

Marianne Gabi Kreusch

**EFEITOS DA TEMPERATURA E DO COBRE SOBRE  
TETRASPORÓFITOS E TETRÁSPOROS DA MACROALGA  
VERMELHA *GELIDIUM FLORIDANUM***

Dissertação submetida ao Programa de Pós  
Graduação da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Zenilda Laurita Bouzon  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carmen Simioni

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kreusch, Marianne Gabi  
Efeitos da temperatura e do cobre sobre  
tetrásporófitos e tetrásporos da macroalga vermelha  
*Gelidium floridanum* / Marianne Gabi Kreusch ;  
orientadora, Zenilda Laurita Bouzon, coorientadora,  
Carmen Simioni, 2017.  
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Mudanças climáticas e temperatura. 3. Metal pesado  
cobre. 4. Interação entre elementos estressores. 5.  
Macroalgas vermelhas, Rhodophyta. I. Bouzon,  
Zenilda Laurita. II. Simioni, Carmen. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.

**"Efeitos da temperatura e do cobre sobre tetrasporófitos e tetrásporos da  
macroalga vermelha *Gelidium floridanum*"**

Por

**Marianne Gabi Kreusch**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (15/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



---

Prof. Dr. Geison de Souza Izídio  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Banca examinadora:



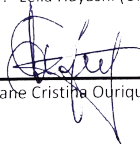
---

Dr.ª Carmen Simioni (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Coordenadora



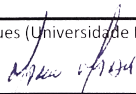
---

Dr.ª Leila Hayashi (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr.ª Luciane Cristina Ouriques (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr. Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de agosto de 2017.



## AGRADECIMENTOS

À professora Zenilda e ao Éder, por me convidarem a fazer parte do projeto e pela orientação ao longo do mestrado.

À Carmen, por aceitar me coorientar e por ser essa pessoa incrível! Por todo o apoio nos experimentos e nos momentos difíceis, nas dúvidas e incertezas. Você foi essencial para a conclusão desse projeto, muito obrigada!!

Ao meu noivo André, por seu amor ao longo de todos esses anos. Muito obrigada por sua paciência, por estar sempre ao meu lado, e por me ajudar em coletas e experimentos, te amo!

À minha família, por me apoiar em todas as minhas decisões, em especial a minha querida mãe Talma, minha grande incentivadora!

Aos companheiros de laboratório, Fernanda, Elisa, Débora, Deonir e Nandara. Muito obrigada por toda ajuda ao longo do mestrado, por todas as coletas, limpezas, experimentos, cafés e por todas as trocas de conhecimento!

Às equipes do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica e do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, em especial Eliana, Thais e Fernanda, pelo apoio com experimentos e análises!

Às professoras Franceli e Luciane, e a todos os professores e colegas do curso de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, por todo conhecimento compartilhado.

À vida, ao universo e tudo mais.



## RESUMO

Uma maior liberação de gases do efeito estufa na atmosfera tem resultado em um aumento na temperatura média global, enquanto que a liberação de compostos tóxicos tem resultado em um aumento na concentração de metais pesados nos ambientes aquáticos. Fatores ambientais e agentes estressores podem interagir e resultar em alterações na ecologia e fisiologia dos organismos marinhos. O presente trabalho investigou os efeitos da temperatura e do cobre sobre tetrásporófitos e tetrásporos da macroalga vermelha *Gelidium floridanum*. Após cultivo, foram realizadas quantificações dos pigmentos fotossintetizantes, dos compostos antioxidativos e carboidratos, análises da viabilidade celular, da taxa de crescimento e germinação, além de observações em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os tetrásporófitos apresentaram redução na clorofila *a* e carotenoides após 7 dias de cultivo e aumento após 14 dias, indicando aclimatação aos tratamentos. Os fenólicos apresentaram redução após os tratamentos com cobre, assim como os grãos de amido nas amostras cultivadas com cobre sob elevada temperatura. Um aumento na espessura da parede celular e nos plastoglobulos e a adsorção de cobre também foram observados, assim como redução na viabilidade celular e na taxa de crescimento das amostras tratadas. Os tetrásporos apresentaram alterações no desenvolvimento e nos tilacoides, extravasamento do conteúdo celular, redução dos pigmentos acessórios, da germinação e da viabilidade celular. Os resultados indicam que, em tetrásporófitos, cobre e temperatura interagem de forma sinérgica, enquanto que, em tetrásporos, estes estressores interagem de forma aditiva.

**Palavras-chave:** temperatura, cobre, interação, macroalgas, Rhodophyta, *Gelidium floridanum*





## ABSTRACT

The increasing release of greenhouse gases has resulted in a higher global mean temperature, while the release of toxic compounds has resulted in an increasing metal concentration in aquatic environments. Environmental factors and stressors can interact and result in changes in the ecology and physiology of marine organisms. The present work investigated the effects of temperature and copper in tetrasporophytes and tetraspores of the red seaweed *Gelidium floridanum*. Quantifications of photosynthetic pigments, antioxidative compounds and carbohydrates, cell viability analyzes, growth and germination rates, as well as morphological and ultrastructural observations in light microscopy and transmission electron microscopy were performed after cultivation. Tetrasporophytes presented a reduction in chlorophyll *a* and carotenoids after 7 days of cultivation, with an increase after 14 days that indicated acclimation to the treatments. Phenolics presented a reduction after treatments with copper, as well as starch grains in samples cultivated with copper with an elevated temperature. An increase in cell wall thickness and plastoglobuli and the adsorption of copper were also observed, as well as reduction in cell viability and growth rates of treated samples. Tetraspores presented changes in the development and thylakoids, cellular content extravasation and reduction in accessory pigments, germination and cell viability. These results indicate that, in tetrasporophytes, copper and temperature interact synergistically, while in tetraspores their interaction is additive.

**Keywords:** temperature, copper, interaction, macroalgae, Rhodophyta, *Gelidium floridanum*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Anomalias da temperatura registradas desde 1880.....	20
<b>Figura 2:</b> Segmento apical de <i>G. floridanum</i> .....	30
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida de <i>G. floridanum</i> .....	31
<b>Figura 4:</b> Formação do tubo germinativo em tetrásporos de <i>G. floridanum</i> .....	33
<b>Figura 5:</b> Grupos experimentais utilizados no presente trabalho.....	36
<b>Figura 6:</b> Morfologia dos segmentos apicais de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 14 dias de cultivo.....	46
<b>Figura 7:</b> Taxa de crescimento de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> .....	47
<b>Figura 8:</b> Concentração de clorofila <i>a</i> de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	48
<b>Figura 9:</b> Concentração de ficobiliproteínas de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	50
<b>Figura 10:</b> Razão entre os pigmentos de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	53
<b>Figura 11:</b> Concentração de compostos antioxidativos de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	55
<b>Figura 12:</b> Concentração de carboidratos de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	57
<b>Figura 13:</b> ML de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> .....	59
<b>Figura 14:</b> MET de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> .....	61
<b>Figura 15:</b> Viabilidade celular de tetrásporófitos de <i>G. floridanum</i> após 7 e 14 dias de cultivo.....	62
<b>Figura 16:</b> ML de tetrásporos controle de <i>G. floridanum</i> .....	66
<b>Figura 17:</b> ML de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo com o metal pesado cobre 1,5 e 3 $\mu\text{M}$ .....	66
<b>Figura 18:</b> ML de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo sob temperatura de 30 °C.....	67
<b>Figura 19:</b> ML de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo com cobre sob temperatura de 30 °C.....	68
<b>Figura 20:</b> Germinação de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> .....	69
<b>Figura 21:</b> Contagem de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> .....	69
<b>Figura 22:</b> Concentração de ficobiliproteínas de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 24 horas de cultivo.....	71
<b>Figura 23:</b> MET de tetrásporos controle de <i>G. floridanum</i> .....	72
<b>Figura 24:</b> MET de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo sob temperatura de 30 °C.....	73
<b>Figura 25:</b> MET de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo com o metal pesado cobre 1,5 e 3 $\mu\text{M}$ .....	74
<b>Figura 26:</b> MET de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após cultivo com cobre sob temperatura de 30 °C.....	76
<b>Figura 27:</b> Parede celular de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> .....	77
<b>Figura 28:</b> Viabilidade celular de tetrásporos de <i>G. floridanum</i> após 24 horas de cultivo.....	78



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Análise de Variância Fatorial e valores de significância para os efeitos da temperatura, do cobre e da interação entre temperatura e cobre sobre os compostos metabólicos, a viabilidade celular e a taxa de crescimento de tetrásporófitos de *G. floridanum*.....63
- Tabela 2:** Contagem de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo, de acordo com o estágio do desenvolvimento.....70
- Tabela 3:** Análise de Variância Fatorial e valores de significância para os efeitos da temperatura, do cobre e da interação entre temperatura e cobre sobre a contagem, os pigmentos fotossintetizantes e a viabilidade celular de tetrásporos de *G. floridanum*.....79



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A, Amido das florídeas  
AFC, Aloficocianina  
ANOVA, Análise de Variância Fatorial  
AT-O, Azul de Toluidina  
C, Cloroplasto  
CH<sub>4</sub>, Metano  
Chl *a*, Clorofila *a*  
CO<sub>2</sub>, Dióxido de carbono  
CuCl<sub>2</sub>, Cloreto de cobre II  
DMSO, Dimetilsulfóxido  
EROs, Espécies reativas de oxigênio  
FC, Ficocianina  
FE, Ficoeretrina  
G, Corpos de Golgi  
GMA, Hioresina glicolmetacrilato  
HNO<sub>3</sub>, Ácido nítrico  
LCME, Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
M, Mitocôndria  
MET, Microscopia eletrônica de transmissão  
Mf, Massa final  
Mi, Massa inicial  
ML, Microscopia de luz  
MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
NO, Óxido nítrico  
O<sub>3</sub>, Ozônio  
OsO<sub>4</sub>, Tetróxido de ósmio  
P, Plastoglóbulo  
PAS, Ácido Periódico de Schiff  
PC, Parede celular  
RuBusCO, Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase  
t, Tempo  
TC, Taxa de crescimento  
V, Vacúolo  
Ve, Vesículas





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Mudanças climáticas e o aquecimento dos oceanos.....	19
1.2 Metais pesados e o Cobre.....	21
1.3 Interação entre elementos estressores.....	24
1.4 Macroalgas.....	26
1.5 Filo Rhodophyta e Classe Florideophyceae.....	28
1.6 <i>Gelidium floridanum</i> W.R. Taylor.....	29
1.7 Ciclo de vida e desenvolvimento dos esporos.....	31
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Coleta e aclimatação do material biológico.....	35
3.2 Desenho experimental.....	35
3.3 Cultivo dos tetrasporófitos.....	36
3.4 Obtenção e cultivo de tetrásporos.....	37
3.5 Análises realizadas em tetrasporófitos.....	37
3.5.1 Taxa de crescimento.....	37
3.5.2 Pigmentos fotossintetizantes.....	38
3.5.3 Compostos antioxidantes.....	39
3.5.4 Compostos carboidratos.....	39
3.5.5 Microscopia de luz.....	40
3.5.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	41
3.5.7 Ensaio do MTT.....	42

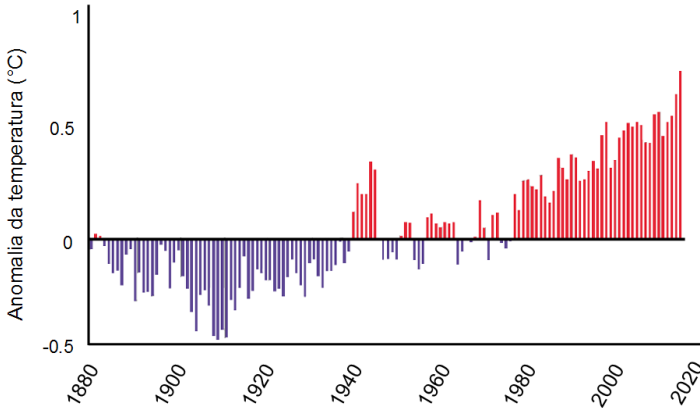
3.6 Análises realizadas em tetrásporos.....	43
3.6.1 Contagem dos esporos.....	43
3.6.2 Pigmentos fotossintetizantes.....	43
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
3.6.4 Ensaio do MTT.....	44
3.7 Análises estatísticas.....	44
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Efeitos da temperatura e do cobre sobre tetrasporófitos de <i>Gelidium floridanum</i> .....	45
4.1.1 Morfologia dos segmentos apicais.....	45
4.1.2 Taxa de crescimento.....	46
4.1.3 Pigmentos fotossintetizantes.....	47
4.1.4 Compostos antioxidativos.....	54
4.1.5 Compostos carboidratos.....	55
4.1.6 Microscopia de Luz.....	57
4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	60
4.1.8 Viabilidade celular – MTT.....	<b>62</b>
4.2 Efeitos da temperatura e do cobre sobre esporos tetrásporos de <i>G. floridanum</i> .....	64
4.2.1 Morfologia e Contagem.....	64
4.2.2 Pigmentos fotossintetizantes.....	70
4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	72
4.2.4 Viabilidade Celular.....	78
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Mudanças climáticas e o aquecimento dos oceanos

O chamado 'efeito estufa' ocorre naturalmente e é essencial para a manutenção da temperatura do planeta em condições favoráveis à vida. Este efeito é resultante da absorção e re-irradiação de parte da energia termal irradiada pelo sol em nossa atmosfera. O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) está entre os mais importantes gases do efeito estufa, seguido do metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e demais gases. A adição de uma maior quantidade destes gases na atmosfera, porém, intensifica o processo do efeito estufa e contribui para um aumento na temperatura do planeta (Koch *et al.*, 2012; Laffoley & Baxter, 2016).

Atividades industriais e agropecuárias estão entre as grandes responsáveis pela recente intensificação do efeito estufa e de suas consequentes alterações climáticas. As concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  aumentaram em cerca de 25% nos últimos 100 anos, enquanto que o gás metano teve sua concentração atmosférica aumentada em duas vezes no mesmo período de tempo (IPCC, 2007). Como resultado, a temperatura média anual, registrada há pelo menos 130 anos, tem indicado um aumento na anomalia da temperatura da superfície global (Figura 1), resultando em efeitos deletérios ao metabolismo das mais variadas espécies (Laffoley & Baxter, 2016).



**Figura 1:** Anomalias da temperatura registradas anualmente desde 1880, com anomalias negativas em azul e anomalias positivas em vermelho. Imagem modificada a partir de dados publicados por National Centers for Environmental Information (NCEI, 2017).

Os ambientes aquáticos absorvem energia de forma mais eficiente que a atmosfera e, por este motivo, representam as maiores reservas de calor do planeta (IPCC, 2013). Desde o início do século XX, a temperatura da região superficial dos oceanos tem apresentado um aumento constante de aproximadamente  $0,13\text{ }^{\circ}\text{C}$  por década, e as temperaturas registradas nas últimas três décadas foram mais altas que qualquer outra temperatura já registrada (Laffoley & Baxter, 2016).

A temperatura é um fator crucial para a homeostase de células e organismos (Mathur *et al.*, 2014), sendo a fotossíntese e diversos outros processos metabólicos dependentes da temperatura ambiente. As macroalgas, em geral, apresentam tolerância à pequenas variações na temperatura a qual são submetidas, uma vez que, diariamente, sofrem as consequências das variações na maré dos costões em que vivem (Hanelt *et al.*, 2004). Um incremento na temperatura da água muito acima do

limite de tolerância da espécie, porém, pode levar ao estresse térmico e reduzir a produtividade dos organismos. Proteínas e enzimas são alvos primordiais do estresse térmico, dentre eles enzimas do Ciclo de Calvin e a Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBisCO), cuja desnaturação pode levar a redução na assimilação de carbono e na fotossíntese, respectivamente (Allakhverdiev *et al.*, 2008). A organização morfológica das organelas celulares também pode sofrer modificações. A fluidez das membranas celulares, por exemplo, pode ser alterada com um aumento na temperatura, levando a insaturação das moléculas lipídicas e desintegração da bicamada em casos extremos (Los & Murata, 2004).

## **1.2 Metais pesados e o Cobre**

Qualquer substância que resulte na redução da qualidade de vida dos organismos pode ser considerada um poluente. Para tal, esta substância precisa estar presente em concentrações acima de um limite de tolerância, o qual pode variar com as espécies e o nível trófico analisado (Duruibe *et al.*, 2007). Um poluente pode ser encontrado de forma aumentada em determinado ambiente em resposta à uma alteração natural, tal como podemos observar em casos de *blooms* de microalgas, geralmente resultantes de alterações naturais na quantidade e qualidade de nutrientes encontrados no ambiente aquático. Metais pesados, por outro lado, fazem parte dos elementos que, apesar de naturalmente encontrados no ambiente, costumam ser observados em concentrações elevadas em reflexo à atividades humanas (Rai & Gaur, 2011).

O termo metal pesado refere-se à elementos metálicos com uma densidade atômica relativamente alta (Lenntech, 2004). Atividades

mineradoras e o despejo de rejeitos industriais estão entre os principais responsáveis pelo aumento na concentração de metais pesados em ambientes aquáticos, porém a aglomeração urbana resultante destas atividades e o consequente despejo de esgoto doméstico também possuem sua parcela de culpa no aumento da poluição de ambientes costeiros do planeta (Rai & Gaur, 2011). A expansão industrial iniciada no Brasil nos anos 1950, por exemplo, promoveu um rápido e desordenado crescimento, principalmente na região costeira do país, e atualmente quase metade da população brasileira vive em regiões litorâneas (Pagliosa *et al.*, 2006). Como resultado, diversos registros de contaminação em áreas costeiras têm sido relacionados aos efeitos causados pela urbanização. Áreas urbanas geralmente apresentam maior contaminação por metais pesados (Pagliosa *et al.*, 2006), e regiões contaminadas por metais pesados já foram registradas em todo o mundo (Wang *et al.*, 2013, Zrelli *et al.*, 2015, Tóth *et al.*, 2016), assim como no Brasil (Bidone *et al.*, 2001, Pagliosa *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2007), onde o recente rompimento de uma barragem mineradora resultou no despejo de aproximadamente 35 milhões de litros de lama contaminada com metais pesados (Santos *et al.*, 2015).

Apesar de essenciais à rotas metabólicas e enzimáticas e responsáveis pela estabilização de proteínas e ácidos nucleicos (Vallee & Ulmer, 1972), os metais pesados tornam-se tóxicos quando em concentrações elevadas. A contaminação por metais pode levar à inibição de rotas metabólicas, através da ruptura de estruturas ou do deslocamento de elementos essenciais, resultando em estresse oxidativo e consequente inibição do crescimento (Dietz *et al.*, 1999). Estes elementos podem entrar na cadeia trófica através dos alimentos, do ar e

da água, e podem ser bio-acumulados ao longo do tempo (Lenntech, 2004).

O cobre é um exemplo de metal essencial para o crescimento e desenvolvimento natural das plantas (Hall, 2002), participando de processos bioquímicos e fisiológicos (Raven *et al.*, 1999). Porém, este também é considerado um dos metais mais tóxicos para as algas, e, quando em concentrações elevadas, pode causar redução na taxa de crescimento e concentração de pigmentos (Rijstenbil *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2014), danos aos cloroplastos e redução da taxa fotossintética (Vidotti & Rollemberg, 2004; Santos *et al.*, 2014), afetar a permeabilidade da membrana plasmática (de Filippis, 1979), a mobilidade celular (Anderson & Morel, 1978) e a distribuição de compostos como proteínas e lipídios (Smith *et al.*, 1985; Gouveia *et al.*, 2013).

A concentração de cobre dissolvido em águas marinhas é geralmente muito baixa, porém em regiões litorâneas próximas a grandes centros urbanos este metal pode ser encontrado em concentrações elevadas (Gledhill, 1997). O aumento na concentração ambiental deste metal pesado está diretamente relacionado à atividade antropogênicas, dentre elas o uso de pesticidas e o despejo de rejeitos minerais e industriais, e indiretamente relacionado ao despejo de rejeitos resultantes da urbanização (He *et al.*, 2005). Casos de contaminação por metais pesados já foram relatados na Baía da Ilha de Santa Catarina (Pagliosa *et al.*, 2006).

### 1.3 Interação entre elementos estressores

Fatores ambientais e agentes estressores podem interagir e resultar em alterações na ecologia e fisiologia dos organismos marinhos. Quando no ambiente natural, as algas são frequentemente submetidas simultaneamente a mais de um elemento estressor (Rai & Gaur, 2011). Desta forma, pesquisar os efeitos cumulativos resultantes destas interações é de extrema importância, pois os organismos marinhos enfrentam diariamente uma complexa combinação de fatores, os quais podem resultar em efeitos intensificadores ou mitigadores de estresse (Crain *et al.*, 2008).

A interação entre elementos estressores pode resultar em três diferentes condições: o efeito sinérgico é observado quando a soma dos efeitos simultâneos é maior que os efeitos produzidos pelos dois elementos de forma isolada. Quando os efeitos simultâneos de ambos elementos estressores é similar aos efeitos observados de forma isolada, diz-se que a interação resultou em um efeito aditivo. Por fim, quando a observação simultânea de dois ou mais elementos estressores resulta na redução da condição estressante, quando comparada aos estresses observados de forma isolada, a interação é considerada antagônica (Crain *et al.*, 2008).

A necessidade de estudos sobre as interações resultantes entre fatores ambientais e elementos estressores passou a ser amplamente difundida apenas ao final da década de 1990 (Breitburg *et al.*, 1999). Com a publicação de pesquisas demonstrando a grande quantidade de interações sinérgicas ocorrendo nos mais variados cenários, a ideia de que os impactos ambientais geralmente resultariam em interações aditivas passou a perder espaço. Estudos sobre a interação de fatores



ambientais continuam a receber atenção por todo o planeta, porém suas conclusões permanecem de difícil interpretação, dada a enorme variedade de condições observadas. Além disso, padrões temporais (estresse agudo ou crônico), a intensidade dos elementos estressores e as variáveis mensuradas também possuem grande importância em trabalhos de interação ambiental (Crain *et al.*, 2008).

Certas espécies possuem capacidade de aclimação a determinado aumento na temperatura ambiental. Esta tolerância, porém, pode ser prejudicada com a exposição a outro elemento estressor (Noyes *et al.*, 2009). Neste caso, um aumento na temperatura pode atuar como co-estressor, afetando processos fisiológicos e reduzindo a capacidade de manutenção da homeostase celular (Broomhall, 2004). Por outro lado, o aumento na temperatura do ambiente pode ser o responsável direto pelo aumento na toxicidade de um determinado contaminante (Gaunt & Barker, 2000). Além disso, um aumento nas precipitações em decorrência das mudanças climáticas tem resultado em um maior escoamento da água terrestre (IPCC, 2013), amplificando a entrada de elementos tóxicos nos oceanos, dentre eles os metais pesados.

