. Fungyi Chow apoiada pela FAPESP. Este estudo é parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

4.6. REFERÊNCIAS

- Alahverdi M, Savabieasfahani M (2012) Metal pollution in seaweed and related sediment of the Persian Gulf, Iran. *Environ Contam Toxicol* 88(6):939-945
- Aman R, Carle R, Conrad J, Beifuss U, Schieber, A (2005) Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1074: 99–105
- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H (2013) In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem* 138:1764–1785

- Betancor S, Tuya F, Gil-Díaz T, Figueroa FL, Haroun R (2014) Effects of a submarine eruption on the performance of two brown seaweeds. *Mar Environ Res* 79: 37-47
- Brinza L, Nygård CA, Dring MJ, Gavrilesco M, Benning LG (2009) Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea. *Bioresource Technol* 100:1727–1733
- Collén J, Pinto E, Pedersén M, Colepicolo P (2003) Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch Environ Con Tox* 45:337–342
- Connan S, Stengel DB (2011) Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. Interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. *Aquat Toxicol* 104:94–107
- Davis TA, Volesky B, Vieira RHSF (2000) *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. *Water Res* 34(17): 4270-4278
- Davis TA, Volesky B, Mucci A (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res* 37:4311–4330
- Dummermuth AL, Karsten U, Fisch KM, König GM, Wiencke C (2003) Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 289:103-121
- Edwards P (1972) Cultured red alga to measure pollution. *Marine Poll Bull* 3(12): 184–188
- Felix MR de L, Osorio LKP, Ouriques LC, Farias-Soares FL, Steiner N, Kreusch M, Pereira D, Simioni C, Costa GB, Horta PA, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, Schmidt EC (2014) The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales). *Microsc Microanal (Print)*, 20:1411-1424
- Fichet D, Radenac G, Miramand P (1998) Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Marine Poll Bull* 7-12(36):509-518
- Figueroa F, Nygard C, Ekelund N, Gómez I (2003) Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *J Photoch Photobio* 72(3):5–44
- Fourestand E, Volesky B (1996) Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. *Environ Sci Technol* 30:277-282

Freitas OMM, Martins RJE, Delerue-Matos CM, Boaventura RAR (2008) Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modeling. *J Hazard Mater* 153:493-501

Gledhill M, Nimmo M, Hill SJ, Brown MT (1999) The release of copper-complexing ligands by the brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) in response to increasing total copper levels. *J Phycol* 35:501–509

Gouveia C, Kreusch M, Schmidt EC, Felix MR De L, Osorio LKP, Pereira DT, Santos R, Ouriques LC, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Carvalho TJG, Chow F, Maraschin M, Bouzon ZL (2013) The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis*. *Microsc Microanal* 19(3):513-524

Han T, Kang SH, Park JS, Lee HK, Brown MT (2008) Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquat Toxicol* 86:176–184

Hu JZ, Zheng AZ, Pei DL, Shi GX (2010) Bioaccumulation and chemical forms of cadmium, copper and lead in aquatic plants. *Braz Arch Biol Technol* 53(1):235-240

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 53:1841-1856

Huovinen P, Leal P, Gómez I (2010) Interacting effects of copper, nitrogen and ultraviolet radiation on the physiology of three south Pacific kelps. *Mar Freshwater Res* 61:330–341

Jacinto MLJAJ, David CPC, Perez TR, Jesus BR (2009) Comparative efficiency of algal biofilters in the removal of chromium and copper from wastewater. *Ecol Eng* 35:856–860

Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol* 167:191–194

Jothinayagi N, Anbazhagan C (2009) Heavy metal monitoring of Rameswaram Coast by some *Sargassum* species. *American-Eurasian J Agric Environ* 4(2):73-80

Karez CS, Magalhaes VF, Pfeiffer WC (1994) Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. *Environ Pollut* 83:351-356

Kim YK, Guo Q, Packer L (2002) Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172:149-156

Kleinübing SJ, Guibal E, Silva EA, Silva MGC (2012) Copper and nickel competitive biosorption simulation from single and binary systems by *Sargassum filipendula*. Chem Eng J 184:16–22

Lignell A, Pedersén M (1989) Ágar composition as a function of morphology and growth rate: studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Bot Mar 32:219-227

Luna AS, Costa ALH, Costa ACA, Henriques CA (2010) Competitive biosorption of cadmium(II) and zinc(II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*. Bioresource Technol 101:5104–5111.

Mamboya FA, Pratap HB, Mtolera M, Björk M (1999) The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalga *Padina boergesenii*. <http://www.oceandocs.org/handle/1834/787>. Accessed 17 April 2014

Martins CDL, Arantes N, Faveri C, Batista MB, Oliveira EC, Pagliosa PR, Fonseca AL, Nunes JMC, Chow F, Pereira SB, Horta PA (2012) The impact of coastal urbanization on the structure of phytobenthic communities in southern Brazil. Mar Pollut Bull 64:772-778

Melville F, Pulkownik A (2007) Investigation of mangrove macroalgae as biomonitors of estuarine metal contamination. Sci Total Environ 387:301–309

Nielsen HD, Nielsen SL (2005) Photosynthetic responses to Cu^{2+} exposure are independent of light acclimation and uncoupled from growth inhibition in *Fucus serratus* (Phaeophyceae). Mar Pollut Bull 51:715–721

Nielsen HD, Nielsenb SL (2010) Adaptation to high light irradiances enhances the photosynthetic Cu^{2+} resistance in Cu^{2+} tolerant and non-tolerant populations of the brown macroalgae *Fucus serratus*. Mar Pollut Bull 60:710–717

Pagliosa PR, Fonseca A, Barbosa FA (2006) Evidence of systemic changes in trace metal concentrations in subtropical estuarine sediments as a result of urbanization. J Coastal Res 39:1078 -1083

Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. J Phycol 39:1008–1018

Platt T, Gallegos C, Harrison W (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J Mar Res 38(68):7-701

Polo LK, Felix MRL, Kreusch M, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, Ouriques LC, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, Schmidt EC (2014) Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *J Photoch Photobiol*

Pupo D, Ouriques LC, Fujii MT, Guimarães SMPB, Yokoya NS (2011) Marine benthic algae from Santa Catarina state, Southern Brazil. *Boletim do Instituto de Botânica* 20, Brazil

Ragan MA, Glombitza KW (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progr Phycologic Research* 4:129-241

Ramus J, Rosenberg G (1980) Diurnal photosynthetic performance of seaweeds measured under natural conditions. *Mar Biol* 56: 21-28

Randhir R, Shetty P, Shetty K (2002) L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem* 37:1247–1256

Romera E, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA (2007) Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresour Technol* 98(17): 3344–3353

Rovai AS, Barufi JB, Pagliosa PR, Scherner F, Torres MA, Horta PA, Simonassi JC, Quadros DPC, Borges DLG, Soriano-Sierra EJ (2013) Photosynthetic performance of restored and natural mangroves under different environmental constraints. *Environ Pollut* 181: 233-241

Santos RW, Schmidt EC, Martins RP, Latini A, Maraschin M, Horta PA, Bouzon ZL (2012) Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Am J Plant Sci* 3:1077-1084

Santos RW, Schmidt EC, Bouzon ZL (2013) Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. *Protoplasma* 250:297–305

Santos RW, Schmidt EC, Felix MRL, Polo LK, Kreusch M, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2014) Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features. *Ecotox Environ Safe* 105:80–89

Scherner F, Ventura R, Barufi JB, Horta PA (2012a) Salinity critical threshold values for photosynthesis of two cosmopolitan

seaweed species: Providing baselines for potential shifts on seaweed assemblages. *Mar Environ Res* 79:1-12

