



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Alessandro Mateus Sloty

**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) COMO MODELO
PARA A AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO**

Florianópolis

2023

Alessandro Mateus Sloty

**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) COMO MODELO
PARA A AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Florianópolis, SC 2023

Ficha de identificação da obra

Sloty, Alessandro Mateus

ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE *Ulva ohnoi* (LINNEAUS) COMO
MODELO PARA A AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO /
Alessandro Mateus Sloty; orientadora, Zenilda Laurita
Bouzon, 2023. 53 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis,
2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento.
2. Ulva. 3. Biorremediação. 4. Célula vegetal. 5.
Morfofisiológica. I.
Bouzon, Zenilda Laurita. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

Alessandro Mateus Sloty

ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) COMO MODELO PARA A
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

O presente trabalho em nível de mestrado será avaliado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

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

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

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestrado em Biologia Celular e do
Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª. Dra. Zenilda Laurita Bouzon Orientadora

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado à minha incrível orientadora,
prof. Z. que me acolheu e teve toda a paciência para
colaborar com meu aprendizado. Me ensinou a ser
cientista sem perder o brilho e o amor ao trabalho
quando um experimento não sai como o planejado.
Obrigado por tanto, não restam dúvidas que levarei seu
exemplo ensinamentos para toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo dom da vida e a toda minha família pelo apoio prestado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento por todo o conhecimento compartilhado durante esse período.

Às professoras Dra. Zenilda Laurita Bouzon, Dra. Carmen Simione e Dra. Luciane Ouriques, pelo acolhimento, orientações, dedicação e principalmente paciência nesse período da vida tão novo e ao mesmo tempo importante para mim.

À UNIEDU pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo suporte técnico e disponibilidade em equipamentos.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) juntamente com a técnica Dra. Eliane pela receptividade e apoio nas microscopias.

A Dra. Claudia Machado, técnica do Laboratório de Camarões Marinhos – LCM Depto. de Aquicultura – UFSC, pelo suporte com as análises de água.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin e a pesquisadora Dra. Eva Regina do laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal - UFSC, pela parceria e por terem sido tão prestativos.

À Luana, Felipe, Yasmin e Andressa companheiros de jornada do Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV-UFSC) que contribuíram de forma prática para a realização desta pesquisa.

Aos meus professores da graduação, de forma especial a professora Larissa Romanello que apesar de distante fisicamente sempre se faz presente prestando todo apoio necessário.

Aos meus queridos amigos que conheci durante toda a trajetória, no ensino médio, graduação e atualmente pós-graduação, pelo incentivo, amparo e bons momentos em toda esta caminhada.

Entre tantas pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho, é fácil esquecer de alguém, então quem não estiver aqui, sinta-se agradecido também!

A todos (as), o meu sincero e profundo, Muito Obrigado. O apoio de cada um foi essencial e insubstituível!

Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
não sou o que irei
ser... mas Graças a
Deus,
não sou mais o que era antes.

Frase adaptada de Martin Luther King

RESUMO

A intensa urbanização nas áreas costeiras aumentou o volume de efluentes depositados em rios e mares induzindo o monitoramento intensivo a fim de analisar como os organismos, que vivem nesses ambientes, reagem com este aumento de matéria orgânica. O rompimento da barragem de tratamento esgoto da CASAN em janeiro de 2021, ocasionou derramamento de dejetos orgânicos e inorgânicos na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, afetando de forma negativa a biota local. Diante do problema, percebeu-se a necessidade de estudos para minimizar o impacto ambiental. Um dos métodos possíveis prevê o uso de macroalgas no processo de biorremediação. O presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações morfofisiológicas em espécimes de *Ulva ohnoi* (Linnaeus) submetidas a processo de biorremediação. Foram selecionadas duas áreas na lagoa para a coleta de água: P1 - Ponta das Almas, e P2 CASAN (água coletada na região do derramamento de efluentes). Os espécimes foram cultivados com a água do ambiente e água do mar filtrada e enriquecida com meio Von Stoch para o grupo controle. Nos experimentos foram avaliados a taxa de crescimento, pigmentos fotossintetizantes, organização celular (microscopia de luz e eletrônica) e a quantificação de nitrito, nitrato e fosfato na água no início e no final dos experimentos. Após as análises, os resultados obtidos foram comparados entre os grupos experimentais e controle através de testes estatísticos indicando que houve alterações morfofisiológicas nos espécimes dos grupos cultivados com água da lagoa. As algas dos grupos cultivados com água da lagoa demonstraram menor taxa de crescimento. Porém alta produção de amido e açúcares solúveis quando comparados ao controle. Foram observadas também alterações no formato e fluorescência dos cloroplastos dos grupos tratados, com redução nos níveis de fluorescência, resultante da redução do sistema de tilacóides e acúmulo de amido no interior dos cloroplastos. Este impacto negativo no desenvolvimento da alga possivelmente está relacionado com a baixa disponibilidade de nitrito, nitrato e fosfato, que dentre outros, são nutrientes indispensáveis para síntese de biomoléculas. Como a coleta de água para o cultivo foi realizada na estação do verão em regiões rasas com ciclagem constante da água, fatores que segundo a literatura podem justificar a redução da disponibilidade dos nutrientes mensurados. Em conclusão, os resultados mostram que o cultivo de *U. ohnoi* com água da lagoa provoca alterações significativas na morfologia dos espécimes. Assim, o entendimento se torna relevante para aspectos que podem ter implicações para a qualidade e a aplicabilidade da alga para fins de biorremediação nas condições da lagoa. Porém, serão necessários estudos complementares que busquem entender os mecanismos envolvidos nas respostas da alga e as possibilidades de otimização do processo.

Palavras-chave: Macroalga. Lagoa da Conceição. Morfofisiologia. Biorremediação.

ABSTRACT

Intense urbanization in coastal areas has increased the volume of effluents deposited in rivers and seas, prompting intensive monitoring to analyze how organisms living in these environments react to this increase in organic matter. The collapse of CASAN's sewage treatment dam in January 2021 caused organic and inorganic waste to spill into Lagoa da Conceição, Florianópolis SC, negatively affecting the local biota. Faced with this problem, there was a need for studies to minimize the environmental impact. One of the possible methods is the use of macroalgae in the bioremediation process. The aim of this study was to evaluate possible morphophysiological changes in specimens of *Ulva ohnoi* (Linnaeus) submitted to a bioremediation process. Two areas in the lagoon were selected for water collection: P1 - Ponta das Almas, and P2 CASAN (water collected in the region of the effluent spill). The specimens were cultivated with water from the environment and filtered seawater enriched with Von Stoch medium for the control group. The experiments assessed growth rate, photosynthetic pigments, cell organization (light and electron microscopy) and the quantification of nitrite, nitrate and phosphate in the water at the beginning and end of the experiments. After analysis, the results obtained were compared between the experimental and control groups using statistical tests, indicating that there were morphophysiological changes in the specimens from the groups cultivated with lagoon water. The algae from the groups cultivated with lagoon water showed a lower growth rate. However, they produced more starch and soluble sugars than the control. Changes were also observed in the shape and fluorescence of the chloroplasts in the treated groups, with a reduction in fluorescence levels, resulting from a reduction in the thylakoid system and an accumulation of starch inside the chloroplasts. This negative impact on the algae's development is possibly related to the low availability of nitrite, nitrate and phosphate, which, among other things, are essential nutrients for the synthesis of biomolecules. As the water was collected for cultivation during the summer season in shallow regions with constant water cycling, factors which according to the literature may justify the reduced availability of the nutrients measured. In conclusion, the results show that the cultivation of *U. ohnoi* with lagoon water causes significant changes in the morphology of the specimens. This understanding is relevant to aspects that may have implications for the quality and applicability of the algae for bioremediation purposes in lagoon conditions.

Key words: Macroalgae. Lagoa da Conceição. Morphophysiology. Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista geral e microscópica de um espécime de <i>Ulva spp</i>	18
Figura 2 - Localização geográfica dos locais de coletas de água	22
Figura 3 - Taxa de crescimento da <i>U. ohnoi</i> após o tratamento de 7 dias	27
Figura 4 - Morfologia externa do talo de <i>U. ohnoi</i> após os cultivos	28
Figura 5 - Taxa de concentração de clorofila <i>a</i> em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).	29
Figura 6 - Taxa de concentração de carotenóides em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).	29
Figura 7 - Autofluorescência dos cloroplastos de <i>U. ohnoi</i> no microscópio confocal de varredura a laser	30
Figura 8 - Densidade de pixels por μm^2 de cloroplasto de <i>U. ohnoi</i> através de análise das imagens pelo programa Image J	31
Figura 9 - Microscopia de Luz (ML) das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> coradas com ATO e PAS após os tratamentos	32
Figura 10 - Taxa de concentração de amido em miligramas por gramas do peso seco das amostras	33
Figura 11 - Taxa de concentração de açúcares solúveis totais em miligramas por gramas considerando o peso seco das amostras	34
Figura 12 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo controle	36
Figura 13 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo tratado P1	38
Figura 15 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U ohnoi</i> do grupo tratado P2	40
Figura 17 - Quantificação do fosfato comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g}/\text{L}$ antes e depois dos experimentos	41
Figura 18 - Quantificação de nitrito comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g}/\text{L}$ antes e depois dos experimentos	42
Figura 19 - Quantificação de nitrato comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g}/\text{L}$ no início e no final dos experimentos	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μG	Microgramas
AT-O	Azul de toluidina
CCA	Centro de ciências agrárias
LABCEV	Laboratório de biologia celular vegetal
LCA	Laboratório de camarões e algas
LCME	Laboratório central de microscopia eletrônica
MCW	<i>Methanol; chloroform; water</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	Microscopia de luz
NM	Nanômetro
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
UFSC	Universidade federal de santa catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos.....	19
2 METODOLOGIA.....	20
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	20
2.2 ANÁLISE DE NUTRIENTES DA ÁGUA DO MAR.....	21
2.3 COLETA DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	22
2.4 TAXA DE CRESCIMENTO.....	22
2.5 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ (ML) DE CAMPO CLARO.....	23
2.6 TESTES CITOQUÍMICOS.....	23
2.7 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	23
2.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO.....	24
2.9 PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES - CLOROFILA a E CAROTENÓIDES.....	25
2.10 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	25
2.11 ANÁLISE DOS DADOS.....	25
3 RESULTADOS.....	26
3.1 TAXA DE CRESCIMENTO.....	26
3.2 MORFOLOGIA EXTERNA DO TALO.....	26
3.3 PIGMENTOS.....	27
3.4 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	29
3.5 MICROSCOPIA DE LUZ.....	30
3.6 AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS.....	32
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	33
3.8 ANÁLISE DE NUTRIENTES.....	40
3.8.1 Fosfato.....	40
3.8.2 Nitrito.....	41
3.8.3 Nitrato.....	42
4 DISCUSSÃO.....	43
5 CONCLUSÃO.....	47
6 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A urbanização rápida e desordenada, devido ao crescimento exponencial da população humana, vem se tornando um fator preocupante quando se trata de condições ambientais. As mudanças, devido à ocupação e uso do solo, retirada de matas ciliares, substituição da vegetação por superfícies impermeáveis, somados com poluentes antrópicos depositados no meio, sem passar antes por um processo de tratamento adequado, formam um cenário propício para danificar a saúde dos corpos hídricos (Bega *et al.*, 2021; Inyinbor *et al.*, 2018).

A poluição dos ambientes aquáticos por ação antrópica representa um problema alarmante devido a estes serem o destino final da maioria dos poluentes solúveis em água, tanto aqueles lançados no solo quanto no ar. Assim, a poluição das águas se torna um problema de saúde pública (Bega *et al.*, 2021; Inyinbor *et al.*, 2018).

Relatórios de monitoramento das águas continentais brasileiras indicam que atualmente apenas 10% da cobertura aquática terrestre se encontram em boas condições, quanto ao restante, 73% são consideradas de qualidade regular e 17% de qualidade ruim (Goncharuk, 2018; Kansakar; Hossain, 2016). Em ambientes litorâneos, desde a década de 70, existem registros de poluição nos ambientes marinhos brasileiros, e em 2020 foi estimado que o Brasil despeja aproximadamente oito milhões de toneladas de lixo plástico por ano nos oceanos. O lixo plástico representa 70% da poluição e o restante 30% são representados pelo esgoto, petróleo, dentre outros (Grechinski, 2020; Hiroki, 1971; Sul; Costa, 2007).

A contaminação por poluentes aquáticos, especialmente pelo elemento químico nitrogênio, é considerado um dos maiores problemas ambientais, principalmente nas regiões em que há influência direta das atividades humanas (Savage, 2005). Além de que, os efeitos desta contaminação acabam por implicar em saúde pública, pois os poluentes, muitas vezes, permanecem durante um longo período de tempo na natureza, resultando em exposição ambiental via cadeia alimentar, sendo encontrados em concentrações mais altas para consumidores de níveis tróficos elevados, dos quais fazem parte os seres humanos (Rossato; Oliveira; Sagrillo, 2021).

Nos ambientes marinhos, a intensificação da descarga de resíduos por fontes antrópicas, como através da liberação de efluentes domésticos e industriais, pode causar degradação destes ecossistemas, tornando-os áreas vulneráveis ao impacto da poluição (Sharma *et al.*, 2022). Como algumas possíveis consequências têm-se a escassez de fontes de

abastecimento e a mortalidade de diversos organismos (Sharma *et al.*, 2022). Na Ilha de Santa Catarina, ocorreu um agravamento desse problema na Lagoa da Conceição em janeiro de 2021 devido ao rompimento da barragem de tratamento de esgoto da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) (UFSC, 2021). Além disso, o grande aporte de nutrientes e matéria orgânica é um dos principais responsáveis pela eutrofização dos ambientes marinhos, contribuindo com o aumento da produtividade primária e causando desequilíbrio em toda a estrutura e dinâmica das comunidades e ecossistemas marinhos (Wang *et al.*, 2020). Também pode ocasionar floração de algas e cianobactérias, que caso sejam tóxicas, podem se tornar um problema de saúde pública (Hartman *et al.*, 2021).