A compreensão dos efeitos resultantes de múltiplos estressores tem se tornado mais urgente com o agravamento das mudanças climáticas. Um aumento na temperatura média do planeta e de seus ambientes aquáticos resulta não apenas em alterações na estrutura de comunidades e ecossistemas, como também impacta a distribuição e a toxicidade de elementos poluentes, aumentando a vulnerabilidade das espécies impactadas (Noyes *et al.*, 2009). Metais pesados possuem uma maior solubilidade em águas mais quentes, devido ao aumento no oxigênio dissolvido (Fritioff *et al.*, 2003). Além disso, um aumento na

temperado ambiente aquático pode levar a uma maior permeabilidade das membranas (Marschner, 2012), aumentando a absorção de metais pelo organismo. Como resultado, a concentração e o acúmulo de metais em macroalgas tende a ser aumentado em ambientes mais quentes (Fritioff *et al.*, 2003).

Apesar dos recentes esforços em relação aos potenciais efeitos resultantes do aquecimento e da poluição de ambientes aquáticos, as respostas de grande parte dos organismos marinhos ainda são pouco conhecidas (Rosenzweig *et al.*, 2008). Dados relacionados à interação entre um aumento na temperatura da água marinha e seus elementos poluidores encontram-se ainda mais escassos. O resultado desta interação depende do tempo de exposição, da intensidade dos elementos estudados e da fase do ciclo de vida em que se encontra o organismo-modelo. Atualmente, poucos estudos preocupam-se em analisar diferentes fases do ciclo de vida (Russell *et al.*, 2012), especialmente em se tratando de trabalhos que utilizem macroalgas e demais macrófitas como organismos de trabalho (Wernberg *et al.*, 2012).

#### **1.4 Macroalgas**

As macroalgas constituem um grupo polifilético de organismos fisiologicamente similares as plantas. Os pigmentos fotossintetizantes (clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas), as estruturas reprodutivas sem proteção e a ausência de um sistema vascular são as principais características destes organismos (van den Hoek *et al.*, 1989; Graham *et al.*, 2009). As macroalgas possuem grande importância ecológica e são essenciais à manutenção da estabilidade dos ecossistemas, sendo responsáveis por boa parte da produção de energia primária (Charpy-

Roubaud & Sournia, 1990). Além de participarem da ciclagem de compostos orgânicos e inorgânicos (Field *et al.*, 1998), constituem substrato para o assentamento, abrigo e refúgio de invertebrados e demais organismos e representam importante função na base da cadeia alimentar dos ambientes aquáticos (Lee, 2008).

A produção de polissacarídeos, minerais, agentes estabilizantes, espessantes e compostos antioxidativos, antivirais, antibacterianos e antifúngicos (Anggadiredja *et al.*, 1997; Matsukawa *et al.*, 1997; Oliveira, 1997; Hudson *et al.*, 1999), confere às macroalgas grande importância econômica, sendo estas utilizadas pelas indústrias alimentícia, química e farmacêutica.

Estes organismos são, ainda, bons indicadores biológicos, com eficiente aplicação em técnicas de biorremediação e demais técnicas biotecnológicas (Oliveira, 1997). Macroalgas podem bioacumular metais pesados, propiciando sua entrada na cadeia alimentar (Vallee & Ulmer, 1972). Além disso, são organismos sésseis, submetidos diariamente as variações de temperatura e demais condições aquáticas, e fazem parte da base da cadeia alimentar, servindo, portanto, como bons organismos para o trabalho de alterações ambientais.

As macroalgas formam um conjunto heterogêneo de organismos extremamente abundantes em nosso planeta. Estima-se que mais de 150 mil espécies de macroalgas possam ser encontradas em todos os oceanos (Sousa *et al.*, 2008). As macroalgas são classificadas em três filos (Lee, 2008): Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Heterokontophyta / Phaeophyceae (algas pardas).

## 1.5 Filo Rhodophyta e Classe Florideophyceae

O Filo Rhodophyta é o mais diverso grupo de macroalgas, com aproximadamente 6 mil espécies descritas dentro de cerca de 20 ordens (Graham *et al.*, 2009). As macroalgas vermelhas são essencialmente marinhas, encontradas desde a região entre marés até profundidades de 200 metros, principalmente na região equatorial do planeta. A ausência de flagelos e centríolos por todo seu ciclo de vida são características únicas específicas do grupo, que também podem possuir características como a presença de *pit connections* entre as células, a produção e o acúmulo de grãos de amido das florídeas no citoplasma celular e o ciclo de vida trifásico, especialmente entre as espécies da Classe Florideophyceae (Lee, 2008).

Os cloroplastos das algas vermelhas são formados por dupla membrana e constituídos por tilacoides paralelos envolvidos por um tilacoide periférico (Oliveira, 2003). A clorofila *a* é o principal pigmento presente nos tilacoides. Os pigmentos acessórios ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina localizam-se na superfície destes tilacoides e organizam-se em estruturas em formato de antena, os ficobilissomos (Yoon *et al.*, 2010). Os ficobilissomos auxiliam na absorção de energia luminosa, transferindo-a a partir dos pigmentos acessórios para o centro do fotossistema II, possibilitando um maior fluxo de elétrons e um maior rendimento energético para as células (Gantt, 1981; Zuber, 1986).

A parede celular das macroalgas vermelhas é formada por um esqueleto de celulose impregnado por galactanas sulfatadas, sendo estas as substâncias responsáveis pela grande importância alimentícia, biomédica e farmacêutica deste grupo (Lee, 2008). Algumas rodófitas da família Corallinaceae podem depositar, ainda, carbonato de cálcio ou

carbonato de magnésio em suas paredes (Oliveira, 2003). As macroalgas vermelhas são bentônicas, vivendo presas à rochas, substratos calcáreos, paredes oceânicas ou sobre conchas de moluscos ou outras algas (van den Hoek *et al.*, 1989).

A classe Florideophyceae subdivide-se nas subclasses Hildenbrandiophycidae, Nemaliophycidae, Ahnfeltiophycidae e Rhodymeniophycidae. Predominantemente marinha, esta classe agrupa organismos com ciclo de vida altamente especializados, por vezes trifásicos, e com estruturas reprodutivas femininas distintivas analisadas como marcadores taxonômicos (Yoon *et al.*, 2010). As macroalgas da classe Florideophyceae incluem espécies de importância econômica cultivadas para a produção de ficocoloides como o ágar, a agarose e a carragenana (Yu *et al.*, 2002).

### **1.6 *Gelidium floridanum* W.R. Taylor**

Gelidiales constitui uma das cinco ordens da subclasse Rhodymeniophycidae, caracterizada principalmente pela presença de um ciclo de vida trifásico isomórfico e esporos com padrão de germinação *Gelidium-type* (Bouzon *et al.*, 2006). A ordem possui apenas 140 espécies classificadas, porém sua diversidade relativamente pequena não reduz sua importância, com espécies produtoras de agar de qualidade (Hommersand & Fredericq, 1988). O gênero *Gelidium* é o mais difundido dentre as Gelidiales, sendo constituído por aproximadamente 100 espécies distribuídas em comunidades intertidais e subtidais de águas temperadas e tropicais de praticamente todos os continentes (Santelices, 1991). As espécies de *Gelidium* fazem parte da alimentação de peixes e invertebrados marinhos, além de também serem

consumidas diretamente por comunidades indígenas. A produção de ágar de alta qualidade e de compostos bactericidas impulsionou a aplicação destas algas para aplicação industrial e tecnológica (Scariot, 2010), porém atualmente toda a sua comercialização é realizada a partir de bancos naturais, especialmente em países como Espanha, Portugal, Indonésia, Japão, Coréia, México e Chile (Friedlander, 2008).

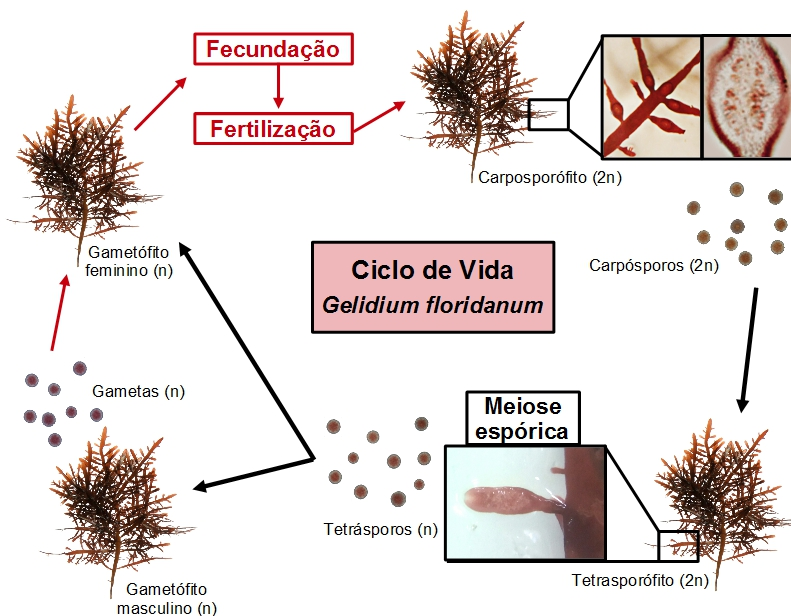
A espécie *Gelidium floridanum* W.R. Taylor possui talos de até 1,5 mm de largura e 15 cm de altura (Cordeiro-Marinho, 1978), com ramos eretos e achatados e uma coloração vermelho-violácea (Figura 2), podendo ser encontrada no mesolitoral de costões rochosos entre os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul. Em Santa Catarina, a espécie distribui-se entre os municípios de Itajaí e Laguna. Seu desenvolvimento ocorre em grande intensidade durante a primavera, com maior liberação de tetrásporos entre os meses de setembro e novembro (Scariot, 2010).



**Figura 2:** Segmento apical de *G. floridanum*. Imagem: arquivo pessoal.

### 1.7 Ciclo de vida e desenvolvimento dos esporos

Os espécimes de *G. floridanum* reproduzem-se através de um ciclo de vida com três fases – gametofítica ( $n$ ), carposporofítica ( $2n$ ) e tetrasporofítica ( $2n$ ) – sem distinção morfológica entre os talos, portanto trifásico e isomorfo, do tipo *Polysiphonia* (Santelices, 1988). Os gametófitos representam a fase haploide e sexuada do ciclo, enquanto que carposporófitos e tetrasporófitos representam a fase diploide e assexuada (Figura 3).



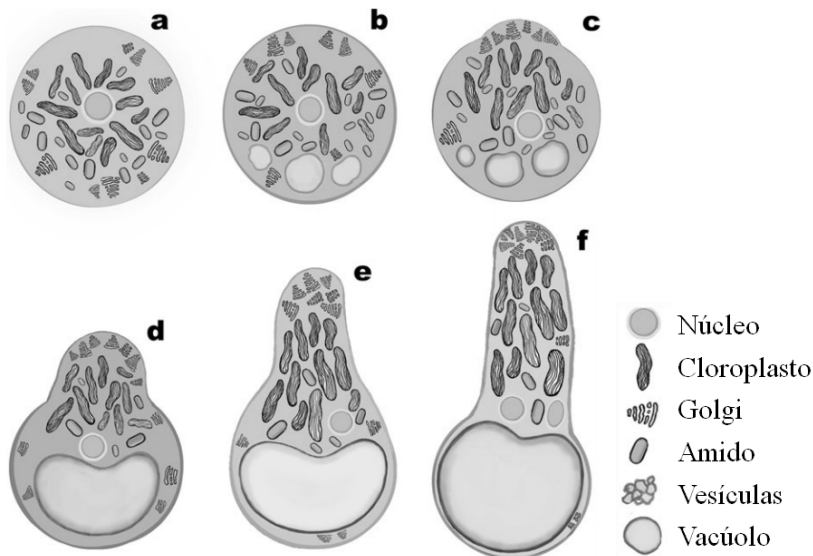
**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de vida de *G. floridanum*, com imagens modificadas de Scariot (2010) e Simioni (2014).’

Os gametófitos masculinos produzem e liberam gametas haploides aflagelados (espermácios) que fecundam os gametófitos femininos em estruturas denominadas carpogônios. Após fecundados, os carpogônios permanecem aderidos aos gametófitos fermininos,

formando uma estrutura denominada cistocarpo e dando início a fase carposporófitica do ciclo. O carposporófito maduro produz e libera carpósporos diploides aflagelados que se fixam ao substrato e desenvolvem-se na terceira fase do ciclo, a fase tetrasporófitica. Os tetrasporófitos são talos diploides e sofrem meiose na região reprodutiva – tetrasporângios –, dando origem a tetrásporos haploides que também se fixam ao substrato e desenvolvem-se em gametófitos femininos e masculinos (Santelices, 1990; Scariot, 2010).

Os tetrásporos não possuem parede celular e são envoltos por uma matriz mucilaginosa de natureza glicoproteica, importante para sua adesão ao substrato. Após fixação, o desenvolvimento dos tetrásporos em talos gametofíticos ocorre a partir de germinação unipolar e tem início com a formação do tubo germinativo (Figura 4). Uma desorganização polarizada do conteúdo citoplasmático permite a expansão do tetrásporo, culminando na formação de uma protuberância que da origem ao tubo germinativo, formado a partir da secreção de vesículas derivadas de corpos de Golgi que se aglomeram próximos ao tubo. Então, todo o conteúdo citoplasmático do tetrásporo migra através do tubo germinativo, ao mesmo tempo em que este começa a ser recoberto por uma fina camada de parede celular (Bouzon *et al.*, 2005). O tetrásporo original permanece como elemento de fixação da plântula, até que a formação de um septo separe o esporo do tubo germinativo, quando este inicia uma série de sucessivas divisões celulares que darão origem à plântula (Simioni *et al.*, 2014).





**Figura 4:** Formação do tubo germinativo em tetráporos de *G. floridanum*. Os corpos de Golgi, que inicialmente encontram-se espalhados ao longo da membrana celular (a), migram para um dos pólos, enquanto vacúolos são formados no pólo oposto (b). O acúmulo de corpos de Golgi indica o início da formação do tubo germinativo (c), para onde as demais organelas migrarão (d-e). O tetrásporo inicial é preenchido por um grande vacúolo (f), que permanece como elemento de fixação. Imagem traduzida e modificada de Simioni et al. (2014).

Para ampliar o conhecimento acerca dos efeitos interativos entre um aumento na temperatura e uma elevada concentração do metal pesado cobre, além das diferenças toxicológicas entre os referidos elementos em diferentes fases do ciclo de vida das algas vermelhas, este trabalho investigou os efeitos isolados e interativos da temperatura e do cobre sobre a fisiologia, a organização e a viabilidade celular de tetrásporófitos e tetrásporos da macroalga vermelha *G. floridanum*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos isolados e interativos da temperatura e do metal pesado cobre sobre a organização celular e aspectos fisiológicos de tetrasporófitos e o desenvolvimento de tetrásporos da macroalga vermelha *Gelidium floridanum*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos isolados e interativos da temperatura e do metal pesado cobre sobre a taxa de crescimento de tetrasporófitos da macroalga vermelha *G. floridanum*.

- Analisar a concentração de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) em tetrasporófitos e tetrásporos após os tratamentos realizados.

- Verificar as alterações nos compostos antioxidativos (carotenoides e compostos fenólicos) de tetrasporófitos após os tratamentos realizados.

- Quantificar a concentração de carboidratos (açúcares solúveis totais e amido das florídeas) em tetrasporófitos após os tratamentos.

- Caracterizar as alterações morfológicas e ultraestruturais de tetrasporófitos e tetrásporos após os tratamentos realizados.

- Determinar a taxa de germinação de tetrásporos e a viabilidade celular de tetrasporófitos e tetrásporos após os tratamentos realizados.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

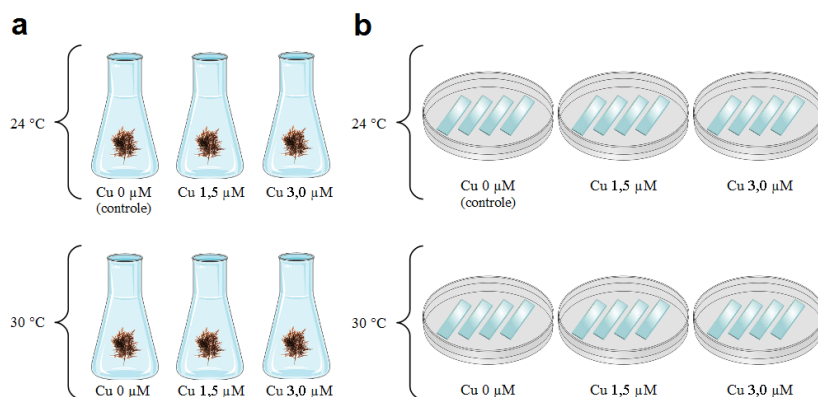
### 3.1 Coleta e aclimação do material biológico

Segmentos apicais tetrasporófitos de *G. floridanum* foram coletadas na praia da Ponta do Sambaqui (27°29'18.8 "S e 48°32'12.9"W), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, onde as temperaturas variam entre 15 a 28 °C dependendo da estação do ano. As coletas foram realizadas entre a primavera e o verão dos anos 2016 e 2017. Após a coleta, as algas foram imediatamente transportadas para o laboratório em recipientes escuros para evitar a ocorrência de fotooxidação, em tempo máximo de 30 minutos, onde foram limpas e aclimatadas durante 7 dias. As algas foram mantidas em Erlenmeyers com água do mar esterelizada, pH de  $8,0 \pm 1$ , salinidade de 35‰, temperatura de  $24 \pm 2$  °C, irradiância de  $70 \pm 10$   $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e 4 mL.L<sup>-1</sup> de meio de cultura von Stosch sem EDTA (Edwards, 1970), em câmaras BOD com aeração contínua e fotoperíodo de 12 horas.

### 3.2 Desenho experimental

Dois experimentos foram realizados de forma independente, o primeiro com tetrasporófitos e o segundo com tetrásporos. Seis grupos experimentais foram analisados em um design fatorial com temperaturas de 24 °C e 30 °C e cobre nas concentrações 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 200 e 400  $\mu\text{g/L}$ ), com análises após 7 e 14 dias de experimento com tetrasporófitos e após 24 horas de experimento com tetrásporos (Figura 5). As amostras cultivadas sob temperatura de 24 °C sem adição de cobre foram consideradas o controle.

As concentrações de cobre utilizadas no presente trabalho foram definidas a partir de um experimento piloto. A temperatura foi determinada a partir de previsões de um aquecimento global moderado (IPCC, 2014). Após os experimentos, todo o material contaminado com cobre passou por procedimento de descontaminação em ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 10%) por pelo menos 2 dias, seguido de procedimentos convencionais de lavagem com detergente e água destilada e secagem em estufa a  $200\text{ }^\circ\text{C}$  por pelo menos 2 horas.



**Figura 5:** Esquema dos grupos experimentais de tetrasporófitos (a) e tetrásporos (b) de *G. floridanum* utilizados no presente trabalho.

### 3.3 Cultivo dos tetrasporófitos

Segmentos apicais tetrasporófitos de *G. floridanum* pesando  $0,5\text{ g} \pm 0,01$  foram cultivados em Erlenmeyers de  $250\text{ mL}$  com água do mar esterilizada em condições semelhantes as do período de aclimação. Câmaras BOD foram utilizadas para controle da temperatura ambiente, e o metal pesado foi adicionado diretamente na água do cultivo, sob a forma de cloreto de cobre II ( $\text{CuCl}_2$ ).

### 3.4 Obtenção e cultivo de tetrásporos

Segmentos apicais tetrásporófitos de *G. floridanum* foram selecionados e incubados em Berzelius com água do mar coletada na praia da Ponta do Sambaqui (temperatura de  $24 \pm 2$  °C, salinidade  $32 \pm 1$  ‰) no escuro *overnight* para liberação dos tetrásporos. Os esporos obtidos foram transferidos para lâminas de vidro, onde permaneceram por um período aproximado de 3 horas para fixação. Cada lâmina recebeu 0.5 mL de esporos, correspondendo a aproximadamente 47 mil esporos (Filipin *et al.*, 2016). Após este período, as lâminas foram imersas em placas de Petri com água do mar com as concentrações de cobre e incubadas sob as temperaturas analisadas, onde permaneceram por um período de 24 horas.

### 3.5 Análises realizadas em tetrásporófitos

Após finalização dos experimentos, os tetrásporófitos de *G. floridanum* foram retirados do cultivo e o excesso de água foi delicadamente seco com papel. As amostras foram então pesadas e processadas de acordo com a análise realizada. As análises a seguir foram realizadas em triplicata.

#### 3.5.1 Taxa de crescimento

As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca das amostras e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, calculadas de acordo com fórmula de Lignell e Pedersén (1989):

$TC [\% \text{ dia}^{-1}] = [(Mf/Mi)^{1/t} - 1] \times 100$ , sendo:

Taxa de crescimento ( $TC$ ) em  $\% \cdot \text{dia}^{-1}$ ;

Massa final ( $Mf$ ) em gramas;

Massa inicial ( $Mi$ ) em gramas;

Tempo ( $t$ ) em dias.

### 3.5.2 Pigmentos fotossintetizantes

A extração dos pigmentos fotossintetizantes foi realizada no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC, Itacorubi – Florianópolis). Amostras de aproximadamente 1 g foram congeladas e maceradas em nitrogênio líquido. As ficobiliproteínas (aloficocianina - AFC, ficocianina - FC e ficoeretrina - FE) foram extraídas em 3 mL de tampão Fosfato de Sódio 0,05 M (pH 6,4) a 4 °C no escuro. O homogenato foi centrifugado a 223 xg durante 20 minutos. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração das ficobiliproteínas foi determinada nos comprimentos de 498, 614 e 651 nm. A concentração de ficobiliproteínas foi determinada utilizando-se as equações descritas por Kursar *et al.* (1983). A clorofila *a* foi extraída do mesmo material macerado em 4 mL de acetona 90%, segundo metodologia de Jeffrey & Humphrey (1975). O homogenato foi centrifugado a 223 xg durante 20 minutos a 4 °C. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração da clorofila foi determinada em 630, 647 e 664 nm. A quantificação dos pigmentos fotossintetizantes também foi utilizada para o cálculo da proporção entre os pigmentos (AFC:Chl *a*, FC:AFC e FE:AFC) – citar artigo.

