



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Andressa Cristina França

Variações morfológicas e bioquímicas em células de *Ulva ohnoi* (M.Hiraoka & S.Shimada) em resposta à exposição a diferentes concentrações de nitrato de sódio.

Florianópolis

2024

Andressa Cristina França

Variações morfológicas e bioquímicas em células de *Ulva ohnoi* (M.Hiraoka & S.Shimada) em resposta à exposição a diferentes concentrações de nitrato.

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

Orientadora: Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon.

Florianópolis – SC

2024

França, Andressa Cristina

Variações morfológicas e bioquímicas em células de *Ulva ohnoi* (M.Hiraoka & S.Shimada) em resposta à exposição a diferentes concentrações de nitrato. / Andressa Cristina França ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon, 2024.
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Morfologia celular. 3. Bioquímica celular. I. Bouzon, Zenilda Laurita . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Andressa Cristina França

Variações morfológicas e bioquímicas em células de *Ulva ohnoi* (M.Hiraoka & S.Shimada) em resposta à exposição a diferentes concentrações de nitrato.

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

Prof.(a), Dr.(a) Evelise Maria Nazari

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Marcelo Maraschin

Universidade Federal de Santa Catarina

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 Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho às mulheres: aquelas que abriram caminho antes de mim, as que me apoiam agora e as que ainda estão por vir. Especialmente, à minha mãezinha Elsa, meu Amor Rafaela e minha orientadora, a incrível e inspiradora Z. Sem a presença e o apoio delas, este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e aos docentes do programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento pela construção de um programa de tamanha relevância científica. Sou grata pelo conhecimento fornecido e pelas valiosas trocas.

Aos meus colegas de turma, que, mesmo sendo a primeira turma presencial após os tempos pandêmicos e sombrios, conseguimos construir uma rede de apoio e conhecimento. Em especial aos amigos Sara, Nerveson e Victor, foi uma honra e um prazer dividir esse tempo com vocês.

Agradeço ao FUMDES/UNIEDU pelo suporte financeiro que possibilitou esta pesquisa.

Agradeço ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) por manter ativo esse laboratório tão essencial para o avanço da pesquisa na universidade.

Agradeço ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela oportunidade de fazer as fotos mais incríveis que já fiz na vida.

Agradeço ao professor Dr. Marcelo Maraschin, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), por ceder o laboratório para as análises de carboidratos, especialmente à pesquisadora Dra. Eva Regina, pela assistência nas análises e pelas trocas durante nossas reuniões. Você foi fundamental para minha pesquisa e continua sendo uma inspiração!

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), Alessandro, Yasmin e Felipe, que sempre estiveram presentes nos experimentos, foi uma experiência enriquecedora compartilhar o mestrado com vocês.

Aos amigos que foram tão importantes e necessários, André Akira, Gabriel Cipriani, Leonardo Arthur, Matheus Paqui, Natalia Valério, Tainara Mello e Yara Pinheiro. Obrigada por serem meu lar e abrigo, festa e loucura. Eu amo vocês e os levarei comigo para sempre!

À Dra. Carmen Simioni, pela generosidade em compartilhar seu conhecimento, auxiliando efetivamente nesta pesquisa e na minha formação como cientista. Você é inspiradora!

A professora Dra. Luciane Ouriques, pelo incentivo e pelas trocas!

À professora Dra. Z, maravilhosa e incrível, obrigada por tanto, por me aceitar e acolher, e por me mostrar que a ciência vale a pena. Minha trajetória com certeza foi e será diferente após ser

atravessada por sua inteligência, ética, humanidade e carinho. É uma honra ter compartilhado esse momento importante contigo.

À minha família, que me proporcionou as condições necessárias para este processo. Mãezinha, se eu estou aqui, é por nós. Obrigada por todo apoio, amor e cuidado nesses tempos, inclusive com os cachorros. Amo você.

Ao meu grande amigo e irmão, Wuel Maia, obrigada pelo apoio constante, pelos conselhos e por todos esses anos de dedicação e amizade. Obrigada pela paciência e pelos cuidados com os dogs, você é fundamental para minha trajetória. Amo você!

Ao meu amor, namorada e companheira Rafaela, que tanto me apoiou, incentivou e cuidou para que eu pudesse passar por essa fase. Foi incrível me tornar mestre ao seu lado. Obrigada por ser meu porto seguro e cuidar tão bem da nossa família e do nosso ninho. Amo você!

Agradeço também a todas as outras pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Se você me ajudou, saiba que sou muito grata!

Por último, mas não menos importante, agradeço a mim mesma por não ter desistido, apesar de todas as dificuldades. Estou escrevendo isso para me lembrar, quando ler, que eu consigo!

Na vida, não existe nada a se temer, mas a se compreender.

Marie Curie

RESUMO

Ulva ohnoi (M. Hiraoka & S. Shimada) é uma alga verde de importância econômica e ambiental na biotecnologia de produtos e na absorção de macronutrientes em ambientes eutrofizados. O nitrato é um íon naturalmente presente no ambiente, mas quando liberado em grandes quantidades por atividades antrópicas é causador de processos de eutrofização. Além disso, é constituinte importante de vários processos e estruturas celulares, sendo crucial em processos biotecnológicos. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos do nitrato de sódio no cultivo de *U. ohnoi*, com foco nas mudanças morfofisiológicas celulares induzidas por diferentes concentrações desse composto, visto a necessidade de esclarecer as respostas específicas a esse macronutriente. Foram cultivados 1.0 g de alga fresca em frascos Erlenmeyer (1L), em concentrações de 0; 4; 25; 50 e 100 mM de nitrato de sódio ao longo de 7 dias. Após o cultivo, foram realizadas análises de taxa de crescimento, pigmentos fotossintetizantes, citoquímica (microscopia de luz), fluorescência dos cloroplastos (microscopia confocal), organização subcelular (microscópio eletrônico de transmissão) e quantificação de amido e açúcares totais. Os resultados revelaram que as concentrações de 25 e 50 mM de nitrato proporcionaram um aumento na taxa de crescimento, produção de pigmentos fotossintetizantes e autofluorescência dos cloroplastos, os quais apresentavam um elevado número de tilacóides. Em contraste, a produção de grãos de amido foi reduzida nessas condições. Na ausência de nitrato (0 mM), observou-se uma maior produção de grãos de amido e um espessamento na parede celular, indicando respostas ao estresse celular. Conclui-se que as concentrações intermediárias (25 e 50 mM) favorecem o incremento na biomassa de *U. ohnoi* e a eficiência fotossintética, sendo o tratamento com 25 mM o que apresenta melhores resultados para otimização destes parâmetros. Entretanto, para a produção de amido, a ausência de nitrato é mais eficaz. Estes achados fornecem informações valiosas para otimizar o cultivo de *U. ohnoi* em contextos tecnológicos, como a produção de alimentos e bioprodutos bem como em ambientes afetados pela poluição de nitrato, ou ainda, processos integrados em que a alga possa ser aplicada em ambas as finalidades.

Palavras-chave: Citoquímica, Microscopia eletrônica de transmissão, Cloroplasto, Amido, Morfologia subcelular.

ABSTRACT

Ulva ohnoi (M. Hiraoka & S. Shimada) is a green alga of economic importance in biotechnology for product development and the absorption of macronutrients in eutrophic environments. Nitrate is a naturally occurring ion in the environment, but when released in large quantities due to human activities, it causes eutrophication. Moreover, it is a crucial component in various cellular processes and structures, making it vital in biotechnological applications. This study aimed to evaluate the effects of sodium nitrate on the cultivation of *U. ohnoi*, focusing on the cellular morphophysiological changes induced by different concentrations of this compound, given the need to clarify the specific responses to this macronutrient. Fresh algae (1.0 g) were cultivated in 1L Erlenmeyer flasks with sodium nitrate concentrations of 0, 0.4, 25, 50, and 100 mM over seven days. After cultivation, analyses were conducted on growth rate, photosynthetic pigments, cytochemistry (light microscopy), chloroplast fluorescence (confocal microscopy), subcellular organization (transmission electron microscopy), and quantification of starch and total sugars. The results showed that nitrate concentrations of 25 and 50 mM led to increased growth rates, production of photosynthetic pigments, and chloroplast autofluorescence, with chloroplasts exhibiting a higher number of thylakoids. In contrast, starch grain production was reduced under these conditions. In the absence of nitrate (0 mM), there was a higher production of starch grains and a thickening of the cell wall, indicating cellular stress responses. It was concluded that intermediate concentrations (25 and 50 mM) enhance the biomass and photosynthetic efficiency of *U. ohnoi*, with 25 mM being the most effective for optimizing these parameters. However, for starch production, the absence of nitrate proved to be more effective. These findings provide valuable information for optimizing the cultivation of *U. ohnoi* in biotechnological contexts, such as food and bioproduct production, as well as in environments affected by nitrate pollution, or in integrated processes where the algae could be applied for both purposes.

Key-words: Cytochemistry, Transmission Electron Microscopy, Chloroplast, Starch, Subcellular Morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.....	20
Figura 2 - Vista superficial em microscopia de luz de campo claro de um espécime de <i>Ulva ohnoi</i>	26
Figura 3 - Taxa de crescimento da <i>U. ohnoi</i> após a exposição por sete dias à diferentes concentrações de nitrato.....	27
Figura 4 - Morfologia externa do talo de <i>U. ohnoi</i> após o período experimental.....	28
Figura 5 - Taxa de concentração de clorofila a em microgramas por grama ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ao final do experimento.....	29
Figura 6 - Taxa de concentração de carotenóides em microgramas por grama ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ao final do experimento.....	30
Figura 7 - Vista superficial em microscopia de luz de campo claro do talo de <i>U. ohnoi</i> com material fresco e material fresco tratado com lugol.....	32
Figura 8 - Microscopia de luz de campo claro de secções transversais do talo de <i>U. ohnoi</i> , submetidas aos testes citoquímicos Azul de Toluidina e Ácido Periódico de Schiff.....	34
Figura 9 - Autofluorescência dos cloroplastos de <i>U. ohnoi</i> no microscópio confocal de varredura a laser.....	36
Figura 10 - Representação gráfica da média da densidade de pixels por μm^2 em cloroplastos de <i>U. ohnoi</i> ao final do período experimental.....	36
Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo controle negativo.....	38
Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo controle positivo (0,04 mM de NO_3).....	40
Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo tratado com 25 mM de nitrato.	42

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo tratado com 50 mM de nitrato.....	44
Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de <i>U. ohnoi</i> do grupo tratado com 100 mM de nitrato.....	46
Figura 16 - Taxa de concentração de amido em miligramas por gramas do peso seco das amostras ao final do período experimental.....	47
Figura 17 - Taxa de concentração de açúcares solúveis totais em miligramas por gramas considerando o peso seco das amostras ao final do período experimental.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ G - Microgramas

ANOVA - análise de variância unifatorial

AT-O - Azul de toluidina

C- Cloroplasto

CCA - Centro de ciências agrárias

Cl *a* - clorofila *a*

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

DP - Desvio padrão

LABCEV - Laboratório de biologia celular vegetal

LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LCM - Laboratório de Camarões Marinhos

LCME - Laboratório central de microscopia eletrônica

LMBV - Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

M - Molar

M - Mitocôndria

MCW - metanol:clorofórmio:água

MCVL - Microscopia Confocal de Varredura a Laser

MCW - Methanol; chloroform; water

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

mg - miligrama

mM - milimolar

Mf - massa final

Mi - massa inicial

mL - mililitro

NaNO₃ – Nitrato de sódio

MLCC - Microscopia de luz de Campo Claro

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nm - Nanômetro

P - plastoglóbulos

PAS - Ácido Periódico de Schiff

PCR - Polymerase Chain Reaction

TC - Taxa de crescimento

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

USP - Universidade de São Paulo

v.S. - von Stoch

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Delineamento experimental	19
3.2. Coleta e cultura das amostras	20
3.3. Identificação molecular dos espécimes coletados.....	21
3.4 Estudos morfológicos e citoquímicos	21
3.4.1. Taxa de crescimento e observação macroscópica	21
3.4.2. Microscopia de Luz Campo Claro	21
3.4.2.1. Testes citoquímicos	22
3.5. Microscopia confocal de varredura a laser	23
3.6. Microscopia eletrônica de transmissão	23
3.7. Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes	24
3.8. Extração e dosagem de açúcares e amido.....	24
3.8.1. Açúcares.....	24
3.8.2. Amido	25
3.9. Análise dos dados.....	25
4. RESULTADOS	25
4.1. Caracterização.....	25
4.1.1. Identificação morfológica estrutural	25
4.1.2. Identificação molecular.....	26
4.2. Taxa de crescimento	26
4.3. Morfologia externa dos talos de <i>Ulva ohnoi</i>	27
4.4. Clorofila <i>a</i>	28
4.5. Carotenoides	29
4.6. Morfologia estrutural e ultraestrutural - vistas superficiais do talo - material fresco.....	30
4.7. Morfologia estrutural e ultraestrutural - Testes citoquímicos com Azul de Toluidina e Ácido periódico de Schiff- secções transversais do talo.....	33
4.8. Autofluorescência do cloroplasto.....	35
4.9.1. Controle negativo(0 mM de nitratode sódio).....	37
4.9.2. Controle positivo(4 mM de nitrato de sódio)	39

4.9.3. 25 mM de nitrato de sódio.....	41
4.9.4. 50 mM de nitrato de sódio.....	43
4.9.5. 100 mM de nitrato de sódio.....	45
4.10. Amido e Açúcares Solúveis Totais.....	47
4.10.1. Amido	47
4.10.2. Açúcares Solúveis Totais	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

As condições ambientais, incluindo fatores bióticos e abióticos, têm um papel crucial na abundância, distribuição e comportamento dos organismos, influenciando sua estrutura e ecologia. Estudam-se as respostas as variações dessas condições para entender como os organismos se adaptam às mudanças naturais. Por exemplo, a disponibilidade de nutrientes pode determinar o sucesso ou fracasso no desenvolvimento dos organismos, afetando seu equilíbrio. Em pesquisas com algas, as respostas obtidas nessas investigações, podem oferecer um alto potencial biotecnológico e de sustentabilidade.