Com o intuito de amenizar esse problema ambiental, estudos envolvendo processos de biorremediação com organismos aquáticos vêm se tornando frequentes (Bugs *et al.*, 2018; Dapper *et al.*, 2014; Rossato; Oliveira; Sagrillo, 2021). A biorremediação é uma técnica de gerenciamento de resíduos que envolve o uso de organismos para remover ou neutralizar poluentes de ambientes contaminados, utilizando organismos naturais para decompor substâncias perigosas em substâncias menos tóxicas ou atóxicas. Esses organismos usados para desempenhar a função de biorremediação são conhecidos como “biorremediadores” (Coutinho *et al.*, 2015).

Os biorremediadores apresentam capacidade de remover ou degradar diversos componentes do ecossistema utilizando-se de processos metabólicos com dependência hídrica, componentes esses que podem estar presentes no solo, lodo, sedimento, águas subterrâneas, águas da superfície e águas residuais, sendo que a espécie biorremediadora mais eficiente no processo irá variar de acordo com as características do ambiente e tipo de componente presente (Coutinho *et al.*, 2015). Para ambientes aquáticos, o grupo de biorremediadores mais comuns a serem utilizados são as algas (Bugs *et al.*, 2018).

A utilização de macroalgas no processo de biorremediação tem sido objeto de estudo em trabalhos científicos como por exemplo a capacidade de absorver e acumular metais pesados (Sweetly, 2014), compostos orgânicos e nutrientes os transformando em matéria algal, reduzindo assim a concentração desses poluentes na água (Mawi *et al.*, 2020). Além disso, a atividade fotossintética das macroalgas promove a liberação de oxigênio para o ambiente, o que pode auxiliar na degradação de contaminantes orgânicos, ressaltando assim o potencial das macroalgas como agentes biorremediadores eficientes (Mawi *et al.*, 2020).

As algas são um grupo diverso de organismos aquáticos que além de serem

diretamente úteis para os humanos como na indústria de alimentos e produção de fármacos (El Gamal, 2010), são também essenciais para a existência da vida como um todo em nosso planeta, decorrente de serem responsáveis pela produção da maior parte de oxigênio (Vidotti & Rollemberg, 2004) e à base de diversas cadeias alimentares (Bold; Wynne, 1984).

Para a aquicultura multitrófica integrada (IMTA) as espécies indicadas para processos de biorremediação, são aquelas com taxas de crescimento relevantes, alto acúmulo de nitrogênio (N) e fosfato (P) no talo, alta assimilação de nutrientes e de importância econômica (Ribeiro *et al.*, 2017), característica presente nas espécies de algas pertencentes ao gênero *Ulva*, divisão Chlorophyta (Ribeiro *et al.*, 2013).

As algas da divisão Chlorophyta são caracterizadas por possuírem coloração verde, clorofila *a* e conterem como substância de reserva o amido intra-plastidial (acumulado nos plastos). Elas também apresentam absorção de nutrientes tanto pelo transporte passivo quanto ativo, sendo os fatores físicos, químicos, biológicos e concentração na coluna d'água os principais influentes que afetam as taxas de absorção e assimilação de nutrientes (Carneiro, 2007).

O gênero *Ulva* (Chlorophyta, Classe Ulvophyceae, Ordem Ulvales, Família Ulvaceae) (Figura 1) possui espécies cujo talo é constituído por uma lâmina flexível formada por apenas duas camadas de células, um cloroplasto por célula e um disco adesivo formado por expansões rizóidais nas células inferiores, com funções de fixação (Algário online, 2021; Pereira, 2009; Raymundo; Horta; Fett, 2012). Além de que os espécimes de *Ulva* costumam ser oportunistas, o que as tornam boas filtradoras em ambientes com disponibilidade excessiva de nutrientes, característica essa que é favorável em processos de biorremediação (Ramos; Gallardo, 2021; Ribeiro *et al.*, 2017; Pires, 2017).

Figura 1 - Vista geral e microscópica de um espécime de *Ulva spp.*



Legenda: Figura a. Detalhe de um espécime. Figura b. Foto da alga fixada no substrato.

Figura c. Corte transversal da fronde com duas camadas de células.

Fonte: <http://ficoherb.fcencias.unam.mx/RecursoslibrosEpub/Verdes/Tesouro/Ulva.html>.

Texto modificado pelo autor.

Segundo Sode *et al.* (2013) a *Ulva spp.* pode ser utilizada para tratar as águas residuais provenientes tanto da aquicultura quanto da agricultura, proporcionando redução nas concentrações de nutrientes antes de serem devolvidas aos rios e oceanos. Porém, Caines e seus colaboradores (2014) contrapõem o uso de *Ulva spp.* em larga escala no sistema IMTA devido a necessidade de constante aeração acarretando em alto custo. Além disso, é importante analisar a capacidade das espécies de *Ulva* em absorver nitrito (NO₂-N) e nitrato (NO₃-N), que estão frequentemente presentes nas águas residuais da aquicultura, sendo a absorção desses elementos (NO₃-N e NO₂-N) reduzida devido à preferência pela assimilação de amônia (NH₃, NH₄⁺ e amoniacal total - TAN) (Li *et al.*, 2015).

Apesar da capacidade de biorremediação das algas pertencentes ao gênero *Ulva* ser bem descrita e apresentar aspectos relevantes que as tornam espécies promissoras nos

processos de biorremediação em ambientes aquáticos de águas salgadas, atualmente ainda existe uma carência de trabalhos que busquem avaliar a resposta morfofisiológica de indivíduos desse gênero submetidos a processos de biorremediação com concentrações distintas de nutrientes. Desta forma, a proposta do presente trabalho foi avaliar o comportamento das estruturas celulares (parede celular, cloroplastos, pigmentos e estocagem de amido) em espécimes de *Ulva ohnoi* (Hiraoka *et al.* 2004) cultivados em condições de laboratório com distinção na disponibilidade de nutrientes entre os grupos .

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento das estruturas celulares (parede celular, cloroplastos, pigmentos e estocagem de amido) em espécimes de *Ulva ohnoi* cultivados em condições de laboratório com distinção na disponibilidade de nutrientes entre os grupos.

1.1.2 Objetivos Específicos

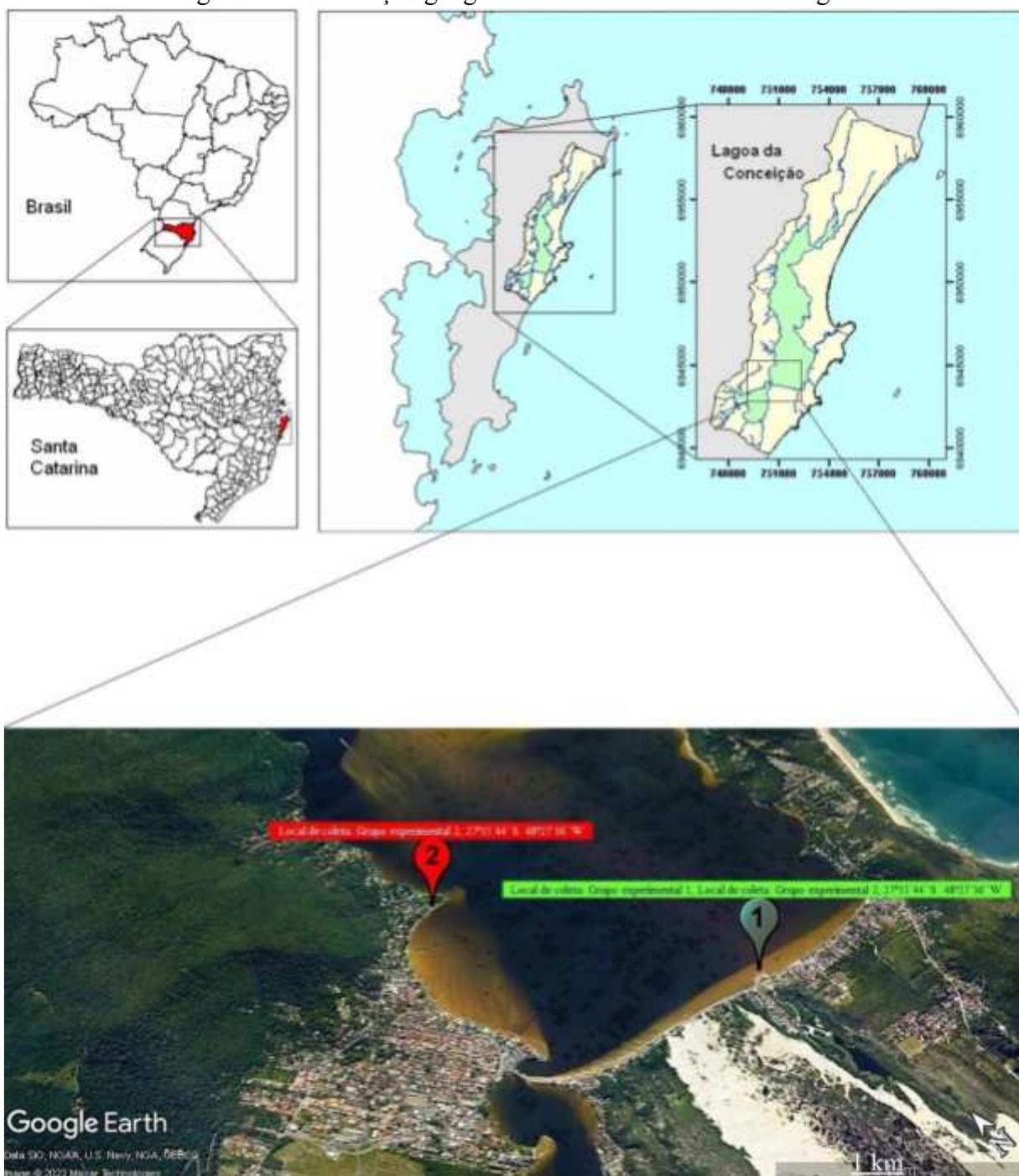
- Avaliar a taxa de crescimento dos espécimes da macroalga *U. ohnoi*.
- Caracterizar comparativamente a morfologia e organização celular dos grupos.
- Analisar a morfologia e quantificar a fluorescência dos cloroplastos.
- Quantificar os pigmentos fotossintetizantes.
- Quantificar o consumo dos principais nutrientes orgânicos.
- Quantificar os açúcares solúveis e amido.

2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa da Conceição constitui uma extensão de aproximadamente 20,7 km², sendo em formato alongado com 13,4 km de comprimento e largura variável entre 0,15 e 2,5 km. A profundidade varia entre centímetros a 8,7 m, sendo a profundidade média 1,7 m (Silva, 2013). Os locais onde foram coletadas as amostras de água são apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Localização geográfica dos locais de coletas de água



Fonte: adaptado de <https://earth.google.com/web>, 2022 & Silva, 2010.

2.2 ANÁLISE DE NUTRIENTES DA ÁGUA DO MAR

Foram selecionados 2 pontos de coleta da água Lagoa da Conceição: Próximo ao derramamento de esgoto ocorrido em janeiro de 2021 (P1) e Ponta das Almas (P2), na Ilha de Santa Catarina, Florianópolis. Os nutrientes quantificados foram nitrato, nitrito e fosfato

utilizando a metodologia descrita em "*Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*" (Federation, 2005). Vale ressaltar, que as análises dos nutrientes foram feitas no início e no final dos experimentos.

2.3 COLETA DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os espécimes de *U. ohnoi* foram provenientes do Laboratório de Cultivo de Algas – LCA/UFSC Barra da Lagoa - Florianópolis SC. Posteriormente o material foi acondicionado em caixas térmicas e transferidos para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), Departamento de Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

No laboratório, as amostras foram lavadas com água do mar filtrada e removidos possíveis contaminantes. Posteriormente os talos foram aclimatados às condições do laboratório durante 7 dias com irradiância de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), fotoper\u00edodo de 12 h, salinidade da \u00e1gua a 30 ppm (partes por milh\u00e3o), com aera\u00e7\u00e3o cont\u00ednua.

Ap\u00f3s a aclima\u00e7\u00e3o, foram selecionados 2,0 g de massa fresca da alga e cultivada em erlenmeyer de 1000ml, com \u00e1gua do mar filtrada para o grupo controle enriquecida com 4ml de von Stosch. Para os grupos experimentais foi utilizado a \u00e1gua coletada na Lagoa da Concei\u00e7\u00e3o, nestas \u00faltimas sem a adi\u00e7\u00e3o de nutrientes. Todos os grupos foram feitos em quadruplicata, e cultivados durante 7 dias. No final do experimento foram avaliadas as taxas de crescimento. Para as an\u00e1lises morfol\u00f3gicas as amostras foram processadas para microscopia de luz e eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o. Para as an\u00e1lises dos par\u00e2metros fisiol\u00f3gicos as amostras foram estocadas em freezer -80°C . Tamb\u00e9m no final do experimento, para avaliar a absor\u00e7\u00e3o de nutrientes, as amostras da \u00e1gua de cada tratamento foram coletadas e avaliadas as concentra\u00e7\u00f5es finais remanescentes de nitrato, fosfato e am\u00f4nia, conforme Ribeiro (2017).

2.4 TAXA DE CRESCIMENTO

As taxas de crescimento (TCs) foram calculadas utilizando a seguinte equa\u00e7\u00e3o: $\text{TC} [\% \text{ dia}^{-1}] = [(P_f/P_i)^{1/t} - 1] \times 100$, onde P_i = peso fresco inicial, P_f = peso fresco depois 7 dias, e t = tempo em dias experimentais (Penniman *et al.* 1986).