### 3.5.3 Compostos antioxidantes

Os carotenoides totais foram extraídos a partir de metodologia descrita por Aman *et al.* (2005), no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC, Itacorubi – Florianópolis). Amostras pesando aproximadamente 1 g foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em refrigeradores -80 °C até a realização da extração. As amostras foram então maceradas em nitrogênio líquido e incubadas em 10 mL de metanol PA por 1 hora no escuro, com posterior centrifugação do extrato durante 10 minutos a 223 xg. Aliquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração dos carotenoides foi determinada em 450 nm. Para extração dos compostos fenólicos, seguiu-se o protocolo estabelecido por Waterman & Mole (1994). As amostras maceradas foram incubadas em 10 mL de metanol 80% durante 1 hora no escuro. Então, 30 mL de cada extrato foi incubado em 225 µL de reativo Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de carbonato de sódio 2% durante 1 hora em temperatura ambiente. Aliquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração dos compostos fenólicos foi determinada em 750 nm.

### 3.5.4 Compostos carboidratos

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com Shannon (1968), no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (UFSC, Itacorubi – Florianópolis). Amostras de aproximadamente 1 g foram maceradas em nitrogênio líquido, incubadas em 2 mL de solução MCW 12:5:3 (metanol:clorofórmio:água destilada) e centrifugadas a 894 xg durante 5 minutos. Este

procedimento foi realizado duas vezes, e os sobrenadantes foram coletados e adicionados a 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada e centrifugados novamente a 894 xg durante 5 minutos. Então, os sobrenadantes foram adicionados a 2 mL de antrona e aquecidos a 100 °C durante 3 minutos. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração dos açúcares solúveis foi determinada em 630 nm. A extração de amido das florídeas foi realizada a partir do resíduo do extrato dos açúcares, segundo metodologia estabelecida por McCready *et al.* (1950). O extrato foi adicionado a 2 mL de ácido perclórico 30% e centrifugado a 894 xg durante 5 minutos. O procedimento foi realizado duas vezes, e os sobrenadantes foram coletados e adicionados a 2 mL de antrona e aquecidos a 100 °C durante 3 minutos. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram lidas em leitora de microplacas Tecan (Infinite M200), e a concentração de amido foi determinada em 630 nm.

### 3.5.5 Microscopia de luz

Secções de amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5%, tampão fosfato 0,1 M e pH 7,2, em temperatura média de 4 °C, *overnight*. As amostras fixadas foram então lavadas em temperatura ambiente com tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos. Em seguida, o material foi desidratado em séries de concentrações crescentes de etanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %). A pré-infiltração das amostras ocorreu em historesina glicolmetacrilato (GMA) 1:1 em álcool 100%, com posterior infiltração em resina pura (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Após a secagem das amostras, estas foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM



2135, em secções de 3 µm. As secções foram secas em lâminas de vidro a 37 °C durante 30 minutos, sendo submetidas aos testes histoquímicos de Ácido Periódico de Schiff (PAS), para observação dos grãos de amido, seguido do teste de Azul de Toluidina (AT-O), para observação da morfologia geral das células. Para PAS, as lâminas foram oxidadas com solução de ácido periódico 1 % durante 20 minutos. Após a oxidação, as amostras foram coradas com reagente de Schiff por mais 20 minutos, sendo posteriormente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina, durante 10 segundos, sendo então lavadas em água corrente. As lâminas coradas foram então secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá, de acordo com as metodologias de Gahan (1984) e Schmidt *et al.* (2009), analisadas em microscópio Leica DM500 e fotografadas com software de captura Opticam.

### **3.5.6 Microscopia eletrônica de transmissão**

Para observação em Microscopia Eletrônica de Transmissão, secções das amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % com sacarose 2 % e tampão cacodilato 0,1 M, com pH resultante em 7,2. A pré-fixação foi realizada em *overnight*, em temperatura média de 4 °C. Após a pré-fixação, foram feitas quatro lavagens das amostras, em tampão cacodilato 0,1 M e sacarose 2 % (Ouriques & Bouzon, 2003), e as lavagens foram seguidas da pós-fixação, que foi realizada em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, com pH 7,2, durante 4 horas à temperatura ambiente (Pueschel, 1979). Após a pós-fixação, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,2, sendo em seguida desidratado em concentrações crescentes

de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), durante 30 minutos em cada solução. Finalizada a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). Esta infiltração foi realizada em sete etapas diárias, com resina Spurr diluída em concentrações crescentes de acetona. O material foi então polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70 °C durante 24 h. As secções ultrafinas foram realizadas em ultramicrótomo Leica e contrastadas em acetato de uranila (1 %) e citrato de chumbo (1 %) por 10 minutos cada, de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### **3.5.7 Ensaio do MTT**

Aproximadamente 0,12 g de amostras frescas foram incubadas em 3 mL de água do mar esterilizada com 30 µL de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (0,17 g.L<sup>-1</sup> MTT, Sigma-Aldrich), durante 3 horas a uma temperatura de 37 °C. Então, os fragmentos das algas foram lavados com água destilada, transferidos para Eppendorf contendo 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) e centrifugados a 503 xg durante 5 minutos. Alíquotas de 250 µL foram lidas em leitora de microplaca Tecan (Infinite M200) a 570 nm. De acordo com Mendes *et al.* (2013), a absorbância final baseia-se na conversão do MTT em formazan por desidrogenases mitocondriais e é proporcional ao número de mitocôndrias ativas, correspondendo, portanto, a quantidade de células viáveis nas amostras.

### **3.6 Análises realizadas em tetrásporos**

Após os experimentos, as lâminas contendo os tetrásporos de *G. floridanum* foram retiradas do cultivo e delicadamente raspadas com o auxílio de lamínulas. As análises a seguir foram realizadas em triplicata.

#### **3.6.1 Contagem dos esporos**

As lâminas foram analisadas em microscópio Leica DM500 e fotografadas com software de captura Opticam. Cinco regiões foram fotografadas em cada lâmina, a partir das quais se realizou a contagem total dos esporos viáveis, com divisões, com rizoide e inviáveis. A contagem foi realizada com o plugin Cell Counter do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

#### **3.6.2 Pigmentos fotossintetizantes**

As extrações de clorofila *a* e ficobiliproteínas dos tetrásporos foram realizadas de forma semelhante às extrações em tetrasporófitos (seção 4.5.1), após centrifugação das amostras a 5585 xg durante 5 minutos para quebra da parede e extravasamento dos pigmentos.

#### **3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão**

O processamento dos tetrásporos para análise em MET ocorreu de forma semelhante ao processamento utilizado para tetrasporófitos (seção 5.5.5), com a adição de centrifugações a 503 xg durante 2 minutos entre cada um dos passos para sedimentação dos esporos. As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### 3.6.4 Ensaio do MTT

O processamento dos tetrásporos para análise de viabilidade celular ocorreu de forma semelhante ao processamento utilizado para tetrásporófitos (seção 5.5.6). As lâminas contendo os tetrásporos foram incubadas em 20 mL de água do mar esterilizada com 200  $\mu\text{L}$  de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (0,17  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT, Sigma-Aldrich), durante 3 horas a uma temperatura de 37 °C. Então, as lâminas foram lavadas em água destilada, delicadamente raspadas com o auxílio de lamínulas e seus conteúdos foram transferidos para Eppendorfs com 1 mL de DMSO. Após centrifugação a 503  $\times\text{g}$  durante 5 minutos, alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  foram lidas em leitora de microplaca Tecan a 570 nm.

### 3.7 Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos foram analisados por Análise de Variância Fatorial (ANOVA), e teste *a posteriori* de Tukey, realizados no Software *Statistica* 13 (nível de significância considerando  $p \leq 0,05$ ). O teste do ETA quadrado ( $\eta^2$ ) também foi realizado, com o intuito de aferir o efeito dos tratamentos sobre as análises realizadas. ETA quadrado pode ser definido como a proporção de variância associada a cada um dos efeitos, interações e erros resultantes da ANOVA (Thompson, 2006), e é calculado da seguinte forma:

$$\eta^2 = (SS_{\text{efeito}}) / (SS_{\text{total}}), \text{ sendo}$$

$SS_{\text{efeito}}$  = a soma dos quadrados do efeito de interesse

$SS_{\text{total}}$  = a soma total dos quadrados de todos os efeitos, interações e erros da ANOVA

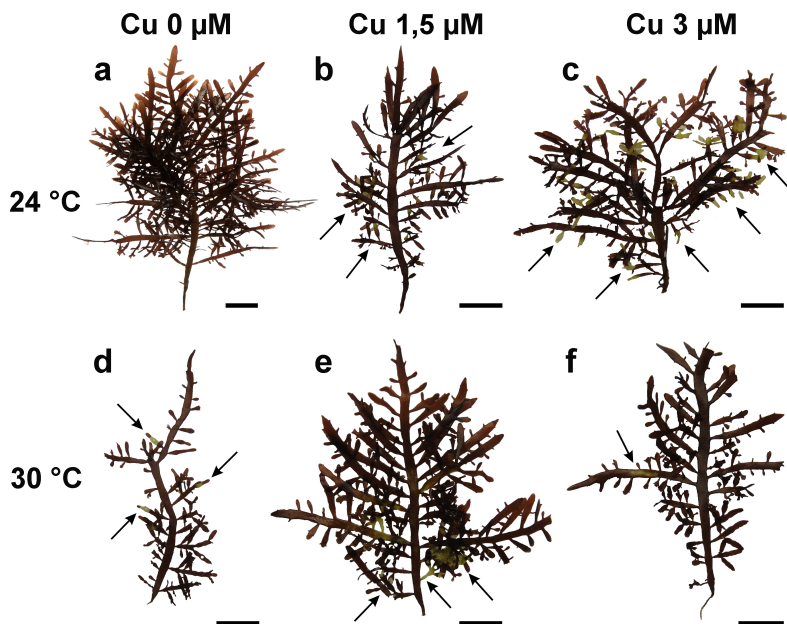
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da temperatura e do cobre sobre tetrasporófitos de *Gelidium floridanum*

A seguir serão apresentadas as alterações na morfologia dos segmentos apicais, na concentração de compostos fotossintetizantes, antioxidativos e carboidratos, na ultraestrutura, na viabilidade celular e na taxa de crescimento das amostras de tetrasporófitos de *G. floridanum* após cultivo com o metal pesado cobre e/ou sob temperatura de 30 °C. A análise de Variância Fatorial, os valores de significância e ETA quadrado encontram-se na tabela 1.

#### 4.1.1 Morfologia dos segmentos apicais

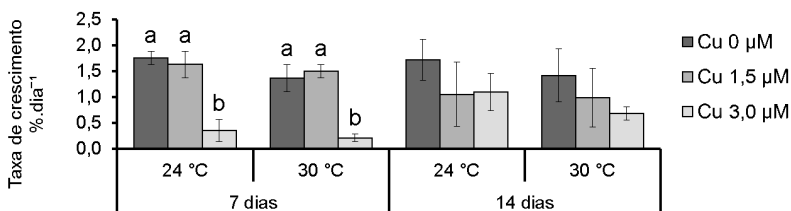
Ao final dos 14 dias de experimento, as amostras do grupo controle de *G. floridanum* apresentaram coloração e ramificações típicas da espécie (Figura 6a). Já a exposição dos segmentos apicais da macroalga ao cobre e/ou à elevada temperatura resultou no desenvolvimento de diversos pontos de despigmentação ao longo dos talos, indicados pelas setas nas figuras 6b-f.



**Figura 6:** Morfologia dos segmentos apicais de tetrasporófitos de *G. floridanum* após 14 dias de cultivo. **a.** Controle. **b-c.** Amostras cultivadas com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. **d.** Amostra cultivada sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ . **e-f.** Amostras cultivadas com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$ , respectivamente, sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ . As setas indicam pontos de despigmentação. Escala = 1 cm

#### 4.1.2 Taxa de crescimento

Após 7 dias de cultivo, as macroalgas cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  e 30  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, com redução de 80 % e 88 %, respectivamente (Figura 7). O cobre foi o maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 80 \%$ ). Após 14 dias, nenhuma diferença significativa pode ser observada entre as amostras.

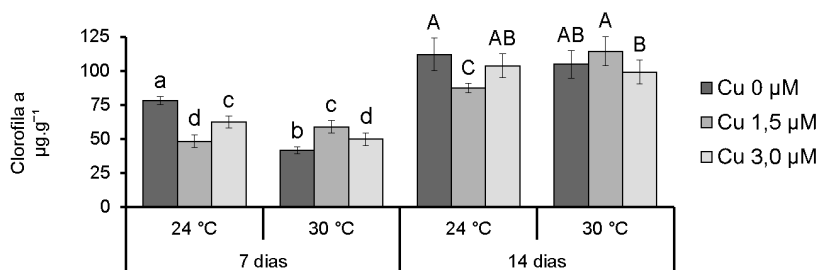


**Figura 7:** Taxa de crescimento de tetrasporófitos de *G. floridanum* (%.dia<sup>-1</sup>) após 7 e 14 dias de cultivo. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

#### 4.1.3 Pigmentos fotossintetizantes

A exposição dos segmentos apicais de *G. floridanum* aos elementos estressores resultou em alterações significativas na composição e proporção de pigmentos fotossintetizantes. Após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram significativa redução na concentração de clorofila *a* (Figura 8). As amostras cultivadas sob temperatura de 30 °C apresentaram a menor concentração do pigmento, com 46 % menos clorofila em relação ao controle. Dentre as amostras cultivadas com o cobre ou com o cobre simultaneamente à temperatura de 30 °C, a redução variou entre 20 % e 38 %. O teste de ETA<sup>2</sup>, porém, revelou que a interação entre o cobre e a elevada temperatura respondeu por 62 % do efeito sobre as amostras. Após 14 dias de cultivo, as amostras apresentaram um aumento na concentração de clorofila *a*, quando comparadas as amostras cultivadas durante 7 dias. Ainda que menos acentuada, uma redução na concentração deste pigmento ainda pode ser observada quando comparados os tratamentos ao controle. A

maior redução foi obtida após cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 24  $^{\circ}\text{C}$  (-22 %), seguida do cultivo com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$  (-11 %). Novamente, o teste de  $\text{ETA}^2$  indicou um maior efeito do tratamento com cobre sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  (43 %).

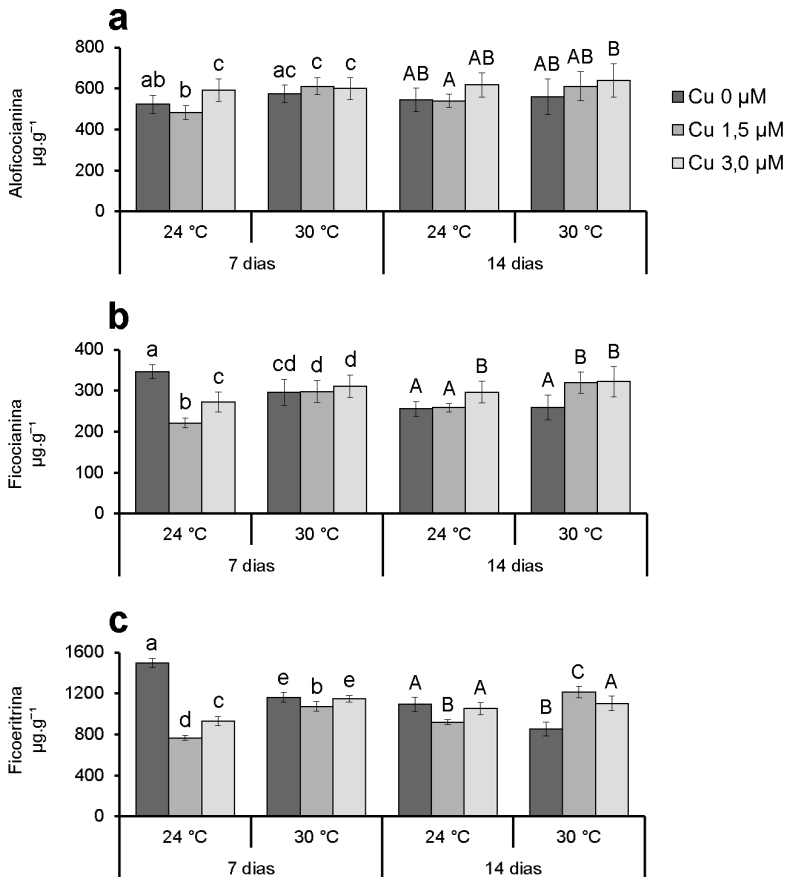


**Figura 8:** Concentração de clorofila *a* de tetrasporófitos de *G. floridanum* ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) após 7 e 14 dias de cultivo. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 9$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

A concentração de aloficocianina (Figura 9a) apresentou um aumento significativo de 13 %, 14 % e 16 % nas amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  e cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, após 7 dias de cultivo. A temperatura respondeu pelo maior efeito sobre as amostras ( $\eta^2 = 26\%$ ). Após 14 dias de cultivo, nenhum dos tratamentos resultou em alterações significativas na concentração deste pigmento acessório. Após 7 dias, o cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  reduziu em 36 % e 21 %, respectivamente, o conteúdo de ficocianina (Figura 9b). Já o cultivo sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  com ou sem o metal pesado levou a reduções entre 10 % e 14 %. Os tratamentos com cobre a 24  $^{\circ}\text{C}$  e 30  $^{\circ}\text{C}$  tiveram os



maiores efeitos sobre as amostras ( $\eta^2 = 36\%$  e  $40\%$ , respectivamente). Após 14 dias de cultivo, as amostras apresentaram aumentos significativos entre  $15\%$  e  $24\%$  na concentração deste pigmento acessório em resposta ao cobre  $3\ \mu\text{M}$  a  $24\ ^\circ\text{C}$  e cobre  $1,5\ \mu\text{M}$  e  $3\ \mu\text{M}$  a  $30\ ^\circ\text{C}$ , sendo o cobre o maior responsável pelas alterações ( $\eta^2 = 31\%$ ). A ficoeritrina foi o pigmento acessório mais afetado pelos tratamentos (Figura 9c). Após 7 dias de cultivo, sua concentração apresentou reduções significativas de  $48\%$  e  $37\%$  nas amostras cultivadas com cobre  $1,5\ \mu\text{M}$  e  $3\ \mu\text{M}$  a  $24\ ^\circ\text{C}$ . Já as amostras cultivadas sob temperatura de  $30\ ^\circ\text{C}$  apresentaram reduções entre  $22\%$  e  $28\%$  em relação ao controle. Segundo o teste de  $\text{ETA}^2$ , o metal pesado cobre apresentou o maior efeito sobre as amostras ( $\eta^2 = 56\%$ ). Porém a interação entre cobre e temperatura também apresentou expressivo efeito sobre este pigmento acessório ( $\eta^2 = 38\%$ ). Após 14 dias de cultivo, as amostras cultivadas sob temperatura de  $30\ ^\circ\text{C}$  apresentaram a maior redução em relação ao controle ( $-22\%$ ), enquanto que o cultivo com o metal pesado cobre  $1,5\ \mu\text{M}$  sob temperatura de  $30\ ^\circ\text{C}$  resultou em um aumento de  $10\%$  em relação ao controle. Após 14 dias de cultivo, os tratamentos com cobre sob temperatura de  $30\ ^\circ\text{C}$  apresentaram maior efeito sobre este pigmento acessório ( $\eta^2 = 67\%$ ).

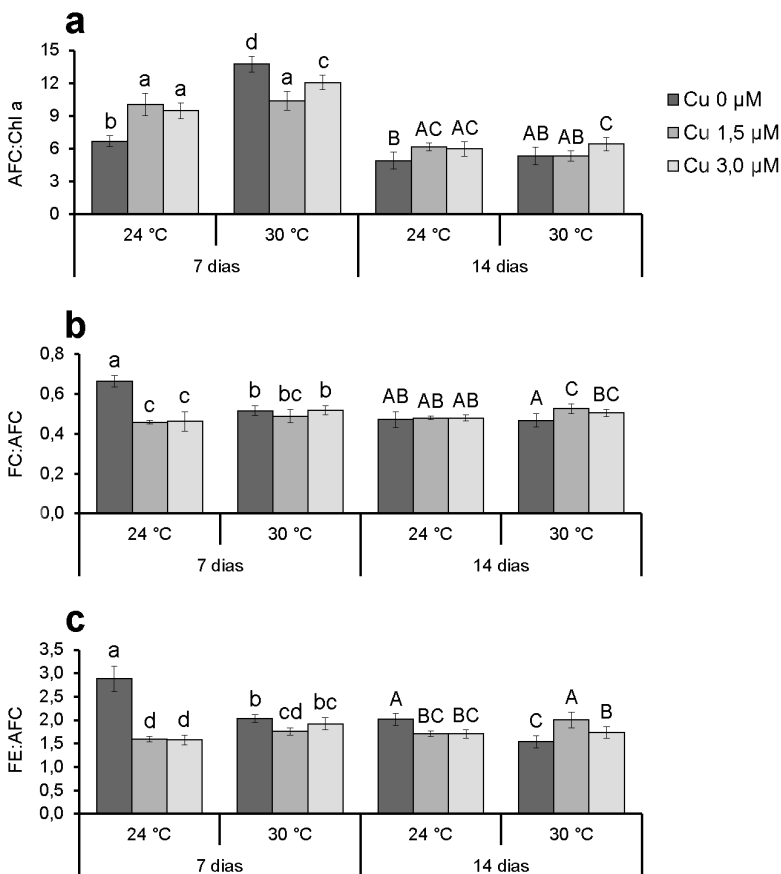


**Figura 9:** Concentração de ficobiliproteínas de tetrasporófitos de *G. floridanum* ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) após 7 e 14 dias de cultivo. **a.** Aloficocianina. **b.** Ficocianina. **c.** Ficoeritrina. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 9$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

Os tratamentos também levaram a alterações na proporção entre clorofila *a* e os pigmentos acessórios (Figura 10). Após 7 dias, a razão entre aloficocianina e clorofila *a* apresentou-se elevada em todos os tratamentos, em relação ao controle, com aumentos de 41 % e 50 % nos tratamentos com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24 °C e de 55 % e 80 % nos tratamentos com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C, respectivamente (Figura 10a). As amostras cultivadas sob 30 °C apresentaram o maior aumento em relação ao controle (+105 %), sendo a temperatura a maior responsável pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 52 \%$ ). Após 14 dias de cultivo, a razão entre AFC:Chl *a* apresentou significativa redução, quando comparada à primeira semana de cultivo. Ainda assim, um aumento significativo entre AFC e Chl *a* pode ser observado nas amostras cultivadas com cobre a 24 °C e nas amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C, sendo o cobre o maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 30 \%$ ).