Scherner F, Barufi JB, Horta PA (2012b) Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: Evidence of selection of pollution-tolerant species. *Mar Pollut Bull* 64:2380-2390

Scherner F, Horta PA, Oliveira EC, Simonassi JC, Hall-Spencer JM, Chow F, Nunes JMC, Pereira SMB (2013) Coastal urbanization leads to remarkable seaweed species loss and community shifts along the SW Atlantic. *Mar Pollut Bull* 76:106-115

Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL (2009) Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860-869

Schmidt EC, Pereira B, Pontes CLM, Santos R, Scherner F, Horta PA, Martins RP, Latini A, Maraschin M, Bouzon ZL (2012) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma* 249:353-367

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10:51-62

Sheng PX, Ting YP, Chen JP, Hong L (2004) Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *J Colloid Interface Sci* 275:131-141

Shoenwaelder M. (2002) The occurrence and cellular significance of physodes in the brown algae. *Phycologia* 41(2):125-139

Shoenwaelder M. (2008) The biology of phenolic containing vesicles. *Algae* 23:163-75

Széchy MTM, Paula EJ (2000) Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Rev Bras Bot* 23(2):121-132

Thibaut T, Pinedo S, Torras X, Ballesteros E (2005) Long-term decline of the populations of Fucales (*Cystoseira* spp. and *Sargassum* spp.) in the Albères coast (France, North-western Mediterranean). *Mar Pollut Bull* 50:1472-1489

Toth G, Pavia H (2000) Lack of phlorotannin induction in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* in response to increased copper concentrations. *Mar Ecol-Prog Ser* 192: 119-126

Vieira RHF, Volesky B (2000) Biosorption: a solution to pollution? *Int Microbiol* 3:17–24

Vijayaraghavan K, Teo TT, Balasubramanian R, Joshi UM (2009) Application of *Sargassum* biomass to remove heavy metal ions from synthetic multi-metal solutions and urban storm water runoff. *J Hazard Mater* 164:1019-1023

5. CAPÍTULO II: A alga parda *Sargassum cymosum*: mudanças no metabolismo e na organização celular sob exposição prolongada ao cádmio.

Giulia Burle Costa¹; Carmen Simioni¹; Fernanda Ramlov²; Marcelo Maraschin²; Fungyi Chow³; Zenilda L. Bouzon¹; Éder C. Schmidt^{4*}

¹Laboratório de Biologia Celular Vegetal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

³Instituto de Bociência, Universidade de São Paulo, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Sargassum cymosum foi exposto ao cádmio (Cd) por período prolongado para determinar os efeitos fisiológicos e ultra-estruturais. Para isto, amostras de *S. cymosum* foram cultivadas sob radiação PAR e cádmio (0, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 mg.L⁻¹), durante sete e 14 dias sob condições controladas de laboratório, considerando a amostra Ambiente como controle. As algas tiveram alta capacidade de retenção (acima de 90%) em ambos os tempos de exposição. As taxas de crescimento aumentaram significativamente em 14 dias. Em oposição, viabilidade celular decresceu em todos os tratamentos. Parâmetros fotossintéticos não foram afetados pelos tratamentos com cádmio, mas os conteúdos pigmentares foram positivamente afetados por metais. A amostra Ambiente teve a maior concentração de carotenóides totais em todos os tratamentos. Entretanto, quando da análise de HPLC foi aplicado nas amostras tratadas com Cd, diferenças significativas no perfil carotenóidico foram observadas, com mudanças na composição de cada classe de carotenóides. Compostos fenólicos e flavonóides mostraram maior acumulação em 14 dias, e padrão similar foi observado para os carboidratos totais. Microscopia de luz mostrou evidências do aumento de fisóides e polissacarídeos ácidos, quando corados com ATO, e vesículas, quando coradas com PAS, relacionados ao tempo de exposição e a concentração do metal. Análises de MEV mostraram pequenas diferenças na superfície dos talos. Por sua vez, análises de MET mostraram maiores alterações nas amostras tratadas com Cd, quando comparadas com amostras de 0 mg.L⁻¹ Cd, em particular, com desorganização das fibrilas de parede, aumento de vesículas, e a presença de precipitados tanto nas paredes celulares quanto nos vacúolos. Portanto pode ser concluído que Cd é um fator de estresse para *S. cymosum*, resultando em alterações fisiológicas e estruturais relacionadas a mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e efeitos toxicológicos da exposição prolongada ao metal. Contudo, no presente trabalho, nós hipotetizamos que as alterações observadas são resultantes de mecanismos de aclimação sobre baixas condições de Cd e capacidade de tolerância de *S. cymosum* as condições experimentais avaliadas.

Palavras-chave: *Sargassum cymosum*; biosorption; eficiência fotossintética; ultra-estrutura celular; toxicologia; aclimação prolongada.

6. CAPÍTULO III: Os efeitos tóxicos do micronutriente manganês na fisiologia e morfologia de *Sargassum cymosum* (Ochrophyta, Fucales) no contexto de aclimação a exposição prolongada.

Giulia Burle Costa¹; Carmen Simioni¹; Fernanda Ramlov²; Marcelo Maraschin²; Zenilda L. Bouzon^{1*}; Éder C. Schmidt¹

¹Laboratório de Biologia Celular Vegetal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Efeitos tóxicos do micronutriente manganês (Mn) sobre a macroalga parda *Sargassum cymosum* foram avaliados para a compreensão das mudanças fisiológicas e celulares como resultado da exposição prolongada. Segmentos de *S. cymosum* foram cultivados com Mn (0, 10, 20, 40 and 80 mg.L⁻¹) durante 7 e 14 dias sob condições controladas laboratoriais. As algas mostraram alta capacidade de biosorção e altas TCs em ambos os períodos de exposição, com tendência de redução na viabilidade celular após 14 dias. Pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *c*) mostraram efeitos positivos com a exposição ao Mn. Reduções no conteúdo de carotenóides totais e alterações no perfil carotenóidico foram observados em todos os tratamentos com Mn. Compostos fenólicos e flavonóides tiveram reduções significativas em seu conteúdo em comparação ao tempo de exposição e concentração de Mn. Açúcares solúveis e insolúveis totais tiveram variações pontuais entre os tratamentos. Microscopia de luz evidenciou acumulação de fisóides e polissacarídeos ácidos nas paredes celulares relacionadas à concentração de Mn. Análises de microscopia eletrônica de varredura indicaram mudanças substanciais na superfície dos talos, especialmente após 14 dias. Na análise de microscopia eletrônica de transmissão, maiores alterações foram observadas após 14 dias, com rompimento de organelas e desorganização das fibrilas de paredes celulares. Na microscopia confocal, foi observada a redução na autofluorescência de cloroplastos e compostos fenólicos. Apesar da função como micronutriente, manganês mostrou-se um estressor metabólico para *S. cymosum*, por causar danos na estrutura de organelas e na organização celular. Uma vez que este metal não é reconhecido como um poluente nas águas costeiras brasileiras, esta espécie pode ser considerada como um potencial biomonitor de áreas costeiras e associada a avaliações de parâmetros abióticos, como salinidade ou pH, que podem intensificar os efeitos metabólicos negativos de manganês na fisiologia e morfologia de *S. cymosum*.

Palavras-chave: Ecofisiologia; Toxicologia; Micronutriente; Manganês; Ultra-estrutura; Bioindicador.