2.5 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ (ML) DE CAMPO CLARO

Os materiais tratados e os controles foram processados para análises citoquímicas e morfológicas em microscopia de luz. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, à temperatura de 4° C, *overnight*. Após a fixação, em temperatura ambiente, o material foi lavado com tampão fosfato, duas vezes, por 25 minutos em cada troca, e em seguida desidratado, com uma série de concentrações crescentes de etanol. A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante 12 h, posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 2- 4 µm foram distendidas em lâminas de vidro sobre gotas de água destilada e secas a 37°C por 30 minutos.

2.6 TESTES CITOQUÍMICOS

As amostras tanto dos grupos controle e tratados foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos:

A) **Azul de toluidina (AT-O)**. Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos a 2 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar a 37°C (Gordon; Mccandless, 1973).

B) **Ácido Periódico de Schiff (PAS)**. Este teste é utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 20 minutos, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 20 minutos, posteriormente lavadas em água corrente, secos ao ar a 37°C (Gahan, 1984).

2.7 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para o processamento do MET, as amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e sacarose 2%, tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4°C por 12h, seguida por quatro lavagens de 30 minutos cada, no mesmo tampão. Posteriormente,

as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (1:1), durante 4 h à temperatura ambiente (Ouriques; Bouzon, 2003). Após esse período, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, sendo mantido por 30 minutos em cada lavagem. A desidratação ocorreu por meio de uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo o material mantido 30 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante cinco dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e polimerizados em estufa a 70°C por 24 horas. Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrótomo e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 1%. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras foram congeladas e posteriormente processadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Itacorubi-Florianópolis). As análises foram realizadas em quadruplicatas.

Seguindo o protocolo proposto por Shannon (1968), para a extração dos açúcares totais foram maceradas 25mg biomassa seca de cada amostra em nitrogênio líquido, em seguida a adição de 2ml de MCW (metanol; clorofórmio; água destilada na proporção 12;5;3) e centrifugadas a 4000 rpm por minuto por 10 minutos em seguida coletado o sobrenadante. Com os *pellets* foram adicionados 2 ml de MCW e centrifugados novamente. Então juntou-se os sobrenadantes da primeira e segunda extração os quais foram reajustados para 4mL com MCW. Para o branco foram utilizados 4 ml de MCW.

Após a extração, para a primeira reação foi adicionado aos volumes de 4 ml, 1 ml de clorofórmio mais 1 ml de água destilada. Para a segunda reação, na capela, foram recolhidas da fase superior (aquosa) 1 ml de cada amostra e adicionados 2 ml de antrona 0,2%. As amostras foram então agitadas em vórtex e aquecidas em banho maria a 100°C por 3 minutos. Após esfriar em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 630 nm (Shannon, 1968).

Para o amido foram recolhidos os pellets resultantes da extração dos açúcares solúveis, adicionados 2 ml de ácido perclórico a 30% em H_2O e centrifugados a 4000 rpm por

10 minutos, em seguida o sobrenadante foi recolhido e reservado e repetido o procedimento para os pellets. Posteriormente foram juntados os sobrenadantes e centrifugados 4000 rpm por 10 minutos, foram recolhidas 1 ml de cada amostra adicionados 2 ml de antrona a 0,2%, agitado em vórtex, aquecido em banho maria a 100° C por 3 minutos, esfriado em temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro a 630 nm (McCreedy *et al.*, 1950).

2.9 PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES - CLOROFILA *a* E CAROTENÓIDES

Foram separados 0,300g de amostra de cada tratamento. Clorofila *a* foi extraído em 3ml de DMSO a 40°C, durante 30 minutos, usando um homogeneizador de tecidos de vidro (Hiscox; Israelstam, 1979), e Multi Leitor Infinite M200 TECAN (Hitachi, Co, Japão) em comprimento de onda 470 e 480 nm com leitura pontual de acordo com Wellburn (1994).

2.10 MICROSCOPIA CONFOCAL

Utilizando microscópio confocal Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Alemanha), as amostras de *U. ohnoi* foram observadas através de cortes transversais e examinadas com laser de argônio que emitia luz nos comprimentos de onda 440, 488 e 514 nm. A estrutura do cloroplasto foi observada pela auto fluorescência da clorofila, usando uma objetiva de óleo de imersão 63x/1.4-0.6 (HCX PLAPO lambda). As imagens foram processadas no programa LAS-AF Lite (Leica). Após fotografadas, a autofluorescência dos cloroplastos foi quantificada utilizando o programa de computador ImageJ.

2.11 ANÁLISE DOS DADOS

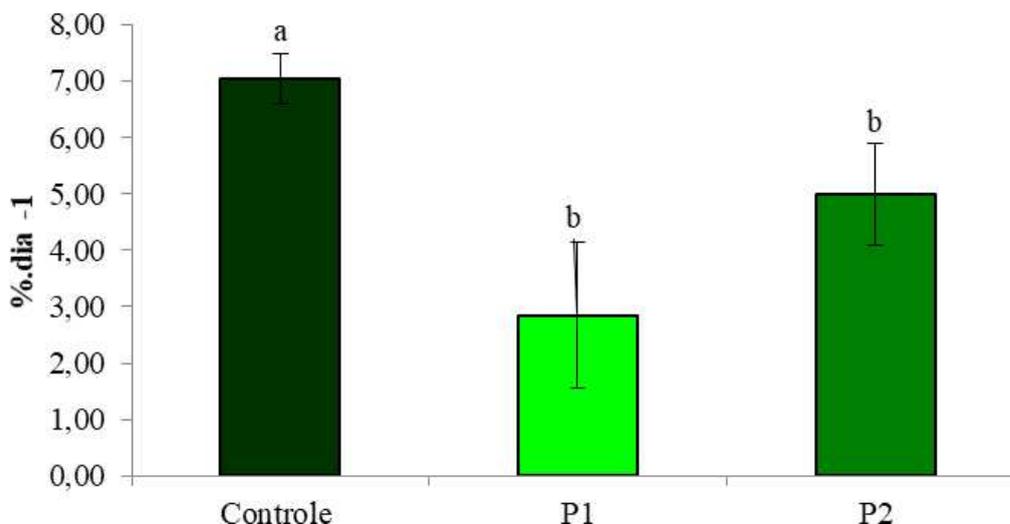
Os dados foram analisados por Análise de Variância Bifatorial (ANOVA) e o teste Tukey *a posteriori*. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando programa *Statistic* (versão 10.0), considerando significativo $p \leq 0,05$. A fórmula numérica utilizada para os cálculos e comparação dos resultados foi microgramas por grama elevado a menos 1 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

3 RESULTADOS

3.1 TAXA DE CRESCIMENTO

Durante os sete dias de cultivo, foi observado que todas as plantas nos diferentes grupos de tratamento aumentaram sua massa. No entanto, as plantas do grupo controle mostraram uma média de biomassa maior, com um valor de $7,04 (\pm 0,45) \% \text{ dia}^{-1}$ gramas. Isso contrasta com as plantas cultivadas com água da lagoa, onde o grupo P1 teve uma média de crescimento de $2,85 (\pm 1,30) \% \text{ dia}^{-1}$ e o grupo P2 teve uma média de biomassa de $4,99 (\pm 0,90) \% \text{ dia}^{-1}$. Ao analisar os resultados estatísticos, verificou-se uma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos de tratamento P1 e P2. No entanto, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento P1 e P2 (Figura 3).

Figura 3 - Taxa de crescimento da *U. ohnoi* após o tratamento de 7 dias em comparativo entre os três grupos.



Legenda: o gráfico de barras indica o ganho de biomassa úmida de *U. ohnoi* nos diferentes tratamentos, sendo $7,04 (\pm 0,45) \% \text{ dia}^{-1}$ para o grupo controle; $2,85 (\pm 1,30) \% \text{ dia}^{-1}$ para o grupo experimental P1 e $4,99 (\pm 0,90) \% \text{ dia}^{-1}$ para o tratamento P2. Acima das barras, as letras se diferem quando há diferença significativa no ganho de biomassa entre os grupos.

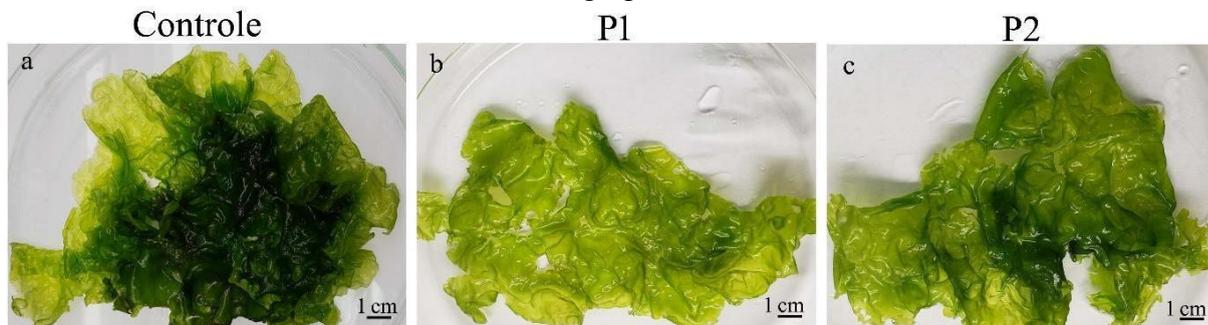
Fonte: O autor (2023).

3.2 MORFOLOGIA EXTERNA DO TALO

Após a realização do experimento, tornou-se evidente que a amostra de controle exibiu uma pigmentação verde significativamente mais intensa. A sequência de intensidade pigmentar foi observada da seguinte maneira: amostra P1 seguida por P2, sendo esta última (P2) a que

apresentou a menor intensidade de pigmentação. Além disso, no grupo controle, foi notado que os espécimes apresentaram talos mais densos, como ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Morfologia externa do talo de *U. ohnoi* após os cultivos em comparativo entre os três grupos,



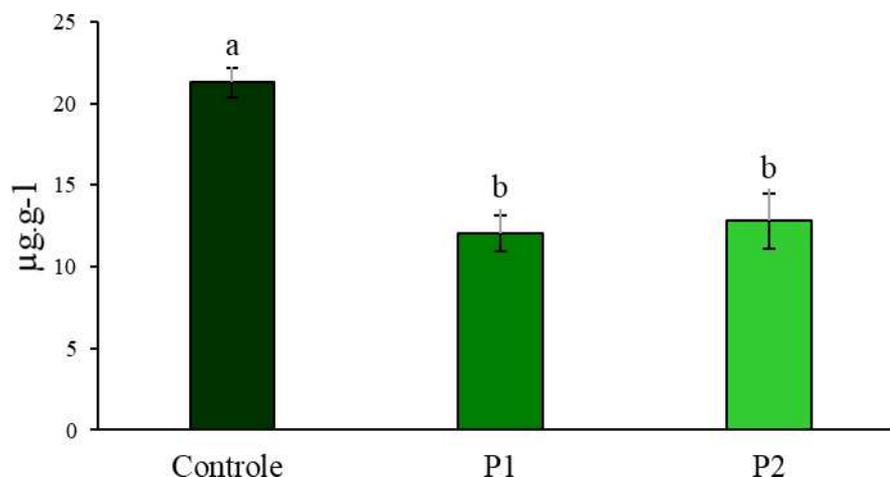
Legenda: Figura *a* representa um espécime de *U. ohnoi* do grupo controle. Figura *b* representa um espécime de *U. ohnoi* do grupo tratado P1. Figura *c* representa um espécime de *U. ohnoi* do grupo tratado P2. Estas são fotos em tamanho real com intuito de demonstrar as diferenças visíveis a olho nú entre os grupos.

Fonte: O autor (2023).

3.3 PIGMENTOS

A avaliação das taxas de concentração dos pigmentos fotossintetizantes revelou resultados de relevância marcante. Tanto para a clorofila *a* conforme representado na figura 5 quanto para os carotenóides conforme ilustrado na figura 6, o grupo controle demonstrou uma concentração significativamente superior em comparação aos grupos sujeitos a tratamentos específicos. Surpreendentemente, entre os grupos que foram submetidos a diferentes tratamentos (P1 e P2), não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação à concentração tanto da clorofila *a* quanto dos carotenóides. Isso indica que, apesar das variações nos tratamentos aplicados, esses grupos apresentaram respostas fotossintéticas semelhantes em termos de concentração de pigmentos.

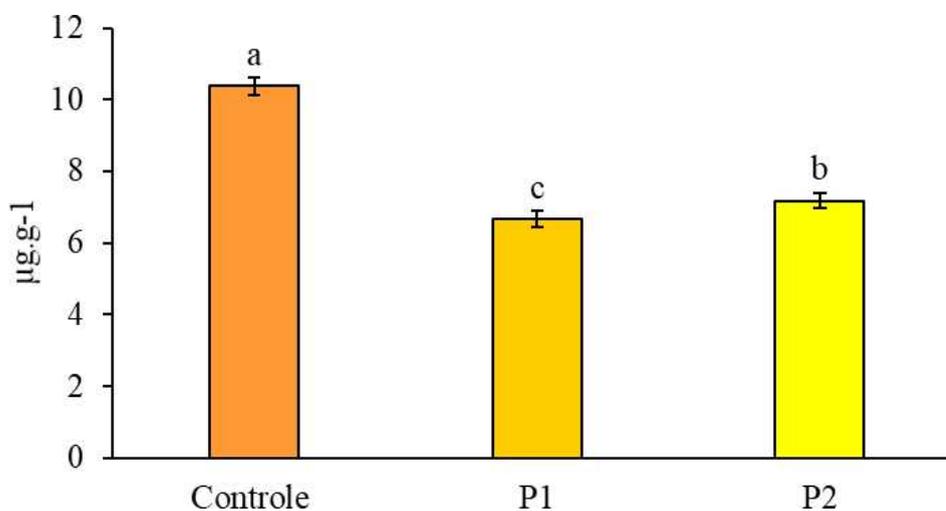
Figura 5 - Taxa de concentração de clorofila *a* em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em comparativo entre os três grupos.