A razão entre ficocianina e aloficocianina (Figura 10b) apresentou redução de 30 % nas amostras cultivadas com cobre a 24 °C, em relação ao controle. Já as amostras cultivadas sob 30 °C apresentaram reduções entre 21 % e 26 %. Segundo teste de ETA<sup>2</sup>, o cobre respondeu por 47% dos efeitos observados nas amostras, enquanto que o cultivo com cobre sob temperatura de 30 °C respondeu por 36 % dos efeitos. Após 14 dias, apenas as amostras cultivadas com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, com aumentos de 12 % e 8,5 %, respectivamente, sendo o cobre o maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 19 \%$ ).

A razão entre ficoeritrina e aloficocianina também foi significativamente reduzida após os tratamentos (Figura 10c). Após 7 dias de cultivo, a razão entre estes pigmentos apresentou reduções entre 33 % e 45 % para as amostras cultivadas com o cobre sob 24 °C ou 30 °C, enquanto que as amostras cultivadas sob temperatura de 30 °C, sem cobre, apresentaram redução de 29 %. O teste de ETA<sup>2</sup> indicou o cobre como o maior responsável pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 57\%$ ), seguido do cultivo com cobre sob temperatura de 30 °C ( $\eta^2 = 32\%$ ). Após 14 dias, o cultivo sob temperatura de 30 °C levou à maior redução observada nas amostras (-23 %), enquanto que as amostras cultivadas com cobre em ambas concentrações de cobre a 24 °C apresentaram redução de 15 % e as amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C apresentaram redução de 13 %. Após 14 dias, o cultivo com cobre sob temperatura de 30 °C respondeu por 60 % dos efeitos observados nas amostras.

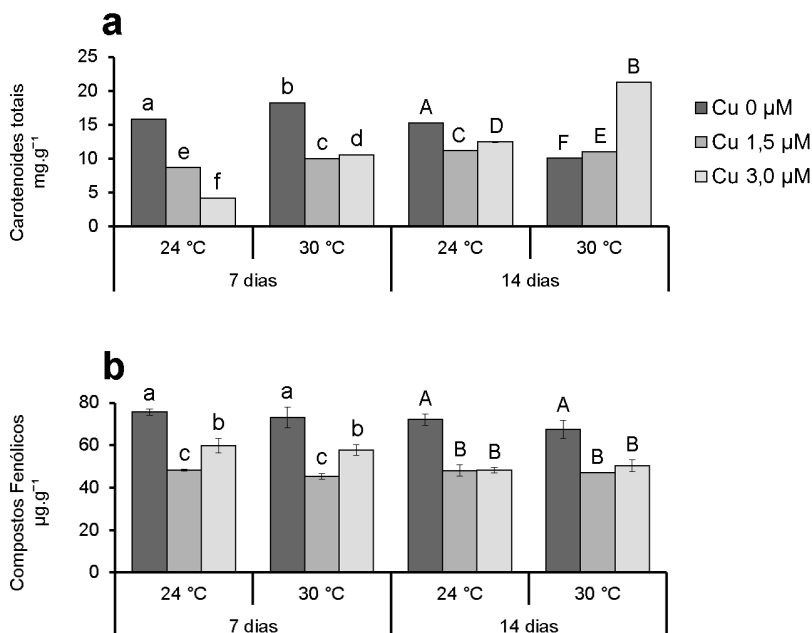


**Figura 10:** Razão entre os pigmentos de tetrasporófitos de *G. floridanum* após 7 e 14 dias de cultivo. **a.** Razão entre aloficocianina e clorofila *a*. **b.** Razão entre ficocianina e aloficocianina. **c.** Razão entre ficoeritrina e aloficocianina. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 9$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

#### 4.1.4 Compostos antioxidativos

O cultivo de *G. floridanum* com o cobre e/ou sob elevada temperatura resultou em alterações significativas na concentração de compostos antioxidativos (Figura 11). Após 7 dias de cultivo, a concentração de carotenoides totais (Figura 11a) apresentou reduções de 44 % e 73 % após cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24 °C, respectivamente. O cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30 °C resultou em reduções de 36 % e 32 %, respectivamente, enquanto que o cultivo das amostras a 30 °C, sem o cobre, resultou em um aumento de 15 % em relação ao controle. O metal pesado cobre foi o maior responsável pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 81 \%$ ). Após 14 dias de cultivo, a concentração de carotenoides totais encontrou-se reduzida em 26 % e 18 % após cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24 °C. O cultivo das amostras sob temperatura de 30 °C e com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  a 30 °C resultou em redução de 33 % e 71 %, respectivamente, enquanto que o cultivo com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C resultou em um acréscimo de 39 % em relação ao controle. Após 14 dias o cultivo com cobre a 30 °C respondeu pela maior parte dos efeitos observados sobre as amostras ( $\eta^2 = 57 \%$ ), seguido do cultivo com cobre sob temperatura de 24 °C ( $\eta^2 = 40 \%$ ).

Os compostos fenólicos (Figura 11b) apresentaram padrão similar após 7 e 14 dias de cultivo. As amostras cultivadas sob 30 °C, sem cobre, não apresentaram alterações significativas. O cultivo com cobre a 24 °C resultou em reduções de 21 % e 36 %, enquanto que o cultivo com cobre a 30 °C resultou em decréscimos de 21 % e 37 %, respectivamente. O cobre foi o maior responsável pelos efeitos ( $\eta^2 = 94 \%$  e 93 %, respectivamente, após 7 e 14 dias de cultivo).



**Figura 11:** Concentração de compostos antioxidativos de tetrasporófitos de *G. floridanum* após 7 e 14 dias de cultivo. **a.** Carotenoides totais ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). **b.** Compostos fenólicos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

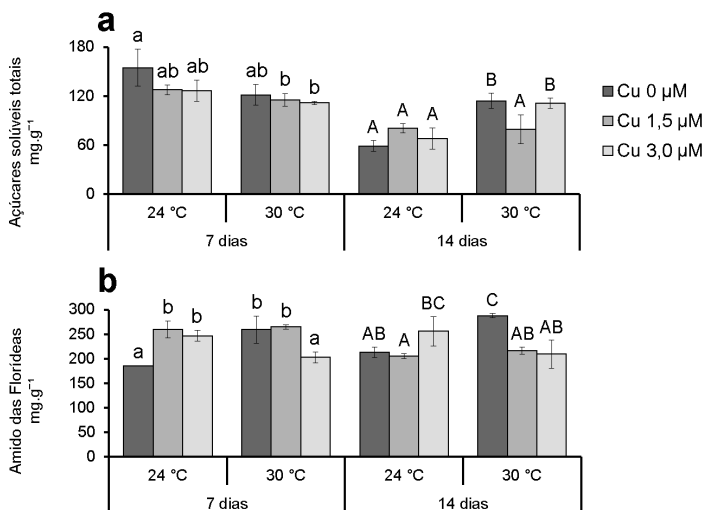
#### 4.1.5 Compostos carboidratos

Após 7 dias de cultivo, a concentração de açúcares totais (Figura 12a) apresentou redução significativa de 17 % e 18 % nas amostras cultivadas com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30 °C, respectivamente, em relação ao controle. A temperatura e o cobre, de

forma isolada, foram os principais responsáveis pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 34\%$  e  $23\%$ , respectivamente). Após 14 dias, a concentração de açúcares apresentou-se reduzida no controle e aumentou  $34\%$  nas amostras cultivadas a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  e  $89\%$  nas amostras cultivadas com cobre  $3\text{ }\mu\text{M}$  a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . A temperatura foi a maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 52\%$ ).

As amostras cultivadas por 7 dias com cobre  $1,5\text{ }\mu\text{M}$  e  $3\text{ }\mu\text{M}$  a  $24\text{ }^\circ\text{C}$ , cobre  $1,5\text{ }\mu\text{M}$  a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  e  $30\text{ }^\circ\text{C}$  sem cobre apresentaram aumentos entre  $33\%$  e  $42\%$  na concentração de amido das florídeas (Figura 12b). O cultivo das amostras com cobre sob elevada temperatura foi o maior responsável pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 52\%$ ). Após 14 dias, as amostras cultivadas sob temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$  sem cobre apresentaram aumento significativo de  $34\%$  em relação ao controle. O cultivo com cobre sob temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$  foi considerado o maior responsável pelos efeitos observados nas amostras ( $\eta^2 = 54\%$ ).



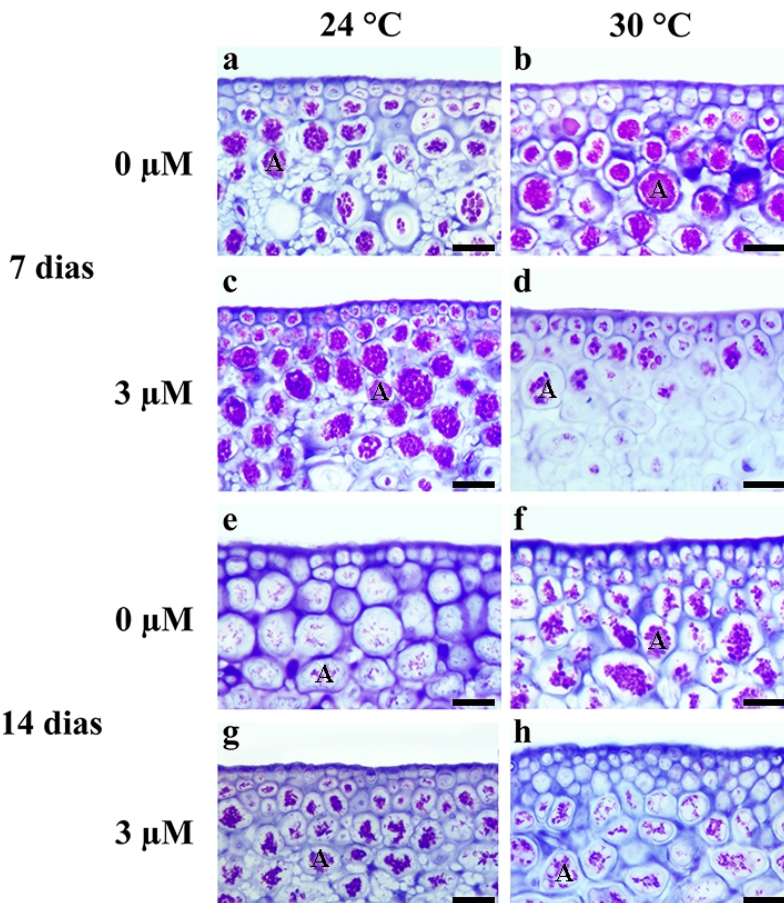


**Figura 12:** Concentração de carboidratos de tetrasporófitos de *G. floridanum* ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) após 7 e 14 dias de cultivo. **a.** Açúcares solúveis totais. **b.** Amido das florídeas. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

#### 4.1.6 Microscopia de Luz

A observação das amostras de *G. floridanum* sob microscopia de luz (Figura 13) indicou um padrão de concentração amido das florídeas similar ao padrão obtido na quantificação deste composto. Após 7 dias de tratamento, as amostras cultivadas com cobre ou sob temperatura de 30 °C apresentaram um aumento nos grãos de amido das florídeas (Figura 13b-c), quando comparadas ao controle (Figura 13a). Porém, amostras expostas a ambos os elementos estressores apresentaram uma redução no conteúdo destes grãos (Figura 13d).

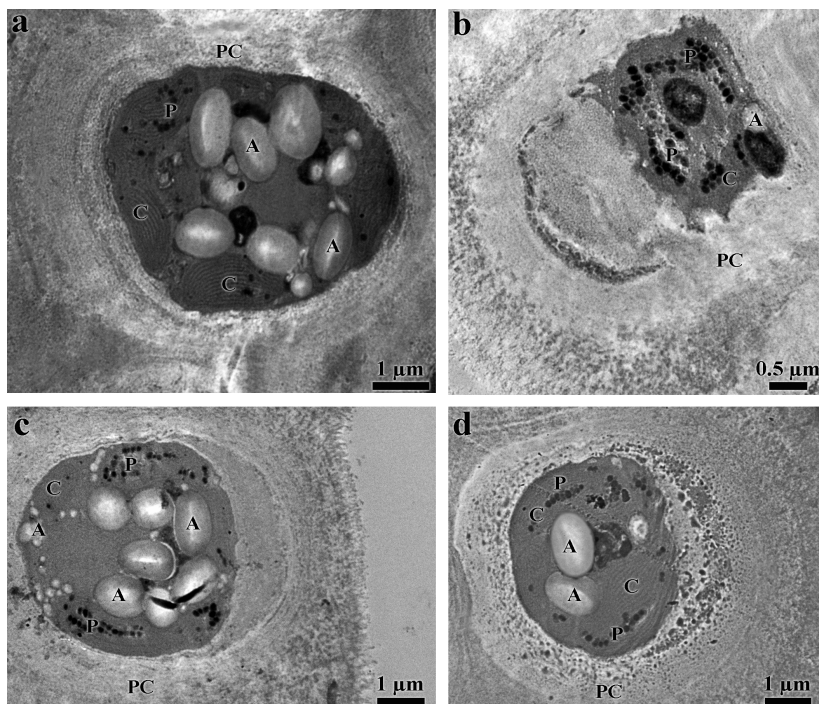
Após 14 dias de cultivo, as amostras do grupo controle apresentaram uma reduzida concentração de grãos de amido das florídeas (Figura 13e), em relação aos tratamentos (Figura 13f-g). Novamente, a exposição da macroalga a ambos os elementos estressores levou a uma redução na concentração de grãos de amido (Figura 13h), em relação aos demais tratamentos. A coloração das amostras com AT-O não revelou diferenças importantes entre os tratamentos.



**Figura 13:** Micrografia de luz de tetrasporófitos de *G. floridanum*, com grãos de amido das florídeas (A) evidenciados pelo PAS. **a.** Corte transversal do controle após 7 dias de cultivo. **b.** Corte transversal de amostra cultivada sob temperatura de 30 °C durante 7 dias. **c-d.** Cortes transversais de amostras cultivadas com cobre 3 μM sob temperatura de 24 °C e 30 °C, respectivamente, durante 7 dias. **e.** Corte transversal do controle após 14 dias de cultivo. **f.** Corte transversal de amostra cultivada sob temperatura de 30 °C durante 14 dias. **g-h.** Cortes transversais de amostras cultivadas com cobre 3 μM sob temperatura de 24 °C e 30 °C, respectivamente, durante 14 dias. Escala = 40 μm.

#### 4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

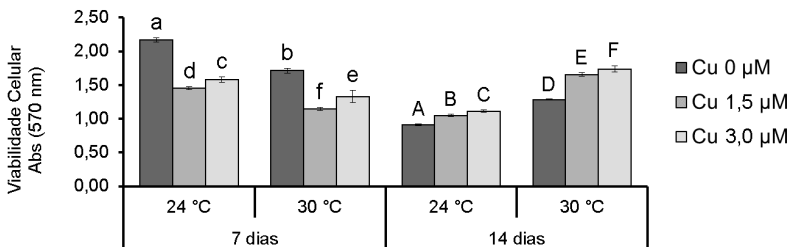
Quando observadas sob MET, as amostras controle de tetrasporófitos de *G. floridanum* (Figura 14a) apresentaram células corticais com 5 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, circundadas por uma parede celular e com citoplasma compactado. Nestas amostras, grãos de amido das florídeas de tamanhos diversos foram observados, especialmente na região central das células. Os cloroplastos encontram-se na região periférica das células, com tilacoides dispostos paralelamente e alguns plastoglóbulos dispersos no interior destas organelas. As células corticais de amostras cultivadas com cobre (Figura 14b) apresentaram um aumento na espessura da parede celular, principalmente na região apical, próxima ao meio externo, além de uma elevada concentração de plastoglóbulos nos cloroplastos. Poucos grãos de amido das florídeas foram observados nestas amostras. O cultivo de *G. floridanum* sob temperatura de 30 °C (Figura 14c) também resultou em um aumento na espessura da parede celular e em uma maior quantidade de plastoglóbulos. Grãos de amido das florídeas puderam ser observados em grande quantidade nestas amostras, em diferentes tamanhos. Grãos de grande porte, com tamanho aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , foram observados na região apical das células, enquanto que grãos de pequeno porte, variando entre 0,1 e 0,5  $\mu\text{m}$ , foram observados na região distal das células corticais. Já as amostras cultivadas com cobre sob elevada temperatura (Figura 14d) apresentaram, além de um aumento na espessura da parede celular e no número de plastoglóbulos, uma forte deposição de material particulado elétron-denso na parede celular.



**Figura 14:** Micrografia Eletrônica de Transmissão de tetrasporófitos de *G. floridanum*. **a.** Célula cortical de amostra controle. Na periferia da célula encontram-se os cloroplastos, enquanto que no interior pode-se observar os grãos de amido das florídeas. **b.** Célula cortical de amostra cultivada com cobre  $3 \mu\text{M}$  sob temperatura de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ , com uma espessa parede celular e grande quantidade de plastoglóbulos, além de poucos grãos de amido das florídeas. **c.** Célula cortical de amostra cultivada sob temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , com parede celular espessa e grande quantidade de plastoglóbulos, além de grãos de amido das florídeas de tamanhos variados. **d.** Célula cortical de amostra cultivada com cobre  $3 \mu\text{M}$  sob temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , com grande espessamento da parede celular, elevado número de plastoglóbulos e forte deposição de material particulado elétron-denso. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. P, plastoglóbulo. PC, parede celular.

#### 4.1.8 Viabilidade celular – MTT

A análise de viabilidade celular revelou um padrão inverso entre as amostras de tetrasporófitos cultivadas por 7 e 14 dias, com diferenças significativas entre todos os tratamentos (Figura 15). Após 7 dias (Figura 15a), as amostras cultivadas com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram redução de 33 % e 27 %, respectivamente, em relação ao controle. As amostras cultivadas sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  e com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram, por sua vez, reduções de 21 %, 47 % e 38 %, respectivamente. De acordo com o teste de ETA<sup>2</sup>, o cobre foi o maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 69$  %). Após 14 dias (Figura 15b), um aumento na viabilidade celular de todas as amostras tratadas pode ser observado em relação ao controle. O cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  resultou em aumentos de 15 % e 21 %. Já as amostras cultivadas sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  e com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram aumentos de 40 %, 82 % e 91 %. Após este período, a temperatura foi a maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 75$  %).



**Figura 15:** Viabilidade celular de tetrasporófitos de *G. floridanum* após 7 e 14 dias de cultivo. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

Fonte de variação	7 dias					14 dias				
	SS	df	F	p	$\eta^2$	SS	df	F	p	$\eta^2$
<b>Clorofila a</b>										
Temperatura	2223.4	1	241.870	0.0000	0.28	345.5	1	5.027	0.0296	0.05
Cobre	370.5	2	20.150	0.0000	0.05	646.8	2	4.705	0.0136	0.09
Temp x Cu	5010.4	2	272.530	0.0000	0.62	3278.3	2	23.845	0.0000	0.43
Erro	441.2	48				3299.6	48			
<b>Allofocianina</b>										
Temperatura	53060	1	30.534	0.0000	0.27	16858	1	3.748	0.0587	0.06
Cobre	28190	2	8.111	0.0009	0.14	55240	2	6.141	0.0042	0.19
Temp x Cu	33036	2	9.506	0.0003	0.17	8832	2	0.982	0.3820	0.03
Erro	83410	48				215898	48			
<b>Ficocianina</b>										
Temperatura	6405	1	20.660	0.0000	0.07	12464	1	18.365	0.0000	0.16
Cobre	34213	2	55.180	0.0000	0.36	24532	2	18/073	0.0000	0.32
Temp x Cu	38292	2	61.760	0.0000	0.41	7513	2	5.535	0.0068	0.10
Erro	14880	48				32576	48			
<b>Ficocitrina</b>										
Temperatura	55539	1	32.670	0.0000	0.02	15742	1	4.290	0.0437	0.02
Cobre	1605825	2	472.310	0.0000	0.57	119472	2	16.280	0.0000	0.13
Temp x Cu	1091177	2	320.940	0.0000	0.39	644243	2	87.790	0.0000	0.67
Erro	81599	48				176113	48			
<b>AFC:Chl a</b>										
Temperatura	149.667	1	256.429	0.0000	0.52	0.003	1	0.008	0.9297	0.00
Cobre	3.645	2	3.123	0.0530	0.01	10.498	2	13.256	0.0000	0.30
Temp x Cu	105.064	2	90.005	0.0000	0.37	5.003	2	6.318	0.0036	0.14
Erro	28.016	48				19.006	48			
<b>FC:AFC</b>										
Temperatura	0.00623	1	6.880	0.0116	0.02	0.00645	1	9.310	0.0037	0.11
Cobre	0.14208	2	78.410	0.0000	0.47	0.01121	2	8.100	0.0009	0.20
Temp x Cu	0.10914	2	60.230	0.0000	0.36	0.00547	2	3.950	0.0250	0.10
Erro	0.04349	48				0.03322	48			
<b>FE:AFC</b>										
Temperatura	0.1711	1	8.750	0.0047	0.01	0.0343	1	2.310	0.1352	0.02
Cobre	6.6564	2	170.130	0.0000	0.58	0.163	2	5.490	0.0071	0.07
Temp x Cu	3.7628	2	96.170	0.0000	0.33	1.3726	2	46.240	0.0000	0.60
Erro	0.939	48				0.7124	48			
<b>Carotenoides</b>										
Temperatura	51.207	1	38405	0.0000	0.13	5.825	1	4681	0.0000	0.02
Cobre	308.824	2	115809	0.0000	0.81	106.552	2	42811	0.0000	0.40
Temp x Cu	21.135	2	7926	0.0000	0.06	151.008	2	60673	0.0000	0.57
Erro	0.016	12				0.015	12			
<b>Compostos Fenólicos</b>										
Temperatura	30.16	1	3.996	0.0687	0.01	6.58	1	0.966	0.3450	0.00
Cobre	2286.07	2	151.440	0.0000	0.95	1820.73	2	133.736	0.0000	0.94
Temp x Cu	0.71	2	0.047	0.9539	0.00	34.41	2	2.528	0.1213	0.02
Erro	90.57	12				81.69	12			
<b>Açúcares Solúveis</b>										
Temperatura	1842.2	1	12.050	0.0046	0.34	5219.0	1	46.100	0.0000	0.53
Cobre	1278	2	4.180	0.0419	0.24	289.9	2	1.282	0.3129	0.03
Temp x Cu	392.7	2	1.284	0.3123	0.07	3023.1	2	13.368	0.0000	0.31
Erro	1834.6	12				1356.9	12			
<b>Amido das Florídeas</b>										
Temperatura	602	1	2.697	0.1264	0.03	759.2	1	2.337	0.1522	0.04
Cobre	6025	2	13.493	0.0008	0.30	4698.3	2	7.231	0.0086	0.23
Temp x Cu	10480	2	23.472	0.0000	0.53	11043	2	16.995	0.0003	0.54
Erro	2679	12				3898.6	12			
<b>Viabilidade Celular</b>										
Temperatura	0.68007	1	300.770	0.0000	0.27	1.712	1	2984.610	0.0000	0.75
Cobre	1.7836	2	394.410	0.0000	0.70	0.47733	2	416.070	0.0000	0.21
Temp x Cu	0.04503	2	9.960	0.0012	0.02	0.07881	2	68.690	0.0000	0.03
Erro	0.0407	18				0.01033	18			
<b>Taxa de Crescimento</b>										
Temperatura	0.41709	1	6.096	0.0295	0.06	0.29902	1	1.4137	0.2574	0.07
Cobre	5.36694	2	39.219	0.0000	0.80	1.54724	2	3.6574	0.0575	0.35
Temp x Cu	0.06948	2	0.500	0.6183	0.01	0.10004	2	0.2365	0.7929	0.02
Erro	0.82107	12				2.53827	12			

**Tabela 1:** Análise de Variância Fatorial e valores de significância para os efeitos da temperatura, do cobre e da interação entre temperatura e cobre sobre os compostos metabólicos, a viabilidade celular e a taxa de crescimento de tetrasporófitos de *G. floridanum*.