Os nutrientes mais utilizados e que podem representar limitações no crescimento das algas marinhas são o nitrogênio e o fósforo (Ribeiro, 2013; Hurd *et al.*, 2014). Desta forma, a presença ou ausência desses elementos desempenha um papel crucial na regulação do desenvolvimento desses organismos. O nitrogênio é considerado um macronutriente envolvido no crescimento e desenvolvimento de organismos fotossintetizantes. Sendo o principal constituinte de macromoléculas tais como aminoácidos, ácidos nucleicos e moléculas como a clorofila, e é essencial na formação de estruturas celulares e no funcionamento dos organismos biológicos. (Lewis, 1986; Raina & Mazahar, 2022). Desta forma, o nitrogênio assume uma posição de destaque como o principal nutriente que regula o desenvolvimento das macroalgas, exercendo um impacto significativo na produtividade primária dos ecossistemas marinhos. Além disso, a disponibilidade de nitrogênio, particularmente na forma de nitrato e amônio, exerce uma influência direta na síntese de diversos componentes nas algas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, pigmentos fotossintetizantes e moléculas de energia (Lewis, 1986; Barsanti & Gualtieri, 2005).

No ambiente marinho, o nitrogênio apresenta diversas formas, tais como nitrato, nitrito, amônio, dinitrogênio e nitrogênio orgânico dissolvido (Barsanti & Gualtieri, 2005). Entretanto, nos oceanos, a forma predominante é o gás dinitrogênio dissolvido (N_2), compreendendo cerca de 95% do nitrogênio disponível. Essa configuração é considerada inerte para as macroalgas, que não utilizam essa forma em seu metabolismo. Em vez disso, esses organismos marinhos dependem principalmente dos íons nitrato e amônio como fontes de nitrogênio (Kim *et al.*, 2007).

O nitrato é predominantemente encontrado em áreas de ressurgência e em plumas de efluentes na região costeira. Devido à sua alta solubilidade na água, contribui para a contaminação dos corpos d'água, sendo o principal agente causador de eutrofização em

ecossistemas costeiros (Howarth & Marino, 2006). Nas águas oceânicas, sua concentração é estimada entre 7-31 μM (Gruber, 2008; Ouyang *et al.*, 2016) Embora o nitrato seja absorvido, ele não pode ser diretamente assimilado pelas algas, sendo necessária sua conversão em amônio. Esse processo envolve duas etapas, a redução do nitrato a nitrito por meio da ação da enzima nitrato redutase e posteriormente, o nitrito é transformado em amônio pela enzima nitrito redutase, tornando-se assimilável pela macroalga (Cai *et al.*, 2013; Sanz-Luque *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, a produção de algas marinhas tem mostrado um crescimento significativo, alcançando cerca de 36 milhões de toneladas em 2020, com um valor estimado em 16,5 bilhões de dólares, de acordo com dados da FAO (2022). Dentre estas, as algas verdes são empregadas em diversas áreas, como biocombustíveis, nutracêuticos, medicamentos e aditivos alimentares (Ferrara, 2020). Além disso, estão sendo estudadas para o desenvolvimento de produtos que possam ajudar no tratamento de doenças metabólicas e relacionadas ao estilo de vida, como as dislipidemias (Mohan *et al.*, 2023). Diversos fitoquímicos extraídos das macroalgas verdes do gênero *Ulva* demonstram atividades anticancerígenas, anticoagulantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antivirais (Mantri *et al.*, 2020). Também, a biomassa de algas abrange uma diversidade de elementos bioquímicos, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas, conferindo-lhes uma base adequada para serem utilizadas como matéria-prima na produção de biocombustíveis (Kooh *et al.*, 2019). Além disso, estas macroalgas apresentam outra característica notável, que é a habilidade de absorver íons do ambiente, especialmente valiosa em situações de eutrofização de corpos d'água, ou ainda, águas residuais, um fenômeno conhecido como biorremediação (Lawton *et al.*, 2013).

As macroalgas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* (Chlorophyta) estão entre as formas de algas marinhas mais prevalentes, sendo amplamente encontradas em comunidades costeiras ao redor do mundo (Wichard *et al.*, 2015). Apresentam características distintas, incluindo um talo composto por uma lâmina flexível composta por duas camadas celulares, um cloroplasto por célula e um disco adesivo formado por expansões rizoidais nas células inferiores, desempenhando funções de fixação (Raymundo *et al.*, 2004; Pereira, 2009). São essenciais aos ecossistemas marinhos, sendo habitat e alimento para várias espécies, além de ajudar na ciclagem de nutrientes. São tolerantes a mudanças de salinidade, temperatura e se adaptam rapidamente, consideradas oportunistas com crescimento rápido, podendo dominar a região onde se encontra (Lobban & Harrison, 1994; Mantri *et al.*, 2020).

Sob uma perspectiva econômica, a biomassa de *Ulva spp.* há muito tempo é reconhecida como uma fonte sustentável e de grande valor por abrigar metabólitos valiosos, incluindo compostos bioativos, que podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, nutracêutica ou em processos de biorrefinaria (Simon *et al.*, 2022).

A espécie *Ulva ohnoi* (M.Hiraoka & S.Shimada) possui talos folhosos de cor verde-claro. Em corte transversal, o talo exibe duas camadas de células, geralmente com bordas arredondadas e formato quadrado ou retangular. Na superfície, as células quadráticas estão dispostas de maneira irregular, evidenciando um único cloroplasto caliciforme ocupando a superfície apical celular. Pirenoides aparecem de 1 a 3 por cloroplasto (Carneiro, 2021; Gabrielson, 2023). *U. ohnoi* tem sido objeto de investigações detalhadas, revelando êxito na busca por alternativas como a produção de amido, o desenvolvimento de métodos integrados para a fragmentação da biomassa e a extração de componentes como sais minerais, lipídios, ulvana, proteínas e celulose (Prabhu *et al.*, 2019; Prabhu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2024). Além disso, seu potencial se estende à produção de rações para animais, e à aplicação em processos de biorremediação ambiental e como biofiltro na aquacultura multitrófica integrada (Lawton *et al.*, 2013; Magnusson *et al.*, 2019; De Moraes, 2023). Compreender os mecanismos e respostas celulares desta espécie poderá propiciar uma melhoria nesses processos.

Apesar das pesquisas mencionadas, ainda existem lacunas no conhecimento sobre as respostas morfofisiológicas da espécie em relação a diferentes níveis de disponibilidade de nutrientes, como o nitrato. É necessário mais conhecimento de ciência básica para que futuras descobertas possam ser aplicadas em pesquisas práticas. Portanto, este estudo visa analisar as potenciais alterações bioquímicas e morfológicas em indivíduos de *U. ohnoi* submetidos a diferentes concentrações de nitrato de sódio durante o cultivo em laboratório, com o objetivo de melhorar estratégias ambientais e de cultivo. Hipotetizamos que diferentes concentrações de nitrato de sódio afetarão as taxas de crescimento e a síntese de pigmentos, com um aumento dessas taxas conforme a concentração do macronutriente aumenta. Além disso, acreditamos que o acúmulo de grãos de amido ocorrerá na ausência do nutriente, assim como o aumento da espessura da parede celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as respostas morfológicas e bioquímicas em células de *U. ohnoi* em resposta à exposição a diferentes concentrações de nitrato de sódio.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar as taxas de crescimento dos espécimes da macroalga;

2.2.2. Caracterizar a morfologia e a organização celular e subcelular das macroalgas;

2.2.3. Quantificar e analisar comparativamente os pigmentos fotossintetizantes, a taxa de fluorescência dos cloroplastos, a produção de amido e açúcares totais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Após serem aclimatadas em ambiente laboratorial, as algas foram divididas em cinco grupos experimentais. A esses grupos, foram administradas doses de 0 mM (controle negativo), 4 mM (controle positivo/von Stoch 50%), 25 mM, 50 mM e 100 mM de nitrato de sódio, incorporadas ao meio de cultura em frasco erlenmeyer durante um período de sete dias.

Ao término do experimento, as taxas de crescimento foram avaliadas e comparadas. Para as análises morfológicas, especialmente das estruturas celulares como os cloroplastos, as amostras passaram por processamento para posterior análise através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

Foram conduzidos ensaios bioquímicos para mensurar os níveis de pigmentos, amido e açúcares totais. A análise de pigmentos também foi avaliada através da microscopia confocal de varredura a laser. Todos os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas.

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental do estudo

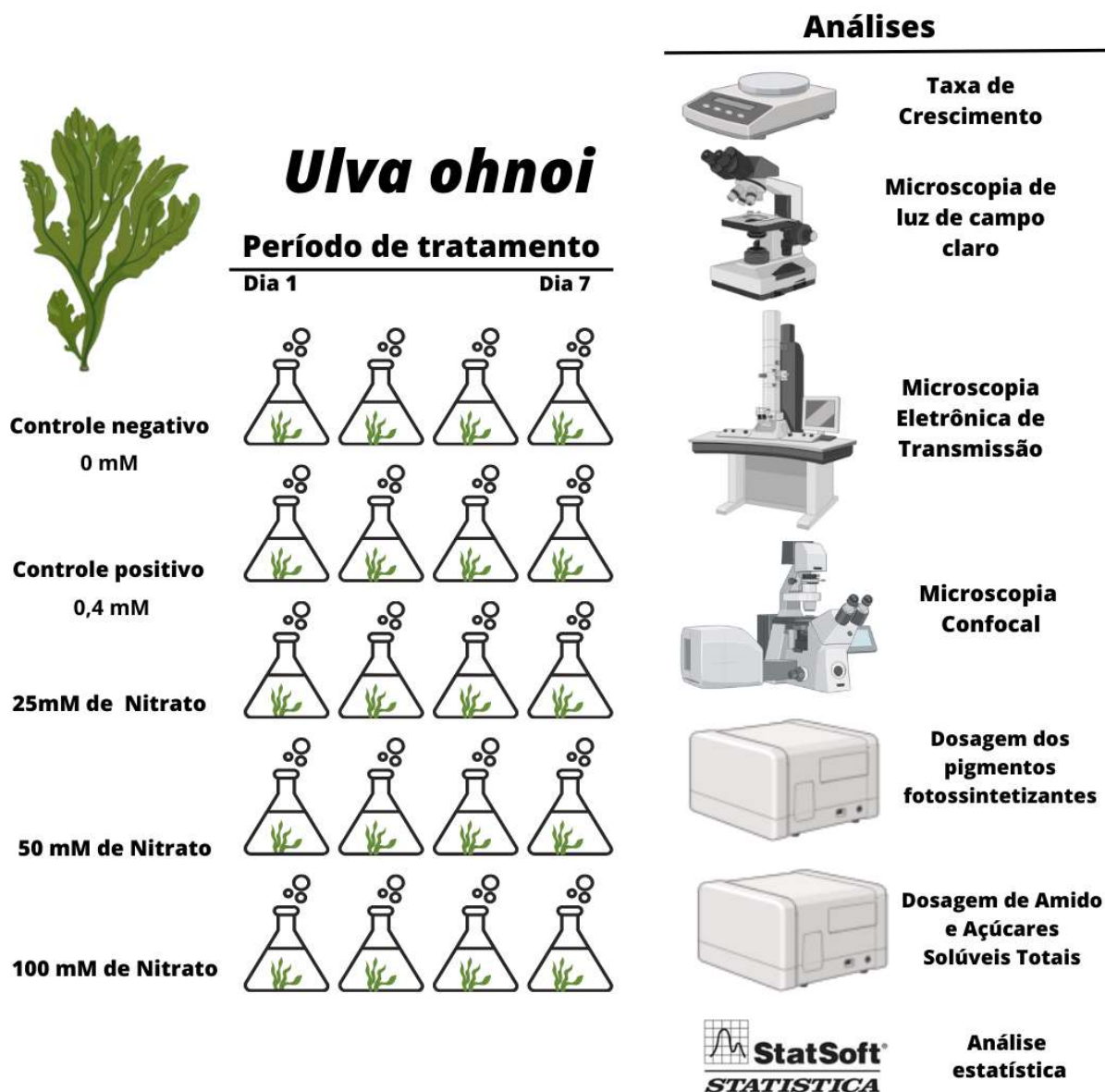


Figura 1. Diagrama ilustrativo da estrutura do experimento realizado na pesquisa. Criado com Canva e Biorender.

Fonte: A autora

3.2. Coleta e cultura das amostras

Amostras da alga *U. ohnoi*, provenientes do banco de algas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), localizado no campus Barra da Lagoa, Florianópolis, foram transportadas para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) no Centro de Ciências Biológicas, campus Trindade, Florianópolis, da mesma instituição.

No laboratório, as algas foram limpas para eliminar macroepífitas e invertebrados e, em seguida, aclimatadas por 7 dias a uma temperatura média de 24°C, com um fotoperíodo de 12 horas, uma intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e meio de cultura contendo \u00e1gua do mar est\u00e9ril suplementada com von Stoch (VS) 50% (von Stoch, 1963). A cultura foi mantida sob constante aera\u00e7\u00e3o (Pereira *et al.*, 2020).

Posteriormente, sob as mesmas condi\u00e7\u00f5es, foram definidos cinco grupos experimentais, aos quais foram adicionados 1,0 g de alga fresca para cada litro de meio de cultura, por um per\u00edodo de 7 dias. Os grupos experimentais foram: 0 mM de NaNO_3 (50% VS sem nitrato de s\u00f3dio), controle positivo (50% VS - 4 mM de nitrato de s\u00f3dio), 25 mM de nitrato de s\u00f3dio, 50 mM de nitrato de s\u00f3dio e 100 mM de nitrato de s\u00f3dio. O nitrato de s\u00f3dio utilizado foi do fabricante Ex\u00f4do Cientifica com peso molecular 84,989. Cada grupo foi replicado quatro vezes.

3.3. Identifica\u00e7\u00e3o molecular dos esp\u00e9cimes coletados

A fim de confirmar geneticamente a esp\u00e9cie, as amostras foram secas em s\u00edlica gel e enviadas ao Laborat\u00f3rio de Algas Marinhas \u00c9dison Jos\u00e9 de Paula, localizado no departamento de Bot\u00e2nica da Universidade de S\u00e3o Paulo (USP). No Laborat\u00f3rio, as amostras seguiram as etapas de extra\u00e7\u00e3o, amplifica\u00e7\u00e3o por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), purifica\u00e7\u00e3o e sequenciamento do gene plastidial tufA.