Legenda: o gráfico indica a taxa de clorofila *a* em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) medidos após os sete dias de cultivo. A taxa de clorofila *a* para o grupo controle foi de 21,26 ($\pm 0,9$), para o grupo tratado P1 foi de 12,1 ($\pm 1,1$) e para o grupo tratado P2 foi de 12,8 ($\pm 1,7$). Acima das barras, letras se diferem quando há diferença significativa na taxa de clorofila *a* entre os grupos.

Fonte: O autor (2023).

Figura 6 - Taxa de concentração de carotenóides em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em comparativo entre os três grupos.



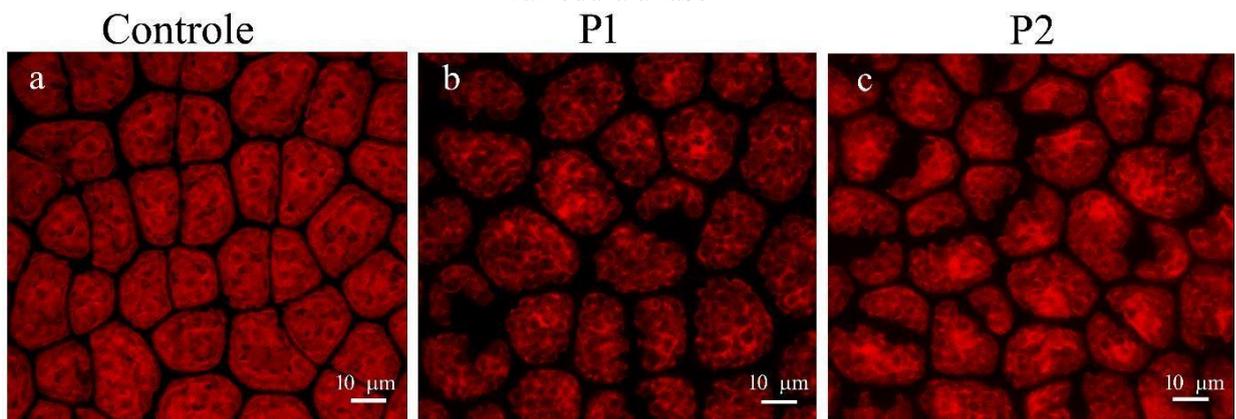
Legenda: o gráfico indica a taxa de carotenóides em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) medidos após os sete dias de tratamento. A taxa de carotenóides para o grupo controle foi de 10,37 ($\pm 0,23$), para o grupo tratado P1 foi de 6,68 ($\pm 0,22$) e para o grupo tratado P2 foi de 7,18 ($\pm 0,21$). Acima das barras, as letras se diferem quando há diferença significativa na taxa de carotenóides entre os grupos.

Fonte: O autor (2023).

3.4 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Na análise através da microscopia confocal (Figura 7), destacou-se a observação da autofluorescência dos cloroplastos. Esse destaque é especialmente relevante devido à característica desse gênero (*Ulva*), no qual cada célula possui um cloroplasto que ocupa uma parcela significativa do espaço intracelular. O propósito subjacente a essa técnica era duplo: observar a distribuição da fluorescência e quantificar suas taxas. Nesse contexto, torna-se notável que as taxas de fluorescência se mostraram distintas entre os grupos avaliados. O grupo controle revelou a taxa mais alta, seguido pelos tratamentos P2 e P1, conforme é possível correlacionar com os dados apresentados na figura 8. Vale mencionar que a quantificação precisa da autofluorescência foi realizada por intermédio do software Image J, reforçando a fidedignidade desses resultados.

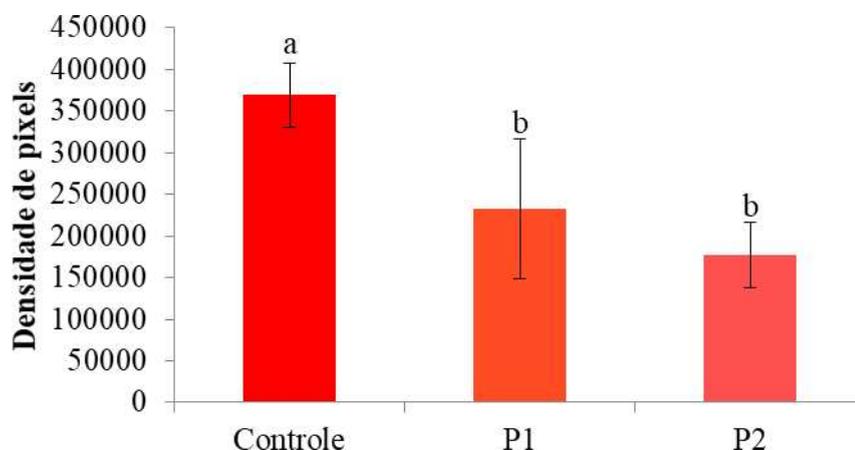
Figura 7 - Autofluorescência dos cloroplastos de *U. ohnoi* no microscópio confocal de varredura a laser



Legenda: Observe que o controle (a) apresentou intensa fluorescência em toda superfície celular. Quando comparado aos tratados (b e c) *U. ohnoi*.

Fonte: o autor (2023).

Figura 8 - Densidade de pixels por μm^2 de cloroplasto de *U. ohnoi* através de análise das imagens pelo programa Image J.



Legenda: Densidade de pixels por μm^2 de cloroplasto de *U. ohnoi* através de análise das imagens pelo programa Image J. Valores apresentados de acordo com a média da intensidade de fluorescência de cloroplasto ($n=100$) e intervalo de confiança para o nível de significância de $p<0,05$. As barras verticais indicam os valores máximo e mínimo observados. Acima das barras, as letras se diferem quando há diferença significativa na densidade de pixels entre os grupos.

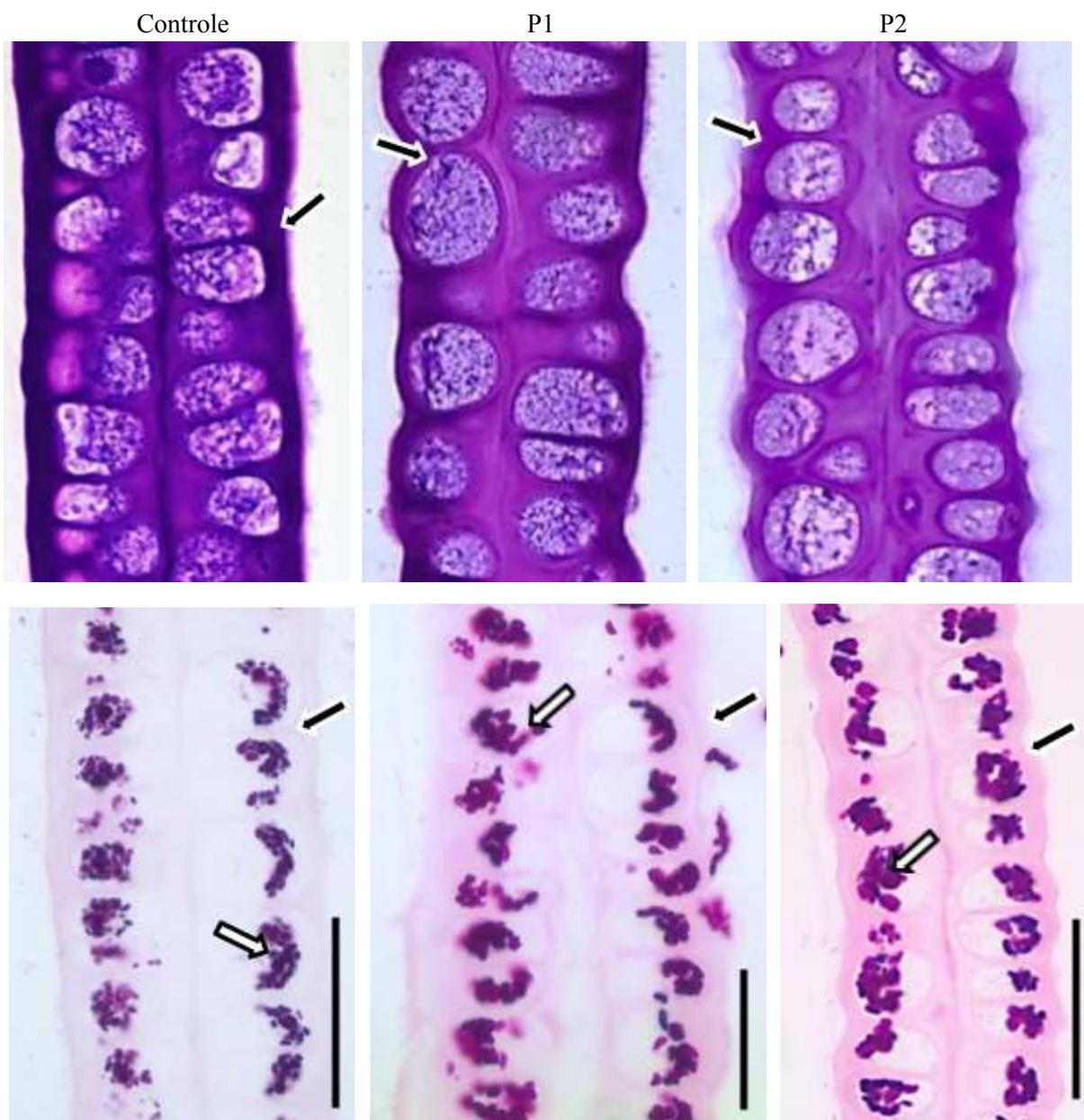
Fonte: o autor (2023).

3.5 MICROSCOPIA DE LUZ

As seções transversais de *U. ohnoi* exibiram a característica estrutural do talo da espécie, que consiste em duas camadas simples de células cúbicas. Ao realizar testes histoquímicos, as seções transversais dos talos que foram coradas com ATO revelaram uma reação metacromática na parede celular, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. Em contraste, o citoplasma apresentou predominantemente uma reação ortocromática com um aspecto granuloso (Figura 9 a - c). A parede celular das amostras tratadas com água dos pontos P1 e P2 demonstrou um notável espessamento em comparação com o grupo controle.

Nas seções transversais dos talos corados com PAS, uma reação positiva foi observada na parede celular das células de todos os grupos, devido a presença de polissacarídeos neutros que constituem a celulose. Porém, a coloração ficou mais intensa no grupo P1 e P2 (Figuras 9 d - f). Além disso, essa mesma reação foi evidente no citoplasma, com a presença de grãos de amido nos cloroplastos (Figuras 9 d - f). Ficou evidente que os grãos de amido nos grupos tratados possuíam um diâmetro maior, distribuição irregular e uma quantidade superior em comparação com o grupo controle.

Figura 9 - Microscopia de Luz (ML) das secções transversais de *U. ohnoi* coradas com ATO e PAS após os tratamentos.



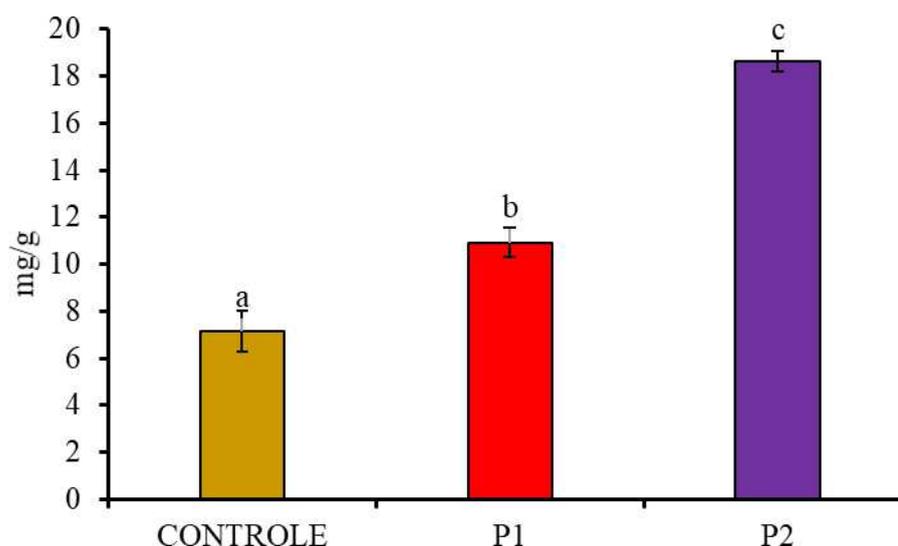
Legenda: Figuras 9 a – c. representam os cortes transversais corados com ATO, das quais figura representando o grupo controle, b o grupo tratado P1 e c o grupo tratado P2. As setas pretas indicam a parede celular interna e externa, letras v indicam o vacúolo com granulosidade distribuída. Amostras coradas com PAS Figuras 9 d - f. apresentaram reação positiva na parede celular e principalmente o acúmulo de grãos de amido preenchendo maior parte do conteúdo citoplasmático que são indicados pelas setas brancas. Escalas de 50 μm .

Fonte: o autor (2023).

3.6 AMIDO E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A análise dos gráficos referente aos açúcares solúveis totais oferece informações reveladoras sobre os efeitos do cultivo de plantas com água proveniente da Lagoa, especificamente nos pontos P1 e P2 que também mostraram diferença significativa entre si, com concentração maior em P2 (Figura 10). Além disso, observou-se que a quantidade de açúcares solúveis totais também apresentou uma variação significativa (Figura 11) onde a concentração foi maior nos espécimes dos grupos P1 e P2. Ambos os resultados revelaram diferenças estatísticas altamente relevantes entre os três grupos analisados, indicando que os efeitos das diferentes fontes de água sobre a concentração de amido e açúcares solúveis são estatisticamente significativos.