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve enfoque nos efeitos tóxicos dos metais pesados cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e manganês (Mn) sobre a morfologia, ultra-estrutura e fisiologia da macroalga parda *Sargassum cymosum*. Os metais escolhidos para as inferências experimentais possuem relevância pela importância metabólica e de efeitos tóxicos para vegetais e algas, assim como potencial poluente em zonas costeiras (Macêdo & Moril, 2008; Brasil, 2011; Karthick et al., 2012). Ainda assim, cada elemento metálico analisado foi ministrado em diferentes concentrações. Isto se deve a 1) o fato que cada elemento metálico é assimilado e biologicamente alterado em diferentes rotas metabólicas; 2) a relação entre espécie tóxica e organismo se dá de maneira específica, pelas interações físicas, químicas e biológicas da espécie com o xenobiótico; 3) a interação cinética do poluente provoca níveis de estresse em escalas variáveis, de acordo com a sua capacidade de assimilação ou penetrabilidade facilitada no organismo (Azevedo & Chasin, 2003).

Sendo assim, foi verificado que, em concentrações mais baixas quando comparado aos outros ensaios, o elemento cobre foi o que levou às maiores alterações macroscópicas em *S. cymosum*. Os elementos cádmio e manganês não levaram a modificações macroscópicas perceptíveis, mesmo ao considerar que foram aplicados em maior tempo de exposição. Com isto, fica evidente que cada elemento teve uma cinética de absorção e capacidade de metabolização pela alga. As respostas morfológicas das exposições individualizadas fazem crer que as rotas metabólicas utilizadas por esta espécie para o combate à toxicidade dos metais pesados variaram, especificamente, de acordo com o elemento químico ao qual foram expostas, de acordo com evidências discutidas a seguir.

A análise de bioacumulação e de bioconcentração foi realizada para todos os metais investigados. Todos os metais tiveram alta capacidade de serem bioacumulados (acima de 90% de bioacumulação). A exceção foi à combinação de cobre e chumbo, onde um elemento reduziu a capacidade de retenção do outro, como já descrito por Jesus (2010), ao observar a preferência de acumulação de chumbo em detrimento do cobre por *Sargassum* sp. A permeabilidade destes elementos pode ter sido favorecida por alguns fatores. Em primeiro, a adição dos metais na forma de cloreto, onde a dissociação dos elementos disponibiliza-os na forma de cátions divalentes, de alta afinidade com os elementos estruturais de parede (grupos sulfatados) (Davis et al.,

2003). Em segundo, os metais cobre e manganês, pela sua função metabólica, podem ter sofrido permeabilidade favorecida, pelo reconhecimento dos elementos e difusão facilitada, assim como o metal cádmio, que compete pelos sítios de ligação com outros elementos como cálcio (Macêdo & Morril, 2008). E em terceiro, cátions divalentes têm afinidade química com elementos antioxidantes, como compostos fenólicos, polifenóis e fitoquelatinas, presentes nas organelas membranosas dos fisóides, e que por ação de neutralização podem ser armazenados em vacúolos (Koivikko, 2008). Por sua vez, é interessante notar que todos os elementos tiveram alta acumulação em condições ótimas de pH (7,5-8,0), enquanto que diversos autores apontam que as melhores cinéticas de absorção ocorrem em pH entre 4,5-5,5 (Sheng et al., 2004). Com isto, evidencia-se que *S. cymosum* tem alta capacidade metabólica de incorporação de elementos metálicos com baixa dependência das condições abióticas do meio.

As taxas de crescimento de *S. cymosum* tiveram variações relativas ao metal dos tratamentos. As menores taxas de crescimento foram obtidas para o metal cobre, entre todos os elementos avaliados. Por outro lado, os delineamentos com cádmio e manganês proporcionaram uma exposição prolongada, que ainda assim não se refletiram em reduções expressivas no crescimento da alga. Sendo assim, é possível considerar, em ordem decrescente de influência negativa nas taxas de crescimento: cobre>chumbo>manganês>cádmio. Com a metodologia de avaliação de viabilidade celular, entretanto, deve-se considerar que a melhor proposição de ordenamento seria: cobre>chumbo>cádmio>manganês, ainda que não tenha sido aplicada a metodologia com os metais cobre e chumbo. Ficou evidente a redução da viabilidade celular nos tratamentos com cádmio submetidos à exposição prolongada, ainda que haja a observação de tendência de redução nos tratamentos com manganês de acordo com aumento na concentração do metal. Hipóteses podem ser apontadas, considerando-se a influência metabólica que exercem. Em primeiro, cobre é responsável pela ruptura de organelas citoplasmáticas, o que levaria a redução nas taxas de divisão celulares e consequente crescimento (Kováčik et al., 2010). Em segundo, o elemento chumbo pode interferir no metabolismo protéico da clorofila e no metabolismo do nitrogênio, afetando assim o crescimento (Santos et al., 2015). Por sua vez, na presença do metal micronutriente manganês, as amostras apresentaram taxas de crescimento elevadas, mas em médias um pouco menores do que as observadas com o metal cádmio. Pode-se supor, com isto, que tanto o tempo de exposição quanto a concentração muito mais elevada do

manganês em relação ao cádmio (100 vezes em aumento de concentração), podem ambos ter contribuído para um nível maior de estresse com o metal nutriente em comparação ao cádmio para o crescimento. Ainda assim, poder-se-ia esperar uma maior resposta fisiológica negativa da exposição ao cádmio em concentrações mais elevadas, especialmente pela drástica redução da viabilidade celular observada, e considerando os relatos na literatura de efeitos negativos de toxicidade de cádmio sobre macroalgas (Huang et al., 2009; Bouzon et al., 2012; Santos et al., 2013).

As variações do metabolismo da espécie podem ser atribuídas a interferências tanto das condições abióticas do experimento, quanto das variações específicas dos indivíduos. As condições abióticas dos experimentos foram padronizadas, para evitar a oxidação dos elementos metálicos, que poderia alterar seu estado iônico, ou até mesmo levar a precipitação, com conseqüente remoção do elemento na forma livre dissolvida para assimilação pela alga. A questão relativa à variação específica do organismo é referente a aspectos ecológicos, considerando a heterogeneidade entre os organismos da população na qual os exemplares foram amostrados, os períodos diferenciados de coleta e efeitos acumulativos das variações sazonais. Com isto, pequenas variações no estado basal seriam esperadas, ainda que os efeitos destas diferenças metabólicas sejam minimizados com o período de aclimação, a que todos os exemplares foram submetidos previamente à aplicação dos tratamentos.

As maiores alterações bioquímicas negativas foram observadas nos metais cobre, isolado e associativo a chumbo, e manganês, enquanto que efeitos estruturais deletérios pronunciados foram obtidos nos metais cobre e manganês. Os metais chumbo individualizado, e cádmio tiveram alterações metabólicas e estruturais observadas, mas ainda assim, em escalas menores de danos e com aparente capacidade de aclimação as condições de exposição propostas.

Essas respostas diferenciadas se devem, especialmente, as características destes metais. O elemento cobre, apesar de ser um micronutriente necessário à manutenção de sítios enzimáticos, é reconhecido pela sua alta toxicidade em células vegetais, e efeitos negativos sobre a fotossíntese e a molécula de clorofila (Rai et al., 1981; Macêdo & Morrill, 2008; Zou et al., 2014), como observado nos presentes resultados. Chumbo é um metal que não tem uma função metabólica reconhecida para as espécies vegetais (Rai et al., 1981; Macêdo & Morrill, 2008), mas que, para a espécie *S. cymosum*, não mostrou elevado grau de toxicidade, reduzindo inclusive os efeitos

tóxicos do cobre quando expostos simultaneamente. O metal cádmio é reconhecido pela sua alta toxicidade em diferentes espécies de macroalgas, mas que não mostrou efeitos metabólicos tão pronunciados, provavelmente pela baixa concentração da exposição. Por fim, o elemento manganês, que é também descrito como um elemento micronutriente (Rai et al., 1981), mas que se mostrou altamente tóxico em nível celular, quando em elevadas concentrações.