3.4 Estudos morfol\u00f3gicos e citoqu\u00edmicos

3.4.1. Taxa de crescimento e observa\u00e7\u00e3o macrosc\u00f3pica

Ao final do per\u00edodo experimental, as taxas de crescimento (TCs) foram determinadas por meio da aplica\u00e7\u00e3o da seguinte equa\u00e7\u00e3o: $\text{TC } [\% \text{ dia}^{-1}] = [(\text{Pf}/\text{Pi})^{(1/t)} - 1] \times 100$, onde Pi representa o peso fresco inicial, Pf \u00e9 o peso fresco ap\u00f3s 7 dias e t corresponde ao tempo decorrido em dias experimentais (Penniman *et al.*, 1986). As amostras foram fotografadas no in\u00edcio e no final do experimento para avalia\u00e7\u00e3o macrosc\u00f3pica de colora\u00e7\u00e3o e desenvolvimento.

3.4.2. Microscopia de Luz Campo Claro

Para an\u00e1lise da morfologia superficial celular, fragmentos de todas as amostras frescas foram colocados entre l\u00e2minas e lam\u00ednulas e fotografados. A estas amostras foi adicionado lugol para identifica\u00e7\u00e3o de gr\u00e3os de amido, fotografadas utilizando microsc\u00f3pio de luz de campo claro (Olympus BX 41, T\u00f3quio, Jap\u00e3o) equipado com o software Image J Capture Pro 5.1

(QImaging Corporation, Austin, TX, EUA), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC - Florianópolis.

Todos os grupos foram submetidos a análises citoquímicas e morfológicas através do uso de microscopia de luz de campo claro. Para essa finalidade, as amostras foram fixadas em uma solução de paraformaldeído a 2,5% em um tampão fosfato 0,1 M, com pH 7,2, a uma temperatura de 4°C, por 12h. Após o processo de fixação, a temperatura ambiente foi restaurada, e o material submetido a duas lavagens com tampão fosfato, 10 minutos cada, com subsequente desidratação em etanol em concentrações crescentes (50-100%).

Uma pré-infiltração das amostras foi conduzida utilizando uma mistura de etanol 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA) na proporção de 1:1, durante um período de 12 horas. Posteriormente, o material foi completamente infiltrado com resina pura (Bouzon, 2006) e posteriormente polimerizado em moldes horizontais. Para a secção das amostras, um micrótomo manual de parafina, modelo Leica RM 2135, equipado com lâminas de tungstênio, foi empregado. As secções com uma espessura variando entre 2-5 µm foram distendidas em uma placa de Petri contendo água à temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas para lâminas de vidro ou dispostas sobre gotas de água destilada em lâminas, e então secas a 37°C durante um período de 30 minutos.

3.4.2.1. Testes citoquímicos

Os materiais foram submetidos a testes citoquímicos específicos, da seguinte maneira:

Azul de toluidina (AT-O): Esse corante foi empregado para a identificação de polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As secções nas lâminas foram tratadas com uma solução aquosa de AT-O a 0,5% pH 3,0 por um período de 30 segundos a 2 minutos. Posteriormente, as secções foram lavadas com água destilada e deixadas secar ao ar conforme descrito por Gordon & McCandless (1973).

Ácido Periódico de Schiff (PAS): Esse teste foi empregado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As secções passaram por uma oxidação utilizando uma solução aquosa de ácido periódico a 1% por um período de 20 minutos. Em seguida, foram lavadas com água corrente e submetidas à coloração com o reativo de Schiff por um período de 20 minutos. Após este período, lavados em água corrente, os cortes foram secos ao ar conforme o método proposto por Gahan (1984).

Após os testes histoquímicos as secções de todas as lâminas foram cobertas com laminulas coladas com o meio de montagem bálsamo do Canadá.

Após os procedimentos citoquímicos, as lâminas coradas foram examinadas e fotografadas utilizando microscópio de luz de campo claro (Olympus BX 41, Tóquio, Japão) equipado com o software Image J Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, EUA), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC - Florianópolis.

3.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Para examinar a morfologia dos cloroplastos, amostras frescas, de *U. ohnoi*, foram empregadas. As amostras foram observadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL) DMI6000B (Leica TCS SP-5, Alemanha) localizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), onde foram realizadas fotomicrografias. A autofluorescência dos cloroplastos e da parede celular foi visualizada utilizando uma excitação a laser com comprimento de onda de 488 nm (violeta), e a gama de emissão observada estendeu-se de 510 a 750 nm (Zitta *et al.*, 2013). As imagens geradas foram analisadas através do software Image J.

3.6. Microscopia eletrônica de transmissão

No processo de preparação para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as amostras passaram por uma série de etapas sequenciais. Inicialmente as amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído (2,5%) e sacarose (2%), tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M a um pH de 7,2, em temperatura de 4°C por 12 horas. Posteriormente, o material foi lavado no mesmo tampão por 3 vezes (30 minutos cada) e pós-fixado em tetróxido de ósmio (2%) e o tampão na proporção de 1:1, por 4 horas em temperatura ambiente. Após lavagem no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em uma série de concentrações crescente de acetona (30 minutos cada) e submetidos a infiltração em séries graduais de acetona-resina Spurr (12 horas cada) ao longo de três dias, seguido por duas infiltrações em resina pura (12 horas cada), e finalmente polimerizados em uma estufa a 70 °C por 24 horas (Ouriques & Bouzon, 2003; Bouzon, 2006). Os cortes ultrafinos foram realizados utilizando uma navalha de diamante em ultramicrotomo com espessura de 70 nm. Estes, foram contrastados utilizando acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 1% (Reynolds, 1963). Por fim, foram observados e

fotografados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 2100, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.7. Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes

Para extrair e quantificar os pigmentos fotossintetizantes clorofila *a* e carotenoides, foram utilizados 0,500 mg de alga fresca de cada tratamento, que foram separadas e colocadas em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 3 mL de DMSO (90%) a cada tubo. O material foi incubado em estufa a 40°C por 45 minutos (Hiscox & Israelstam, 1979). O extrato obtido foi transferido para uma microplaca e a quantificação dos pigmentos, foi realizada por meio de um espectrofotômetro (Multileitora Infinite - M200 TECAN) nos comprimentos de onda de 665 e 480 nm (Wellburn, 1994) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Os dados gerados foram submetidos a seguinte equação:

$$\text{Clorofila } a: (12,47 \times \text{abs } 665) - (3,62 \times \text{abs branco})$$

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times \text{abs } 480) - (2,14 \times \text{abs } 665) / 220$$

3.8. Extração e dosagem de açúcares e amido

Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), do Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

3.8.1. Açúcares

De acordo com o protocolo de Shannon (1968), 25mg de biomassa seca de cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido. Em seguida, 2ml de MCW (metanol; clorofórmio; água destilada - 12;5;3) foi adicionado, seguido por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e os pellets foram submetidos a uma segunda centrifugação após adição de mais 2 ml de MCW. Os sobrenadantes foram combinados e ajustados para 4 ml com MCW. Para o branco, utilizou-se 4 ml de MCW. Após a extração, 1 ml de clorofórmio e 1 ml de água destilada foram adicionados aos volumes de 4 ml para a primeira reação. Para a segunda reação, 1 ml da fase superior (aquosa) de cada amostra foi recolhido e misturado com 2 ml de antrona (0,2%). Após agitação em vórtex e aquecimento em banho-maria a 100°C por 3 minutos, a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 630 nm (Shannon, 1968).

3.8.2. Amido

Após a extração dos açúcares solúveis, os pellets resultantes foram tratados com 2 ml de ácido perclórico a 30% em H₂O. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e reservado, repetindo-se o processo para os pellets. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados novamente. Em seguida, 1 ml de cada amostra foi misturado com 2 ml de antrona a 0,2%, agitado em vórtex e aquecido em banho-maria a 100°C por 3 minutos para leitura em espectrofotômetro a 630 nm (McCreedy *et al.*, 1950).

3.9. Análise dos dados

Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e havendo normalidade, foi utilizado o teste One-way ANOVA, complementado com o teste post-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram feitas através do software STATISTICA 6.0.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização

4.1.1. Identificação morfológica estrutural

Ulva ohnoi FOI caracterizada por apresentar talo foliáceo, diestromático, levemente ondulado de cor verde brilhante (Fig. 2a) Em cortes transversais exibe duas camadas de células cúbicas com um cloroplasto caliciforme localizado na superfície apical celular (Fig. 2).

Figura 2 - Vista superficial macroscópica e transversal em microscopia de luz de campo claro de um espécime de *U. Ohnoi* do estudo.

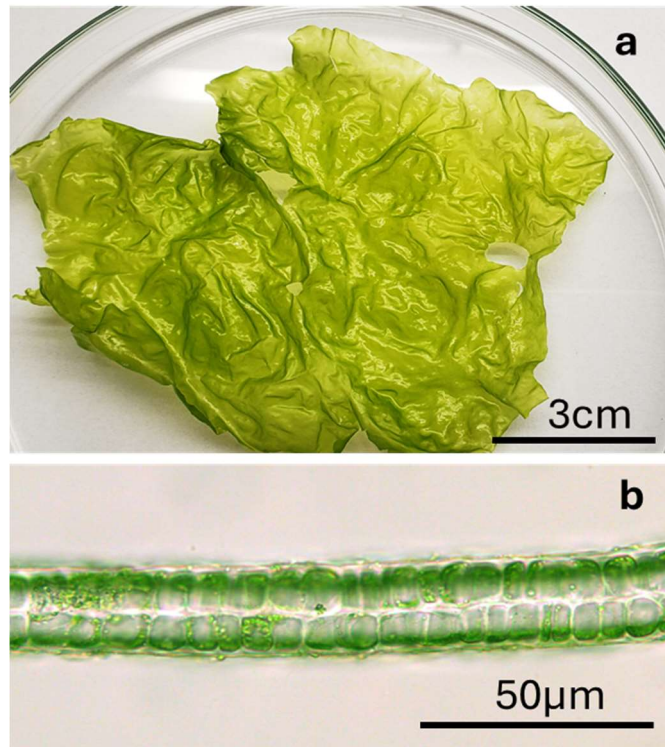


Figura 2. a. Vista macroscópica superficial do talo foliaceo de *U. ohnoi*. b. Corte transversal do talo observado em microscopia de campo claro, mostrando duas camadas de células com cloroplasto na superfície celular. Fonte: A autora

4.1.2. Identificação molecular

A sequência obtida do gene *tufA*, foi submetida a uma busca na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para confirmar a espécie geneticamente. Foi encontrada uma similaridade de 100% entre esta sequência e a do holótipo AP018696 identificado como *Ulva ohnoi*, cujo genoma do cloroplasto foi sequenciado e depositado na plataforma.

4.2. Taxa de crescimento

Todos os tratamentos apresentaram uma taxa de crescimento ao dia positiva, calculada em porcentagem (Fig. 3). Diferenças estatísticas foram observadas entre todos os tratamentos. O tratamento com 50 mM de nitrato de sódio foi o que apresentou maior taxa de crescimento ($61,97\% \pm 9,25$) em comparação com os outros grupos. A ausência de nitrato de sódio no 0 mM de NaNO_3 resultou na menor taxa de crescimento ($18,09\% \pm 1,2$).

Figura 3 - Taxa de crescimento da *U. ohnoi* após a exposição por sete dias à diferentes concentrações de nitrato de sódio

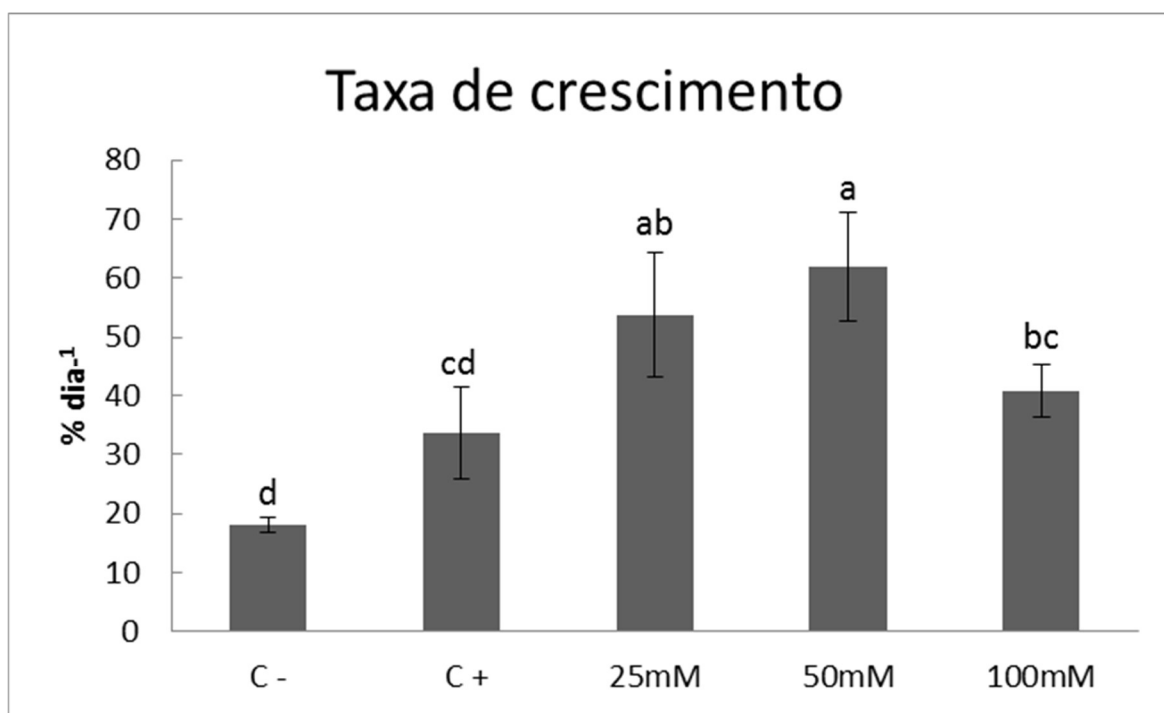


Figura 3. Taxas de crescimento positivas (porcentagem de crescimento por dia⁻¹) de talos de *U. ohnoi* expostos a diferentes concentrações de NaNO₃. (0, 0,4, 25, 50 e 100 mM). Observou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos. O grupo tratado com 50 mM de nitrato de sódio apresentou a taxa de crescimento mais elevada. A ausência de nitrato de sódio no 0 mM de NaNo₃ resultou na menor taxa de crescimento. Valores apresentados com média (n=4, média ± desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora

4.3. Morfologia externa dos talos de *Ulva ohnoi*

Através de avaliação macroscópica, foi possível observar que as algas nos tratamentos com 25 e 50 mM de nitrato de sódio apresentaram uma morfologia mais exuberante, acompanhada de uma pigmentação mais intensa, em comparação com os demais tratamentos (Fig. 4). Destaca-se que o tratamento com 0 mM de nitrato de sódio apresentou uma pigmentação menos intensa, ao final do tratamento quando comparado ao início do experimento.