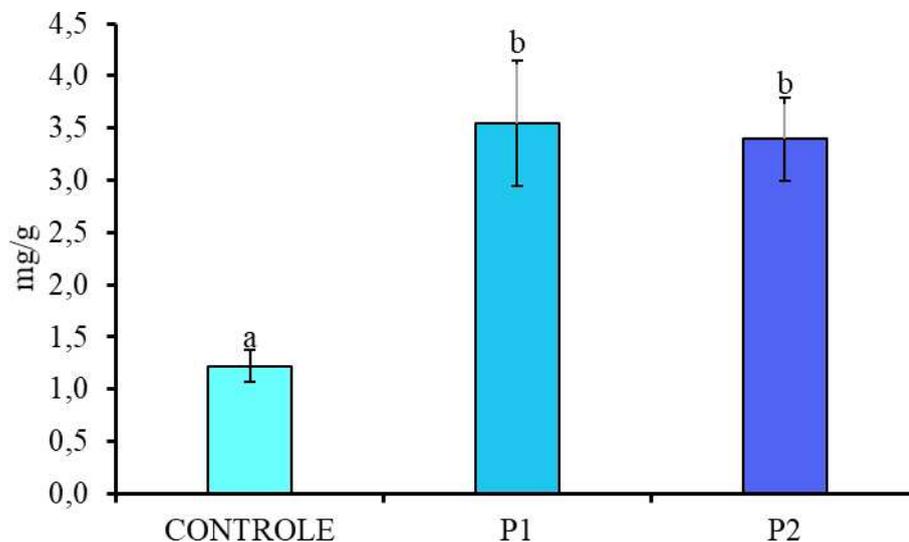
Figura 10 - Taxa de concentração de amido em miligramas por gramas do peso seco das amostras



Legenda: quantificação de amido de acordo com peso seco, demonstrado em miligramas por gramas. O grupo controle apresentou uma média de 7,15 (\pm 0,87) mg/g de amido, seguido em ordem crescente pelo grupo tratado P1 com média de 10,92 (\pm 0,64) mg/g e tratado P2 com média de 18,63 (\pm 0,41) mg/g de amido. As barras verticais indicam os valores máximo e mínimo observados. Acima das barras, as letras se diferem quando há diferença significativa na concentração de amido entre os grupos.

Fonte: o autor (2023).

Figura 11 - Taxa de concentração de açúcares solúveis totais em miligramas por gramas considerando o peso seco das amostras



Legenda: quantificação dos açúcares solúveis totais levando em consideração o peso seco das amostras. O grupo controle apresentou uma média de 1,22 ($\pm 0,15$) mg/g obtendo diferença significativa quando comparado com os grupos trata dos P1 e P2 que apresentaram uma média de 3,55 ($\pm 0,60$) e 3,39 ($\pm 0,40$) respectivamente. Os grupos tratados P1 e P2 não apresentaram diferença significativa entre si. As barras verticais indicam os valores máximo e mínimo observados. Acima das barras, as letras se diferem quando há diferença significativa na concentração de amido entre os grupos.

Fonte: o autor (2023).

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

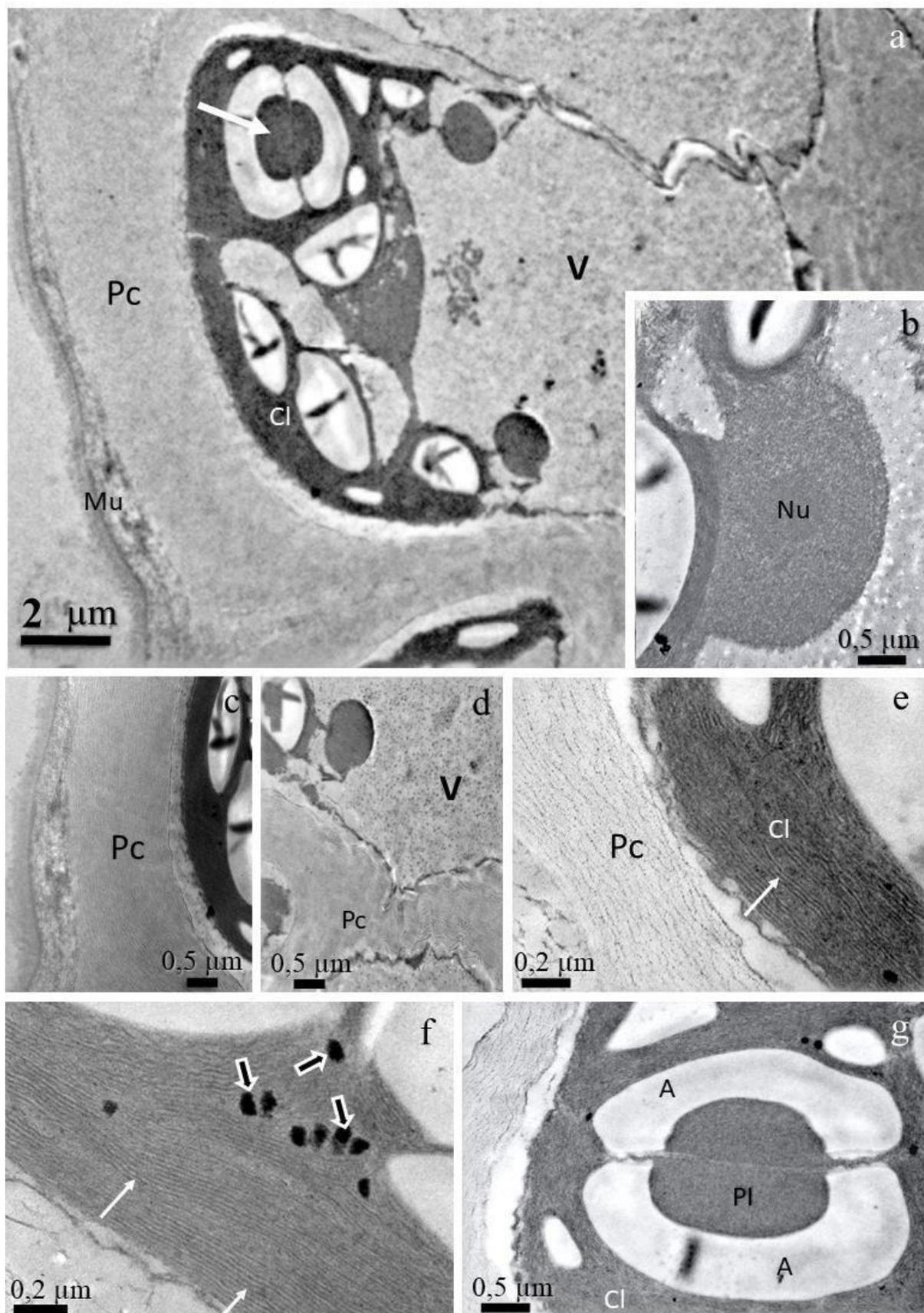
A análise ultraestrutural das células das amostras do grupo controle, quando observadas em seção transversal, revelou a presença de paredes celulares periféricas espessas (Figura 12a). Essas paredes são compostas por microfibrilas dispostas de forma concêntrica e imersas em uma matriz amorfa. Esta parede celular é coberta por uma fina camada de mucilagem amorfa (Figuras 12 c-e), a qual envolve a superfície do talo. Nessas células, é perceptível a presença de duas regiões nitidamente diferenciadas no citoplasma. A região apical é destacada pela presença proeminente de um único cloroplasto de dimensões consideráveis, enquanto a porção basal é ocupada por um grande vacúolo (figura 12a). O núcleo, encontra-se situado entre o cloroplasto e o vacúolo (Figura 12 b). Este núcleo revela uma organização na qual o nucléolo ocupa uma posição central, cercado por uma cromatina densa e homogênea (Figura 12 b).

O cloroplasto, sem dúvida, emerge como a organela proeminente nesses tipos celulares, apresentando uma estrutura rica em detalhes (Figuras 12 a, c, e - f). Sua morfologia é caracterizada por inúmeros tilacóides que se estendem de forma paralela ao longo de toda a

extensão do cloroplasto (Figuras 12 e-f). Frequentemente, esses tilacóides se agrupam formando granum. Em meio aos tilacóides, é possível visualizar plastoglóbulos e diversos grãos de amido (figuras 12 a, g).

Uma característica notável é a presença marcante de um pirenóide proeminente, cercado por grãos de amido. Essa configuração é observada na maioria dos cloroplastos analisados, destacando a importância do pirenóide no armazenamento e mobilização de amido dentro da célula (Figura 12 g).

Figura 12 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U. ohnoi* do grupo controle.

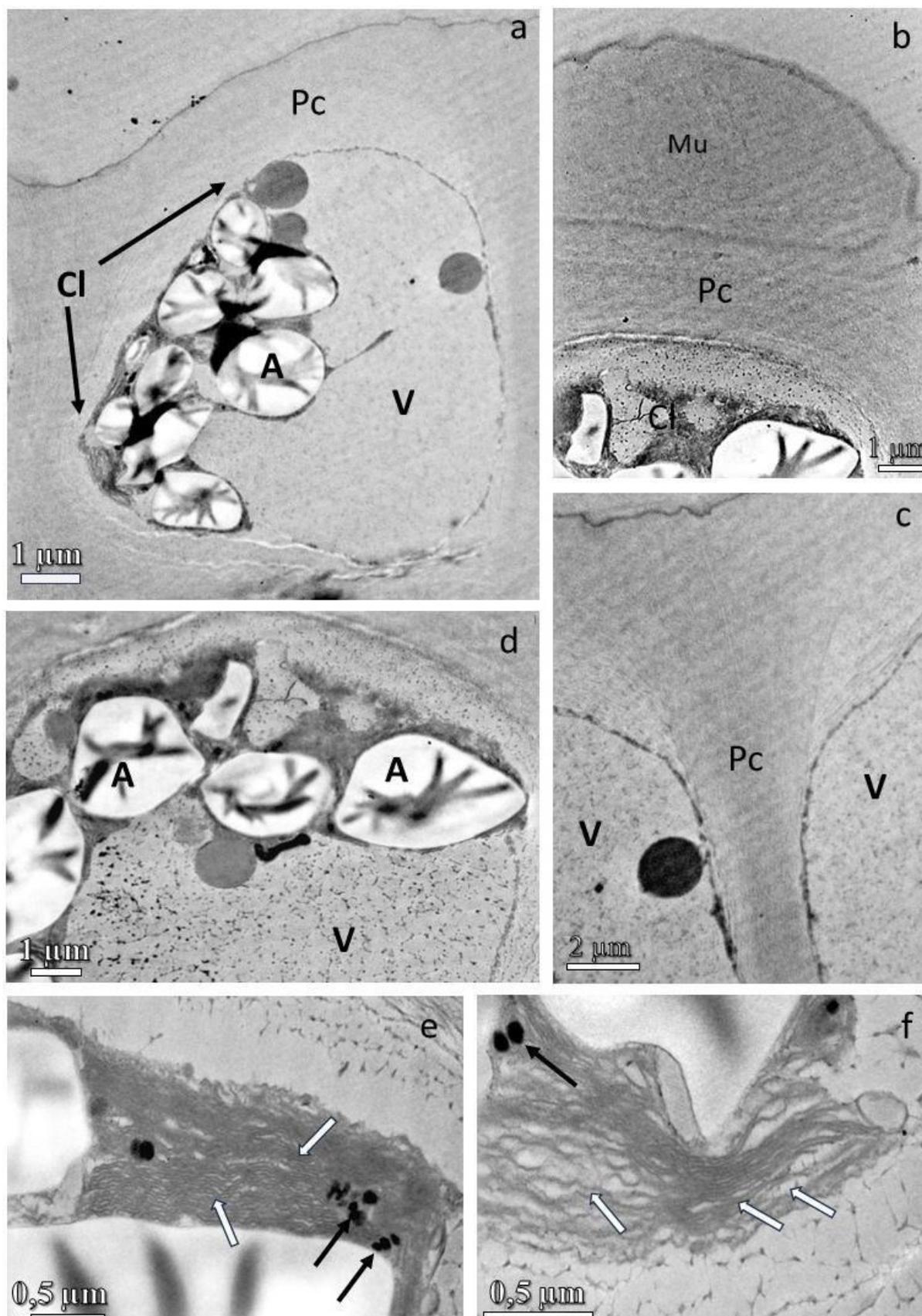


Legenda: A figura 12 a apresenta uma vista geral da célula, na qual é possível observar a parede celular (**Pc**), o cloroplasto (**Cl**), os grãos de amido (**A**) e o pirenóide (**Pi**). A figura **b** indica o núcleo celular (**Nu**), sendo a porção central mais escura o nucléolo. As figuras **c-e** fornecem uma visão mais ampliada da parede celular (**Pc**), o vacúolo (**V**) e a membrana dos tilacóides, indicada pela seta branca na figura **e**. A figura **f** mostra as membranas dos tilacóides, indicadas pelas setas brancas, e os plastoglóbulos, indicados pelas setas pretas. A figura **g** fornece uma visão ampliada de uma porção do cloroplasto (**Cl**), na qual é possível observar de forma mais detalhada os pirenóides (**Pi**) envoltos por grãos de amido (**A**).

Fonte: o autor (2023).