Os pigmentos fotossintetizantes sofreram variações positivas e negativas consideráveis. O tempo de exposição parece ser determinante na resposta pigmentar de *S. cymosum*, embora variações macroscópicas, como despigmentações ou necroses, não tenham sido observadas e passíveis de uso como principal caráter de determinação da resposta tóxica dos metais. O conteúdo de clorofilas *a* e *c* não demonstraram tendências claras de variações de acordo com o aumento da concentração do metal. Picos isolados destes pigmentos foram observados entre tratamentos de todos os delineamentos experimentais aplicados. Ainda assim, em média, os tratamentos com cobre e chumbo foram os que apresentaram a menor concentração destes pigmentos, seguidos pelos tratados com manganês e cádmio. A mesma tendência foi observada para o conteúdo de carotenóides totais. Com isso, pode-se inferir que a presença de cobre e chumbo foram inibidores da síntese de clorofilas e carotenóides, e promoveram também a degradação de carotenóides. Por sua vez, a presença de manganês promoveu aumento na síntese destes compostos, mas não na mesma proporção obtida para o metal cádmio. Sendo assim, este último elemento parece proporcionar o aumento na síntese de clorofilas e carotenóides, podendo ser relacionado tanto à manutenção das taxas fotossintéticas, quanto à ativação da proteção antioxidante proporcionada pelos carotenóides.

Duas análises complementares foram interessantes para a melhor compreensão da dinâmica de pigmentos de *S. cymosum*. A realização de análise de fluorometria de amplitude modulada (PAM) indicou que, assim como para o elemento cobre houve redução no seu conteúdo total, a taxa de transporte de elétrons também foi inibida, e conseqüentemente, reduções na eficiência fotossintética puderam ser observadas. Estes efeitos foram menos pronunciados com o metal chumbo, mas não levaram a efeito de fotoinibição para o elemento cádmio, possivelmente pela sua manutenção em conteúdo pigmentar, o que justifica o menor efeito do cádmio, em baixas concentrações, sobre a capacidade fotossintetizante da espécie. A segunda análise complementar foi do perfil de carotenóides, por cromatografia líquida (HPLC). Esta análise, realizada com os extratos das algas expostas a cádmio e manganês,

evidenciaram que, além do papel como pigmento acessório, o conteúdo de carotenóides pareceu ser intrinsecamente associado com a defesa antioxidante. Embora ambos os extratos tenham apresentado majoritariamente os conteúdos de fucoxantina, luteína e β -caroteno, a proporção entre estes compostos foi bastante variável comparando-se os períodos de exposição, com especial redução no conteúdo de luteína. Embora ainda não existam relatos detalhados em literatura sobre a variação na composição do perfil de carotenóides, decorrente da presença de metais pesados, os presentes resultados indicam que o uso de determinada fração pode ser relacionada com a defesa antioxidante do organismo.

Ainda relativo à defesa antioxidante de *S. cymosum*, foi realizado análises de quantificação de compostos fenólicos totais, e também de flavonóides. Ambos os compostos mostraram interferências negativas da exposição a todos os metais avaliados. Considerando os metais qualitativamente, as maiores reduções na presença de fenólicos foram obtidas para os metais cobre e chumbo; e considerando-se os tempos de exposição prolongada, o metal manganês apresentou reduções significativas entre os tratamentos. Os compostos fenólicos e flavonóides são relacionados tanto em algas quanto em plantas, majoritariamente, a defesa oxidativa por fatores de estresse e principalmente, na degradação de espécies reativas de oxigênio (Cobbett, 2000; Davis et al., 2003; Huang et al., 2005; Agati et al., 2013; Balboa et al., 2013). Esta defesa ocorre em nível citoplasmático, com ligação dos prótons danosos na estrutura química destes compostos, e conseqüentes reações de neutralização por oxi-redução (Sathya et al., 2013). Com isto, reduções significativas foram observadas com exposições prolongadas, uma vez que estes compostos são ativamente degradados. Ainda assim, os elementos cobre e chumbo apresentaram danos expressivos em menor tempo de exposição, e por isso *S. cymosum* foi mais susceptível a estes elementos.

As análises por diferentes técnicas de microscopia evidenciam algumas tendências comuns de resposta estrutural perante a presença de metais pesados poluentes. A primeira técnica utilizada foi a citotóxica para a microscopia de luz. O reagente ATO mostrou variações expressivas na presença de fisóides nas células corticais. Estas organelas foram observadas na porção apical das células, bem como aumento da intensidade de reação metacromática tanto das organelas quanto das paredes. Estas variações indicam que o rearranjo de organelas é um mecanismo efetivo de defesa, já que contém substâncias antioxidantes (fenólicos, fitoquelatinas e polifenóis), capazes de neutralizar elementos

tóxicos, e também de exsudá-los do meio citoplasmático, pela fusão com as membranas e paredes celulares (Andrade et al., 2010a; Sathya et al., 2013). Sendo assim, a percepção química da presença de elementos estranhos tem reflexos estruturais, ativados possivelmente por mecanismos de sinalização bioquímica e transporte intra e intercelular. Além disso, as imagens de microscopia de varredura confocal evidenciaram a perda progressiva da autofluorescência de fenólicos com aumento na concentração de Mn. Este dado é forte indicativo que houve supressão da fluorescência do composto, associada com a sua degradação oxidativa, e esta resposta poderia ser similar em resposta aos outros metais.

Quanto à reação química com PAS, realizada com exemplares expostos a cádmio e manganês, as alterações observadas foram passíveis de correlação com a quantificação de carboidratos. Os principais carboidratos de algas pardas são manitol, laminarina, fucoidina e ácido algínico (Cavalcante, 2003; Davis et al., 2003), embora no presente trabalho não se tenha focado na determinação do perfil de carboidratos das amostras. Estes açúcares se encontram em formas oligoméricas, ou seja, em pequenas cadeias de ligações de monômeros de glicose. A técnica de microscopia evidenciou as alterações em coloração, tanto de paredes celulares quanto de reações positivas no citoplasma, evidenciando a presença de açúcares livres, provavelmente utilizados como fonte energética para a alga. Houve também a incorporação de açúcares nas paredes celulares, reconhecidamente um mecanismo de defesa a estresse oxidativo (Salgado et al., 2005).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi também realizada em todos os ensaios. Interessante notar, com esta técnica, a importância das paredes celulares nos mecanismos de defesa de *S. cymosum* quanto à penetrabilidade dos metais e sua possível associação defensiva contra a toxicidade. Com exceção do metal cádmio, que apresentou variações sutis no padrão de rugosidade superficial, característica do talo de *S. cymosum*, os outros elementos mostraram variações bem demarcadas nos padrões superficiais de rugosidade e até mesmo, na presença de epifíticos e rupturas de paredes. Os metais cobre e chumbo levaram à redução da rugosidade superficial dos talos, especialmente com o aumento da concentração dos metais. O metal manganês além de reduzir a rugosidade superficial levou a rupturas das paredes com o aumento da concentração do metal e o tempo de exposição. As paredes celulares de algas pardas são capazes de reter metais, por ligações iônicas dos cátions com grupamentos sulfatados presentes na estrutura do alginato (Brinza et al., 2009). Além disso, são