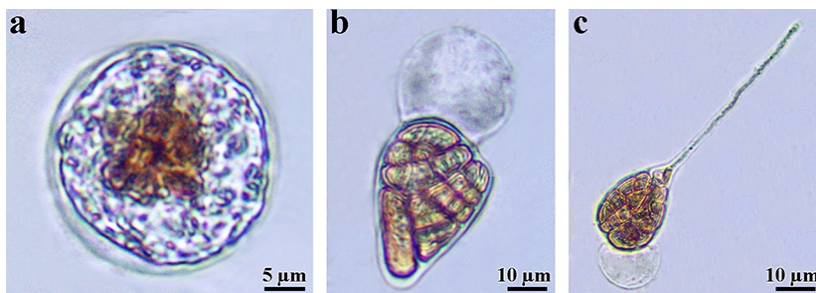
## 4.2 Efeitos da temperatura e do cobre sobre esporos tetrásporos de *G. floridanum*

A seguir serão apresentadas as alterações na morfologia e contagem, na concentração de pigmentos fotossintetizantes, na ultraestrutura e na viabilidade celular de tetrásporos de *G. floridanum* após cultivo com o metal pesado cobre e/ou sob temperatura de 30 °C. A análise de Variância Fatorial, os valores de significância e ETA quadrado encontram-se na tabela 3.

### 4.2.1 Morfologia e Contagem

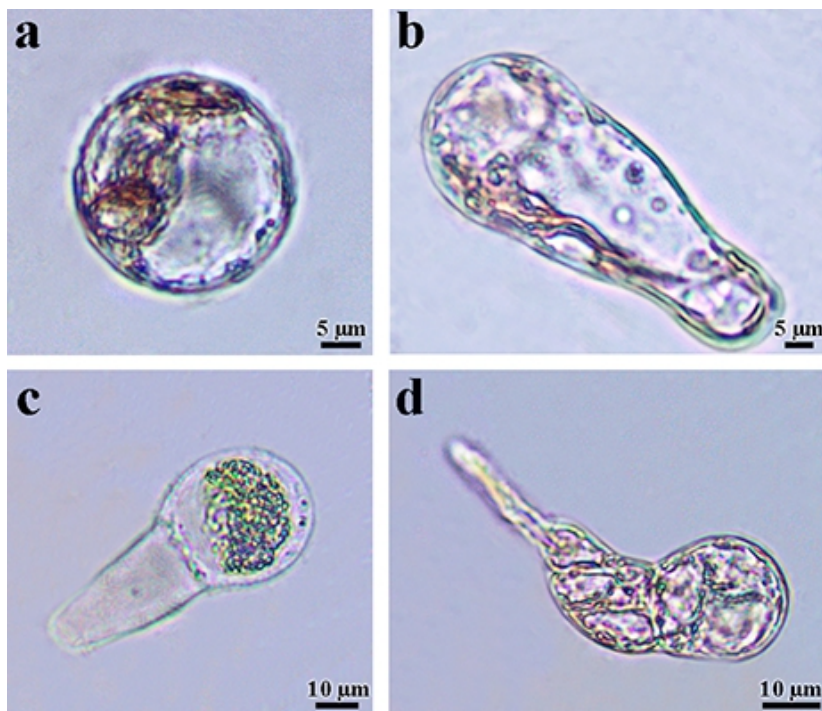
Observadas sob microscopia de luz após 24 horas de cultivo, as amostras do grupo controle apresentaram uma grande quantidade de tetrásporos em estágio inicial do desenvolvimento (Figura 16a). A contagem revelou uma taxa de 71 % de viabilidade (Figura 20), e os tetrásporos viáveis apresentaram morfologia típica da ordem Gelidiales, com formato esférico e tamanho entre 25 e 30 µm de diâmetro, com coloração interior vermelho-escuro devido à grande quantidade de ficobiliproteínas nos cloroplastos. As amostras do grupo controle apresentaram, ainda, 16 % de tetrásporos com divisões e 29 % de tetrásporos com formação de rizoide (Figura 21, Tabela 2), nos quais uma célula distal tornou-se alongada e estreita (Figura 16c). Dentre as amostras do grupo controle, apenas 29 % dos tetrásporos observados apresentaram-se inviáveis (Figura 20).





**Figura 16:** Micrografia de Luz de amostras controle de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo. **a.** Tetrásporo viável, não germinado. **b.** Tetrásporo germinado, com divisões. **c.** Tetrásporo com rizoide.

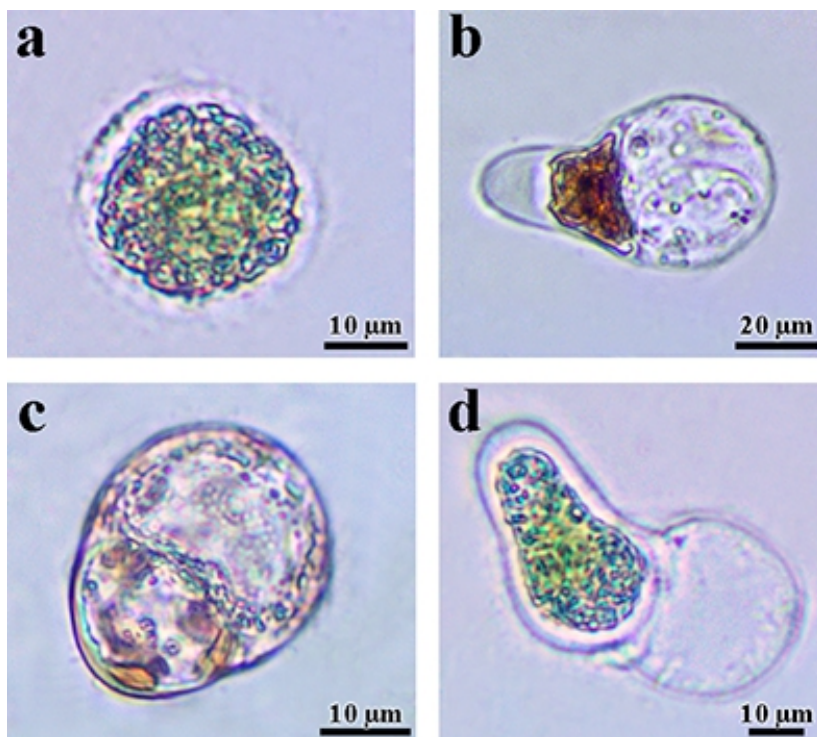
As amostras cultivadas com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram 53 % e 43 % de tetrásporos viáveis, respectivamente (Figura 20). O cultivo com cobre 1,5  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  não alterou significativamente a contagem dos tetrásporos com divisões ou com formação do rizoide. Já o cultivo com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  alterou significativamente a porcentagem de tetrásporos com formação do rizoide, que foi reduzida para 14 % (Figura 21, Tabela 2). Nestes tratamentos foi possível a observação de diversas alterações morfológicas, como a presença de tetrásporos com conteúdo citoplasmático polarizado (Figura 17a), tetrásporos com formação de tubo germinativo porém com reduzido conteúdo citoplasmático (Figura 17b), ou sem migração do conteúdo citoplasmático e de coloração esverdeada indicando sua inviabilidade (Figura 17c), e tetrásporos com formação de rizoide com células sem conteúdo citoplasmático (Figura 17d). O cultivo com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  resultou em 46 % e 57 % de tetrásporos inviáveis, respectivamente (Figura 21, Tabela 2).



**Figura 17:** Micrografia de Luz de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo com o metal pesado cobre 1.5 e 3  $\mu\text{M}$ . **a.** Tetrásporo com citoplasma polarizado. **b.** Tetrásporo com formação do tubo germinativo incompleta e redução do conteúdo citoplasmático. **c.** Tetrásporo com formação do tubo germinativo porém inviável. **d.** Tetrásporo com rizoide sem conteúdo citoplasmático.

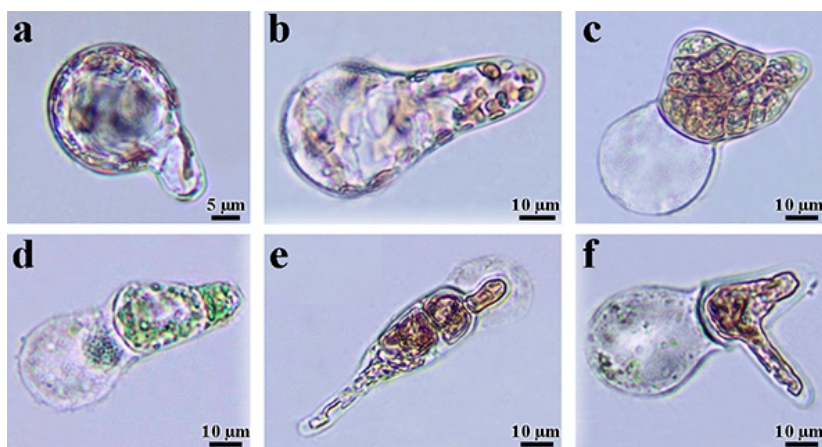
As amostras cultivadas sob temperatura de 30 °C, sem o metal pesado cobre, apresentaram 66 % de tetrásporos inviáveis, 13 % de tetrásporos viáveis não germinados, 9 % de tetrásporos com divisões e 10 % de tetrásporos com formação do rizoide (Figura 21, Tabela 2). Além dos tetrásporos inviáveis (Figura 18a), muitos tetrásporos encontravam-se em processo inicial de formação do tubo germinativo

(Figura 18b), enquanto outros já apresentavam divisões porém sem a formação do tubo (Figura 18c). Outros, ainda, apresentaram divisões mas seu conteúdo citoplasmático encontrava-se esverdeado, indicando sua inviabilidade (Figura 18d).



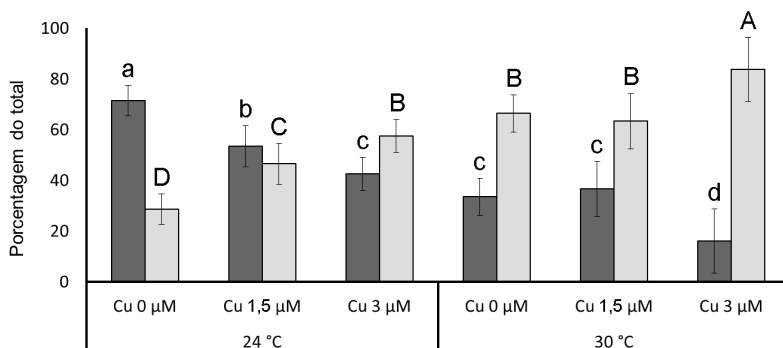
**Figura 18:** Micrografia de Luz de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo sob temperatura de 30 °C. **a.** Tetrásporo inviável. **b.** Tetrásporo em fase inicial da formação do tubo germinativo. **c.** Tetrásporo com divisões sem formação do tubo germinativo. **d.** Tetrásporo com divisões porém inviável.

Por fim, o cultivo dos tetrásporos com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  resultou em taxas de inviabilidade de 63 % e 83 %, com 13 % e 6 % de tetrásporos viáveis, 10 % e 5 % de tetrásporos com divisões e 13 % e 3 % de tetrásporos com formação do rizóide, respectivamente (Figura 21, Tabela 2). Dentre as alterações observadas nestas amostras, podem ser destacadas a grande quantidade de tetrásporos com formação do tubo germinativo sem a correta polarização do conteúdo citoplasmático (Figura 19a-b), os tetrásporos com divisões com alterações no padrão de desenvolvimento (Figura 19c-f), além de muitos tetrásporos com coloração esverdeada indicativa de inviabilidade (Figura 19d).

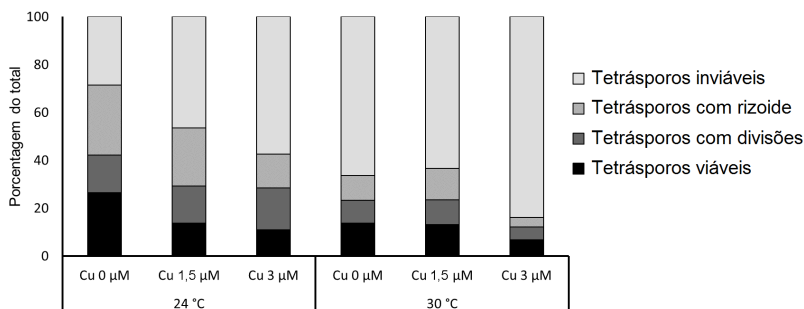


**Figura 19:** Micrografia de Luz de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$ . **a-b.** Tetrásporos com formação do tubo germinativo sem correta polarização do conteúdo citoplasmático. **c.** Tetrásporo com alteração no padrão do desenvolvimento. **d.** Tetrásporo dividido inviável. **e.** Tetrásporo com rizóide e alteração no padrão do desenvolvimento. **f.** Tetrásporo dividido e com alteração no padrão do desenvolvimento.

Segundo teste de ETA<sup>2</sup>, a temperatura foi o fator de maior importância sobre a viabilidade dos tetrásporos, respondendo por 50% dos efeitos observados, seguida do cobre, que respondeu por 25% dos efeitos observados (Tabela 3). A temperatura foi também a maior responsável pelas alterações observadas no número de tetrásporos com divisões e tetrásporos com formação do rizoide ( $\eta^2 = 34$  e 40 %, respectivamente).



**Figura 20:** Germinação de tetrásporos de *G. floridanum*, com tetrásporos viáveis (barras escuras) e inviáveis (barras claras). Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com teste bifatorial ANOVA e teste de Tukey.



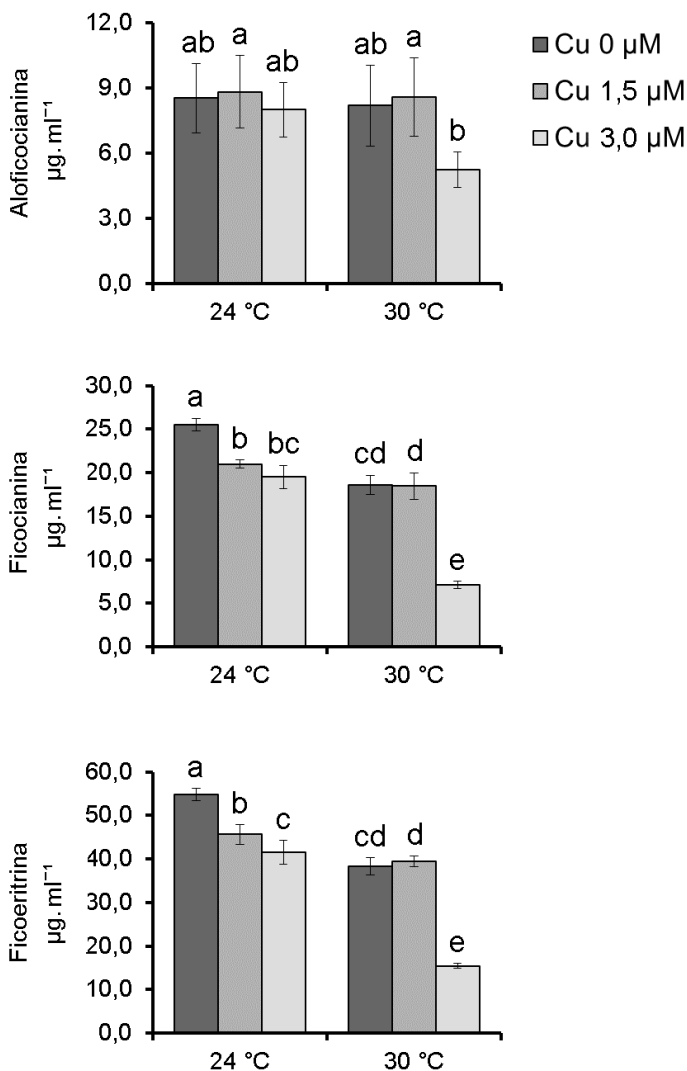
**Figura 21:** Contagem de tetrásporos de *G. floridanum* de acordo com o estágio do desenvolvimento. Valores representados em média ( $n = 3$ ).

Temperatura	Cobre	Tetrásporos viáveis	Tetrásporos com divisões	Tetrásporos com rizóide	Tetrásporos inviáveis
24 °C	0 µM	26,4 ± 4,0 a	15,7 ± 6,6 ab	29,5 ± 9,4 a	28,6 ± 6,0 c
	1,5 µM	13,7 ± 4,1 c	15,5 ± 4,7 ab	24,1 ± 6,7 a	46,5 ± 8,1 b
	3,0 µM	11,0 ± 3,9 bc	17,3 ± 6,8 a	14,1 ± 5,5 c	57,45 ± 6,5 d
30 °C	0 µM	13,7 ± 3,3 c	9,47 ± 3,1 c	10,3 ± 4,6 bc	66,4 ± 7,3 d
	1,5 µM	13,2 ± 6,7 c	10,2 ± 4,2 bc	13,1 ± 7,1 c	63,3 ± 10,9 d
	3,0 µM	6,7 ± 5,6 b	5,4 ± 6,1 c	3,9 ± 3,9 b	83,8 ± 12,7 a

**Tabela 2:** Contagem de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo, de acordo com o estágio do desenvolvimento. Valores representados em média ± desvio padrão (n = 3). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

#### 4.2.2 Pigmentos fotossintetizantes

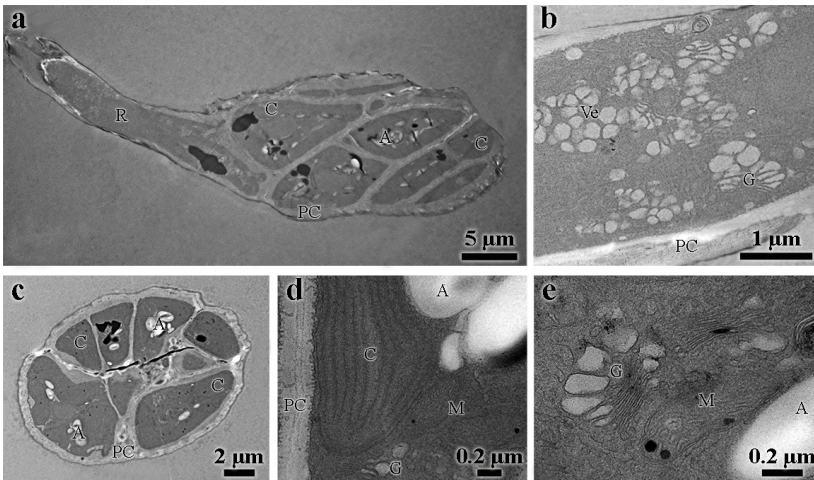
As análises realizadas no presente trabalho não possibilitaram a quantificação de clorofila *a* nas amostras de tetrásporos de *G. floridanum*. A concentração de aloficocianina foi significativamente alterada apenas nas amostras cultivadas com cobre 3 µM sob temperatura de 30 °C, sendo reduzida em 37 % em relação ao controle (Figura 22a). O cobre foi o maior responsável pelos efeitos observados neste pigmento ( $\eta^2 = 22$  %). O cultivo das amostras com cobre 1,5 e 3 µM a 24 °C e 1,5 µM a 30 °C reduziu a concentração de ficocianina em 17 a 27 %, enquanto que a concentração deste pigmento acessório foi reduzida em 72 % nas amostras cultivadas com cobre 3 µM a 30 °C (Figura 22b). A temperatura foi a maior responsável pelos efeitos observados neste pigmento ( $\eta^2 = 47$  %). Já o cultivo das amostras com cobre 1,5 e 3 µM a 24 °C e 1,5 µM a 30 °C reduziu a concentração de ficoeritrina em 16 a 30 %, enquanto que a concentração deste pigmento acessório foi reduzida em 71 % nas amostras cultivadas com cobre 3 µM a 30 °C (Figura 22c). Novamente, a temperatura foi a maior responsável pelos efeitos observados ( $\eta^2 = 51$  %).



**Figura 22:** Concentração de ficobiliproteínas de tetrásporos de *G. floridanum* ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) após 24 horas de cultivo. **a.** Alofococianina. **b.** Ficocianina. **c.** Ficoeritrina. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

### 4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

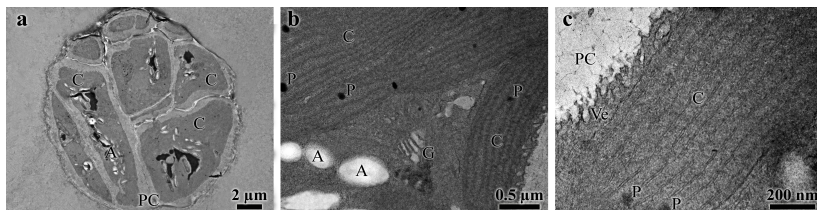
A observação do controle em MET (Figura 23) revelou tetrásporos em fase avançada do desenvolvimento, já divididos e/ou com formação de rizoide (Figura 23a). No rizoide, corpos de Golgi hipertróficos são abundantes e apresentam cisternas formando inúmeras vesículas (Figura 23b). Nos tetrásporos com divisões, os cloroplastos encontram-se na periferia das células, com grãos de amido dispersos pelo citoplasma (Figura 23c). Os cloroplastos apresentaram ultraestrutura típica de macroalgas vermelhas (Figura 23d). Mitocôndrias e corpos de Golgi hipertróficos também puderam ser observados (Figura 23d-e).