Quando observadas no microscopia eletrônica de transmissão (MET) as seções transversais das amostras do grupo tratado P1 apresentaram células com paredes celulares espessas (Figura 13 a). Estas paredes são compostas por microfibrilas dispostas de forma concêntrica e cobertas por uma camada espessa de mucilagem amorfa (Figura 13 b). Esta camada de mucilagem envolve toda a superfície do talo. Entre as células a parede celular é mais fina (Figura 13 c). Quando observado o interior celular, é perceptível a presença de duas regiões nitidamente diferenciadas no citoplasma (Figura 13 a), na qual a região apical destaca-se pela presença proeminente de um único cloroplasto de dimensões consideráveis (Figuras 13 a e d), enquanto a porção basal é ocupada por um grande vacúolo (Figura 13 a). Nestes cloroplastos predominaram numerosos grãos de amido, de tamanhos variáveis, que preenchem a maior parte do conteúdo plastidial, com pouco espaço disponível para os tilacóides e o estroma (Figuras 13 a, e). Os tilacóides são reduzidos em número e quando observados apresentaram distribuição paralela levemente ondulada, raramente formando granum. (Figuras 13 e, f). Em meio aos tilacóides, foi possível observar grupos de plastoglóbulos (Figuras 13 e, f). Os vacúolos apresentaram conteúdo levemente granular (Figuras 13 d) Corpos esféricos, homoganeamente elétrons densos, foram observados no interior dos vacúolos (Figuras 13 a, c, d).

Figura 13 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U. ohnoi* do grupo tratado P1.



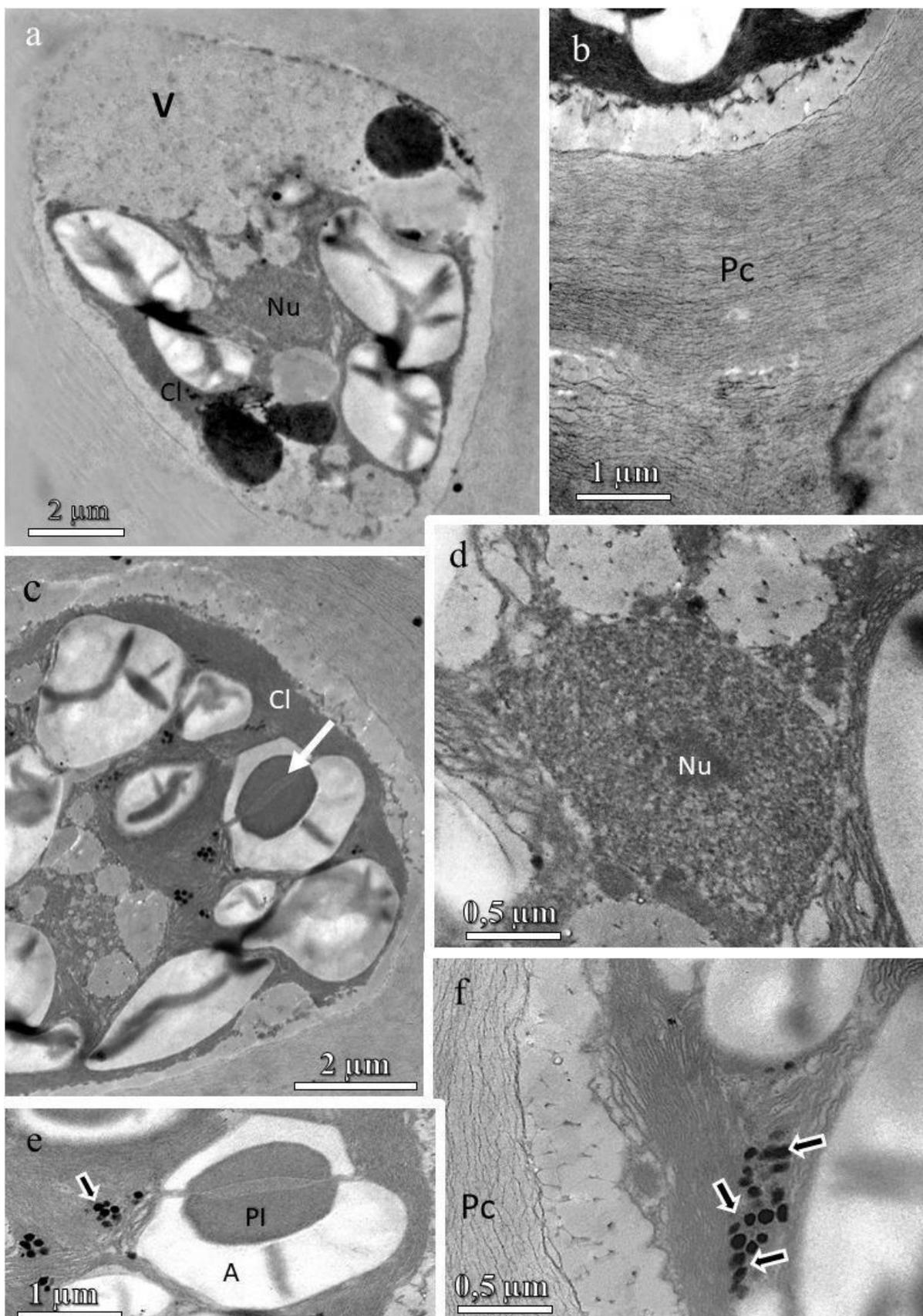
Legenda: A figura a apresenta uma vista geral da célula, na qual é possível observar a parede

celular (**Pc**), o cloroplasto (**Cl**), os grãos de amido (**A**) e o vacúolo (**V**). A figura **b** indica a presença de mucilagem (**Mu**) logo acima da parede celular (**Pc**). As figuras **c**, **d**, **e** e **f** fornecem uma visão mais ampliada da parede entre as membranas (**Pc**), o vacúolo (**V**), os grãos de amido grandes (**A**) e a membrana dos tilacóides, indicada pelas setas brancas. No interior dos tilacóides, as setas pretas indicam os plastoglóbulos.

Fonte: o autor (2023).

Observou-se em MET que as seções transversais das amostras do grupo tratado P2 também apresentaram paredes celulares espessas (Figuras 14 a-b), compostas por microfibrilas dispostas de forma concêntrica (Figura 14 b). Nessas células, também foi perceptível a presença de duas regiões nitidamente diferenciadas no citoplasma (Figura 14 a), na qual a região apical destaca-se pela presença proeminente de um único cloroplasto de dimensões consideráveis (Figuras 14 a, c), enquanto a porção basal é ocupada por um grande vacúolo com aspecto granuloso (Figura 14 a). O cloroplasto apresenta inúmeros tilacóides que se estendem de forma irregular com rica quantidade de plastoglóbulos em seu interior (Figuras 14 e-f). Em alguns cloroplastos foram observados pirenóides envoltos por grãos de amido (Figuras 14 c, e). O núcleo também foi possível de ser visualizado com um nucléolo localizado na região central (Figuras 14 d). Nesta amostra o núcleo apresentou aspecto granular (Figura 14 d).

Figura 14 – Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U ohnoi* do grupo tratado P2



Legenda: A figura a apresenta uma vista geral da célula, na qual é possível observar o cloroplasto

(Cl), o vacúolo (V) e o núcleo (Nu). A figura **b** indica a organização da parede celular (Pc). As figuras **c**, **e** e **f** fornecem uma visão ampliada do cloroplasto (Cl) indicando os pirenóides (Pi) envoltos por grãos de amido, e as setas pretas indicam os plastoglóbulos que se encontram em grande quantidade. A figura **d** mostra o núcleo com seu nucléolo na região central.

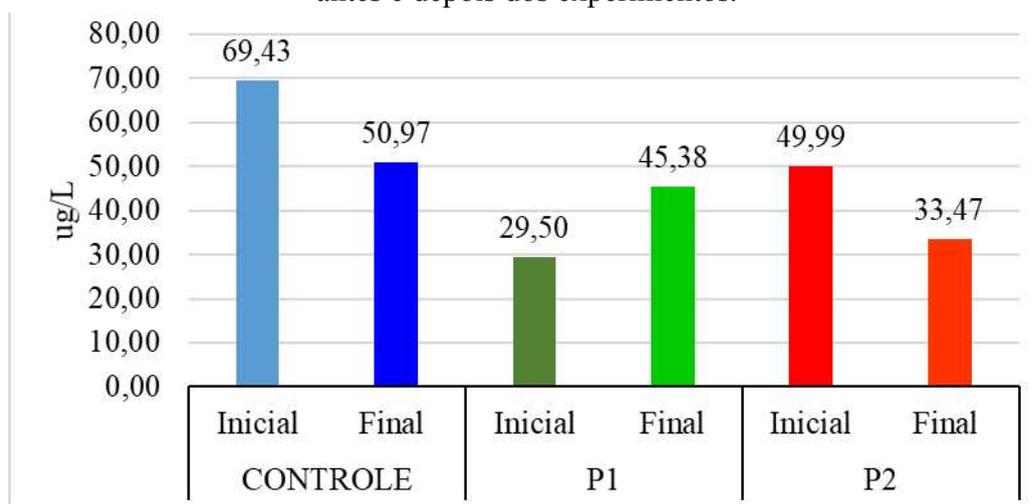
Fonte: o autor (2023).

3.8 ANÁLISE DE NUTRIENTES

3.8.1 Fosfato

Por meio das análises de nutrientes presentes na água, os quais foram quantificados em microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$), foi possível perceber que o fosfato esteve presente em maior quantidade no grupo controle, tanto no início dos experimentos ($69,43 \mu\text{g/L}$) quanto no final ($50,97 \mu\text{g/L}$) indicou que houve um consumo de fosfato. No grupo tratado P1, inicialmente apresentou $29,50 \mu\text{g}$ de fosfato por litro e após os experimentos $45,38 \mu\text{g}$ de fosfato por litro, indicando assim que houve liberação de fosfato na água por parte das algas. Já no grupo tratado P2 que inicialmente apresentou $49,99 \mu\text{g}$ de fosfato por litro e no final dos experimentos $33,47 \mu\text{g}$ de fosfato por litro, indicou que houve um consumo de fosfato, porém, esse consumo é mais baixo quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação do fosfato comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g/L}$ antes e depois dos experimentos.



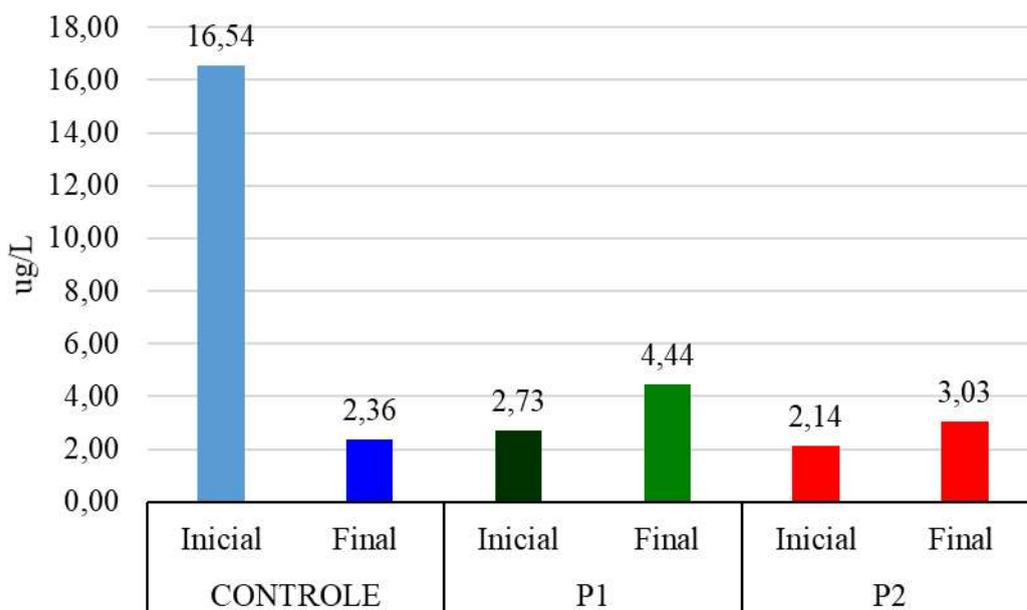
3.8.2 Nitrito

Quanto às análises de nitrito, também indicaram uma quantidade maior no grupo controle inicialmente, com 16,54 $\mu\text{g/L}$, porém após os experimentos o nível de concentração de nitrito baixou para 2,36 $\mu\text{g/L}$, indicando alta taxa de absorção de nitrato no grupo controle. Nos grupos tratados, P1 obteve 2,73 $\mu\text{g/L}$ de nitrato e P2 2,14 $\mu\text{g/L}$ de nitrato, após o tratamento P1 teve 4,44 $\mu\text{g/L}$ e P2 3,03, indicando uma leve liberação de nitrito na água em ambos os tratamentos (Figura 16).

Nas análises de nitrito, inicialmente, foi observada uma concentração maior no grupo controle, com um registro de 16,54 $\mu\text{g/L}$. Ao longo do período experimental de 7 dias, houve consumo de nitrito, atingindo 2,36 $\mu\text{g/L}$, resultando em uma remoção de 85,73% de nitrito no meio.

Nos grupos tratados (P1 e P2), as concentrações iniciais de nitrito foram relativamente baixas, com P1 apresentando 2,73 $\mu\text{g/L}$ e P2 registrando 2,14 $\mu\text{g/L}$. Ao final do experimento, o grupo P1 apresentou um aumento leve para 4,44 $\mu\text{g/L}$, enquanto o grupo P2 atingiu 3,03 $\mu\text{g/L}$. Estes resultados sugerem uma leve liberação de nitrito na água em ambos os grupos tratados no final do experimento.