capazes de incorporar exsudados dos fisóides no componente amorfo, e com isso, isolar elementos tóxicos do meio citoplasmático (Andrade et al., 2010a; Andrade et al., 2010b). Os diferentes graus de interferência se devem à capacidade metabólica de assimilar e degradar o composto em nível intracelular, e também à capacidade de ligação nas paredes e exsudação.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET), avaliada sobre os delineamentos com cádmio e manganês, evidenciaram detalhes sobre a reorganização estrutural de organelas na presença de metais. Com ambos os metais, a migração de fisóides nas células corticais, especialmente para as porções apicais, confirmam as observações feitas com a microscopia de luz. Ainda, evidenciou as alterações nas paredes citoplasmáticas, com presença de precipitados, fusões de vacúolos, alta recorrência de plasmodesmas com intercâmbio de conteúdo citoplasmático, além de desestruturação de fibrilas e incorporação de componente amorfo nas paredes celulares. O elemento cádmio induziu menores alterações em organelas citoplasmáticas, mas os tratamentos com manganês mostraram, com aumento na concentração do metal e com maior tempo de exposição, influências bastante negativas sobre a estrutura de cloroplastos e mitocôndrias. Foi possível afirmar que o manganês apresentou efeitos deletérios na organização ultra-estrutural, em graus distintos, e dependentes tanto da concentração aplicada quanto do tempo de exposição. Assim, é possível fazer predições sobre alterações macroscópicas de acordo com as inferências observadas em microscopia. Ainda assim, em um período limite de 14 dias de avaliação, as observações macroscópicas não podem ser consideradas significativas para avaliação de resposta tóxica. Estes danos poderiam ser evidenciados, possivelmente, com maior tempo de exposição, já que o efeito acumulativo poderia se pronunciar em aspectos como textura de talo, coloração ou perda e fragmentação de filóides. Para melhor visualização dos resultados obtidos, um resumo das principais alterações entre os tratamentos está descrito na Tabela 1 desta seção.

Com relação à deposição de elementos tóxicos em ambientes aquáticos costeiros, a legislação brasileira propõe medidas de monitoramento e mitigação bastante rigorosas. Em vigência, as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) prevêm, dentre outras medidas, os limites tolerados para cada elemento metálico depositado, e ainda, considera a qualidade de água do corpo receptor para determinar qual o limite de tolerância para cada químico poluente (Brasil, 2005; Brasil, 2011). Estas medidas visam assegurar tanto a preservação da qualidade das águas, quanto à melhoria do seu

estado atual. Para os elementos estudados, a legislação prevê os seguintes limites: 1,0 mg.L⁻¹ de Cu dissolvido; 0,5 mg.L⁻¹ de Pb total; 0,2 mg.L⁻¹ de Cd total; 1,0 mg.L⁻¹ de Mn dissolvido.

Tabela 1: Sumário dos resultados obtidos para os delineamentos experimentais com os metais cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e manganês (Mn).

Análise	Resultados obtidos
Oxigênio dissolvido e pH	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Sem diferenças significativas para os parâmetros com Cd e Mn.
Bioacumulação	-Todos os elementos: alta acumulação; -Em associação: chumbo inibiu acumulação de cobre; -Maior acumulação com o tempo de exposição.
Biosorção	-Todos os elementos: alta concentração de metais; -Em associação: chumbo inibiu absorção de cobre; -Maior concentração com o tempo de exposição.
Taxa de crescimento	-Menor TC: metal cobre; -Variações pontuais entre as concentrações (Cd e Mn); -Relação com concentração do metal.
Viabilidade celular	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Alto impacto na viabilidade mitocondrial (Cd); -Tendência de redução com o tempo (Mn).
Análise <i>in vivo</i> de clorofila <i>a</i>	-Alta fotoinibição com Cu; Pb reduz efeito de fotoinibição de Cu; -Fotoinibição não observada para Cd; -Análise não realizada para Mn.
Quantificação de clorofilas	-Maior redução para Cu e Pb entre todos os tratamentos -Cobre: mais nocivo -Cd e Mn: variações pontuais, sem relação clara com concentração.
Quantificação de carotenóides totais	-Maior redução para Cu e Pb entre todos os tratamentos; -Cd e Mn: variações pontuais, sem relação clara com concentração.
Perfil de carotenóides	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Cd e Mn: variações relacionadas ao tempo e concentração.

Compostos fenólicos	-Maior redução para Cu e Pb entre todos os tratamentos; -Redução relacionada à concentração e ao tempo.
Compostos flavonóides	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Redução relacionada à concentração e ao tempo.
Atividade antioxidante (DPPH)	-Variações pontuais, sem relação com a concentração do metal; -Análise não realizada para Cd e Mn.
Açúcares solúveis/insolúveis	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Variações sem relação com a concentração do metal; -Possível fonte energética para manutenção metabólica.
Microscopia de luz	-Alta metacromasia de paredes celulares e fisóides; -Migração de fisóides nas células corticais.
Microscopia eletrônica (varredura)	-Mudanças relacionadas ao metal; -Cu e Pb: maiores alterações superficiais; -Cd: pequenas alterações, Mn: rupturas de paredes.
Microscopia eletrônica (transmissão)	-Análise não realizada para Cu e Pb; -Cd: pequenas alterações em organelas; -Mn: desestruturação de mitocôndrias e cloroplastos.
Microscopia de varredura confocal	-Análise não realizada para Cu, Pb e Cd; -Reduções na autofluorescência; -Relação com tempo e concentração de Mn.

Apesar de limites claros e rígidos sobre os padrões de efluentes e contaminantes metálicos passíveis de deposição no meio aquático, a falta de fiscalização ao longo da costa, bem como impactos pontuais causados por desastres ambientais não devem ser desconsiderados nas ações de monitoramento e avaliação de impactos sobre populações. Outro fator que deve ser levado em conta é a lacuna existente entre os dados produzidos pela academia e os índices utilizados para elaboração e revisão das normativas e leis ambientais. Como observado, níveis mais baixos das concentrações dos cobre e chumbo, como presentemente avaliados, foram responsáveis por danos significativos em *S. cymosum*, mostrando que os índices vigentes não contemplam, com amplitude, espécies sensíveis, cujas populações podem sofrer danos mais severos

ao longo das gerações. Assim, os presentes níveis de concentrações de metais na legislação vigente se aplicam parcialmente ao monitoramento de efeitos tóxicos sobre *S. cymosum*, e esta espécie poderá sofrer com os impactos de deposição de poluentes em zonas costeiras.

Com os presentes resultados, a população de *S. cymosum* avaliada na Ilha de Santa Catarina pode sofrer alterações em sua estrutura mediante poluição com metais pesados. Apesar de não avaliados no presente trabalho, aspectos reprodutivos podem ser comprometidos, uma vez que o crescimento é afetado pelos metais pesados. Também a capacidade de competição por nichos na sua zona de distribuição nos costões rochosos pode ser afetada, com maior energia sendo despendida em defesas metabólicas do que propriamente em defesa ao pastejo, ou competição interespecífica com outras espécies oportunistas. Sendo assim, medidas mais eficazes de monitoramento destes elementos deveriam ser propostas, tanto em nível de deposição quanto para observação de alterações na estrutura e distribuição dos bancos naturais ao longo da costa de Florianópolis.