**Figura 23:** Micrografia Eletrônica de Transmissão do controle de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo sob temperatura de 24 °C. **a.** Visão longitudinal de um tetrásporo com rizoide. **b.** Detalhe do rizoide, com corpos de Golgi e vesículas. **c.** Visão transversal de um tetrásporo com divisões, com cloroplastos parietais e grãos de amido na região central do citoplasma. **d-e.** Detalhes do cloroplasto, grãos de amido, corpos de Golgi e mitocôndrias. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. G, corpos de Golgi. M, mitocôndria. PC, parede celular. Ve, vesículas.

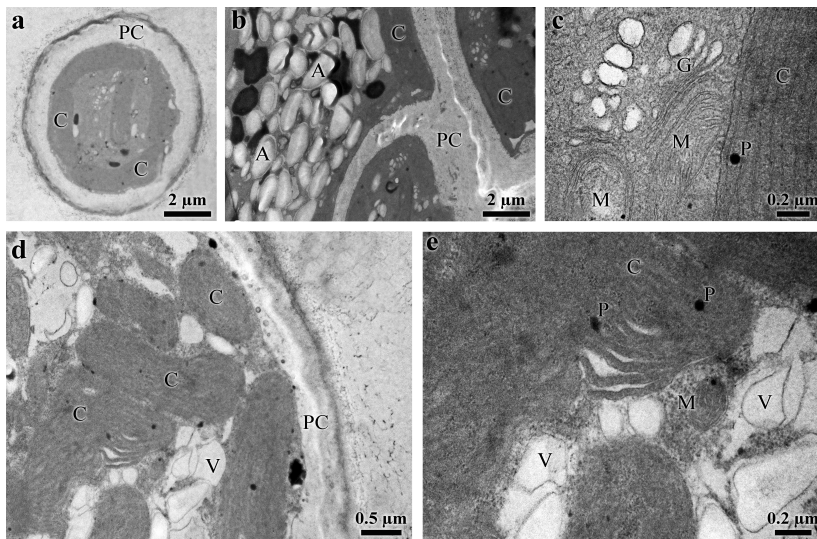


Após cultivo sob temperatura de 30 °C (Figura 25), os tetrásporos com divisões apresentaram a mesma organização interna observada nas amostras controle, e organelas como cloroplastos, mitocôndrias, corpos de Golgi e grãos de amido das florídeas não apresentaram alterações ultraestruturais (Figura 25a-b). Porém, nestas amostras, vesículas puderam ser observadas próximas a parede celular (Figura 25b-c).



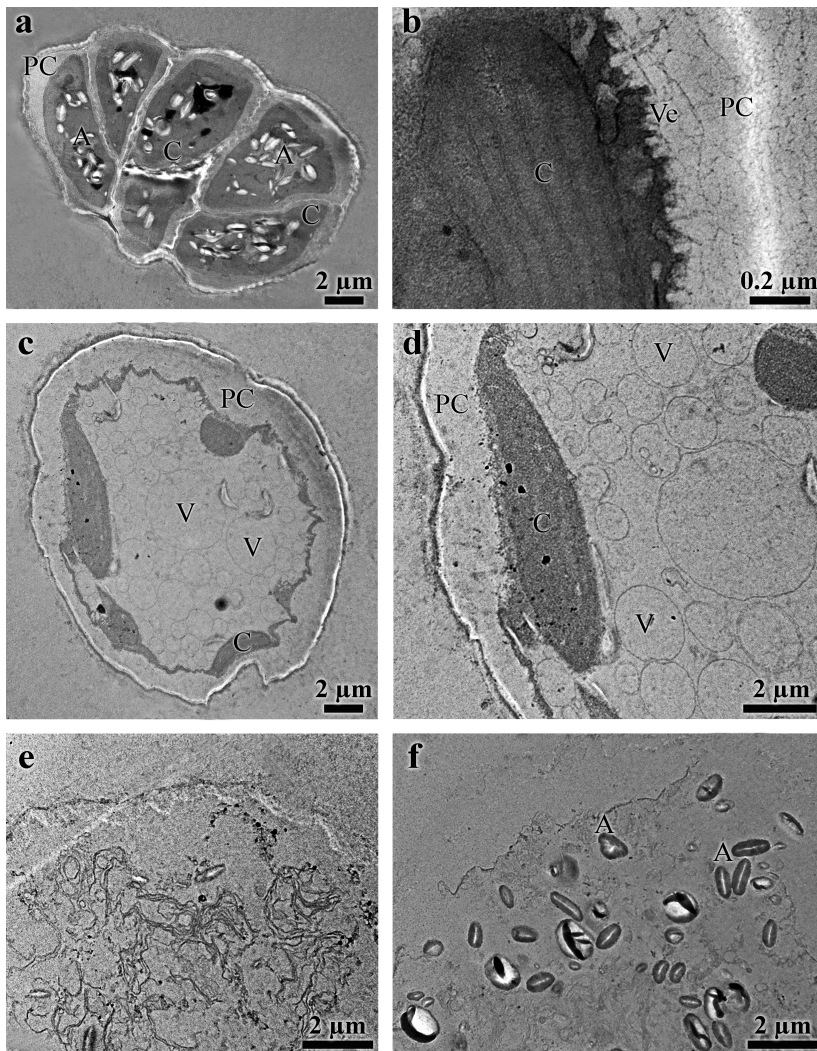
**Figura 24:** Micrografia Eletrônica de Transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo sob temperatura de 30 °C. **a.** Visão geral de um tetrásporo dividido. **b.** Detalhes das principais organelas celulares. **c.** Detalhe do cloroplasto e da parede celular. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. G, corpos de Golgi. PC, parede celular. P, plastoglóbulo. Ve, vesículas.

As amostras cultivadas com cobre sob temperatura de 24 °C apresentaram alterações ultraestruturais bastante evidentes (Figura 25). Os tetrásporos observados, em sua maioria, não apresentaram muitas divisões (Figura 25a). Algumas células apresentaram grande quantidade de grãos de amido das florídeas em seu citoplasma (Figura 25b). Corpos de Golgi e mitocôndrias apresentaram ultraestrutura típica (Figura 25c), porém, alguns cloroplastos apresentaram tilacoides dilatados e uma grande quantidade de vacúolos pode ser observada (Figura 25d-e).



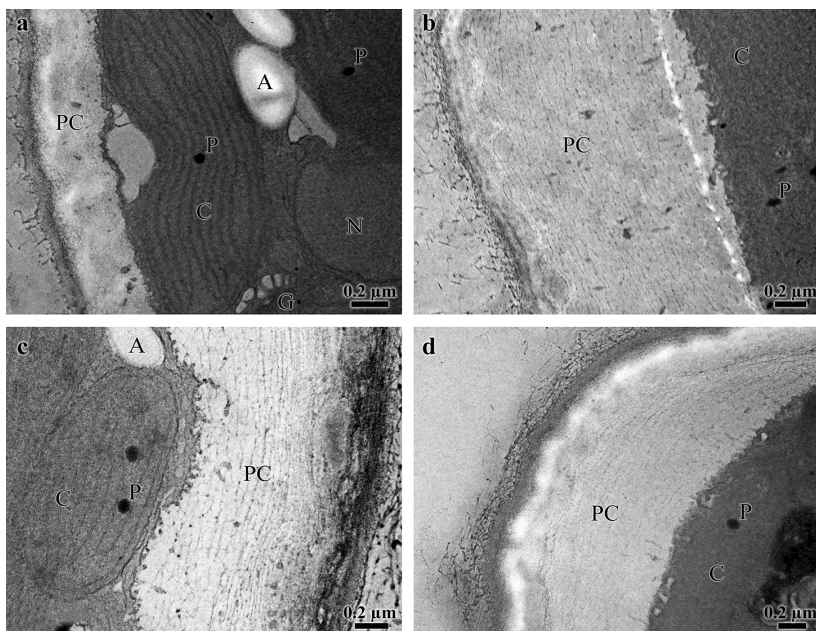
**Figura 25:** Micrografia Eletrônica de Transmissão de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo com cobre  $3 \mu\text{M}$  sob temperatura de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . **a.** Visão transversal de um tetrásporo em fase inicial do desenvolvimento. **b.** Detalhe da grande quantidade de grãos de amido das florídeas. **c.** Detalhe das mitocôndrias e corpos de Golgi. **d-e.** Visão periférica de uma célula, com detalhe para cloroplastos com tilacoides alterados e grande quantidade de vacúolos. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. G, corpos de Golgi. M, mitocôndria. PC, parede celular. P, plastoglóbulo. V, vacúolo.

A análise das amostras cultivadas com cobre sob elevada temperatura permitiu a observação de alguns tetrásporos divididos e com grande quantidade de grãos de amido das florídeas, cloroplastos íntegros e vesículas associadas a parede celular (Figura 26a-b). Outros tetrásporos, porém, apresentaram ultraestrutura celular fortemente alterada, com vesículas por todo o citoplasma e poucos cloroplastos na periferia das células, com tilacoides desestruturados e de difícil observação (Figura 26c-d). Além disso, uma grande quantidade de tetrásporos apresentou-se inviável, sem delimitação celular e com material degenerado ou extravasado (Figura 26e-f).



**Figura 26:** Micrografia Eletrônica de Transmissão de tetrasporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo com cobre  $3 \mu\text{M}$  sob  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . **a.** Visão geral de um tetrasporo com divisões. **b.** Detalhe de um cloroplasto íntegro e vesículas associadas a parede celular. **c-d.** Visão geral e detalhe de um tetrasporo com grande quantidade de vesículas. **e-f.** Tetrasporos inviáveis, degenerados e extravasados. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. PC, parede celular. P, plastoglóbulo. Ve, vesículas.

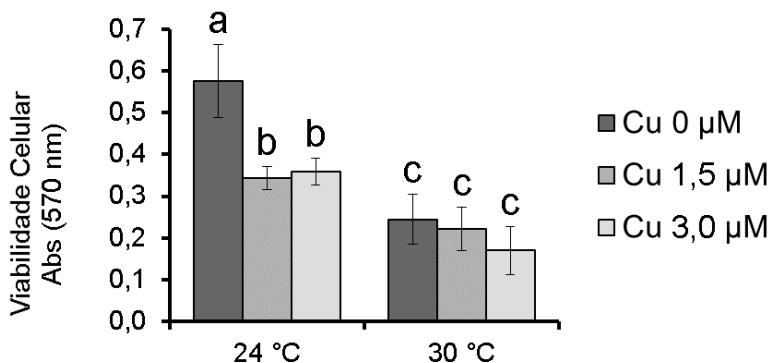
Quando comparadas as paredes celulares ao final das 24 horas de cultivo, os tetrásporos dos grupo controle apresentaram paredes com espessura entre 0,3 e 0,4  $\mu\text{m}$  (Figura 27a). Já nas amostras cultivadas sob elevada temperatura, com o cobre, ou sob ambas as condições, a espessura da parede celular apresentou valores entre 1,0 e 1,4  $\mu\text{m}$  (Figura 27b-d).



**Figura 27:** Detalhe da parede celular de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo. **a.** Tetrásporo controle. **b.** Tetrásporo cultivado sob temperatura de 30 °C. **c.** Tetrásporo cultivado com cobre 3  $\mu\text{M}$ . **d.** Tetrásporo cultivado com cobre 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30 °C. A, amido das florídeas. C, cloroplasto. G, corpos de Golgi. N, núcleo. PC, parede celular. P, plastoglóbulo.

#### 4.2.4 Viabilidade Celular

A análise de viabilidade celular de tetrásporos revelou uma significativa redução na viabilidade de todas as amostras cultivadas com cobre e/ou sob elevada temperatura, em relação ao controle (Figura 28). Considerando-se o controle como 100 % de viabilidade, as amostras cultivadas com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  a 24  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram viabilidades de 59 e 62 %, respectivamente, enquanto que as amostras cultivadas sob temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  apresentaram viabilidades entre 42 e 29 %, sendo a menor delas apresentada pelas amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Segundo teste de ETA<sup>2</sup>, a temperatura foi o fator de maior importância sobre os efeitos observados na viabilidade celular das amostras ( $\eta^2 = 56 \%$ ), seguida do cobre ( $\eta^2 = 21 \%$ ).



**Figura 28:** Viabilidade celular de tetrásporos de *G. floridanum* após 24 horas de cultivo. Valores representados em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey.

<b>Fonte de variação</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2</math></b>
<b>Tetrásporos viáveis</b>					
Temperatura	16424.1	1	206.948	0.0000	0.50
Cobre	8335.3	2	52.514	0.0000	0.25
Temp x Cu	1662.8	2	10.476	0.0000	0.05
Erro	6666.5	84			
<b>Tetrásporos inviáveis</b>					
Temperatura	16426.8	1	206.936	0.0000	0.50
Cobre	8333.3	2	52.489	0.0000	0.25
Temp x Cu	1663.9	2	10.481	0.0000	0.05
Erro	6668	84			
<b>Tetrásporos</b>					
Temperatura	760.97	1	33.848	0.0000	0.15
Cobre	1901.09	2	42.280	0.0000	0.37
Temp x Cu	576.4	2	12.819	0.0000	0.11
Erro	1888.49	84			
<b>Tetrásporos com divisões</b>					
Temperatura	1379.06	1	46.745	0.0000	0.34
Cobre	36.2	2	0.614	0.5438	0.01
Temp x Cu	189.45	2	3.2108	0.0453	0.05
Erro	2478.17	84			
<b>Tetrásporos com rizóide</b>					
Temperatura	4026.71	1	95.815	0.0000	0.40
Cobre	2078.95	2	24.734	0.0000	0.21
Temp x Cu	349.7	2	4.1605	0.0189	0.04
Erro	3530.19	84			
<b>Aloficocianina</b>					
Temperatura	8.777	1	3.434	0.0752	0.08
Cobre	23.638	2	4.624	0.0191	0.22
Temp x Cu	9.314	2	1.822	0.1817	0.09
Erro	66.459	26			
<b>Ficocianina</b>					
Temperatura	378.757	1	581.720	0.0000	0.47
Cobre	318.185	2	244.350	0.0000	0.40
Temp x Cu	88.918	2	68.280	0.0000	0.11
Erro	14.324	22			
<b>Ficoeritrina</b>					
Temperatura	1888.43	1	429.930	0.0000	0.51
Cobre	1396.33	2	182.240	0.0000	0.37
Temp x Cu	362.61	2	47.330	0.0000	0.10
Erro	84.28	22			
<b>Viabilidade Celular</b>					
Temperatura	0.617241	1	195.002	0.0000	0.56
Cobre	0.225885	2	35.681	0.0000	0.21
Temp x Cu	0.103924	2	16.416	0.0000	0.09
Erro	0.151934	48			

**Tabela 3:** Análise de Variância Fatorial e valores de significância para os efeitos da temperatura, do cobre e da interação entre temperatura e cobre sobre a contagem, os pigmentos fotossintetizantes e a viabilidade celular de tetrásporos de *G. floridanum*.

## 5 DISCUSSÃO

Habitantes das zonas de transição entre as zonas terrestre e oceânica, as macroalgas estão constantemente expostas às alterações no ambiente em que vivem. Apesar disto, os impactos resultantes da interação entre estressores globais e locais ainda são pouco estudados nestes organismos, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento (Coelho *et al.*, 2000). No presente trabalho, a temperatura elevada e o cobre resultaram em efeitos deletérios na macroalga vermelha *G. floridanum*, especialmente no início do desenvolvimento dos tetrásporos, alterando a fisiologia, o desenvolvimento e a ultraestrutura dos espécimes.

De acordo com Davison & Pearson (1996), a realocação de compostos protetores sob condições de estresse pode reduzir o crescimento de organismos fotossintetizantes. No presente trabalho, o cultivo de *G. floridanum* com cobre resultou em reduzidas taxas de crescimento. Estudos anteriores demonstram uma redução na biomassa de macroalgas vermelhas (Gouveia *et al.*, 2013), marrons (Nielsen & Nielsen, 2010; Roncarati *et al.*, 2015) e verdes (Han *et al.*, 2009) cultivadas com cobre. As amostras cultivadas a 30 °C também apresentaram reduzidas taxas de crescimento, e resultados similares foram observados nas macroalgas vermelhas *Pterocladia capillacea* (Poore *et al.*, 2016), *Kappaphycus alvarezii* (Araújo *et al.*, 2014), *Hypnea cervicornis* (Ding *et al.*, 2013) e *Gracilaria tenuistipitata* (Liu & Dong, 2001). Um aumento na temperatura além do limite ao qual as espécies estão adaptadas pode alterar mecanismos fotossintéticos e processos bioquímicos (Zou, 2014), consequentemente reduzindo o crescimento (Koch *et al.*, 2012). As amostras cultivadas com cobre 3



$\mu\text{M}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentaram a menor taxa de crescimento. Nielsen *et al.* (2014) observaram que nem a temperatura elevada ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), nem o cobre, de forma isolada, refletiram em reduções significativas na taxa de crescimento da macroalga parda *Fucus serratus*; porém o cultivo sob ambas as condições reduziu pela metade a taxa de crescimento desta espécie, indicando o efeito interativo da temperatura com o cobre. Esta reduzida taxa de crescimento observada nos talos cultivados com ambos os agentes estressores reflete, portanto, a maior toxicidade da interação entre os agentes estressores sobre a fisiologia de *G. floridanum*.

O cultivo de tetrásporófitos de *G. floridanum* com cobre ou sob elevada temperatura, bem como a exposição a ambos os agentes estressores, resultou em segmentos apicais com regiões de despigmentação, indicando a morte, por necrose, de porções dos talos. Estudos anteriores já apresentaram alterações morfológicas como a despigmentação dos segmentos apicais de amostras de talo de *G. floridanum* cultivadas com cobre (Santos *et al.*, 2014) e outros metais pesados (Simioni *et al.*, 2014), assim como amostras de *Kappaphycus alvarezii* cultivadas sob temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Araújo *et al.*, 2014). Os agentes estressores estudados afetaram também as fases iniciais do desenvolvimento, alterando a morfologia e a germinação dos tetrásporos. Durante a germinação, os tetrásporos sofrem uma rápida sucessão de divisões celulares que demandam alto consumo energético (Bouzon *et al.*, 2005). A temperatura ambiente e os metais pesados encontrados no meio aquoso são importantes fatores que podem afetar este processo do desenvolvimento (Agrawal, 2009), através da realocação de gastos energéticos para a produção de compostos protetores (Alestra & Schiel, 2015). Além disso, agentes estressores

podem afetar componentes celulares como proteínas e membranas (Eggert, 2012), reduzindo ou impedindo o correto desenvolvimento dos tetrásporos. Alterações no padrão de germinação e desenvolvimento de esporos em resposta a temperatura e ao cobre também foram observados especialmente em zoósporos e esporófitos de macroalgas pardas (Bond *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2007; Gaitan-Espitia *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2008), refletindo a maior sensibilidade dos estágios iniciais do ciclo de vida.

A despigmentação dos talos está diretamente relacionada a perda de pigmentos fotossintetizantes, indicando alterações na maquinaria fotossintética (Luder *et al.*, 2001). Os resultados do presente trabalho revelam que os pigmentos fotossintetizantes de *G. floridanum* foram significativamente afetados pela temperatura, pelo cobre ou pela interação destes agentes estressores, evidenciando a sensibilidade destes compostos aos agentes estressores estudados. A clorofila *a* foi o principal pigmento afetado pelos tratamentos após 7 dias de cultivo. Os pigmentos possuem conhecida sensibilidade à temperatura e elementos tóxicos, e danos a estas moléculas podem resultar em uma inibição do processo fotossintético (Ashraf & Harris, 2013). A clorofila *a*, em particular, é muito sensível a temperatura, devido a desnaturação enzimática (Efeoglu & Terzioglu, 2009), e ao cobre (Bačkor *et al.*, 2007), que, uma vez absorvido, pode substituir o átomo central de magnésio da molécula de clorofila, formando complexos metálicos e prejudicando suas funções fotossintéticas (Petrovic *et al.*, 2006). Nielsen & Nielsen (2010) também observaram uma redução no conteúdo de clorofila *a* da macroalga parda *Fucus serratus* após 12 dias de cultivo com cobre. Já Wernberg *et al.* (2016) observaram uma

reduzida concentração de pigmentos em macroalgas de regiões de água quentes, quando comparadas a macroalgas de águas frias. Após 14 dias, a clorofila *a* apresentou um conteúdo elevado em relação ao observado após 7 dias de cultivo. Além disso, a redução na concentração deste pigmento em relação ao controle apresentou-se de forma menos acentuada, indicando uma menor sensibilidade deste pigmento as condições estudadas e uma aclimatação às condições de cultivo. De acordo com Rym (2012), um aumento na concentração de pigmentos em resposta a um estresse crônico pode ser considerado um mecanismo adaptativo, de forma que um aumento na eficiência da captação de energia luminosa e conseqüentemente uma maior geração de energia química venham a ser utilizados para a produção de componentes antioxidativos.

Os pigmentos acessórios apresentaram diferentes respostas aos agentes estressores, sendo a ficoeritrina o pigmento mais sensível aos tratamentos. Os ficobilissomos consistem em um complexo hexamérico em formato de antena cujas hastes são formadas pelo empilhamento das ficobiliproteínas (Miller, 2007). Em algas vermelhas, cada um dos três pigmentos forma uma camada nos ficobilissomos, sendo a camada mais interna constituída por um núcleo de aloficocianinas, a camada mais externa constituída por ficoeritrinas, e a camada mediana constituída por ficocianinas (Glazer, 1989). Agentes estressores também podem induzir a dissociação de ficobiliproteínas do complexo antena (Rym, 2012). Desta forma, a ficoeritrina é o pigmento mais externo do complexo e também o mais sensível as alterações ambientais, tal como pode ser observado no presente trabalho. Além disso, a ficoeritrina também possui uma alta capacidade de dissociação, sendo degradada em

situações de estresse para redução de gastos e liberação de energia durante o processo de aclimatação (Luder & Wiencke, 2002).

A dissociação de pigmentos do complexo antena pode alterar as suas proporções, as quais podem indicar mudanças na estrutura e no tamanho dos ficobilissomos (Gantt, 1981). Alterações na concentração e na proporção de pigmentos já foram observadas em cianobactérias (Grossman *et al.*, 2001), bem como em macroalgas vermelhas (Luder & Wiencke, 2002; Schmidt *et al.*, 2014) submetidas a diferentes condições ambientais. Neste trabalho, o aumento na proporção entre AFC:Chl *a* e as reduções nas proporções entre FC:AFC e FE:AFC em amostras de tetrasporófitos indicam uma maior ativação dos fotossistemas e uma redução no tamanho das hastes do complexo antena, respectivamente. Tais alterações sugerem uma redução no uso dos ficobilissomos, uma vez que antenas menores continuarão a transferir luz ao mesmo tempo em que requerem uma menor quantidade de energia (Kübler & Davison, 1993).