Figura 4 - Morfologia externa do talo de *U. ohnoi* após o período experimental

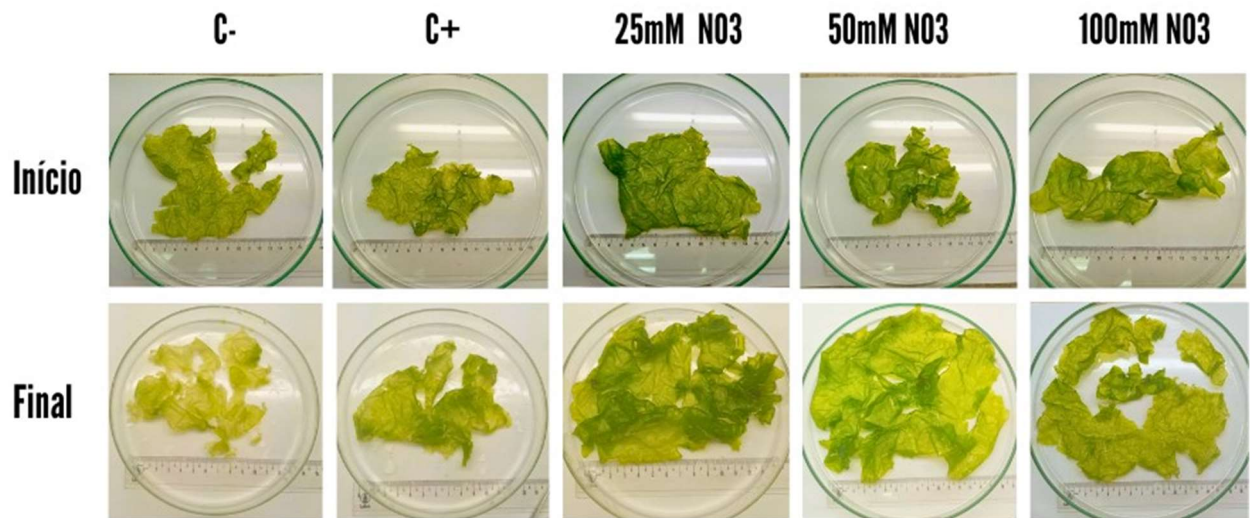


Figura 4. Morfologia externa dos talos de *U. ohnoi* antes e após o tratamento com NaNO_3 . (0, 0,5, 25, 50 e 100 mM). O tratamento sem nitrato de sódio (0 mM) reduziu a intensidade da pigmentação em *U. ohnoi*. Os tratamentos contendo 25 e 50 mM de nitrato de sódio promoveram um aumento no crescimento e pigmentação das algas. Fonte: A autora

4.4. Clorofila *a*

Os dados sobre a clorofila *a* (Fig. 5), mostraram uma maior concentração deste pigmento nos tratamentos com 25 e 50 mM de nitrato de sódio ($27,12 \pm 2,09$ e $27,26 \pm 2,24$ $\mu\text{g/g}$), que não apresentaram diferença estatística entre si, mas diferem estatisticamente do controle negativo. A menor concentração ocorreu no tratamento com 0 mM de nitrato de sódio ($8,2 \pm 1,93$ $\mu\text{g/g}$).

Figura 5 - Taxa de concentração de clorofila a em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ao final do experimento.

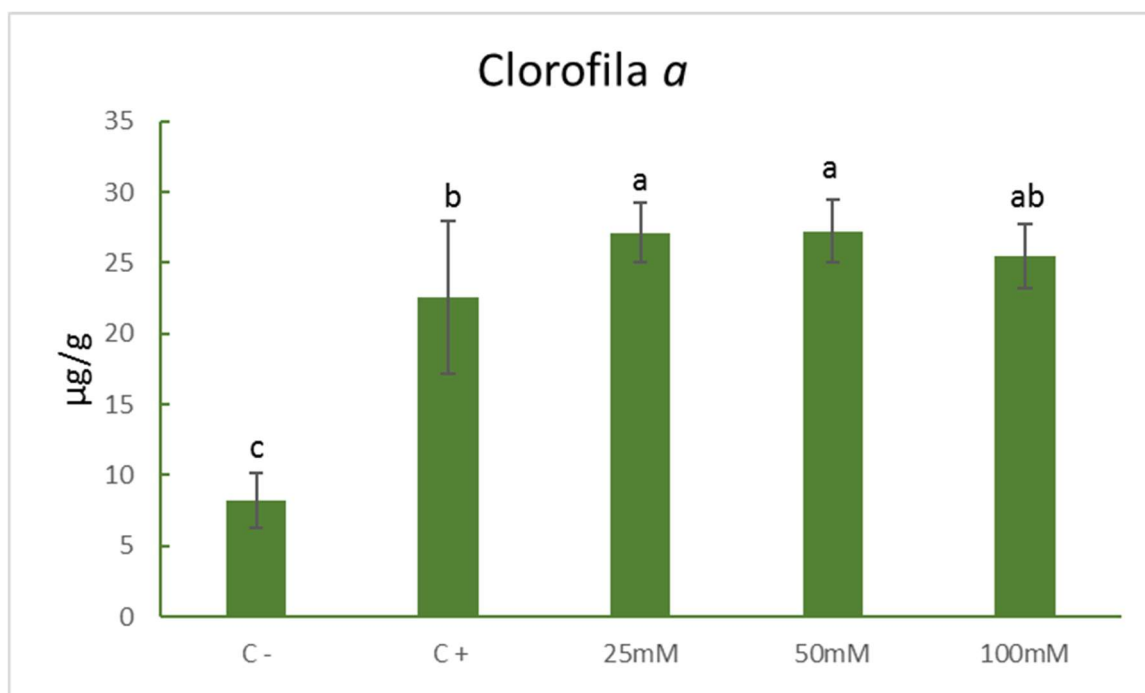


Figura 5. Conteúdo de clorofila *a* em *U. ohnoi* após o tratamento com diferentes concentrações de NaNO_3 (0, 0,4, 25, 50 e 100 mM). Clorofila foi detectada em todos os grupos. Os grupos tratados com 25 e 50 mM de nitrato de sódio exibiram uma concentração significativamente maior de clorofila *a*. O grupo tratado com 0 mM de nitrato de sódio demonstrou menor concentração do pigmento. Valores apresentados com média ($n=16$, média \pm desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora

4.5. Carotenoides

Na produção dos pigmentos secundários de fotoproteção, foi observado um aumento dos carotenoides em relação às maiores dosagens de nitrato de sódio. O tratamento com 25 mM de nitrato de sódio destacou-se por produzir mais carotenoides ($2,817 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$), apresentando uma diferença estatisticamente significativa em comparação com os outros tratamentos. No entanto, esse resultado está estatisticamente relacionado aos tratamentos com 50 mM ($2,807 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$) e 100 mM ($2,760 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ de nitrato de sódio). Assim como na análise de clorofila, o tratamento com 0 mM de nitrato de sódio foi o que apresentou o menor teor de pigmento ($1,210 \pm 0,28 \mu\text{g/g}$) (Fig. 6).

Figura 6 - Taxa de concentração de carotenoides em microgramas por grama ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ao final do experimento.

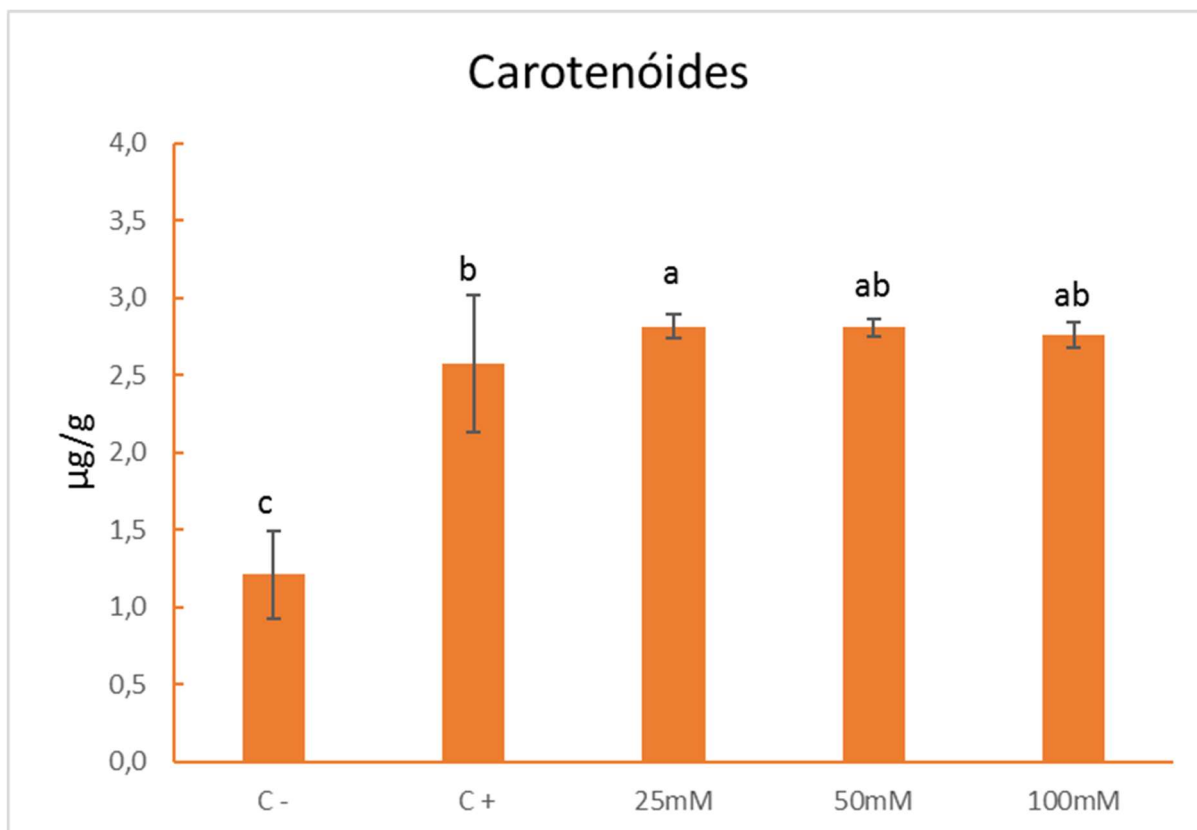


Figura 6. Conteúdo de carotenoides em *U. ohnoi* após o tratamento com diferentes concentrações de NaNO_3 (0, 0,4, 25, 50 e 100 mM). Os carotenóides foram encontrados em todos os grupos. O grupo tratado com 25 mM foi o que apresentou maior produção do pigmento mas está estatisticamente relacionado os grupos com 50 e 100 mM de nitrato de sódio. O grupo com 0 mM de nitrato de sódio demonstrou menor concentração do pigmento. Valores apresentados com média ($n=16$, média \pm desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora

4.6. Morfologia estrutural e ultraestrutural - vistas superficiais do talo - material fresco

Em vista superficial do talo membranoso, em todos os tratamentos (Fig. 7), observou-se as células como formatos diversos (alongadas, ovais, quadráticas ou irregulares). Nestas células, a organela que se destacou foi o cloroplasto, preenchido por muitos ou poucos grãos de amido e pirenoides. Em vista superficial, nas amostras cultivadas na ausência de nitrato de sódio, foi possível observar uma grande quantidade de grandes grãos de amido preenchendo praticamente todo o cloroplasto (Fig. 7a), dados estes corroborados com a coloração de lugol

(Fig. 7b). Além disso, a parede celular, na ausência de nitrato de sódio, tornou-se mais espessa evidenciada pelos espaços claros entre as células. As amostras do controle positivo também apresentaram grãos de amido, porém menores e em menor quantidade do que o observado no 0 mM de NaNO_3 (Fig. 7c,d). Nestas células foram observados alguns pirenídes. As células das plantas cultivadas com 25 e 50 mM de nitrato de sódio (Fig. 7 e - h) apresentaram cloroplasto grande, ocupando toda a superfície celular, com 2 a 4 pirenídes. Os grãos de amido, quando presentes, envolvem os pirenídes. As células das plantas tratadas com 100 mM de nitrato de sódio (Fig. 7i) também apresentaram cloroplasto ocupando a parte superior do citoplasma, com vários pirenídes maiores e pequenos grãos de amido ora envolvendo o pirenoide ora dispersos no estroma (Fig. 7j).

Figura 7 - Vista superficial em microscopia de luz de campo claro do talo de *U. ohnoi* com material fresco e material fresco tratado com lugol.