Considerando os efeitos metabólicos obtidos no presente trabalho, deve ser sugerido que a população de *S. cymosum* é susceptível a poluição por metais pesados, com efeitos metabólicos dependentes qualitativamente do poluente inserido. O presente estudo enfocou nos efeitos tóxicos dos elementos isoladamente, ou seja, em modelos que evidenciam o grau de toxicidade isoladamente de outros fatores ambientais, como luminosidade, disponibilidade de nutrientes, variações de temperatura, salinidade e pH, além de hidrodinamismo local. Com isto, ressalta-se que os efeitos nocivos observados no presente estudo podem ser intensificados e levar a consequências metabólicas adversas das presentemente mensuradas. Isto porque os metais pesados são bastante susceptíveis a variações abióticas, que levam a alterações em sua carga iônica, capacidade de quelação, interações com outros sais, além de adsorção e precipitação em sedimentos (Melo et al., 2012). Estas variações na disponibilidade química alteram, em si, a capacidade de assimilação do elemento pela alga, além de provocarem efeitos de interação adversos, de acordo com a carga iônica do elemento. Com isto, populações de *S. cymosum* podem ser apontadas, em curto e médio prazo, como boas biomonitoras de ambientes costeiros submetidos a baixo grau de eutrofização e introduções antrópicas de poluentes. Mas quadros extremos de poluição, com aumento da carga poluente orgânica, na turbidez, ou alterações mais drásticas de parâmetros abióticos podem também afetar e intensificar o efeito de poluentes sobre a população, e levar a seu declínio com o passar do tempo.

8. CONCLUSÃO

Presentes resultados levam a conclusão de que *S. cymosum* é uma espécie sensível a poluição por metais pesados, e que por sua importância na estruturação e composição de comunidades algais, deve ser monitorada para avaliação dos impactos decorrentes das atividades antrópicas em zonas costeiras. Os danos morfofisiológicos promovidos pelo metal cobre foram os mais intensos dentre todos os elementos avaliados, tanto ao nível celular, observados pelas microscopias de luz e eletrônica de varredura, quanto pelos parâmetros bioquímicos. O elemento manganês também promoveu grandes alterações bioquímicas de metabólitos, e de morfologia celular, quando comparado ao elemento cádmio. Entretanto, os elementos chumbo, cádmio e manganês induziram menores modificações macroscópicas, sem aparentes necroses ou despigmentações que sejam indicativos de danos morfológicos da toxicidade dos metais. Todos os elementos levaram a alterações bioquímicas, com redução na concentração de pigmentos e compostos com função antioxidante. Cada elemento poluente exerceu um efeito de resposta metabólica diferenciada sobre *S. cymosum*, de acordo com o delineamento experimental proposto. As variações observadas se mostraram dependentes não apenas do metal, mas também da concentração aplicada e do tempo de exposição. Os efeitos de toxicidade, avaliados em modelos isolados, podem ser amplificados no ambiente, com a interação de fatores abióticos e nutricionais. Com isto, sugere-se que a espécie possa ser mais sensível aos efeitos de metais tóxicos, com possíveis alterações na estrutura populacional e também de comunidades.

9. REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 72, p. 35-45, 2013.
- ALAHVERDI, M.; SAVABIEASFAHANI, M. Metal pollution in seaweed and related sediment of the Persian Gulf, Iran. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 6, p. 939-945, 2012.
- AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal Chromatography**, n. 1074, p. 99-105, 2005.
- ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; AMADO FILHO, G. M. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 58, p. 117-125, 2004.
- ANDRADE, L. R.; LEAL, R. N.; NOSEDA, M.; DUARTE, M. E. R.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S.; FARINA, M.; AMADO FILHO, G. M. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, n. 60, p. 1482-1488, 2010a.
- ANDRADE, S.; PULIDO, M. J.; CORREA, J. A. The effect of organic ligands exuded by intertidal seaweeds on copper complexation. **Chemosphere**, n. 78, p. 397-401, 2010b.
- ARANA, L. V. **Qualidade de água em aquíicultura: princípios e práticas**. 3ª Ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 238 p.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo, SP: Rima, 2004. 322 p.
- BABU, M. Y.; PALANIKUMAR, L.; NAGARANI, N.; DEVI, V. J.; KUMAR, S. R.; RAMAKRITINAN, C. M.; KUMARAGURU, A. K. Cadmium and copper toxicity in three marine macroalgae: evaluation of

the biochemical responses and DNA damage. *Environmental Science Pollution Research*, n. 21, p. 9604–9616, 2014.

BALBOA, E. M.; CONDE, E.; MOURE, A.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from Brown algae. **Food Chemistry**, n. 138, p. 1764–1785, 2013.

BATISTA, M. B. *Macrófitas Marinhas da Ilha de Santa Catarina, Brasil*. 2012. 104 f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

BETANCOR, S.; TUYA, F.; GIL-DÍAZ, T.; FIGUEROA, F. L.; HAROUN, R. Effects of a submarine eruption on the performance of two Brown seaweeds. **Marine Environment Research**, n. 79, p. 37-47, 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 18 de Mar. De 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2015.

BRASIL. **Relatório técnico 19 – Perfil da mineração de manganês do Ministério de Minas e Energia**. Brasília, Distrito Federal, Ago. 2009. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/portalmme/opencms/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_decenal/a_mineracao_brasileira/P11_RT19_Perfil_da_mineracao_de_manganxs.pdf>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 430, de 13 de Maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 13 de Mai. De 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2015.

BRINZA, L.; NYGÅRD, C. A.; DRING, M. J.; GAVRILESCU, M.; BENNING, L. G. Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 1727–1733, 2009.

BRITO, L. V. R.; SZÉCHY, M. T. M.; CASSANO, V. Levantamento taxonômico das macroalgas da zona das marés de costões rochosos adjacentes ao Terminal Marítimo Almirante Maximiano Fonseca, Baía da Ilha Grande, RJ. **Atlântica**, n. 24, p. 17-26, 2002.

BOUZON, J. L.; SALLES, J. P.; BOUZON, Z. L.; HORTA, P. A. Aspectos florísticos e fitogeográficos das macroalgas marinhas das baías da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **Ínsula**, n. 35, p. 69-84, 2006.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; OLIVEIRA E C. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of Apply Phycology**, n. 18, p. 287-94, 2006.

BOUZON, Z. L.; CHOW, F.; ZITTA, C. S.; SANTOS, R. W.; OURIQUES, L. C.; FELIX, M. R. L.; OSORIO, L. K. P.; GOUBEIA, C.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E. C. Effects of natural radiation, photosynthetically active radiation and artificial ultraviolet radiation-B on the chloroplast organization and metabolism of *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* (Rhodophyta, Bangiales). **Microscopy Microanalysis**, n. 18, p. 1467-1479, 2012.

BOUZON, Z. L.; FERREIRA, E. C.; SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E. C. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. **Protoplasma**, n. 249, p. 637-650, 2012.

CAVALCANTE, J. A. Análise experimental da cinética de secagem da alga marinha *Sargassum* sp. 2003. 191 f. **Tese**. (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2003.

CETESB. **Ficha de informação toxicológica – cádmio e seus compostos**. São Paulo, SP: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), 2012. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cadmio.pdf>>. Acesso em 20 de Junho de 2014.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, v. 123, p. 825-832, 2000.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; VIEIRA, R. H. S. F. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4270-4278, 2000.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, n. 37, p. 4311-4330, 2003.