Os pigmentos acessórios foram observados em menor proporção nos tetrásporos, quando comparados aos tetrasporófitos, tal como observado para a macroalga vermelha *Grateloupia doryphora* (Rodrigo & Robaina, 1997). De acordo com estes autores, uma elevada concentração de ficobiliproteínas reflete a maturação do aparato fotossintético de tetrasporófitos em relação aos esporos e talos jovens. Em relação aos tratamentos, as ficobiliproteínas apresentaram-se mais sensíveis nos tetrásporos, especialmente ficocianina e ficoeritrina, cujas concentrações foram reduzidas por todos os tratamentos em relação ao controle. Mesmo a aloficocianina, cujas concentrações foram aumentadas pelos tratamentos em tetrasporófitos, apresentou reduzida

concentração após cultivo com cobre sob elevada temperatura em tetrásporos. A redução na concentração das ficobiliproteínas foi ainda mais acentuada nas amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30 °C, indicando uma interação sinérgica entre os estressores. Rodrigo & Robaina (1997), por sua vez, encontraram uma maior tolerância dos esporos de *G. doryphora* à temperatura, quando comparados aos tetráspórofitos. Sugere-se, portanto, que a sensibilidade dos esporos em relação aos agentes estressores e aos tetráspórofitos varia de acordo com a espécie analisada.

Carotenoides e compostos fenólicos são agentes antioxidativos que normalmente apresentam alterações após cultivo sob condições de estresse. As concentrações intracelulares destes compostos em tetráspórofitos de *G. floridanum* cultivados com cobre e/ou sob elevada temperatura revelaram diferentes padrões. Inicialmente, a exposição das amostras ao cobre resultou em uma redução na concentração de carotenoides. De acordo com Bačkor & Vaczi (2001), os carotenoides são compostos sensíveis ao estresse oxidativo causado pela exposição a metais pesados, sendo ainda considerados marcadores sensíveis a presença de cobre (Bačkor *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram observados em trabalhos com as clorófitas *Scenedesmus quadricauda* (Piovar *et al.*, 2011) e *Cladophora prolifera* (Bačkorova *et al.*, 2016), bem como nas macroalgas vermelhas *Gracilaria domingensis* (Gouveia *et al.*, 2013) e *Hypnea musciformis* (Santos *et al.*, 2015). Porém, após 14 dias de cultivo, as amostras expostas ao cobre 3  $\mu\text{M}$  sob temperatura de 30 °C apresentaram uma elevada concentração deste composto. Além de sua função como pigmentos auxiliares na captação de energia luminosa, os carotenoides também participam em processos de detoxificação,

sinalizam moléculas envolvidas no metabolismo anti-estresse (de Pascale *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008), e são responsáveis pela proteção das moléculas de clorofila contra danos térmicos (Wahid, 2007). Um aumento na concentração de carotenoides pode ser observado na macroalga verde *Ulva pertusa* (Kakinuma *et al.*, 2006), bem como em amostras de cana-de-açúcar (Wahid 2007) cultivadas sob uma elevada temperatura. Supõe-se, portanto, que as referidas concentrações de cobre refletem em uma redução inicial no conteúdo de carotenoides de *G. floridanum*, porém, a exposição crônica ao cobre sob elevada temperatura reflete em um maior estresse e, conseqüentemente, em uma maior produção deste composto antioxidativo.

Os compostos fenólicos apresentaram concentrações reduzidas nas amostras de tetrasporófitos de *G. floridanum* cultivadas com cobre, não sendo influenciados pela temperatura. Estudos anteriores demonstraram um aumento na concentração de polifenóis e demais compostos fenólicos em macroalgas vermelhas (Hammann *et al.*, 2016) e outros organismos fotossintetizantes (Rivero *et al.*, 2001; Wahid, 2007). Outros estudos, porém, observaram uma redução no conteúdo de compostos fenólicos em macroalgas vermelhas cultivadas com cobre (Connan & Stengel, 2009; Nielsen & Nielsen, 2010). Os compostos fenólicos possuem uma alta afinidade aos íons de cobre e agem primariamente após serem secretados, quelando as moléculas de cobre extracelularmente (Nielsen & Nielsen, 2010). Assim, uma redução na concentração intracelular destes compostos pode indicar sua secreção ao ambiente extracelular após exposição ao metal pesado. Além disso, Connan & Stengel (2011) observaram uma alta concentração de cobre em frações fenólicas de macroalgas expostas ao cobre, confirmando sua

afinidade a este metal. Ainda, Nielsen & Nielsen (2010) observaram uma coloração amarelada na água de cultivo da macroalga *Fucus serratus* com baixa concentração de compostos fenólicos após exposição ao cobre. A mesma coloração pode ser observadas nas amostras de água de cultivo de *G. floridanum* expostas ao cobre neste trabalho, indicando uma maior secreção de compostos fenólicos (dados não apresentados).

Açúcares e carboidratos complexos estão envolvidos em vias energéticas e de detoxificação (Pilatti *et al.*, 2016), e genes responsáveis por seu metabolismo podem ser regulados pela temperatura ou pelo cobre (Ruan *et al.*, 2010; Ritter *et al.*, 2014). No presente trabalho, tetrasporófitos de *G. floridanum* cultivados sob temperatura de 30 °C ou com o cobre sob elevada temperatura apresentaram reduções similares no conteúdo de açúcares solúveis. Assim, infere-se que a temperatura possui maior efeito sobre a produção e o acúmulo de metabólitos primários nesta espécie. Estudos anteriores demonstraram que uma elevada temperatura pode levar a desnaturação de enzimas e a regulação negativa de genes do metabolismo de carboidratos (Mathur *et al.*, 2014). A redução no conteúdo de clorofila *a* após 7 dias de cultivo também reflete em uma menor atividade fotossintética, conseqüentemente limitando a produção de carboidratos. Após 14 dias de cultivo, porém, as amostras cultivadas sob temperatura de 30 °C apresentaram um aumento na concentração de açúcares. Estudos anteriores demonstram o acúmulo destes compostos sob condições de estresse (Wahid, 2007), uma vez que transcritos para genes da síntese de carboidratos podem responder a elevadas temperaturas (Hurkman *et al.*, 2003). Além disso, danos a membranas e enzimas podem impedir a passagem de açúcares

solúveis através da cadeia respiratória, levando ao acúmulo destas substâncias no citoplasma (Pilatti *et al.*, 2016).

O amido das florídeas representa a principal fonte de carbono em macroalgas vermelhas (Viola *et al.*, 2001), podendo ocupar até 80% do volume celular total (Ekman *et al.*, 1991). O aumento no conteúdo de amido das florídeas nas amostras cultivadas com cobre e/ou sob elevada temperatura indicam um maior acúmulo deste metabólito sob condições de estresse em tetrasporófitos de *G. floridanum*. Respostas similares foram observadas em amostras de trigo (Hurkman *et al.*, 2003) e *Arabidopsis thaliana* (Szymanska *et al.*, 2015) cultivadas sob elevada temperatura, assim como na Rhodophyta *Hypnea musciformis* (Santos *et al.*, 2015) e na Chlorophyta *Enteromorpha flexuosa* (Andrade *et al.*, 2004) cultivadas com cobre. Amostras de *Scenedesmus obtus* cultivadas sob elevada temperatura também apresentaram maior acúmulo de grãos de amido (Xia *et al.*, 2015). Porém, as amostras cultivadas com cobre 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C durante 7 dias, bem como as amostras cultivadas com cobre 1,5 e 3  $\mu\text{M}$  a 30 °C durante 14 dias apresentaram redução no conteúdo de amido. Infere-se, portanto, que a exposição de tetrasporófitos de *G. floridanum* ao cobre e/ou a uma elevada temperatura pode resultar em uma maior conversão de açúcar em grãos de amido; porém, quando um limite de estresse é ultrapassado, a redução no conteúdo de açúcar não reflete em um acúmulo de grãos de amido, sendo o açúcar possivelmente convertido na produção de demais compostos necessários para a defesa celular destas algas, como os compostos antioxidativos anteriormente mencionados.

Alterações ultraestruturais também foram observadas após o cultivo de tetrasporófitos e tetrásporos de *G. floridanum* com cobre e/ou



sob elevada temperatura. O aumento na espessura da parede celular observado nos tetrásporófitos de amostras cultivadas com cobre no presente trabalho já foram registrados anteriormente (Bouzon *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014), e é considerado uma estratégia de proteção das células, uma vez que os polissacarídeos e compostos sulfatados presentes na parede celular das macroalgas possuem a capacidade de ligar-se aos metais pesados presentes no meio aquoso, quelando-os e reduzindo seus efeitos tóxicos (Diannelidis & Delivopoulos, 1997). Os efeitos de um aumento na temperatura sobre a parede celular de macroalgas ainda foram pouco estudados, porém trabalhos em plantas revelaram alterações na composição da parede celular, notadamente um aumento na concentração de polímeros, contribuindo para uma maior espessura da parede e, conseqüentemente, maior tolerância a elevadas temperaturas (Le Gall *et al.*, 2015). Porém, a fluidez das membranas encontra-se diretamente relacionada a temperatura ambiente (Los & Murata 2004). Dessa forma, a observação de uma grande quantidade de material particulado elétron-denso na parede celular das células corticais de tetrásporófitos cultivados com cobre sob elevada temperatura indica um maior acúmulo do metal na parede celular, uma vez que a parede, mais espessa, e as membranas, mais fluídas, acabam por facilitar a adsorção do metal.

Os tetrásporos cultivados com cobre e/ou sob elevada temperatura também apresentaram um aumento na espessura da parede celular. Nestas amostras, a espessura das paredes chegou a ser encontrada entre três a cinco vezes maior que o controle. A formação da parede celular em tetrásporos tem início imediatamente após sua adesão ao substrato (Bouzon *et al.*, 2005; Steinhoff *et al.*, 2007). Neste

contexto, a produção e liberação de compostos polissacarídeos pode ser facilitada pela presença de uma grande quantidade de corpos de Golgi, refletindo em uma rápida resposta de aumento da parede em relação às condições de estresse. Porém, diferentemente das células corticais de tetrásporófitos cultivados com cobre sob elevada temperatura, os tetrásporos cultivados nestas condições não apresentaram material particulado elétron-denso em suas paredes, possivelmente em razão da diferença na composição da parede celular de tetrásporos em relação a tetrásporófitos (Bouzon *et al.*, 2005).

Um aumento na concentração de plastoglóbulos pode ser observado nas células corticais de tetrásporófitos cultivados com cobre e/ou sob elevada temperatura. Os plastoglóbulos são glóbulos lipoproteicos com tamanho entre 30 nm e 5  $\mu$ m e alta densidade eletrônica diretamente ligados as membranas dos tilacoides (Rotter *et al.*, 2015). Os plastoglóbulos possuem grande participação no desarranjamento de cloroplastos e no metabolismo de carotenoides (Brehelin *et al.*, 2007), tendo sido anteriormente observados em maior concentração em células de macroalgas (Felix *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2014) e plantas (Sandalio *et al.*, 2001; Daud *et al.*, 2013) cultivadas com metais pesados e em demais condições de estresse (Steinhoff *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2014). Portanto, um aumento no número de plastoglóbulos nas células corticais das amostras tratadas indica um maior desorganização das membranas tilacoides e uma maior produção de compostos antioxidativos, reflexo de um metabolismo em situação de estresse.

Os tetrásporos de *G. floridanum* cultivados sob temperatura de 30 °C não apresentaram importantes alterações ultraestruturais. Já os

tetrásporos cultivados com cobre apresentaram cloroplastos com membranas tilacoides danificadas. O cultivo de esporos de macroalga parda com cobre em concentrações aproximadas de 0.05 a 2  $\mu\text{M}$  não revelou alterações ultraestruturais (Bond *et al.*, 1999), e a realocação destes esporos para meio de cultivo sem adição de cobre possibilitou a recuperação das amostras, indicando uma possibilidade de recuperação para os tetrásporos de *G. floridanum* cultivados neste trabalho com cobre ou sob elevada temperatura. Porém, nas amostras cultivadas com cobre sob temperatura de 30 °C, grande parte dos tetrásporos apresentou ultraestrutura danificada, retardo no desenvolvimento e células totalmente deformadas e inviáveis, de forma que a interação entre ambos os agentes estressores analisados neste trabalho resultaria em uma impossibilidade de recuperação para estas amostras.

A redução na viabilidade celular das amostras tratadas durante 7 dias reflete os efeitos tóxicos de uma elevada temperatura e do cobre sobre as células de tetrasporófitos *G. floridanum*. Mendes *et al.* (2013) observou um padrão semelhante ao cultivar amostras de *G. domingensis* com diferentes concentrações de zinco. A viabilidade celular dos tetrásporos apresentou padrão semelhante ao encontrado nas amostras de tetrasporófitos cultivadas por 7 dias. Porém, os tetrásporos apresentaram-se mais sensíveis aos efeitos do cultivo sob temperatura de 30 °C, sem diferenças significativas entre as amostras cultivadas com cobre. De fato, a viabilidade celular dos tetrasporófitos apresentou maior sensibilidade ao cultivo com o cobre, enquanto que as amostras de tetrásporos apresentaram maior sensibilidade a elevação da temperatura. Comparações entre as respostas de indivíduos jovens e adultos da macroalga parda *Ecklonia radiata* indicam que as temperaturas ótimas

para a sobrevivência nem sempre coincidem entre as diferentes fases do ciclo de vida destes organismos (Mohring *et al.*, 2013). Estes resultados indicam a importância do conhecimento acerca das respostas de diferentes fases do ciclo de vida dos organismos, uma vez que estes podem apresentar maior ou menor sensibilidade em relação aos mesmos parâmetros (Coelho *et al.*, 2000).

Por outro lado, a viabilidade celular dos tetrasporófitos cultivados durante 14 dias apresentou um padrão inverso, podendo ser observado um aumento na absorvância para amostras cultivadas com cobre, sob temperatura de 30 °C e em ambas as condições. Estes resultados podem ser um indicativo das limitações do método MTT para quantificação da viabilidade celular, como explicado por Riss (2014). O teste MTT geralmente demonstra uma correta correlação entre o número de células viáveis e a taxa de redução do tetrazólio, porém, trabalhos recentes têm demonstrado resultados contrários, com testes refletindo mais do estado metabólico das células e menos de sua viabilidade. Isto se deve ao fato de que, diferentemente do que se acreditava durante o desenvolvimento da técnica, o tetrazólio não é reduzido apenas pela maquinaria mitocondrial, mas também por diversas outras enzimas localizadas no citoplasma e associada aos compartimentos de membrana das células, utilizando NADH como co-fator para um número de atividades relacionadas ao metabolismo celular (Berridge *et al.*, 2005). Assim, um aumento na absorvância pode indicar não apenas a quantidade de células viáveis em determinada amostra, mas a taxa de produção de NADH, a qual encontra-se fortemente ligada aos complexos antioxidativos dos organismos. Portanto, pode-se sugerir que o aumento na absorvância das

amostras cultivadas por 14 dias refletem o aumento da atividade antioxidativa das células com metabolismo estressado.

As amostras controle de tetrásporos de *G. floridanum* apresentaram a maior taxa de viabilidade após 24 horas de cultivo, com apenas um terço dos tetrásporos em condições de inviabilidade. Os tetrásporos cultivados com cobre e/ou sob elevada temperatura, porém, apresentaram reduzida viabilidade, sendo esta indiretamente proporcional ao nível de estresse aplicado as amostras. O cultivo de esporos das macroalgas pardas *Durvillaea antarctica* (Alestra & Schiel, 2015) e *Macrocystis pyrifera* (Gaitan-Espitis *et al.*, 2014) sob elevada temperatura (14 °C e 18 °C, respectivamente) resultou em uma redução de cerca de 30 % na taxa de germinação. Redmond (2013) também observou drásticas reduções na taxa de germinação de esporos da macroalga parda *Saccharina latissima* após cultivo sob temperatura de 22 °C. O cultivo de esporos com cobre também alterou a taxa de germinação de esporos das macroalgas *Ecklonia radiata* (Bidwell *et al.*, 1998) e *Lessonia nigrescens* (Contreras *et al.*, 2007) e *Fucus vesiculosus* (Andersson & Kautsky, 1996), com reduções entre 40 a 90%. As amostras cultivadas com cobre 3 µM sob temperatura de 30 °C apresentaram a menor taxa de viabilidade dentre as amostras, além de reduzido número de tetrásporos em fases avançadas do desenvolvimento (com divisões ou formação de rizoide). Garman *et al.* (1994) observou que o cultivo com cobre levou a inibição de importantes estágios do desenvolvimento de gametas de *M. pyrifera*, dentre eles a formação do tubo germinativo e a migração nuclear. Infere-se, portanto, que a exposição ao cobre e a uma elevada temperatura implica em alterações no padrão de desenvolvimento de tetrásporos de *G. floridanum*,

resultando no surgimento de aberrações morfológicas e, conseqüentemente, reduzindo a viabilidade da população de tetrásporos.

Os tetrásporos de *G. floridanum* apresentaram maior sensibilidade aos agentes estressores, especialmente levando-se em conta o tempo de exposição de 24 horas para os tetrásporos e 7 a 14 dias para tetrasporófitos. Os esporos representam estágios críticos do ciclo de vida e possuem evidente importância na formação das comunidades bentônicas (Bouzon *et al.*, 2006), sendo considerados os gargalos ecofisiológicos do início do desenvolvimento das macroalgas (Agrawal, 2009). Estudos indicam uma maior sensibilidade dos estágios iniciais do desenvolvimento aos metais pesados (Coelho *et al.*, 2000, Nielsen *et al.*, 2003), porém, neste trabalho, os tetrásporos apresentaram maior sensibilidade a temperatura, enquanto que tetrasporófitos da espécie apresentaram maior sensibilidade ao cobre. Esta variação demonstra a importância de se estudar as respostas de diferentes espécies e da comparação entre fases do ciclo de vida de uma mesma espécie, especialmente levando-se em conta que a grande maioria das macroalgas utilizadas para trabalhos dos estágios iniciais do desenvolvimento pertencem a Classe Phaeophyceae (Eklund & Kautsky, 2003). Além disso, um terço das análises realizadas com tetrasporófitos apresentaram um maior efeito resultante da interação entre cobre e temperatura, enquanto que em tetrásporos nenhuma das análises indicou interação entre os agentes estressores estudados. Assim, infere-se que a interação entre o cobre e a temperatura seja do tipo sinérgica para tetrasporófitos e aditiva para tetrásporos de *G. floridanum*, evidenciando as divergências nas respostas de uma mesma espécie quando analisados diferentes estágios do desenvolvimento.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies primárias estão entre as mais sensíveis às alterações resultantes das mudanças climáticas, especialmente nos oceanos (Hoegh-Guldberg & Bruno, 2010). Ainda que sobrevivam as interações entre estressores globais e locais, como o aumento na temperatura da água e na concentração de cobre dissolvido, um estresse subletal pode levar a uma redução na eficiência fotossintética e fisiológica destes organismos, consequentemente reduzindo sua capacidade de aclimação (Davison *et al.*, 1993) e alterando as dinâmicas populacionais do ambiente. No presente trabalho, os tetrásporófitos de *G. floridanum* apresentaram capacidade de aclimação quando expostos de forma crônica, porém os tetrásporos da mesma espécie apresentaram considerável sensibilidade aos agentes estressores aos quais foram submetidos. Desta forma, conclui-se que, apesar de aditiva, a interação entre o metal pesado cobre e uma elevada temperatura representa maior risco aos tetrásporos que aos tetrásporófitos de *G. floridanum*. Novos estudos devem ampliar o conhecimento acerca dos diferentes mecanismos fisiológicos responsáveis pelas respostas das fases iniciais do desenvolvimento de macroalgas às interações entre alterações climáticas e estressores locais.

## 7 REFERÊNCIAS

Agrawal SC, 2009. Factors Affecting Spore Germination in Algae - review. **Folia Microbiol**, 54(4): 273-302.

Alestra T, Schiel DR, 2015. Impacts of local and global stressors in intertidal habitats: Influence of altered nutrient, sediment and temperature levels on the early life history of three habitat-forming macroalgae. **J Exp Mar Biol Ecol**, 468: 29-36.

Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohnaty P, 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. **Photosynth Res**, 98: 541-550.

Aman R, Carle R, Conrad J, Beifuss U, Schieber A, 2005. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by highspeed counter-current chromatography. **J Chromatogr A**, 1074: 99-105.

Anderson DM, Morel FMM, 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. **Limnol Oceanogr**, 23: 283-95.

Andersson S, Kautsky L, 1996. Copper effects on reproductive stages of Baltic Sea *Fucus vesiculosus*. **Mar Biol**, 125: 171-176.

Andrade LR, Farina M, Filho GMA, 2004. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) *in vitro*. **Ecotoxicol Environ Saf**, 58: 117-125.



Anggadiredja J, Andyani R, Hayati, Muawanah, 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **J Appl Phycol**, 9: 477-479.

Araújo PG, Ribeiro ALNL, Yokoya NS, Fujii MT, 2014. Temperature and salinity responses of drifting specimens of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) farmed on the Brazilian tropical coast. **J Appl Phycol**, DOI 10.1007/s10811-014-0303-9.

Ashraf M, Harris PJC, 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, 51(2): 163-190.

Bačkor M, Vaczi P, 2001. Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). **Environ Exp Bot**, 48: 11-20.

Bačkor M, Fahselt D, Davidson RD, Wu CT, 2003. Effects of Copper on Wild and Tolerant Strains of the Lichen Photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta) and Possible Tolerance Mechanisms. **Arch Environ Contam Toxicol**, 45: 159-167.

Bačkor M, Pawlik-Skowrońska B, Budová J, Skowroński T, 2007. Response to copper and cadmium stress in wild-type and copper tolerant strains of the lichen alga *Trebouxia erici*: metal accumulation, toxicity and non-protein thiols. **Plant Growth Regul**, 52: 17-27.

Bačkorova M, Maslanáková I, Bačkor M, 2016. Copper uptake and copper-induced physiological changes in the marine alga *Cladophora*

*prolifera* (Roth.) Kütz. (Chlorophyta, Ulvophyceae). **Braz J Bot**, 39(2): 447-452.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS, 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnol Annu Rev**, 11: 127-152.

Bidone ED, Laybauer L, Castilhos ZC, Maddock JL, 2001. Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil. **An Acad Bras Cienc**, 73(2): 277-286.

Bidwell JR, Wheeler KW, Burrige TR, 1998. Toxicant effects on the zoospore stage of the marine macroalga *Ecklonia radiata* (Phaeophyta: Laminariales). **Mar Ecol Prog Ser**, 163: 259-265.

Bond P, Brown M, Moate R, Gledhill M, Hill S, Nimmo M, 1999. Arrested development in *Fucus spiralis* (Phaeophyceae) germlings exposed to copper. **European J Phycol**, 34(5): 513-521.