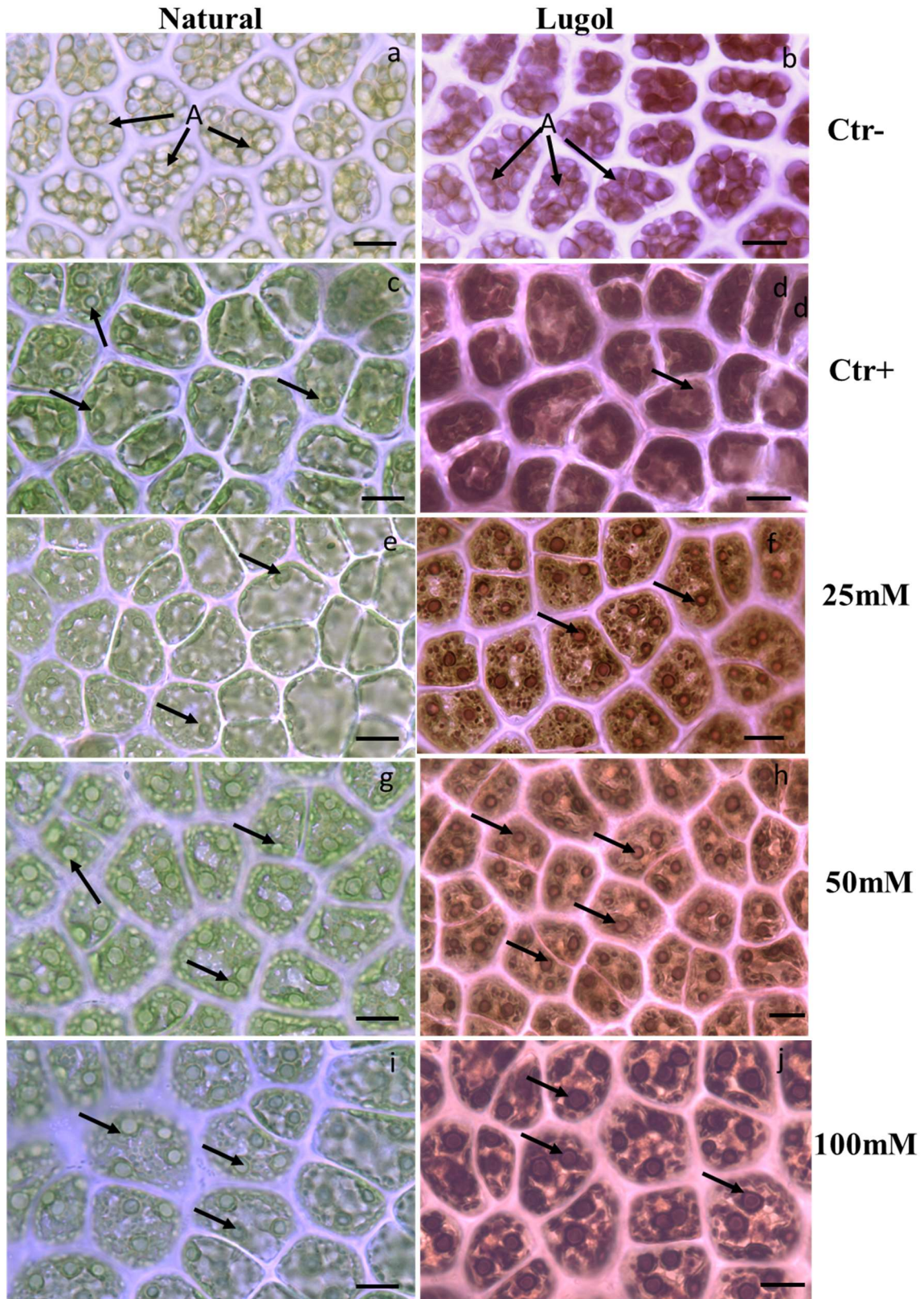


Figura 7. Microscopia de luz campo claro, vistas superficiais do talo de *U. ohnoi* de material fresco (a,c,e,g,h), e material fresco corado com lugol (b,d,f,h,j) no final do experimento a,b.- As células do tratamento com 0 mM de NaNO_3 , apresentaram grande quantidade de volumosos grãos de amido (setas. letra A) que ocupam quase todo o cloroplasto, além de um aumento na espessura da parede celular. c,d- No controle positivo (4 NaNO_3) ocorre uma diminuição na produção e tamanho dos grãos de amido quando comparado ao 0 mM de NaNO_3 pode-se observar alguns pirenoides. e-h- Amostras tratadas com 50 e 100 mM de nitrato de sódio apresentaram grandes cloroplastos ocupando a superfície celular com poucos grãos de amido que envolvem os pirenoides. i,j- O tratamento com 100 mM de nitrato de sódio apresentou pequenos grãos de amido e alguns envolvendo os pirenoides. Escala= 20 μm . Fonte: A autora

4.7. Morfologia estrutural e ultraestrutural - Testes citoquímicos com Azul de Toluidina e Ácido periódico de Schiff- secções transversais do talo

Ao realizar testes citoquímicos, as secções transversais do talo coradas com AT-O revelaram uma reação metacromática na parede celular e nos vacúolos, indicando a presença de polissacarídeos ácidos, com alterações estruturais nas células em respostas às diferentes concentrações de nitrato de sódio (Fig. 8 a-e). Essa reação revelou que a parede celular, densamente corada, é mais espessa no 0 mM de NaNO_3 (Fig. 8b) tanto nas paredes entre células, como na parede superficial quando comparadas aos outros tratamentos (Fig. 8 a,c-e). Em todos os tratamentos foi possível observar uma região não reativa que corresponde ao cloroplasto, localizado na porção apical celular como uma fina região (Fig. 8a-e), exceto na figura 8b, onde o cloroplasto ocupa a maior parte do citoplasma. Na maioria das células, com a presença de nitrato de sódio, o vacúolo ocupa a maior parte do citoplasma, e é preenchido por granulações metacromáticas (Fig. 8a,c-e).

Nas secções transversais dos talos coradas com PAS (Fig. 8f,j) evidenciou-se um aumento na síntese e tamanho dos grãos de amido no tratamento com 0 mM de NaNO_3 (Fig. 8g), estes, presentes no interior dos cloroplastos ocupando quase a totalidade do seu volume. Os tratamentos de 25 e 50 mM de NaNO_3 (Fig.8 h,i) apresentaram uma diminuição deste parâmetro quando comparados com os outros tratamentos (Fig. 8f,g,j). As amostras tratadas com 100mM de NaNO_3 , apresentaram um resultado semelhante ao controle positivo (Fig. 6f, j).

Figura 8 - Microscopia de luz de campo claro de secções transversais do talo de *U. ohnoi*, submetidas aos testes citoquímicos Azul de Toluidina e Ácido Periódico de Schiff.

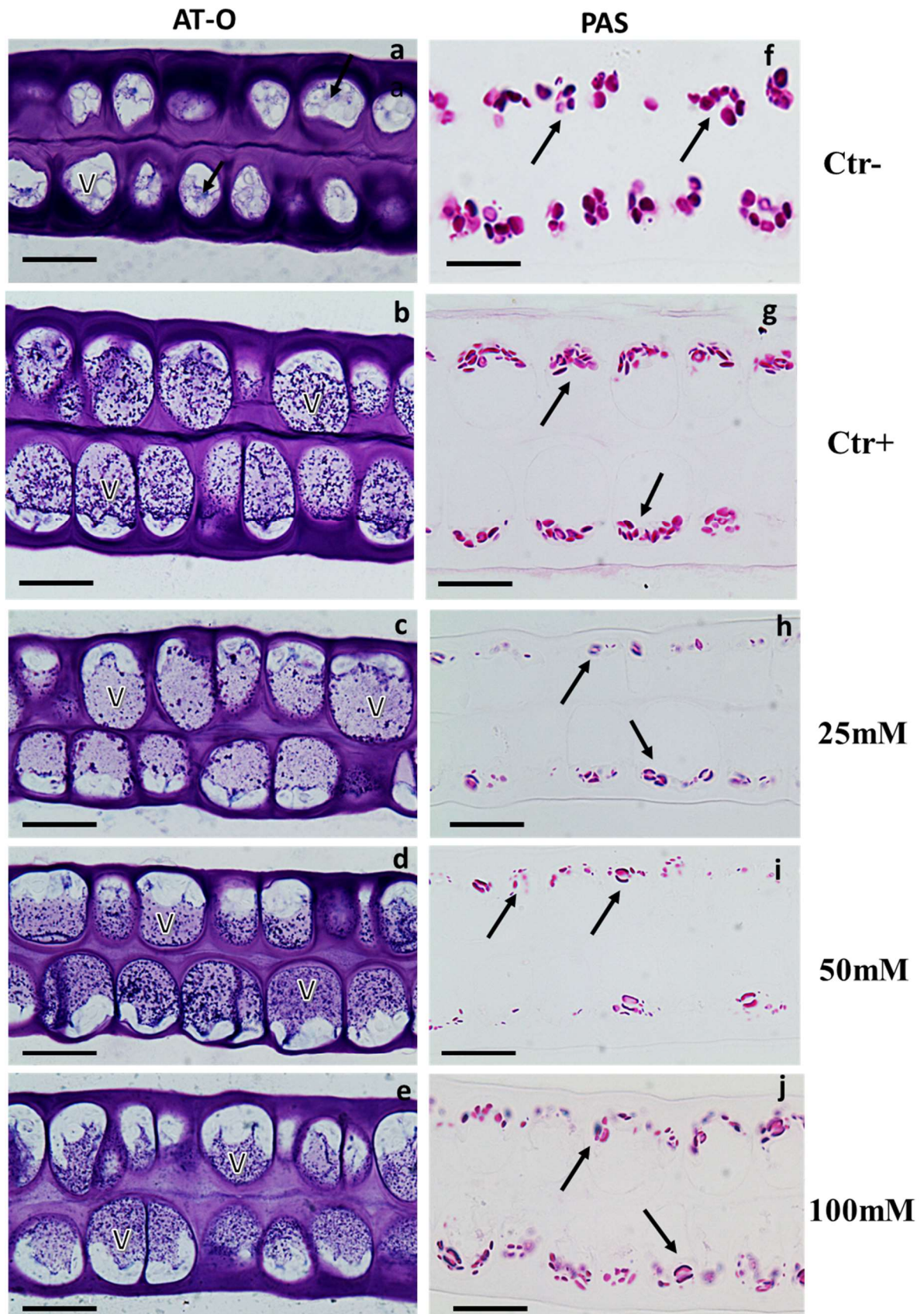


Figura 8. Microscopia de luz campo claro das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com diferentes concentrações de NaNO_3 (0, 0.4, 25, 50 e 100 mM). a-e- Células coradas com Azul de toluidina (ATO) com paredes celulares metacromáticas. a- Na ausência de nitrato de sódio observa-se espessamento das paredes celulares e citoplasma preenchido pelo cloroplasto (setas) com redução do volume citoplasmático. b-e- Na presença de nitrato de sódio o vacúolo (V) exibe granulações metacromáticas e ocupa a maior porção do citoplasma deslocando o cloroplasto para a superfície. f-j- Células coradas com ácido periódico de Schiff (PAS), evidenciando grãos de amido. f- Na ausência de nitrato de sódio (0 mM) as células apresentaram maior síntese e maior variação no tamanho e forma dos grãos de amido. g e j- O controle positivo e o tratamento com 100 mM apresentam semelhança na produção de grãos de amido. h e i- Os tratamentos com 25 e 50 mM de nitrato de sódio apresentaram a menor quantidade de amido, estando estes em algumas células, presentes apenas envolvendo os pirenoides. Escala= 20 μm . Fonte: A autora

4.8. Autofluorescência do cloroplasto

Ao serem observados superficialmente no microscópio confocal de varredura a laser, os talos de *U. ohnoi* permitiram a avaliação da intensidade da autofluorescência dos cloroplastos (Intensidade de pixels por μm^2) sob os diferentes tratamentos (Fig. 9). As células do 0 mM de NaNO_3 apresentaram baixa intensidade de fluorescência ($282,42 \pm 20,93$) e um aspecto granular, provavelmente associado a uma maior produção de amido (Fig. 9). As células do controle positivo mostraram uma fluorescência um pouco mais intensa ($383,46 \pm 51,02$) do que as do 0 mM de NaNO_3 (Fig. 9), porém sem diferença estatística significativa entre estes tratamentos, conforme evidenciado na figura 10. O tratamento com 25 mM de NaNO_3 apresentou a maior média de intensidade média ($1247,87 \pm 266,06$), diferenciando-se estatisticamente de todos os outros tratamentos (Fig. 10), o que corrobora com os dados de quantificação bioquímica de clorofila, onde este tratamento também apresentou o maior índice de produção. Os tratamentos com 50 mM ($795,29 \pm 181,31$) e 100 mM ($781,74 \pm 160,07$) apresentaram valores médios semelhantes, sem diferenças estatísticas entre eles.

Figura 9 - Autofluorescência dos cloroplastos de *U. ohnoi* no microscópio confocal de varredura a laser.

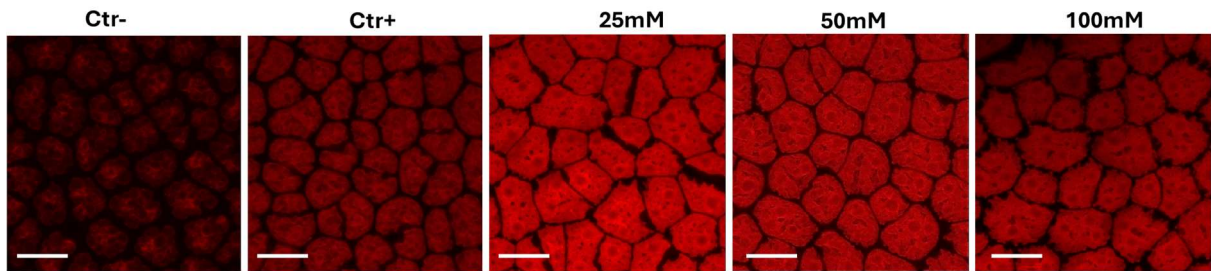


Figura 09. Autofluorescência dos cloroplastos de *U. ohnoi* avaliada em microscópio confocal de varredura a laser. Observa-se uma autofluorescência mais intensa no tratamento com 25 mM de nitrato de sódio e com a menor intensidade no controle negativo. Escala = 20 μm Fonte: A autora

Figura 10 - Representação gráfica da média da densidade de pixels por μm^2 em cloroplastos de *U. ohnoi* ao final do período experimental.