DEMORI, J. Análise histórica da contaminação por metais pesados na Baía da Babitonga – SC. 2008. 94 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

DUMMERMUTH, A. L.; KARSTEN, U.; FISCH, K. M.; KÖNIG, G. M.; WIENCKE, C. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 289, p. 103-121, 2003.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 112-118, 2007.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; COSTA, A. C. A. The performance of a continuous system for biosorption and desorption of zinc, cadmium, manganese and copper by the seaweed *Sargassum* sp. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v. 2, n. 3, p. 131-140, 2002.

EDWARDS, P. Cultured red alga to measure pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 3, n. 12, p. 184-188, 1972.

FAVERI, C.; SCHERNER, F.; FARIAS, J.; OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A. Temporal changes in the seaweed flora in Southern Brazil and its potential causes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 2, p. 350-357, 2010.

FELIX, M. R. L.; OSORIO, L. K. P.; OURIQUES, L. C.; FARIAS-SOARES, F. L.; STEINER, N.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D.; SIMIONI, C.; COSTA, G. B.; HORTA, P. A.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, E. C. The effect of cadmium under different salinity conditions on the cellular architecture and metabolism in the red alga *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta,

Gelidiales). **Microscopy and Microanalysis (Print)**, n. 20, p. 1411-1424, 2014.

FICHET, D.; RADENAC, G.; MIRAMAND, P. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 7-12, p. 509-518, 1998.

FIGUEROA, F.; NYGARD, C.; EKELUND, N.; GÓMEZ, I. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. **Journal Photochemistry Photobiology**, n. 72, v. 3, p. 5-44, 2003.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. [Org.]. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Volume 1**. Rio de Janeiro, RJ: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FOURESTAND, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. **Environment Science Technology**, n. 30, p. 277-282, 1996.

FREITAS, O. M. M.; MARTINS, R. J. E.; DELERUE-MATOS, C. M.; BOAVENTURA, R. A. R. Removal of Cd(II), Zn (II) and Pb (II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modeling. **Journal of Hazardous Materials**, n. 153, p. 493-501, 2008.

GOUVEIA, C.; KREUSCH, M.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. R. DE L.; OSORIO, L. K. P.; PEREIRA, D. T.; SANTOS, R.; OURIQUES, L. C.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; CARVALHO, T. J. G.; CHOW, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga

Gracilaria domingensis. **Microscopy Microanalysis**, v. 3, n. 19, p. 513-524, 2013.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HU, J. Z.; ZHENG, A. Z.; PEI, D. L.; SHI, G. X. Bioaccumulation and chemical forms of cadmium, copper and lead in aquatic plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 235-240, p. 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, Z.; LI, L.; HUANG, G.; YAN, Q.; SHI, B.; XU, X. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. **Aquatic Toxicology**, n. 91 p. 54–61, 2009.

IBRAHIM, W. M.; MUTAWIE, H. H. Bioremoval of heavy metals from industrial effluent by fixed-bed column of red macroalgae. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 1, p. 38–42, 2012.

JACINTO, M. L. J. A. J.; DAVIDA, C. P. C.; PEREZ, T. R.; JESUS, B. R. Comparative efficiency of algal biofilters in the removal of chromium and copper from wastewater. **Ecological Engineering**, n. 35, p. 856–860, 2009.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemistry Physiology Pfl.**, n. 167, p. 191–194, 1975.

JESUS, C. A. de. Estudo cinético e do equilíbrio da biossorção dos íons chumbo e cobre pela macroalga *Sargassum* sp. em sistemas monocomponente e binário. 2010. 95 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

JOTHINAYAGI, N.; ANBAZHAGAN, C. Heavy metal monitoring of Rameswaram Coast by some *Sargassum* species. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 73-80, 2009.

KAEWSARN, P. Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine algae *Padina* sp. **Chemosphere**, n. 47, p. 1081–1085, 2002.

KOIVIKKO, R (Org.). **Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods**. Finlândia: Annales Universitatis Turkuensis, 2008.

KAREZ, C. S.; MAGALHAES, V. F.; PFEIFFER, W. C. Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. **Environmental Pollution**, n. 83, p. 351-356, 1994.

KARTHICK P.; SANKAR R. S.; KAVIARASAN T.; MOHANRAJU R. Ecological implications of trace metals in seaweeds: Bio-indication potential for metal contamination in Wandoor, South Andaman Island. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, n. 38, p. 227–231, 2012.

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

KLEINÜBING, S. J.; GUIBAL, E.; SILVA, E. A. da; SILVA, M. G. C. Copper and nickel competitive biosorption simulation from single and binary systems by *Sargassum filipendula*. **Chemical Engineering Journal**, n. 184, p. 16– 22, 2012.

KOIVIKKO, R. **Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods**. Annales Universitatis Turkuensis AI 381. Disponível em: <<http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/36054/AI381.pdf>>. Acesso em: 03 de Janeiro de 2015.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; HEDBAVNY, J.; BAČKOR, M. Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Plant Science**, n. 178, p. 307–311, 2010.

LANA, P. C.; BIANCHINI, A.; RIBEIRO, C. A. O.; NIENCHESKI, L. F. H.; FILLMAN, G.; SANTOS, C. S. G. (Org.). **Avaliação ambiental de estuários brasileiros: diretrizes metodológicas**. Série Livros, 22. Rio de Janeiro, RJ: Museu Nacional, 2006. 156 p.

LEE, R. E. **Phycology**. New York: Cambridge University Press, 2008. 561 p.

LIGNELL, A.; PEDERSÉN, M. Ágar composition as a function of morphology and growth rate: studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**, n. 32, p. 219-227, 1989.

LISBOA, L. K.; Silva, A. L. L.; Petrucio, M. M. Aquatic invertebrate's distribution in a freshwater coastal lagoon of southern Brazil in relation to water and sediment characteristics. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 2, p. 1-9, 2011.

LIU, Y.; CAO, Q.; LUOA, F.; CHEN, J. Biosorption of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} ions from aqueous solutions by pretreated biomass of brown algae. **Journal of Hazardous Materials**, n. 163, p. 931-938, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006. 588 p.

LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. G.; FARR, A. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-275, 1951.

LUNA, A. S.; COSTA, A. L. H.; COSTA, A. C. A.; HENRIQUES, C. A. Competitive biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 5104-5111, 2010.

MACÊDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão da literatura. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, v. 2, n. 2, p. 29-38, 2008.

MAMBOYA, F. A.; PRATAP, H. B.; MTOLERA, M.; BJÖRK, M. The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalga *Padina boergesenii*. **Proceedings of the**

Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania, p. 185-192, 1999.

MARQUES JÚNIOR, A. N.; MORAES, R. B. C. de; MAURAT, M. C. Poluição marinha. In: **Biologia Marinha**. PEREIRA, R. C. & SOARES-GOMES, A. (Org.). Rio de Janeiro, RJ: Editora Interciência, 2009.

McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156–1158, 1950.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. **Food and Agriculture Organization (FAO)**. Rome, Italy: Fisheries Technical Paper, nº 441, 2003.

MELO, V. F.; ANDRADE, M.; BATISTA, A. H.; FAVARETTO, N. Chumbo e zinco em águas e sedimentos de área de mineração e metalurgia de metais. **Química Nova**, v. 35, nº 1, p. 22-29, 2012.

MELVILLE, F.; PULKOWNIK, A. Investigation of mangrove macroalgae as biomonitors of estuarine metal contamination. **Science of the Total Environment**, n. 387, p. 301–309, 2007.

MENDES, L. F.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; COLEPICCOLO, P.; MARINHO-SORIANO, E.; STEVANI, C. V.; YOKOYA, N. S. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. **Journal Applied Phycology**, n. 25, p. 1939–1947, 2013.