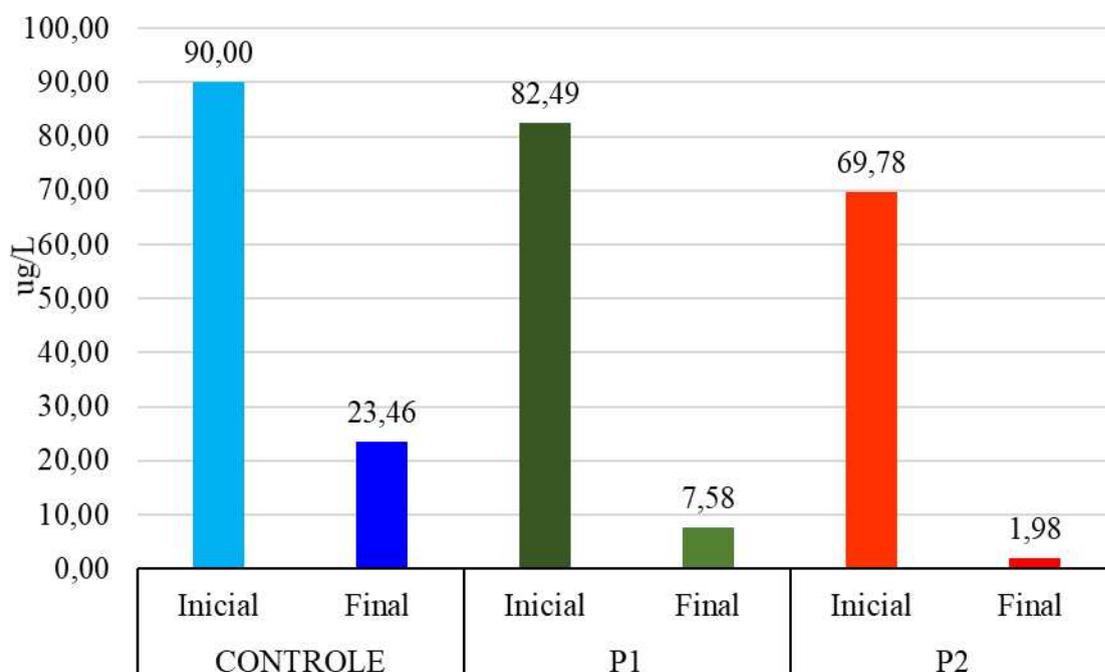
Figura 16 - Quantificação de nitrito comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g/L}$ antes e depois dos experimentos.



3.8.3 Nitrato

As análises realizadas indicaram que, ao final dos experimentos, houve uma alta absorção de nitrato por parte das algas, tanto nos grupos P1 e P2 quanto no grupo controle, conforme ilustrado na figura 17. Notavelmente, foi possível observar uma absorção de 97,2% do nitrato pelos espécimes do grupo P2 onde a concentração inicial de nitrato era de 69,78 $\mu\text{g/L}$ e, após 7 dias de cultivo a concentração final foi de 1,98 $\mu\text{g/L}$. Seguido do grupo P1, que apresentou uma remoção de 90,8%, com concentração inicial de 82,49 $\mu\text{g/L}$ enquanto o grupo de controle registrou uma absorção de 74% apesar de ter uma concentração inicial de 90,0 $\mu\text{g/L}$ mais alta.

Figura 17 - Quantificação do nitrato comparando os três grupos (controle e tratados) em $\mu\text{g/L}$ no início e no final dos experimentos.



4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento revelaram inibição na produção de biomassa de *U. ohnoi* quando se utilizou água da lagoa como meio de cultivo. Este impacto se manifestou por meio de uma redução significativa na taxa de crescimento das algas, em comparação com o grupo controle. Em um comparativo com o trabalho de Bews *et al.* (2021) é possível inferir que esse desequilíbrio no crescimento pode ser atribuído à inadequação da disponibilidade de macro e micronutrientes no meio cultivo proveniente da lagoa. Essas constatações indicam a possibilidade de que a água da lagoa apresenta uma concentração de nutrientes inferior à necessária para o crescimento desta espécie. Estes dados corroboram os resultados de análise da água nos quais as taxas de nitrito, nitrato e fosfato foram mais baixas na água da lagoa quando comparados ao meio de cultivo do controle. Cabe destacar que, dentre outros nutrientes, nitrito, nitrato e fosfato são componentes indispensáveis para a síntese de biomoléculas (Carneiro, 2021; Lovio-Fragoso, *et al.*, 2021; Pilatti *et al.*, 2016). Dentre os nutrientes quantificados o nitrato foi o mais consumido pelas algas em todos os grupos experimentais, seguido pelo fosfato nos grupos controle e P2, isso está de acordo com a literatura, que aponta que esses dois elementos são os mais requeridos pelas algas para o seu crescimento (Garcia Rodriguez, 1999; Pereira; Branco, 2007). Segundo Kumar e Bera (2020) diferentes concentrações na fonte de nitrogênio, em diferentes proporções, podem alterar as condições de crescimento. No entanto, o nitrito apresentou um comportamento diferente, pois aumentou nos grupos tratados e diminuiu no grupo controle. Uma possível explicação para isso é que o nitrito é um intermediário na nitrificação e desnitrificação, processos realizados por bactérias presentes na água da lagoa (Santos *et al.*, 2020). Assim, o nitrito pode ter sido produzido ou consumido por esses microrganismos, ou ainda, convertido em amônio.

É importante destacar que as concentrações de nutrientes presentes na água da lagoa, abaixo dos parâmetros estabelecidos pelo CONAMA, podem estar associadas a fatores como estação do ano (verão) em que foi realizada a coleta de água, e a profundidade (± 30 cm). De acordo com os estudos realizados por Barros *et al.* (2017), os níveis de fosfato e compostos nitrogenados tendem a ser mais altos no outono e inverno reduzindo no verão. Além disso, Cabral, Bercovich e Fonseca (2019) mostram em seus trabalhos que mesmo com elevado escoamento de nutrientes dos riachos urbanizados, os processos biogeoquímicos e físicos mantêm a maior parte das águas rasas da lagoa em boas condições.

Além do crescimento notou-se também que as algas do grupo controle apresentaram

uma coloração verde mais intensa do que os espécimes tratados com água da lagoa, corroborados com os resultados de quantificação dos pigmentos fotossintetizantes, em que teve maior concentração de clorofila *a* e carotenóides no grupo controle. Cabe destacar que a clorofila *a* é o principal pigmento fotossintetizante das algas verdes, responsável pela absorção da luz e pela transferência de energia para o centro de reação (Cabrera, 2023; Moustakas; Calatayud; Guidi, 2021). Desta forma, a menor concentração destes pigmentos nos grupos tratados, pode ser decorrente de taxas menores de nutrientes, tais como nitrato e fosfato, sendo um indicativo de que a água da lagoa afeta negativamente a produção destes pigmentos envolvidos com a fotossíntese (Cabrera, 2023; Moustakas; Calatayud; Guidi, 2021; Sousa *et al.*, 2008). Os carotenóides são pigmentos acessórios que auxiliam na captação de luz e na proteção contra o estresse oxidativo (Sousa *et al.*, 2008). O metabolismo do nitrogênio e a atividade fotossintetizante são processos interligados, e uma limitação de nitrogênio afeta a fotossíntese, especialmente a absorção de luz devido ao declínio no conteúdo da clorofila (Geider *et al.*, 1993). A limitação de nitrogênio pode estar associada a ativação e inibição de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos como o observado por Cheng *et al.* (2017). No geral, foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de clorofila *a* e a disponibilidade de nitrato e fosfato nos meios de cultura. Além disso, grupo de genes, tais como os que codificam a nitrato redutase e os envolvidos nos fotossistemas, podem ter sido regulados negativamente sob privação de nitrogênio e levando a mudanças significativas em algumas vias metabólicas, incluindo metabolismo de nitrogênio, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos (Yu, *et al.*, 2017). A compreensão dessas nuances nas respostas fotossintetizantes das algas aos diferentes tratamentos é fundamental para identificar padrões e mecanismos subjacentes que influenciam a concentração de pigmentos. Isso contribui para uma visão mais completa dos efeitos dos tratamentos sobre a fotossíntese e as taxas de crescimento.

Corroborando a quantificação dos pigmentos, foi constatado maior taxa de autofluorescência nas algas do grupo controle, em seus cloroplastos, do que os espécimes tratados com água da lagoa, indicando um reflexo da maior concentração de clorofila *a* no grupo controle, visto que esse pigmento é responsável pela emissão de fluorescência quando excitado por luz (Campostrini, 2001). A fluorescência é um fenômeno que ocorre quando parte da energia luminosa absorvida pelos pigmentos é refletida na forma de luz de comprimento de onda maior. Assim, a fluorescência pode ser usada como um indicador do estado funcional dos cloroplastos e da fotossíntese, pois maior a fluorescência indica maior quantidade de pigmentos fotossintetizantes, conseqüentemente, mais eficiente será a atividade fotossintética

(Campostrini, 2001). Pode-se inferir que a combinação da redução do fosfato e nitrato na utilização de nitrogênio e fósforo levou a uma estrutura degenerada do cloroplasto, com conteúdo reduzido de pigmento e uma menor capacidade fotossintética na macroalga.

Estas algas são caracterizadas ainda por possuírem uma parede celular, uma estrutura que confere proteção e sustentação às células vegetais e é composta principalmente por polissacarídeos, espessa-se como estratégia para reforçar a integridade celular contra possíveis danos físicos ou químicos (Le Gall, *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi observado, através do teste citoquímico com azul de toluidina, e confirmado pela microscopia eletrônica de transmissão, um aumento na espessura da parede celular nas algas cultivadas com água da lagoa. Este dado, pode ser entendido como uma resposta da alga a baixa disponibilidade dos macronutrientes nitrato e fosfato, evidenciada na análise da água. Visto que, o nitrogênio e o fósforo, são dois nutrientes essenciais e limitantes na produtividade e crescimento de algas marinhas (Suthar *et al.*, 2019).

Alguns dos polissacarídeos encontrados na parede celular do gênero *Ulva*, são celulose, ulvana e xiloglucano, sendo a ulvana constituída por ramnose, xilose, ácido glucurônico e ácido idurônico (Wahlström *et al.*, 2020). Tais componentes ácidos são detectados por meio da reação metacromática com azul de toluidina (Epstein *et al.*, 1992), o que corrobora com os resultados citoquímicos encontrados neste estudo.

O aumento da espessura da camada de mucilagem nos grupos tratados pode indicar uma resposta ao estresse ambiental junto a maior produção de ulvana, o polissacarídeo sulfatado que compõe a mucilagem, atuando como barreira física contra ameaças mecânicas e químicas (Pilatti, 2016).

Além do espessamento da parede celular, a microscopia de luz de campo claro bem como MET, revelou também aumento dos grãos de amido nos cloroplastos em comparação com as do grupo controle, corroborando com os resultados de quantificação dos açúcares solúveis totais e amido. Foi possível perceber uma diferença expressiva destas reservas energéticas maiores nos grupos tratados em detrimento ao controle. O amido é formado por um polissacarídeo e representa uma forma de armazenamento energético, seu aumento indica uma forma de acumular energia para situações de escassez ou demanda (Prabhu, *et al.*, 2019).

Os vacúolos apresentaram, predominantemente, uma mistura de grânulos com reação orto e metacromática, indicando a possível presença de compostos neutros e ácidos em seu interior. Os resultados sugeriram a presença de uma quantidade significativa de grânulos nos vacúolos das células dos grupos P1 e P2. De acordo com Ruiz *et al.* (2001) parte dessas

granulações devem ser grupos polifosfatos com características ácidas. Uma vez que esses vacúolos contendo polifosfato possuem uma pirofosfatase que bombeia prótons (Ruiz et al., 2001), V-ATPase (Ruiz et al., 2001) e fosfatase ácida (Matagne et al., 1976), os vacúolos contendo polifosfato de *Chlamydomonas* representam o compartimento lítico. O vacúolo lítico é importante para a manutenção da pressão de turgescência, armazenamento de metabólitos, sequestro de compostos xenobióticos e digestão de constituintes citoplasmáticos (Park et al., 2004). Esses vacúolos aparentemente também estão envolvidos na degradação de proteínas plastidiais (Park et al., 1999). Apesar das amostras dos grupos P1 e P2 apresentarem redução das membranas plastidiais indicando degradação dos constituintes, possivelmente nos vacúolos, a natureza destes vacúolos em *U. ohnoi* não está bem descrita.

Os cloroplastos das amostras controle apresentaram típica estrutura das algas verdes com ampla rede de tilacóides formando granum. Destacou-se a presença de plastoglóbulos e grãos de amido, e grande pirenóide. Neste grupo de algas, esta organização típica dos cloroplastos, é decorrente da disponibilidade de nutrientes presente no meio de cultivo o que resulta numa maior eficiência fotossintetizante. Porém, nas amostras dos grupos P1 e P2, os cloroplastos foram as organelas com maior alteração, decorrentes da menor disponibilidade de nutrientes. Supõem-se que sob condições de estresse compostos ricos em nitrogênio como a clorofila *a* e sistemas de membranas podem ser reutilizados na manutenção celular. Sob condições de redução de nitrato e fosfato os cloroplastos tiveram uma degradação do sistema de tilacóides ao mesmo tempo que ocorreu aumento do número de grãos de amido, estas observações também foram vistas em *Chlorella vulgaris* por Liu et al. (2022). Os plastoglóbulos são gotículas lipídicas que podem estar envolvidas na biossíntese e no transporte de lipídios no cloroplasto. A maior quantidade de plastóglóbulos nas amostras do grupo tratado P2 pode sugerir uma maior demanda ou acúmulo de lipídios nas cloroplastos, possivelmente relacionados à degradação do sistema de tilacóides.

5 CONCLUSÃO

A visualização de características morfológicas revelou que as células de *U. ohnoi* das amostras controle, com a disponibilidade de nutrientes, são bem estruturadas. Entretanto, a organização estrutural e ultraestrutural das amostras P1 e P2 cultivadas com água da lagoa, sofreram alterações morfológicas quando comparadas com as amostras controle. Estas mudanças morfofisiológicas devem ser resultantes da privação de nutrientes especialmente nitrato e fosfato. Além disso, o cultivo de *U. ohnoi* com água da lagoa provocou alterações significativas na taxa de crescimento, na pigmentação e conseqüentemente na fluorescência. Por outro lado, ocorreu um aumento das reservas energéticas como grãos de amidos e açúcares totais. Essas alterações podem ser interpretadas como efeito positivo, visto que o cultivo de algas com menor disponibilidade de nutrientes induz as algas a aumentarem as reservas energéticas que poderão ser utilizadas economicamente. Por outro lado, a utilização desta macroalga como potencial biorremediadora não foi possível caracterizar quando cultivada com a água da lagoa. Com base nos dados obtidos no presente estudo observou-se que é importante a realização de estudos complementares para o entendimento dos processos metabólicos de *U. ohnoi* com água as condições semelhantes à da lagoa, buscando entender os mecanismos envolvidos nas respostas a produção de carboidratos em condições de estresse.