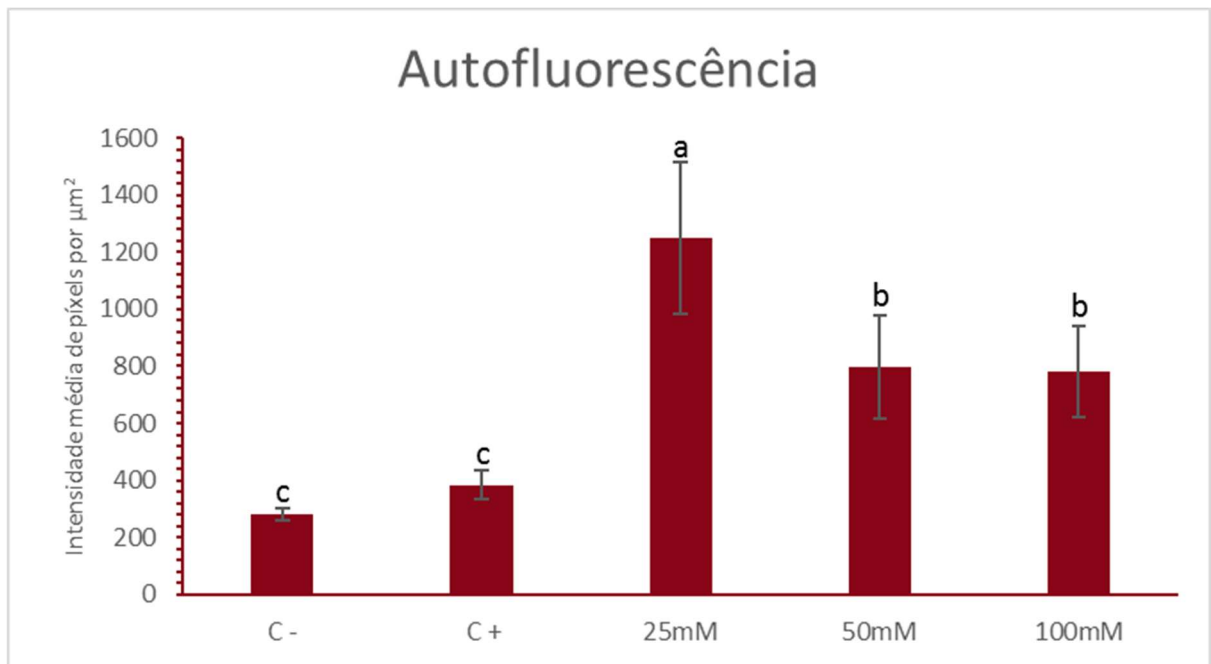


Figura 10. Média da densidade de pixel por μm^2 em cloroplastos de *U. ohnoi*. Valores apresentados com média ($n=7$, média \pm desvio padrão). Os dados confirmam as análises de microscopia confocal onde o tratamento com 25 mM apresenta maior taxa de intensidade. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão

4.9.1. Controle negativo

Alterações na organização celular foram observadas nas amostras submetidas a redução de nitrato de sódio. Em corte longitudinal, o cloroplasto ocupa quase metade do espaço intracelular (Fig. 11a). O vacúolo exibe conteúdo irregular denso e parece estar comprimido devido ao aumento do volume do cloroplasto decorrente do acúmulo de grãos de amido (Fig. 11a). Nota-se que a ausência de nitrato de sódio resultou em um incremento na síntese de grãos de amido, que ocupam todo o volume plastidial (Fig. 11a). Esta evidência corrobora os resultados da análise bioquímica de quantificação de amido, esperado como resposta à falta de nutrientes. Além do aumento no número de grãos, esse tratamento exibiu uma diversidade de tamanho e forma dos grãos de amido (Fig. 11a,b), que são maiores em comparação com os demais tratamentos. Nestes cloroplastos poucos pirenoides foram observados (Fig. 11a,b). As membranas dos tilacoides, entre os grãos de amido, apresentaram pouca definição, estando em número reduzido ou ausentes (Fig. 11c). Por outro lado, ocorreu também um aumento no número de plastoglóbulos (Fig. 10b,d). Nestas células, observou-se um pequeno núcleo com o nucléolo, corroborando com a pouca atividade e reprodução celular (Fig. 11e). Nestas células, foi evidente a presença de parede celular espessa com uma alta deposição de microfibrilas dispostas de forma concêntrica. A porção superficial é revestida por uma camada de mucilagem (Fig. 11a-f,g).

Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão das seções transversais de *U. ohnoi* do grupo controle negativo.

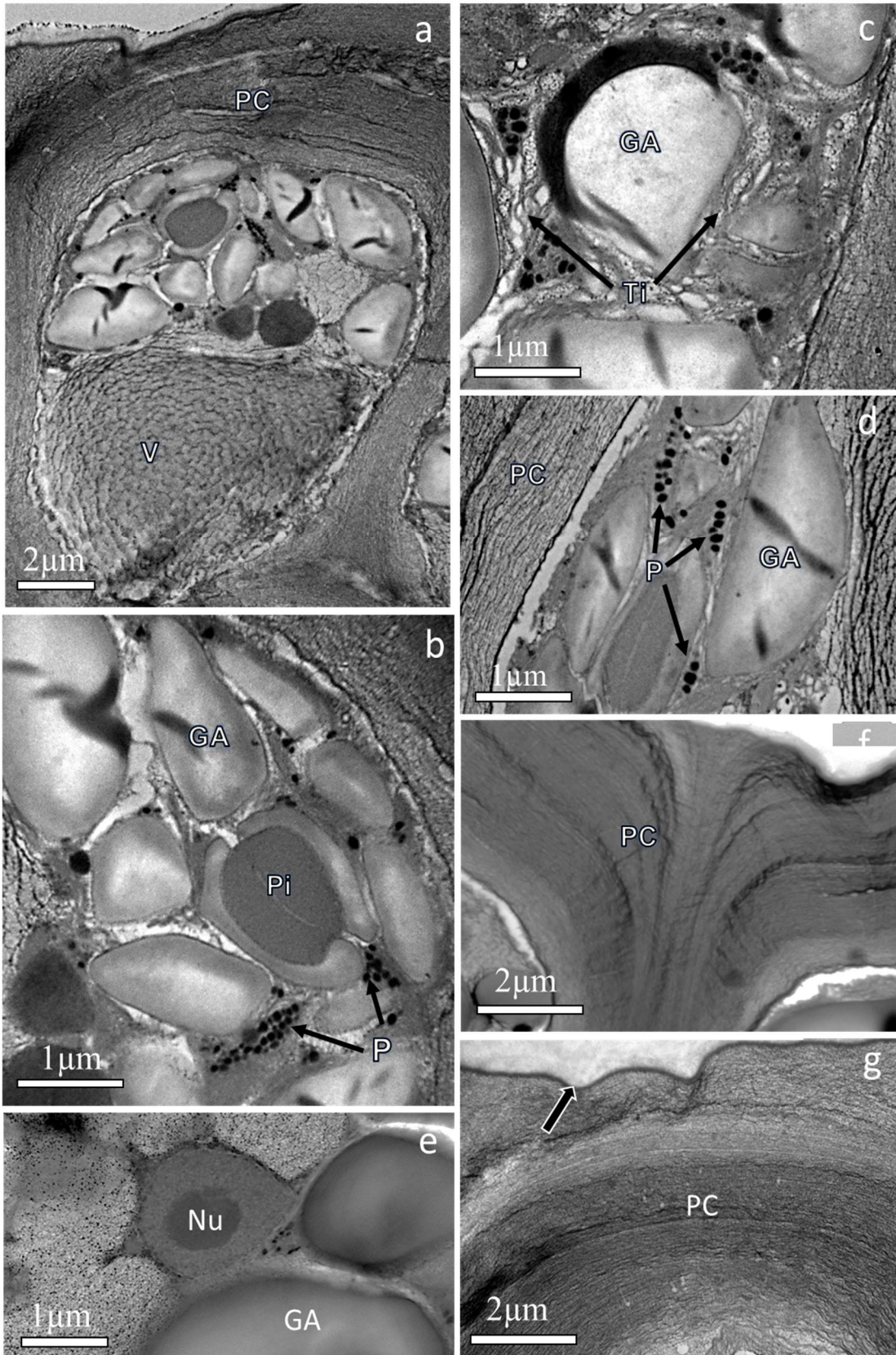


Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com 0 mM de NaNO₃ (controle negativo). a- Célula com vacúolo comprimido devido ao aumento do cloroplasto ocupado por uma grande quantidade de grãos de amido. b- Detalhe de um grupo de grãos de amido, e pirenoide envolvido por grão de amido. c- Membranas dos tilacóides com formato irregular. d- Plastoglóbulos agrupados entre os grãos de amido. e- Núcleo e nucléolo de tamanho reduzido. f,g- Nota-se uma parede celular espessada envolta por uma camada de mucilagem. GA - Grão de Amido. Mu- Mucilagem. Nu- Núcleo. Pi- Pirenoide. PC- Parede Celular. Pi- Pirenoide. P- Plastoglóbulos. T - Tilacóides. V - Vacúolo. Fonte: A autora

4.9.2. Controle positivo

As amostras que receberam uma dosagem de 50% de meio von Stoch (4mM de nitrato de sódio), considerado adequado para a manutenção da cultura, serviram como parâmetro de comparação (Fig. 12a-f). As células, destas amostras, em cortes longitudinais, são homogeneamente alongadas apresentando duas regiões citoplasmáticas distintas: a região plastidial e a vacuolar (Fig. 12a). A região plastidial formada por único cloroplasto por célula, característico do gênero *Ulva*, ocupa a periferia apical celular (Fig. 9b). Nestes cloroplastos, numerosas membranas tilacoidais foram observadas, estas são bem definidas podendo formar granum (Fig. 12c). Os grãos de amido foram vistos em menor quantidade quando comparados aos observados nos cloroplastos do controle negativo. Estes grãos estão dispersos entre os tilacoides e envolvendo o pirenoide (Fig. 12a-d,b). Um grande vacúolo que preenche quase toda a porção citoplasmática deslocou o restante do citoplasma para a periferia apical (Fig. 12a,b). Este vacúolo é preenchido por um material pouco elétron denso. Observou-se, também, um núcleo com nucléolo adjacente a uma possível porção citoplasmática abaixo do cloroplasto. Estruturas vesiculadas, provavelmente retículo endoplasmático, foram observadas (Fig. 12b). A parede celular, mais espessa, que reveste a superfície do talo, exibiu fibrilas paralelamente organizadas, que se prolongam entre as células vizinhas (Fig. 12a). Sendo esta parede intercelular menos espessa, podendo apresentar plasmodesmos (Fig. 12a). A superfície do talo, acima da parede celular, é coberta por uma delicada camada de mucilagem (Fig. 12e,f).

Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão das seções transversais de *U. ohnoi* do grupo controle positivo (0,04 mM de NO_3).

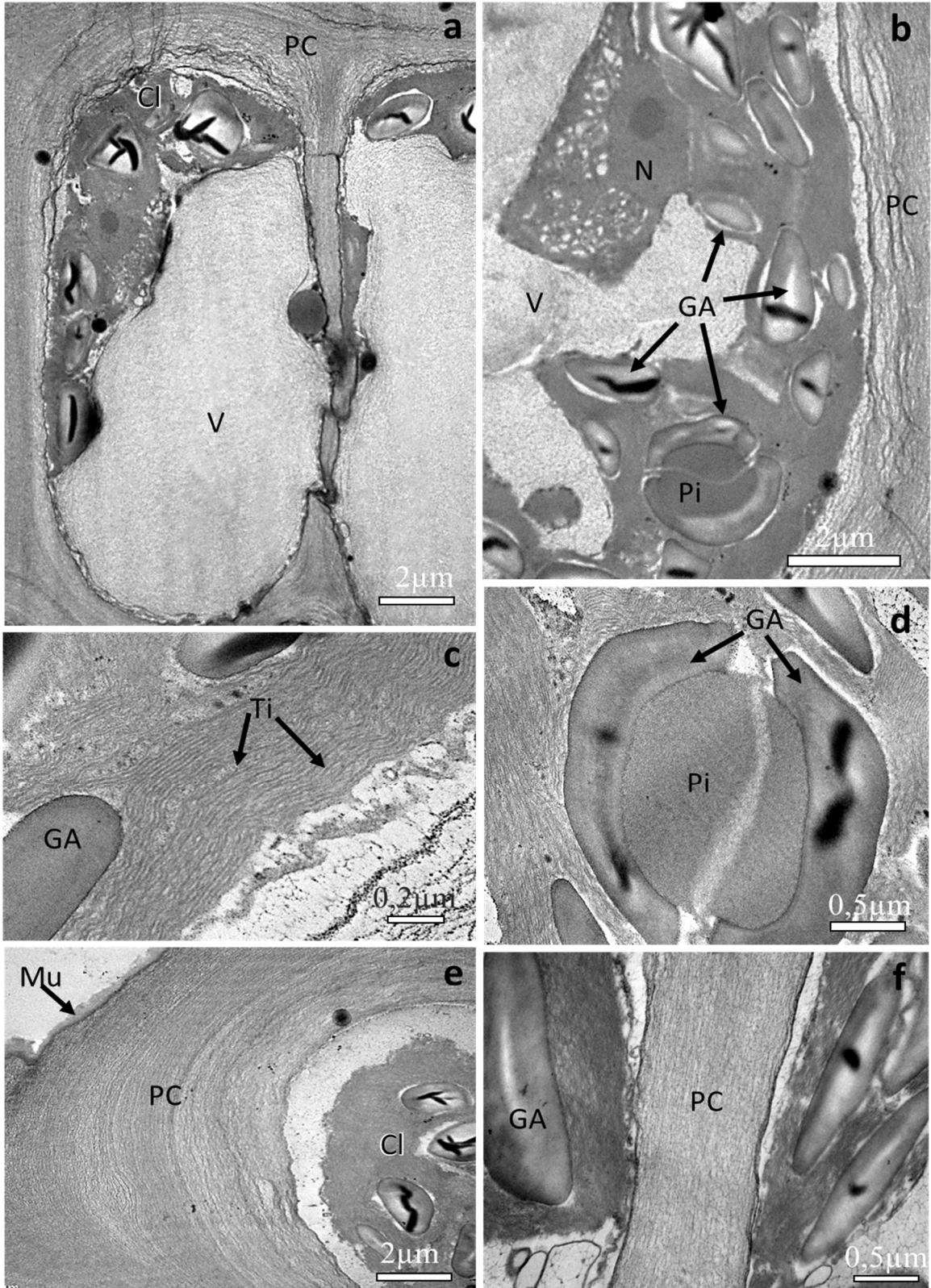


Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com 4 mM de NaNO₃ (v.S. 50%/controle positivo). a- Células com citoplasma parietal um grande vacúolo. b - Porção do citoplasma mostrando cloroplasto com grãos de amido e pirenoide. Núcleo evidente e pequenas vesículas de RE. c. Detalhe do cloroplasto com tilacoides bem preservados. d- Pirenoide envolvido por grãos de amido. e,f- A parede celular é composta por fibrilas organizadas, com maior deposição na superfície do que entre as células e é coberta por uma camada de mucilagem. g- Mitocôndrias adjacentes ao cloroplasto. Cl- Cloroplasto. GA- Grão de Amido. Mi- Mitocôndrias. Mu- Mucilagem. N- Núcleo. PC- Parede Celular. Pi- Pirenoide. Ti- Tilacoides. V- Vacúolo. Fonte: A autora

4.9.3. 25 mM de nitrato de sódio

Com uma concentração intermediária de 25 mM de nitrato de sódio, as células de *U. ohnoi* mantiveram a organização celular característica da espécie, com um cloroplasto em forma de cálice mantendo localização periférica e um grande vacúolo voltado para a região central (Fig. 13a). Nos cloroplastos, os pirenoides estavam bem definidos e em alguns cortes foi possível observar dois ou mais no mesmo cloroplasto (Fig 13b). Nesta organela as membranas tilacoidiais bem definidas e organizadas de forma paralela, agregadas em alguns pontos formando granum (Fig.13c,g). Entre estas membranas, foi possível identificar poucos grãos de amido, muitas vezes envolvendo o pirenoide (Fig. 13b,c). Estas células, na região superficial, são envolvidas por parede celular constituída de microfibrilas concêntricas mergulhadas em uma matriz amorfa (Fig 13a,d). A parede entre células é mais fina e apresentou uma distribuição mais dispersa das microfibrilas, às vezes irregularmente organizadas especialmente próximo à membrana plasmática (Fig. 13e,f). Além disso, observou-se que a parede externa está coberta por mucilagem, como nos demais tratamentos (Fig. 13d). Pequenas mitocôndrias foram observadas próximas ao cloroplasto (Fig. 13f). Um núcleo com nucléolo bem desenvolvido, indicando atividade celular intensa, foi observado na maioria das células analisadas (Fig. 13g).

Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U. ohnoi* do grupo tratado com 25 mM de nitrato de sódio.

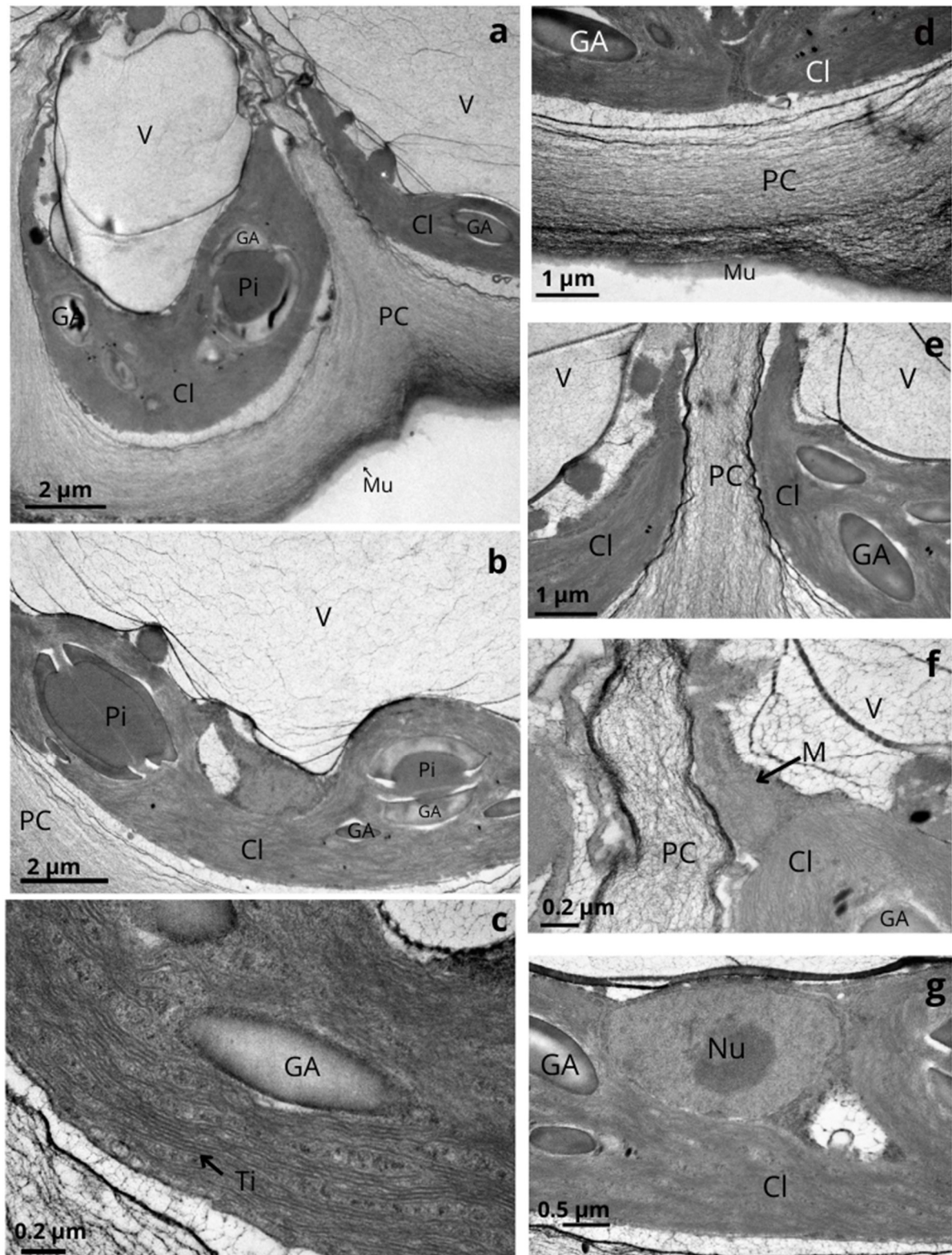


Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com 25 mM de NaNO_3 . a- A organização celular foi mantida, revelando um cloroplasto na superfície apical

celular junto com um grande vacúolo. b- Dois pirenoides são observados no mesmo cloroplasto envoltos por grãos de amido que são observados em pouca quantidade. c- Membranas tilacoides bem definidas e organizadas podem ser observadas. d, e- A parede celular apresenta fibrilas levemente desorganizadas e tem distribuição dispersa, sendo a parede externa coberta por uma camada de mucilagem. f- Mitocôndrias foram observadas adjacentes ao cloroplasto. g- Nota-se um núcleo com nucléolo. Cl- Cloroplasto. GA- Grão de Amido. Mi- Mitocôndrias. Mucilagem. Nu- Nucléolo. PC- Parede Celular. Pi- Pirenoide. Ti- Tilacoides. V- Vacúolo. Fonte: A autora

4.9.4. 50 mM de nitrato de sódio

Este tratamento também exibiu a morfologia subcelular característica de *Ulva*, onde o cloroplasto ocupa a periferia celular e um grande vacúolo é evidente (Fig. 14a). O vacúolo, rico em material elétron transparente, ocupa a maior porção do citoplasma deslocando as demais organelas para a periferia. O cloroplasto, em corte longitudinal, tem formato de cálice onde pirenoides foram observados sempre associados à grãos de amido (Fig. 14a,c,d). Neste cloroplastos, corroborando ao visualizado na microscopia de luz, poucos grãos de amido, de tamanho reduzido, foram vistos dispersos entre os tilacoides (Fig. 14c,d). Abaixo do cloroplasto, em uma reentrância, foi possível observar um grande núcleo envolvido por porções do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 14b,c).

Um maior número de mitocôndrias foi observado adjacente ao cloroplasto (Fig. 14e), sugerindo uma alta demanda energética. A parede celular superficial é menos espessa quando comparada a outros tratamentos Também possui microfibrilas bem organizadas com densidades diferentes (Fig. 14f,g). A porção superficial da parede celular é revestida por uma delicada camada de mucilagem (Fig. 14g).

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U. ohnoi* do grupo tratado com 50 mM de nitrato de sódio.

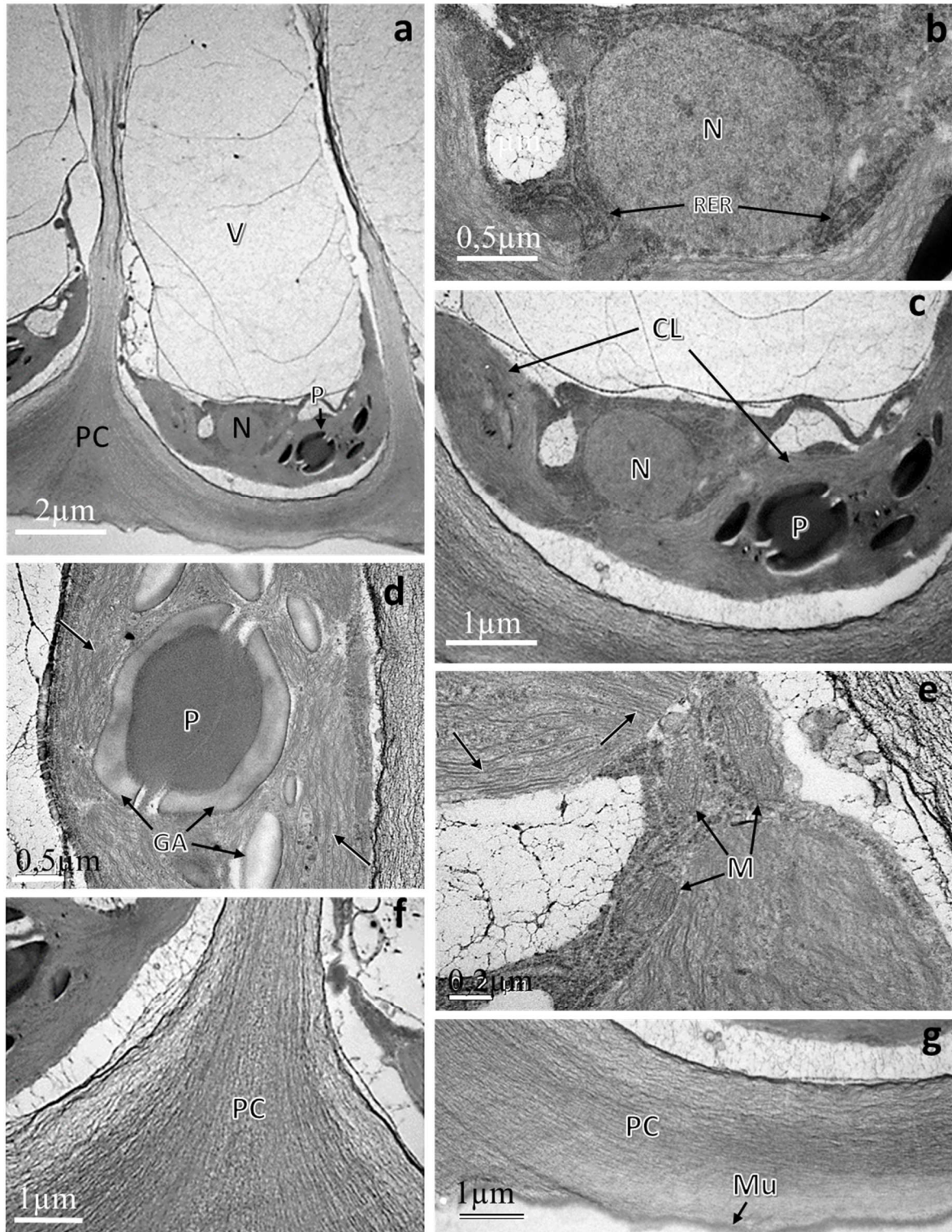


Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com 50 mM de NaNO_3 . a- Célula em corte longitudinal com cloroplasto na superfície apical e grande vacúolo.

b.c- Porção do citoplasma com o núcleo, retículo endoplasmático rugoso e partes de cloroplasto. d- Parte de um cloroplasto com grande pirenoide associado à grãos de amido, grãos de tamanho reduzido dispersos entre membranas tilacoidais. e- Mitocôndrias podem ser vistas vizinhas ao cloroplasto. f,g- Detalhes da parede celular entre as células e na superfície, que é coberta por mucilagem. Cl- Cloroplasto. GA- Grãos de Amido. N- Núcleo. Mi- Mitocôndrias. Mu- Mucilagem. PC- Parede Celular. P- Pirenoide. RER- Retículo endoplasmático Rugoso. Setas- Tilacoides. V- Vacúolo. Fonte: A autora

4.9.5. 100 mM de nitrato de sódio

Na dose máxima testada (100 mM) a microscopia eletrônica de transmissão evidenciou que a ultraestrutura não foi alterada. O vacúolo e o cloroplasto caliciforme na superfície apical celular seguiram suas conformações tradicionais, como observado nas concentrações anteriores (Fig. 15a). Grãos de amido estão imersos entre as membranas do tilacoides e envolvendo o pirenoide (Fig. 15a,d). Os cloroplastos com tilacoides bem definidos, associados em alguns pontos, formando granum (Fig. 15b-d). Nestas células foi observado atividade celular intensa evidenciada pela justaposição de cloroplastos, retículo endoplasmático rugoso, núcleo e mitocôndria (Fig. 15b). Pequenas mitocôndrias foram vistas sempre próximas ao cloroplasto (Fig. 14b,c). A superfície do talo é revestida por uma fina camada de mucilagem amorfa (Fig. 15d,e). Abaixo dessa mucilagem, observa-se a parede celular que reveste a superfície do talo formada por duas camadas, a mais periférica é mais eletrondensa e mais fina e a interna é mais espessa e formada por numerosas microfibrilas mergulhadas em uma matriz amorfa. Nas paredes celulares, localizadas entre as células, foi possível verificar algumas regiões onde as microfibrilas parecem estar colapsadas. (Fig. 15a,b).

Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais de *U. ohnoi* do grupo tratado com 100 mM de nitrato de sódio.