NASSAR, C. A.; PEDRINI, A. G.; NUNES, J. M. C. Características gerais das algas pardas. In: **Macroalgas (ocrófitas multicelulares) marinhas do Brasil**. PEDRINI, A. G. (Org.). Rio de Janeiro, RJ: Technical Books, 2010.

NUNES, J. M. de C.; MARINS, B. V.; OURIQUES, L. C.; BATISTA, M. B.; SZÉCHY, M. T. M.; ANDRADE, N. A.; ARANTES, N. P.; HORTA, P. A.; CAÍRES, T. A. Taxonomia das algas pardas marinhas – descrições e ilustrações dos gêneros. In: **Macroalgas (ocrófitas multicelulares) marinhas do Brasil**. PEDRINI, A. G. (Org.). Rio de Janeiro, RJ: Technical Books, 2013. 173 p.

OLIVEIRA, E. C. **Introdução à biologia vegetal**. 2ª Ed. São Paulo, SP: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 266 p.

OURIQUES, L. C. Phaeophyceae. In: PUPO, D.; OURIQUES, L. C.; FUJII, M. T.; GUIMARÃES, S. M. P. de B.; YOKOYA, N. S. **Marine benthic algae from Santa Catarina state, Southern Brazil**. São Paulo, 2011, Boletim do Instituto de Botânica, n. 20, p. 55-97.

OURIQUES, L. C.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L. The mechanism of adhesion and germination in the carpospores of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Rhodophyta, Bangiales). **Micron**, n. 43, p. 269-277, 2012.

PAGLIOSA, P. R.; FONSECA, A.; BARBOSA, F. A. Evidence of systemic changes in trace metal concentrations in subtropical estuarine sediments as a result of urbanization. **Journal of Coastal Research**, SI 39, p. 1078-1083, 2006.

PESSOA, F. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes - A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 6, p. 510-526, 2012.

PINTO, E.; CARVALHO, A. P.; CARDOZO, K. H. M.; MALCATA, F. X.; ANJOS, F. M.; COLEPICOLO, P. Effects of heavy metals and light levels on the biosynthesis of carotenoids and fatty acids in the macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 349-354, 2011.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. 1ª Reimpressão. Porto Alegre: Artmed, 2000.

PLATT, T.; GALLEGOS, C.; HARRISON, W. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal Marine Research**, v. 38, n. 68, p. 7-701, 1980.

POPP, J. H. **Geologia geral**. Rio de Janeiro, RJ: LTC Editora, 1998. 376 p.

RAI, L. C.; GAURX, J. P.; KUMAR, H. D. Phycology and heavy-metal pollution. **Biological Reviews**, n. 56, p. 99-151, 1981.

RAMUS J.; ROSENBERG, G. Diurnal photosynthetic performance of seaweeds measured under natural conditions. **Marine Biology**, n. 56, p. 21-28, 1980.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, n. 37, p. 1247–1256, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara & Koogan, 2007. 830 p.

ROMERA, E.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A.; BLÁZQUEZ, M. L.; MUÑOZ, J. A. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. **Bioresource Technology**, n. 98, v. 17, p. 3344–3353, 2007.

ROVAI, A. S.; BARUFI, J. B.; PAGLIOSA, P. R.; SCHERNER, F.; TORRES, M. A.; HORTA, P. A.; SIMONASSI, J. C.; QUADROS, D. P. C.; BORGES, D. L. G.; SORIANO-SIERRA, E. J. Photosynthetic performance of restored and natural mangroves under different environmental constraints. **Environmental Pollution**, n. 181, p. 233-241, 2013.

RUANGSOMBOONA, S.; WONGRAT, L. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*. **Aquatic Toxicology**, n. 78, p. 15–20, 2006.

SALA, E.; KNOWLTON, N. Global marine biodiversity trends. **Annual Rev. Environment Resource**, n. 31, p. 93–122, 2006.

SALGADO, L. T.; ANDRADE, L. R.; AMADO FILHO, G. M. Localization of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to heavy-metal accumulation. **Protoplasma**, n. 225, p. 123–128, 2005.

SANTOS, R. W.; SCHMIDT, E. C.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; MARASCHIN, M.; HORTA, P. A.; BOUZON, Z. L. Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in

the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). **American Journal of Plant Sciences**, n. 3, p. 1077-1084, 2012.

SANTOS, R. W.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. **Protoplasma**, n. 250, p. 297–305, 2013.

SANTOS, R. W.; SCHMIDT, E. C.; VIEIRA, I. C.; COSTA, G. B.; ROVER, T.; SIMIONI, C.; BARUFI, J. B.; SOARES, C. H. L.; BOUZON, Z. L. The effect of different concentrations of copper and lead on the morphology and physiology of *Hypnea musciformis* cultivated in vitro: a comparative analysis. **Protoplasma**, 2015 (Article in press).

SATHYA, R.; KANAGA, N.; SANKAR, P.; JEEVA, S. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. **Arabian Journal of chemistry** (article in press), 2013.

SCHMIDT, E. C.; SCARIOT, L. A.; ROVER, T.; BOUZON, Z. L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, n. 40, p. 860–869, 2009.

SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, B.; PONTES, C. L. M.; SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, n. 249, p. 353–367, 2012.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, n. 10, p. 51-62, 1986.

SCHREIBER, U.; NEUBAUER, C. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical

quenching of chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research**, n. 25: 279-293, 1990.

SHANNON, J. C. Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays*. Kernels following $^{14}\text{CO}_2$ treatment of intact plants. **Plant Physiology**, v. 43, n. 8, p. 1215-1220, 1968.

SHENG, P. X.; TING, Y. P.; CHEN, J. P.; HONG, L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal Colloid and Interface Science**, n. 275, p. 131–141, 2004.

SILVA, M.; HORN FILHO, N. O. Depósitos tecnogênicos e áreas antropizadas do aterro da baía Norte, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **XIII Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário (ABEQUA)**, 2009.

SOUZA, F. B.; SOUZA, S. M. A. G. U.; SOUZA, A. A. U.; COSTA, C. A. E.; BOTELHO, C. M. S.; VILAR, V. J. P.; BOAVENTURA, R. A. R. Modeling of trivalent chromium speciation in binding sites of marine macroalgae *Sargassum cymosum*. **Clean Technology Environment Policy**, 2013.

SZÉCHY, M. T. M.; DE PAULA, E. J. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 23, v. 2, p. 121-132, 2000.

THIBAUT, T.; PINEDO, S.; TORRAS, X.; BALLESTEROS, E. Long-term decline of the populations of Fucales (*Cystoseira* spp. and *Sargassum* spp.) in the Albères coast (France, North-western Mediterranean). **Marine Pollution Bulletin**, n. 50, p. 1472–1489, 2005.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F. Method for glucose and other sugars. **Manometric Techniques**, v. 4, 1964.

UREN, N. C. Cobalt and manganese. In: ALLOWAY, J. B. **Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**. 3ª ed. Environmental pollution, v. 22. Springer, 2013. 614 p.

VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, n. 3, p. 17–24, 2000.

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*. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

ZOU, H. X.; PANG, Q. Y.; LIN, L. D.; ZHANG, A. Q.; LI, N.; LIN, Y. Q.; LI, L. M.; WU, Q. Q.; YAN, X. F. Behavior of the edible seaweed *Sargassum fusiforme* to copper pollution: short-term acclimation and long-term adaptation. **Plos one**, v. 9, n. 7, 2014.