Bouzon ZL, Ouriques LC, Oliveira EC, 2005. Ultrastructure of tetraspore germination in the agar-producing seaweed *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycol**, 44(4): 409-415.

Bouzon ZL, Ouriques LC, Oliveira EC, 2006. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **J Appl Phycol**, 18: 287-294.

Bouzon ZL, Ferreira EC, dos Santos R, Scherner F, Horta PA, Maraschin M, Schmidt EC, 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated *in vitro*. **Protoplasma**, 249(3): 637-650.

Brehelin C, Kessler F, van Wijk KJ, 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. **Trends Plant Sci**, 12: 260-266.

Breitburg DL, Sanders JG, Gilmour CC, Harfield CA, Osman RW, Riedel GF, Seitzinger SP, Sellner KG, 1999. Variability in responses to nutrients and trace elements, and transmission of stressor effects through an estuarine food web. **Limnol Oceanogr**, 44: 837-863.

Broomhall SD, 2004. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. **J Appl Ecol**, 41(1): 105-113.

Charpy-Roubaud C, Sournia A, 1990. The comparative estimation of phytoplanktonic, microphytobenthic and macrophytobenthic primary production in the oceans. **Mar Microb Food Webs**, 4: 31-57.

Coelho SM, Rijstenbil JW, Brown MT, 2000. Impacts of anthropogenic stresses on the early development stages of seaweeds. **J Aquat Ecosyst Stress Recovery**, 7: 317-333.

Connan S, Stengel DB, 2009. **Macroalgal Biomonitoring** – Applying Phenolic Compounds as Biomarkers for Metal Uptake Characteristics in

Irish Coastal Environments. Environmental Protection Agency, Department of Botany, Environmental Change Institute/Martin Ryan Institute, NUIG, Wexford, Ireland, 32p.

Connan S, Stengel DB, 2011. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. **Aquat Toxicol**, 104: 1-13.

Contreras LC, Medina MH, Andrade S, Oppliger V, Correa JA, 2007. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). **Environ Pollut**, 145: 75-83.

Cordeiro-Marinho M, 1978. **Rodoficeas bentônicas marinhas do Estado de Santa Catarina**. Rickia, são Paulo, 7:1-243.

Crain CM, Kroeker K, Halpern BS, 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. **Ecol Lett**, 11: 1304-1315.

Daud MK, Ali S, Variath MT, Zhu SJ, 2013. Differential physiological, ultramorphological and metabolic responses of cotton cultivars under cadmium stress. **Chemosphere**, 93: 2593-2602.

Davison IR, Johnson LE, Brawley SH, 1993. Sublethal stress in the intertidal zone: tidal emersion inhibits photosynthesis and retards development in embryos of the brown alga *Pelvetia fastigiata*. **Oecologia**, 96: 483-492.

Davison IR, Pearson GA, 1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds: a review and preview. **J Phycol**, 32: 197-211.

de Filippis LF, 1979. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. **Pflanzenphysiol**, 92: 39-49.

de Pascale S, Maggio A, Fogliano V, Ambrosino P, Ritieni A, 2001. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. **J Hortic Sci Biotechnol**, 76: 447-453.

Diannelidis BE, Delivopoulos SG, 1997. The effects of zinc, copper and cadmium on the fine structure of *Ceramium ciliatum* (Rhodophyceae, Ceramiales). **Mar Environ Res**, 44(2): 127-134.

Dietz KJ, Baier M, Kramer U, 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In*: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, p. 73-97.

Ding LD, Ma Y, Huang B, Chen S, 2013. Effects of Seawater Salinity and Temperature on Growth and Pigment Contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). **BioMed Research International**, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/594308>.

Efeoglu B, Terzioglu S, 2009. Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. **EurAsia J BioSci**, 3: 97-106.

Eggert A, 2012. Seaweed responses to temperature. *In*: Wiencke C, Bischof K, eds. **Seaweed Biology**. Springer-Verlag, Berlin, p. 47–66.

Ekman P, Yu S, Pedersén M, 1991. Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, alpha-galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. **Br Phycol J**, 26: 123-131.

Felix MRL, Osorio LKP, Ouriques LC, Farias-Soares FL, Steiner N, Kreusch M, Pereira DT, 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**, doi:10.1017/S1431927614012768.

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P, 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science**, 281: 237-240.

Filipin EP, Bouzon ZL, Ouriques L, Pereira DT, Braum F, Schmidt EC, Simioni C, 2016. Evaluation of salinity effects on the release, adhesion, and germination of the tetraspores of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). **J Appl Phycol**, 28: 2925-2938.

Friedlander M, 2008. Advances in cultivation of Gelidiales. **J Appl Phycol**, 20(5): 1-6.

Fritioff A, Kautsky L, Greger M, 2003. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. **Environ Pollut**, 133: 265-274.

Gaitan-Espitia JD, Hancock JR, Padilla-Gamiño JL, Rivest EB, Blanchette CA, Reed DC, Hofmann GE, 2014. Interactive effects of elevated temperature and pCO<sub>2</sub> on early-life-history stages of the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. **J Ex Mar Biol Ecol**, 457: 51-58.

Gantt E, 1981. Phycobilisome. **A Rev Pl Physiol**, 28: 335-377.

Garman GD, Pillai MC, Cherr GN, 1994. Inhibition of cellular events during early algal gametophyte development: effects of select metals and an aqueous petroleum waste. **Aquat Toxicol**, 28: 127-144.

Gaunt P, Barker SA, 2000. Matrix solid phase dispersion extraction of triazines from catfish tissues; examination of the effects of temperature and dissolved oxygen on the toxicity of atrazine. **Int J Environ Pollut**, 13(1-6): 284-312.

Glazer AN, 1989. Light Guides. **J Biol Chem**, 264(1): 1-4.

Gledhill M, Nimmo M, Hill SJ, 1997. The toxicity of copper(II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. **J Phycol**, 33: 2-11.

Gouveia C, Kreusch M, Schmidt EC, Felix MRL, 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: 513-524.

Graham LE, Graham JM, Wilcox LE, 2009. **Algae**, Second edition. Pearson, 720 p.

Grossman AR, Bhaya D, He Q, 2001. Tracking the Light Environment by Cyanobacteria and the Dynamic Nature of Light Harvesting. **J Biol Chem**, 276(15): 11449-11452.

Hall JL, 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **J Exp Bot**, 53(366): 1-11.

Hammann M, Wang G, Boo SM, Aguilar-Rosas LE, Weinberger F, 2016. Selection of heat shock resistance traits during the invasion of the seaweed *Gracilaria vermiculophylla*. **Mar Biol**, 163: 1-11.

Han T, Kong JA, Brown MT, 2009. Aquatic toxicity tests of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Chlorophyta) using spore germination and gametophyte growth. **Eur J Phycol**, 44(3): 357-363.

Hanelt D, Bischof K, Wiencke C, 2004. The radiation, temperature and salinity regime in Kongsfjorden. **Ber Polarforsch Meeresforsch**, 492: 14-25.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ, 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **J Trace Elem Med Biol**, 19: 125-140.



Hommersand MH, Fredericq S, 1988. An investigation of cystocarp development in *Gelidium peridifolium* with a revised description of the Gelidiales (Rhodophyta). **Phycologia**, 27: 254-272.

Hudson JB, Kim JH, Lee MK, DeWreede RE, Hong YK, 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. **J Appl Phycol**, 10: 427-434.

Hurkman WJ, McCue KF, Altenbach SB, Korn A, Tanaka CK, Kothari KM, Johnson EI, Bechtel DB, Wilson JD, Anderson OD, DuPont FM, 2003. Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. **Plant Sci**, 164: 873-881.

IPCC, 2007: Summary for Policymakers. *In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL, eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 18 p.

IPCC, 2013: Summary for Policymakers. *In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, eds). Cambridge

University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 27 p.

IPCC, 2014: Summary for Policymakers. *In: Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Edenhofer O, Pichs-Madruga R, Sokona Y, Farahani E, Kadner S, Seyboth K, Adler A, Baum I, Brunner S, Eickemeier P, Kriemann B, Savolainen J, Schlömer S, von Stechow C, Zwickel T Minx JC, eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1436 p.

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

Kakinuma M, Coury DA, Kuno Y, Itoh S, Kozawa Y, Inagaki E, Yoshiura Y, Amano H, 2006. Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). **Mar Biol**, 149: 97-106.

Koch M, Bowes G, Ross C, Zhang XH, 2012. Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. **Glob Change Biol**, doi: 10.1111/j.1365-2486.2012.02791.x.

Kübler JE, Davison IR, 1993. High-temperature tolerance of photosynthesis in the red alga *Chondrus crispus*. **Mar Biol**, 117: 325-335.

Kursar TA, van Der Meer J, Alberte RS, 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. **Plant Physiol**, 73: 353-360.

Laffoley D, Baxter JM (eds), 2016. Explaining ocean warming: causes, scale, effects and consequences. Gland, Switzerland : IUCN. Gland, Switzerland, 458 p.

Le Gall H, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C, 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. **Plants**, 4: 112-166.

Lee RE, 2008. **Phycology**. Fourth edition. Cambridge University Press, New York, 547 p.

Lenntech, 2004. **Water Treatment and Air Purification**. Water Treatment, Lenntech, Rotterdamseweg, Netherlands.

Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel E, 2008. The Maize Phytoene Synthase Gene Family: Overlapping Roles for Carotenogenesis in Endosperm, Photomorphogenesis, and Thermal Stress Tolerance. **Biochemical Processes and Macromolecular Structures**, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.122119>.

Lignell A, Pedersén M, 1989. Effects of pH and inorganic carbon concentration on growth of *Gracilaria secundata*. **Br Phycol J**, 24: 83-89.

Liu JW, Dong SL, 2001. Interactions between light and temperature on the growth and levels of chemical constituents of *Gracilaria tenuistipitata* var. Liui. **J Ocean Univ China**, 31(3): 332-338.

Los DA, Murata N 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochim Biophys Acta**, 1666: 142-157.

Luder UH, Wiencke C, 2002. Acclimation of photosynthesis and pigments during and after six months of darkness in *Palmaria decipiens* (Rhodophyta): a study to simulate antarctic winter sea ice cover. **J Phycol**, 38: 904-913.

Luder UH, Knoetzel J, Wiencke C, 2001. Acclimation of photosynthesis and pigments to seasonally changing light conditions in the endemic Antarctic red macroalga *Palmaria decipiens*. **Polar Biol**, 24: 598-603.

Marschner H, 2012. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Third edition. School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide, Australia, 651 p.

Mathur S, Agrawal D, Jajoo A, 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. **J Photochem Photobiol B**, 137: 116-126.

Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I, 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J Appl Phycol**, 9: 29-35.

Mendes LF, Zambotti-Villela L, Colepicolo P, Marinho-Soriano E, Stevani CV, Yokoya NS, 2013. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. **J Appl Phycol**, DOI 10.1007/s10811-013-0036-1.

Miller C, 2007. Identification and Characterization of Enzymes Involved in Post-translational Modifications of Phycobiliproteins in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Dissertação de mestrado**, Unversidade de New Orleans, EUA, 126 p.

Mohring MB, Kendrick GA, Wernberg T, Rule MJ, Vanderklift MA, 2013. Environmental influences on kelp performance across the reproductive period: an ecological trade-off between gametophyte survival and growth? **PLoS One**, 8: e65310.

Muller R, Wiencke C, Bischof K, 2008. Interactive effects of UV radiation and temperature on microstages of Laminariales (Phaeophyceae) from the Arctic and North Sea. **Clim Res**, 37: 203-213.

National Centers for Environmental Information, Climate at a Glance: Global Time Series, publicado em Janeiro de 2017 em <http://www.ncdc.noaa.gov/cag/>

Nielsen HD, Brown MT, Brownlee C, 2003. Cellular responses of developing *Fucus serratus* embryos exposed to elevated concentrations of Cu<sup>2+</sup>. **Plant Cell Environ**, 26: 1737-1747.

Nielsen HD, Nielsen SL, 2010. Adaptation to high light irradiances enhances the photosynthetic Cu<sup>2+</sup> resistance in Cu<sup>2+</sup> tolerant and non-tolerant populations of the brown macroalgae *Fucus serratus*. **Mar Pollut Bull**, 60: 710-717.

Nielsen HD, Nielsen SL, Pedersen MF, 2014. Juvenile life stages of the brown alga *Fucus serratus* L. are more sensitive to combined stress from high copper concentration and temperature than adults. **Mar Biol**, DOI 10.1007/s00227-014-2471-1.

Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, Erwin KN, Levin ED, 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environ Int**, 35: 971-986.

Oliveira EC, 1997. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, 6(7): 24-26.

Oliveira EC, 2003. **Introdução à Biologia Vegetal**, segunda edição. São Paulo: EDUS, 272 p.

Ouriques LC, Bouzon ZL, 2003. Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **Plant Biosyst Int J Deal Aspects Plant Biol**, 137: 193-201.

Pagliosa PR, Fonseca A, Barbosa FA, 2004. Evidence of Systemic Changes in Trace Metal Concentrations in Subtropical Estuarine Sediments as a Result of Urbanization. **J Coast Res**, 39: 1078-1083.

Pereira E, Baptista-Neto JA, Smith BJ, McAllister JJ, 2007. PedriniThe contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments – Rio de Janeiro / Brazil. **An Acad Bras Ciênc**, 79(4): 739-750.

Petrovic J, Nikolic G, Markovic D, 2006. *In vitro* complexes of copper and zinc with chlorophyll. **J Serb Chem Soc**, 71(5): 501-512.

Pilatti FK, Ramlov F, Schmidt EC, Kreusch M, Pereira DT, Costa C, Oliveira ER, Bauer CM, Rocha M, Bouzon ZL, Maraschin M, 2016. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline e Biochemical and morphological alterations. **Chemosphere**, 156: 428-437.

Piovar J, Stavrou E, Kaduková J, Kimáková T, Bačkor M, 2011. Influence of long-term exposure to copper on the lichen photobiont *Trebouxia erici* and the free-living algae *Scenedesmus quadricauda*. **Plant Growth Regul**, 63: 81-88.

Poore AGB, Graham SE, Byrne M, Dworjanyn SA, 2016. Effects of ocean warming and lowered pH on algal growth and palatability to a grazing gastropod. **Mar Biol**, 163: 99.

Pueschel CM, 1979. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **J Phycol**, 15: 409-424.

Rai LC, Gaur JP, 2001. **Algal Adaptation to Environmental Stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms**. First edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 421 p.

Raven JA, Evans MC, Korb RE, 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. **Photosynth Res**, 60: 111-149.

Redmond S, 2013. Effects of Increasing Temperature and Ocean Acidification on the Microstages of two Populations of *Saccharina latissima* in the Northwest Atlantic. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Connecticut, EUA, 51 p.

Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, 17: 208-212.

Rijstenbil JW, Derksen JWM, Gerringa LJA, Poortvliet TCW, Sandee A, Berg M, Drie J, Wijnholds JA, 1994. Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. **Mar Biol**, 119: 583-90.

Riss T, 2014. Is Your MTT Assay Really the Best Choice? Disponível em: <<http://www.promega.com.br/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2017.



Ritter A, Dittami SM, Goullitquer S, Correa JA, Boyer C Potin P, Tonon T, 2014. Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. **BMP Plant Biol**, 14: 116.

Rivero RM, Pablo JMR, García PC, López-Lefebvre LR, Sánchez E, Romero L, 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Sci**, 160: 315-321.

Rodrigo M, Robaina RR, 1997. Stress tolerance of photosynthesis in sporelings of the red alga *Grateloupia doryphora* compared to that of Stage III thalli. **Mar Biol**, 128: 689-694.

Roncarati F, Sáez CA, Greco M, Gledhill M, Bitonti MB, Brown MT, 2015. Response differences between *Ectocarpus siliculosus* populations to copper stress involve cellular exclusion and induction of the phytochelatin biosynthetic pathway. **Aquat Toxicol** 159: 167-175.

Rosenzweig C, Karoly D, Varelli M, Neofotis P, Wu Q, Casassa G, Menzel A, Root TL, Estrella N, Seguin B, Tryjanowski P, Liu C, Rawlins S, Imeson A, 2008. Attributing physical and biological impacts to anthropogenic climate change. **Nature**, 453: 353-358.

Rotter S, Besagni C, Kessler F, 2015. The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. **Biochim Biophys Acta**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.002>.

Ruan YL, Jin Y, Yang YJ, Li GJ, Boyer JS, 2010. Sugar Input, Metabolism, and Signaling Mediated by Invertase: Roles in Development, Yield Potential, and Response to Drought and Heat. **Mol Plant**, 3(6): 942-955.

Russell BD, Harley CDG, Wernberg T, Mieszkowska N, Widdicombe S, Hall-Spencer JM, Connel SD, 2012. Predicting ecosystem shifts requires new approaches that integrate the effects of climate change across entire systems. **Biol Lett**, 8: 164-166.

Rym BD, 2012. Photosynthetic Behavior of Microalgae in Response to Environmental Factors. *In*: Najafpour MM, eds. **Applied Photosynthesis**. INTECH, Rijeka, Croatia, 432 p.

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, Del Río LA, 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **J Exp Bot**, 52: 2115-2126.

Santelices B, 1988. Synopsis of biological data on the seaweed genera *Gelidium* and *Pterocladia* (Rhodophyta). **FAO Fish Synop**, 145, 56 p.

Santelices B, 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *In*: Barnes H, Barnes M, eds. **Oceanography and Marine Biology - An annual review**. Aberdeen University Press, 28: 177-276.

Santelices B, 1991. Production ecology of *Gelidium*. *In*: **International Workshop on *Gelidium***. Springer Netherlands, p. 31-44.

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. **Ecotoxicol Environ Saf**, 105: 80-89.

Santos RW, Schmidt EC, Vieira IC, Costa GB, Rover T, Simioni C, Barufi JB, Soares CHL, Bouzon ZL, 2015. The effect of different concentrations of copper and lead on the morphology and physiology of *Hypnea musciformis* cultivated *in vitro*: a comparative analysis. **Protoplasma**, DOI 10.1007/s00709-014-0751-8.

Scariot L, 2010. Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, 93 p.

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 SC, Kreusch M, Felix MRL, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, Ouriques LC, Farias-Soares FL, Steiner N, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, 2014. Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) and Copper on the Morphology, Ultrastructural

Organization and Physiological Responses of the Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Photochem Photobiol**, 91: 359-370.

Simioni C, 2014. Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e desenvolvimento de gametófitos jovens de *Gelidium floridanum* sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, 120 p.

Simioni C, Schmidt EC, Felix MRL, Polo LK, Rover T, Kreusch M, Pereira DT, Chow F, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, 2014. Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) on Young Gametophytes of *Gelidium floridanum*: Growth Rate, Photosynthetic Pigments, Carotenoids, Photosynthetic Performance, and Ultrastructure. **Photochem Photobiol**, 90: 1050-1060.

Smith KL, Bryan GW, Hurwood JL, 1985. Changes in endogenous fatty acids and lipid synthesis associated with copper pollution in Fucus. **J Exp Bot**, 36: 663-669.

Sousa MB, Pires KMS, Alencar DB, Sampaio AH, Saker-Sampaio S, 2008.  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em algas marinhas *in natura*. **Ciênc Tecnol Aliment**, 28(4): 953-958.

Spurr AR, 1969. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **J Ultrastruct Resh**, 26: 31-43.

Steinhoff FS, Wiencke C, Muller R, Bischof K, 2007. Effects of ultraviolet radiation and temperature on the ultrastructure of zoospores of the brown macroalga *Laminaria hyperborea*. **Plant Biol**, 10: 388-397.

Szymanska R, Nowicka B, Gabruk M, Glinska S, Michlewska S, Dłużewska J, Sawicka A, Kruk J, Laitinen R, 2015. Physiological and antioxidant responses of two accessions of *Arabidopsis thaliana* in different light and temperature conditions. **Physiol Plant**, 154: 194-209.

Thompson B, 2006. **Foundations of behavioral statistics**: An insight-based approach. Guilford, New York, USA, 457 p.

Tóth, G, Hermann T, da Silva MR, Montanarella L, 2016. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environ Int**, 88: 299-309.

Vallee BL, Ulmer DD, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and Lead. **Annu Rev Biochem**, 41: 19-128.

van den Hoek C, 1989. The distribution of benthic marine algae in relation to the temperature regulation of their life histories. **Biol J Linn Soc**, 18: 81-144.

Vidotti EC, Rollemberg MCE, 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim Nova**, 27(1): 139-145.

Viola R, Nyvall P, Pedersén M, 2001. The unique features of starch metabolism in red algae. **Proc R Soc**, 268: 1417-1422.

Wahid A, 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **J Plant Res**, 120: 219-228.

Wang SL, Zu ZR, Sun YX, Liu JL, Li HB, 2013. Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review. **Mar Pollut Bull**, 76: 7-15.

Waterman P, Mole S, 1994. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, 248 p.

Wernberg T, Smale DA, Thomsen MS, 2012. A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. **Glob Change Biol**, doi: 10.1111/j.1365-2486.2012.02656.x.

Wernberg T, Bettignies T, Joy BA, Finnegan PM, 2016. Physiological responses of habitat-forming seaweeds to increasing temperatures. **Limnol Oceanogr**, 61(6): 2180-2190.

Xia L, Song S, Hu C, 2015. High temperature enhances lipid accumulation in nitrogen-deprived *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **J Appl Phycol**, DOI 10.1007/s10811-015-0636-z.

Yoon HS, Zuccarello GC, Bhattacharya D, 2010. Evolutionary history and taxonomy of red algae. *In*: Seckbach J, Chapman DJ, eds. Red algae in the genomic age. Springer, Netherlands, 500 p.

Yu S, Blennow A, Bojko M, Madsen F, Olsen CE, Engelsen SB, 2002. Physico-chemical Characterization of Floridean Starch of Red Algae. **Starch**, 54: 66-74.

Zou D, 2014. Temperature response of photosynthetic light- and carbon-use characteristics in the red seaweed *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta). **J Phycol**, 50: 366-375.

Zrelli RE, Courjault-Radé P, Rabaoui L, Castet S, Michel S, Bejaoui N, 2015. Heavy metal contamination and ecological risk assessment in the surface sediments of the coastal area surrounding the industrial complex of Gabes city, Gulf of Gabes, SE Tunisia. **Mar Pollut Bull**, 101(2): 922-929.

Zuber H, 1986. Primary structure and function of the light-harvesting polypeptides from cyanobacteria, red algae, and purple photosynthetic bacteria. *In*: Staehelin LA, Arntzen CJ, eds. **Encyclopedia of Plant Physiology**. Springer-Verlag, Berlin.