6 REFERÊNCIAS

- ALGÁRIO ONLINE, 2021. Disponível em: <http://www1.ci.uc.pt/pessoal/nunogdias/algario/frameset.html> Acesso em: 12 de dez. de 2021.
- BARROS, G. D.; FONSECA, A. L. D. O.; SANTOS, A. C. D.; FONTES, M. L. S.; VARELA, A. R. D.; FRANCO, D. Nutrient distribution in a shallow subtropical lagoon, south Brazil, subjected to seasonal hypoxic and anoxic events. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 65, p. 116-127, 2017.
- BEGA, J. M. M.; OLIVEIRA, J. N. D.; ALBERTIN, L. L.; ISIQUE, W. Uso da cafeína como indicador de poluição por esgoto doméstico em corpos d'água urbanos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, p. 381-388, 2021.
- BEWS, E.; BOOHER, L.; POLIZZI, T.; LONG, C.; KIM, J. H.; EDWARDS, M. S. Effects of salinity and nutrients on metabolism and growth of *Ulva lactuca*: Implications for bioremediation of coastal watersheds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 166, p. 02-10, 2021.
- BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae**. 2. ed. [S. l.]: Prentice -Hall, 1984. 720 p. ISBN 978-0134777467.
- BUGS, L.; CUPERITINI, P.; WOLF, T.; TREICHEL, H. Uso Da Biomassa De Algas Como Biossorvente Para Remoção De Metais Pesados: Uma Revisão. **Revista Ciatic-Upf**, v. 10, p. 53-67, 2018.
- CABRAL, A.; BERCOVICH, M. V.; FONSECA, A. Implications of poor-regulated wastewater treatment systems in the water quality and nutrient fluxes of a subtropical coastal lagoon. **Regional Studies in Marine Science**, v. 29, p. 100672, 2019.
- CABRERA, H. O. **Nuevos ingredientes alimentarios a partir del alga *ulva ohnoi*: influencia de los procesos de conservación en su composición**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universitat Politècnica de Catalunya.
- CAINES, S.; MANRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, J. A.; DUSTON, J.; COREY, P.; GARBARY, D. J. Intermittent aeration affects the bioremediation potential of two red algae cultured in finfish effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 2173-2181, 2014.
- CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila *a*: considerações teóricas e aplicações práticas. **Rio de janeiro: UFNF**, 2001.
- CARNEIRO, V. A. R. **Estudos moleculares e morfológicos do gênero *Ulva L.*(Ulvales, Chlorophyta) no sudeste do Brasil**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CHENG, D.; L., D.; YUAN, Y.; ZHOU, L. L. X.; WU, T.; SUN, Y. Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella sp.* AE10 by a novel two-stage process with cell dilution.

Biotechnology for Biofuels, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

COUTINHO, P. W. R.; CADORIN, D. A.; NORETO, L. M.; GONÇALVES JR, A. C. Alternativas De Remediação E Descontaminação De Solos: Biorremediação E Fitorremediação. **Nucleus**, v. 12, p. 59-68, 2015.

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

EL GAMAL, M. **Activation of affective gambling outcome expectancies: an exploratory study**. 2010. Tese de Doutorado. University of Guelph.

EPSTEIN, J B.; SCULLY, C.; SPINELLI, J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 160-163, 1992.

FEDERATION, W. E. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. **American Public Health Association (APHA)**: Washington, DC, USA, v. 21, 2005.

GARCÍA RODRÍGUEZ, M. I. **Utilización de *Ulva* como biofiltro en acuicultura. Estudio comparativo de la retención de compuestos nitrogenados**. 1999. Tese de Doutorado. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

GAHAN, P.B. Plant histochemistry and cytochemistry, an introduction. **Academic Press, London**. 1984.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J.; GREENE, R. M.; OLAIZOLA, M. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation 1. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 6, p. 755-766, 1993.

GONCHARUK, V. V. Features of water origin on the planet earth. new approaches to the assessment of water quality. **Journal of Water Chemistry and Technology**, v. 40, p. 1-10, 2018.

GORDON, E. M., MCCANDLESS, E. L.: Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proceedings of the Nova Scotian Institute of Science**, in press, 1973.

GRECHINSKI, P. Lixo No Mar. **Revista Mosaicos: Estudos em Governança, Sustentabilidade e Inovação**. v. 2, p. 30-43, 2020.

HARTMAN, K. J.; WELLMAN, D. I.; KINGSBURY, J. W.; CINCOTTA, D. A.; CLAYTON, J. L.; ELIASON, K. M.; SMITH, D. M. A case study of a prymnesium parvum harmful algae bloom in the Ohio River drainage: Impact, recovery and potential for future invasions/range expansion. **Water**, v. 13, n. 22, p. 22-33, 2021

HIRAOKA, M.; SHIMADA, S.; UENOSONO, M.; MASUDA, M. A new green-tide-forming

alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov.(Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. **Phycological Research**, v. 52, n. 1, p. 17-29, 2004.

HIROKI, K. Fisiocologia De Invertebrados Marinhos: Resistência À Anoxia. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**. v. 28, p. 315-341, 1971.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

INYINBOR, A. A.; ADEBESIN, B. O.; OLUYORI A. P.; TABITHA, A. A.; DADA, A. O.; OREOFE, T. A. Water Pollution: Effects, Prevention, And Climatic Impact. **Water Challenges of an Urbanizing World**. v. 33, p. 33-47, 2018.

KANSAKAR, P.; HOSSAIN, F. A review of applications of satellite earth observation data for global societal benefit and stewardship of planet earth. **Space Policy**, v. 36, p. 46-54, 2016.

KUMAR, A.; BERA, S. Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 01-11, 2020.

LE GALL, H.; PHILIPPE, F.; DOMON, J. M.; GILLET, F.; PELLOUX, J.; RAYON, C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112–166, 2015.

LIU, T.; CHEN, Z.; XIAO, Y.; YUAN, M.; ZHOU, C.; LIU, G.; YANG, B. Biochemical and morphological changes triggered by nitrogen stress in the oleaginous microalga *Chlorella vulgaris*. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 01-16, 2022.

LOVIO-FRAGOSO, J. P.; DE JESÚS-CAMPOS, D.; LÓPEZ-ELÍAS, J. A.; MEDINA-JUÁREZ, L. Á.; FIMBRES-OLIVARRÍA, D.; HAYANO-KANASHIRO, C. Biochemical and molecular aspects of Phosphorus limitation in diatoms and their relationship with biomolecule accumulation. **Biology**, v. 10, n. 7, p. única, 2021.

MATAGNE, R. F.; LOPPE, R.; DELTOUR, R. Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii* biochemical and cytochemical approach with specific mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 126, p. 937–950. 1976.

MAWI, S.; KRISHNAN, S.; DIN, M. F. M.; ARUMUGAM, N.; CHELLIAPAN, S. Bioremediation potential of macroalgae *Gracilaria edulis* and *Gracilaria changii* co-cultured with shrimp wastewater in an outdoor water recirculation system. **Environmental Technology & Innovation**, v. 17, p. 01-08, 2020.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MOUSTAKAS, M.; CALATAYUD, Á.; GUIDI, L. Chlorophyll fluorescence imaging analysis in biotic and abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 01-03, 2021.

PARK, H.; EGGINK, L. L.; ROBERSON, R. W.; HOOBER, J. K.; Transfer of proteins from

the chloroplast to vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta): A path-way for degradation. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 528–538. 1999.

PARK, M.; KIM, S. J.; VITALE, A.; HWANG, I. Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. **Plant physiology**, v. 134, p. 625–639. 2004.

PEREIRA, J. L.; BRANCO, L. H. Z. Influência do nitrato e fosfato no crescimento de *Schizomeris leibleinii* Kützing (Chaetophorales, Chlorophyta). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 155-162, 2007.

PEREIRA, L. **Guia Ilustrado Das Macroalgas**. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 1.^a Edição, p.01-90, 2009.

PILATTI, F. K.; RAMLOV, F.; SCHMIDT, E. C.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; COSTA, C.; OLIVEIRA, E. R.; BAUER, C. M.; ROCHA, M.; BOUZON, Z. L.; MARASCHIN, M.. In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations. **Chemosphere**, v. 156, pág. 428-437, 2016.

PIRES, C. M. **Aproveitamento De Efluente Da Carcinicultura De *Litopenaeus vannamei* Em Sistemas Biofloco Pela Macroalga *Kappaphycus alvarezii***. 2017. 54p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

PENNIMAN, C. A.; MATHIESON, A. C.; PENNIMAN, C. E. Reproductive Phenology And Growth Of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. **Botanica Marinha**. v. 29; p. 147–154.1986.

PRABHU, M.; CHEMODANOV, A.; GOTTLIEB, R.; KAZIR, M.; NAHOR, O.; GOZIN, M.; GOLBERG, A. Starch from the sea: the green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. **Algal Research**, v. 37, p. 215-227, 2019.

RAMOS, R.; GALLARDO, S. Capacidad De Biofiltración De Nutrientes Y Crecimiento De Macroalgas Utilizando Efluentes Generados En El Cultivo Del Pez Dorado *Seriola lalandi* (Perciformes : Carangidae). **Biología Marina y Oceanografía**. v. 56, p. 13–21, 2021.

RAYMUNDO, M. S. HORTA, P. FETT, R. Atividade Antioxidante In Vitro De Extratos De Algumas Algas Verdes (Chlorophyta) Do Litoral Catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 495-503, 2004.

RIBEIRO, A. L. N.; CHIOZZINI, V. G.; BRAGA, E. S.; YOKOYA, N. S. Physiological Responses And Biofilter Potential Of *Hypnea aspera* (Rhodophyta, Gigartinales) Cultivated In Different Availabilities Of Nitrate, Ammonium, And Phosphate. **Journal of Applied Phycology**. v. 29, p. 683-694, 2017.

RIBEIRO, A. L. N.; TESIMA, K. E.; SOUZA, J.; YOKOYA, N. S. Effects Of Nitrogen And Phosphorus Availabilities On Growth, Pigment, And Protein Contents In *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**. v. 25, p. 1151-1157, 2013.

ROSSATO, A.; OLIVEIRA, P. S.; SAGRILLO, M. R. Microalgas Como Aditivos De Descontaminação De Ambientes: Uma Revisão. **Disciplinarum Scientia Naturais e Tecnológicas**. v. 22, p. 25-37, 2021.

RUIZ, F. A.; MARCHESINI, N.; SEUFFERHELD, M.; GOVINDJEE DOCAMPO, R.; The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 46196–46203. 2001.

SANTOS, E. V. M.; SILVA FILHO, H. A.; HANDDEL, A. C. V.; SOUSA, J. T. Capacidade metabólica de bactérias heterotróficas de sistemas de lodo ativados em ambientes aeróbios e anóxicos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, p. 41-50, 2020.

SAVAGE, C. Tracing the influence of sewage nitrogen in a coastal ecosystem using stable nitrogen isotopes. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 34, n. 2, p. 145-150, 2005.

SHARMA, P.; GAUR, V. K.; GUPTA, S.; VARJANI, S.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; WONG, J. W. Trends in mitigation of industrial waste: Global health hazards, environmental implications and waste derived economy for environmental sustainability. **Science of The Total Environment**, v. 811, p. 01-13, 2022.

SHANNON, L. M. Plant isoenzymes. **Annual review of plant physiology**, v. 19, n. 1, p. 187-210, 1968.

SILVA, C. F. **Estimativa da evapotranspiração na bacia da Lagoa da Conceição**. 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

SODE, S.; BRUHN, A.; BALSBY, T. J.; LARSEN, M. M.; GOTFREDSEN, A.; RASMUSSEN, M. B. Bioremediation of reject water from anaerobically digested waste water sludge with macroalgae (*Ulva lactuca*, Chlorophyta). **Bioresource Technology**, v. 146, p. 426-435, 2013.

SOUSA, M. B.; PIRES, K. M. D. S.; ALENCAR, D. B. D.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. α -and β -carotene, and α -tocopherol in fresh seaweeds. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 953-958, 2008.

SUL, J. A.; COSTA, M. F. Marine Debris Review For Latin America And The Wider Caribbean Region: From The 1970's Until Now And Where Do We Go From Here? **Marine Pollution Bulletin**. v. 54, p. 1087-1104. 2007.

SUTHAR, P.; GAJARIA, T. K.; REDDY, C. R. K. Production of quality seaweed biomass through nutrient optimization for the sustainable land-based cultivation. **Algal Research**, v. 42,

p. 01-08, 2019.

SWEETLY, D. J. Macroalgae as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal removal: a review. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 5, n. 2, p. 17-26, 2014.

WAHLSTRÖM, N.; NYLANDER, F.; MALMHÄLL-BAH, E.; SJÖVOLD, K.; EDLUND, U.; WESTMAN, G.; ALBERS, E. Composition and structure of cell wall ulvans recovered from *Ulva spp.* along the Swedish west coast. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, p. 01-09, 2020.

WANG, T.; WANG, L.; CHEN, Q.; KALOGERAKIS, N.; JI, R.; MA, Y. Interactions between microplastics and organic pollutants: Effects on toxicity, bioaccumulation, degradation, and transport. **Science of The Total Environment**, v. 748, p. 142427, 2020.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YU, C.; ZHAO, X.; QI, G.; BAI, Z.; WANG, Y.; WANG, S.; ZHOU, G. Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.