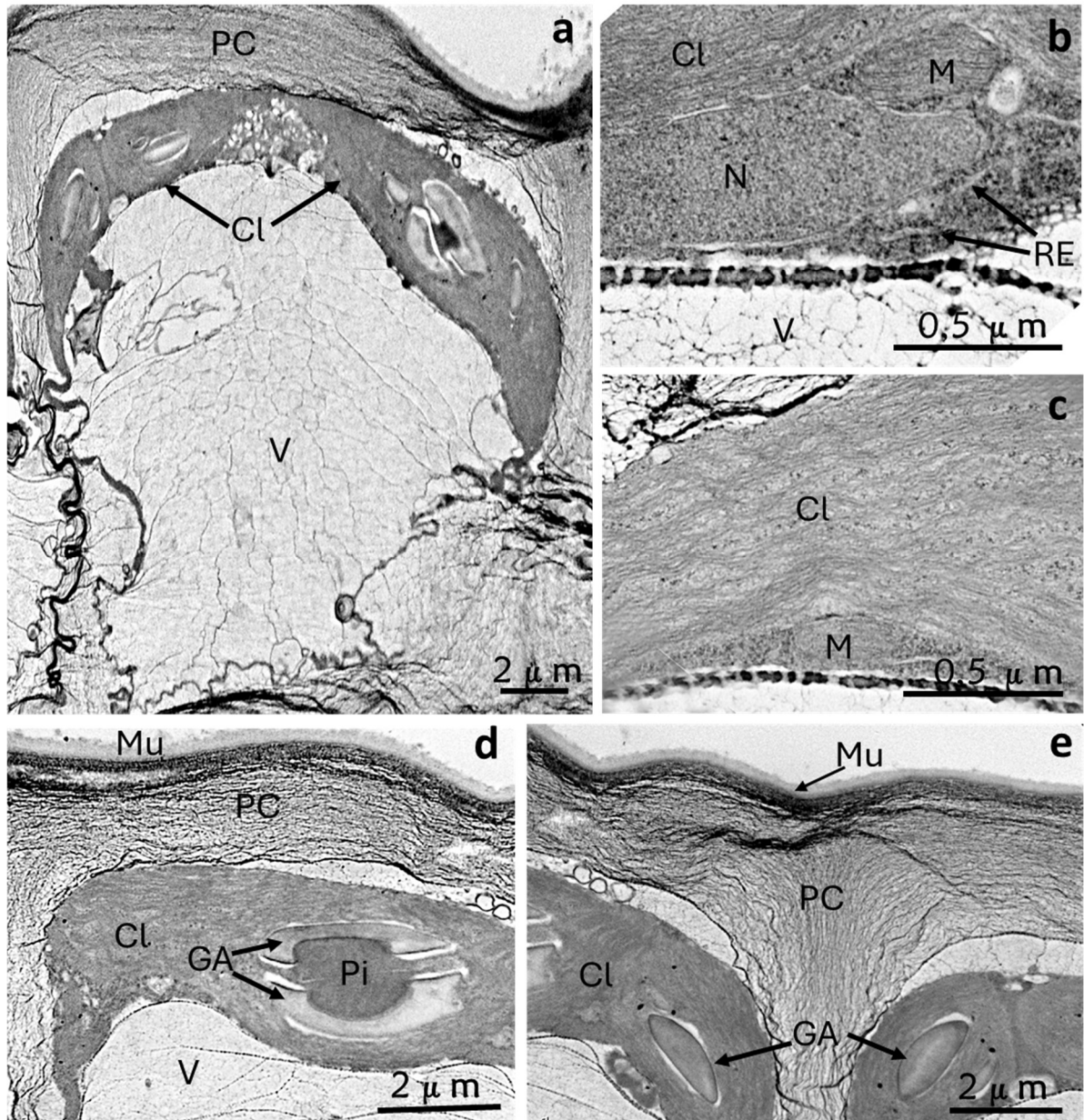


Figura 15. Microscopia eletrônica de transmissão das secções transversais dos talos de *U. ohnoi* após o tratamento com 100 mM de NaNO_3 . a- A ultraestrutura celular foi mantida, revelando um cloroplasto na superfície apical celular junto com um grande vacúolo. b - Neste corte é possível observar a justaposição do núcleo, cloroplasto, mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso. c- Detalhe do cloroplasto com tilacóides paralelos, e mitocôndria adjacente. d- Porção da célula com cloroplasto com grande pirenoide envolvido por grãos de amido. Parede celular externa formada por duas regiões, revestida por mucilagem amorfa. Cl- Cloroplasto. GA- Grão de amido. Mi- Mitocôndrias. Mu- Mucilagem. N- Núcleo. PC- Parede Celular. Pi- Pirenoide. RE- Retículo endoplasmático. V- Vacúolo. Fonte: A autora.

4.10. Amido e Açúcares Solúveis Totais

4.10.1. Amido

A análise bioquímica para dosagem de amido revelou resultados consistentes com as análises microscópicas anteriores. Demonstrando uma maior produção deste polissacarídeo utilizado como reserva energética, nas amostras sem nitrato de sódio ($39,69 \pm 3,27$). A análise de variância de um fator indicou diferença estatística entre todos os outros grupos (Fig. 15). Os grupos, controle positivo ($18,86 \pm 0,80$) e 100 mM ($15,74 \pm 1,69$) produziram quantidade intermediária do carboidrato entre os tratamentos. O tratamento com 25 mM resultou na menor produção de amido ($9,95 \pm 1,72$), aproximadamente 4 vezes menor do que o controle negativo, seguido pelo tratamento com 50 mM de NaNO_3 ($12,86 \pm 48$).

Figura 16 - Taxa de concentração de amido

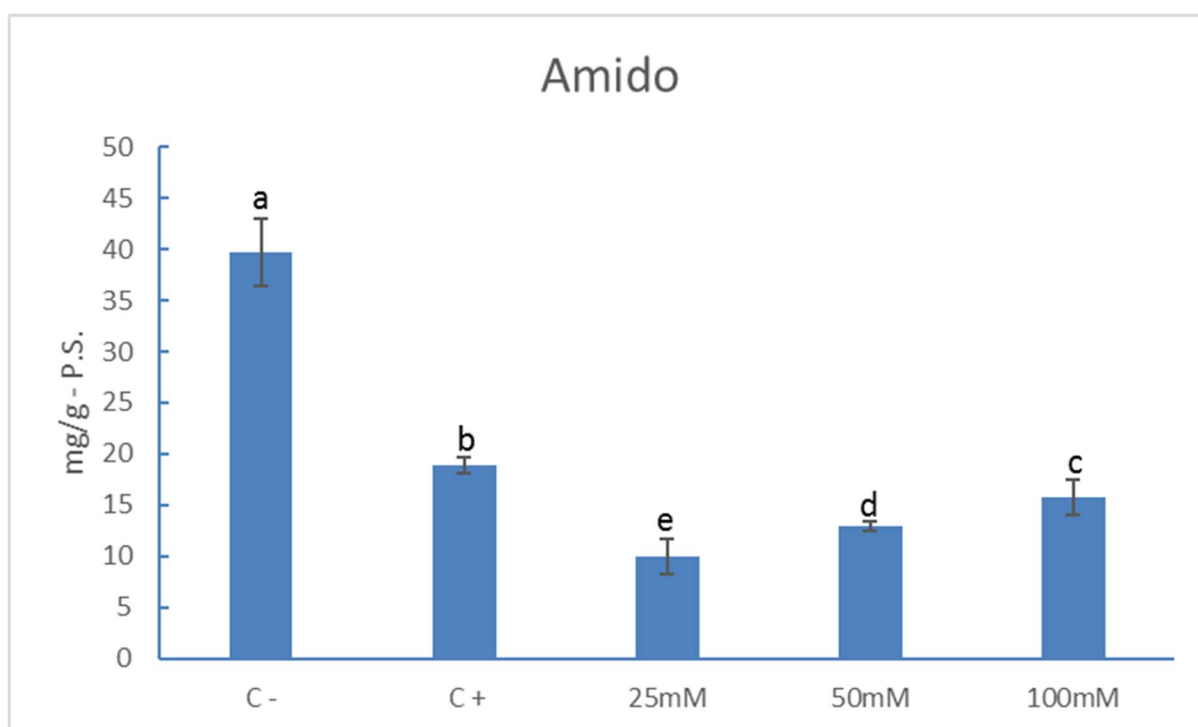


Figura 16. Análise bioquímica de dosagem de amido após o tratamento com diferentes concentrações de nitrato de sódio por um período de 7 dias. Todos os grupos produziram amido. A ausência de NaNO_3 culminou na maior produção de amido com diferenças estatisticamente significativas dos outros grupos. A dosagem de 25 mM de NaNO_3 foi a que apresentou menor produção do polissacarídeo, seguida das amostras com 50 mM. O controle positivo e o tratamento com 100 mM de NaNO_3 apresentaram proporções semelhantes. Valores apresentados com média ($n=8$, média \pm desvio padrão) Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora

4.10.2. Açúcares Solúveis Totais

A dosagem dos açúcares totais mostrou que este parâmetro não foi significativamente afetado pelas diferentes concentrações de nitrato de sódio (Fig. 17), apresentando pouca variação no teor. O tratamento sem nitrato de sódio ($43 \pm 0,02$) foi estatisticamente similar ao tratamento com 25 mM ($44 \pm 0,06$). Os tratamentos controle positivo ($0,37 \pm 0,02$) e 50 mM ($0,38 \pm 0,00$) também fora, estatisticamente similares. O grupo que apresentou a maior produção foi o de 100 mM ($49 \pm 0,11$).

Figura 17 - Taxa de concentração de açúcares solúveis totais em miligramas por gramas considerando o peso seco das amostras ao final do período experimental.

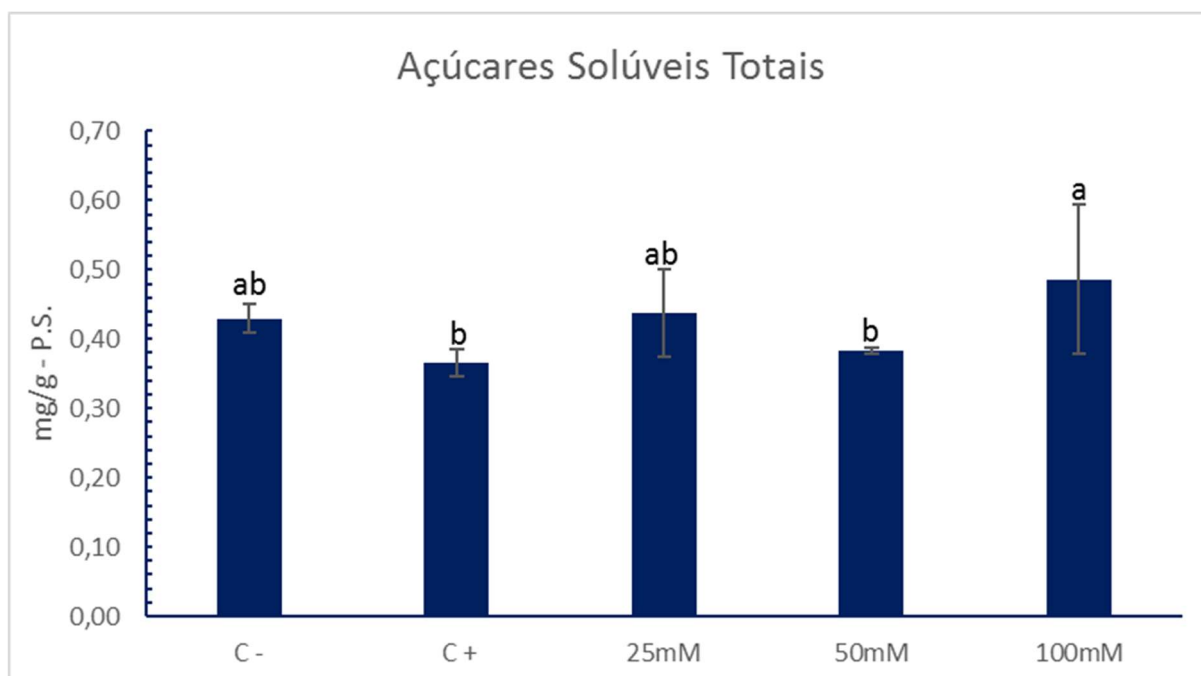


Figura 17. Análise bioquímica de dosagem dos açúcares totais após o tratamento com diferentes concentrações de NaNO_3 por um período de 7 dias. Taxas positivas foram verificadas em todos os tratamentos sem grandes variações. Valores apresentados com média ($n=8$, média \pm desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora.

5. DISCUSSÃO

Após a exposição a várias concentrações de nitrato de sódio, os talos de *U. ohnoi* exibiram respostas distintas, demonstrando uma relação direta entre a concentração do composto e as alterações observadas nos níveis fisiológicos, estruturais e ultraestruturais. Corroborando Sterner & Elser (2002) onde destacam que um dos fatores críticos que influenciam no sucesso ecológico das macroalgas é a habilidade em manter proporções equilibradas de carbono, nitrato e fosfato. Conforme observado por Kumar e Bera (2020), diferentes concentrações de nitrogênio, em diferentes proporções, podem modificar as condições de crescimento em algas.

No que diz respeito à taxa de crescimento, os resultados deste experimento indicaram uma menor produção de biomassa em *U. ohnoi* quando cultivada em meio sem nitrato de sódio. Um padrão semelhante foi observado por Prabhu *et al.* (2019) utilizando o mesmo modelo, sob privação de nutrientes nitrato e fosfato. Isso evidencia que, mesmo na presença de fosfato, a ausência de nitrato afeta o desenvolvimento da alga, destacando a importância deste macronutriente para a espécie. Ainda, em relação à taxa de crescimento, foi observado que as concentrações intermediárias de 25 e 50 mM de nitrato de sódio, utilizadas nesta pesquisa, resultaram nas taxas de crescimento mais elevadas. Esse padrão foi semelhante ao encontrado por Carvalho (2019) na alga vermelha *Gelidium floridanum*, que também apresentou uma taxa superior na concentração de 25 mM de NaNO₃. Com base nestas observações pode supor que, sendo uma espécie oportunista, *U. ohnoi* demanda um grande e rápido consumo de nutrientes para desenvolvimento de biomassa algal.

Ao analisar a morfologia externa, além de um aumento significativo na biomassa, observou-se que as algas dos grupos com concentrações de 25 mM e 50 mM de nitrato de sódio exibiram uma coloração verde mais intensa, especialmente quando comparadas às algas cultivadas sem a adição de nitrato de sódio. Estes achados foram consistentes com os resultados da quantificação dos pigmentos fotossintéticos, revelando uma maior concentração de clorofila *a* nos tratamentos intermediários e uma menor concentração no tratamento sem nitrato de sódio. Davidson *et al.* (2007) verificaram que, na macroalga marrom *Laminaria saccharina* (L.) J.V. Lamour., a disponibilidade de nitrogênio estava fortemente relacionada ao conteúdo de pigmentos, apresentando valores mais baixos em algas com limitação de nitrogênio (N), corroborando nossos achados. Na macroalga vermelha *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*, a presença de nitrato também levou ao aumento dos pigmentos fotossintéticos (Pereira *et al.*, 2020), assim como visto neste estudo. A clorofila *a* é o pigmento fotossintetizante primário das algas verdes, sendo responsável pela absorção da luz e pela transferência de energia para o

centro de reação fotossintético (Cabrera, 2023; Moustakas *et al.*, 2021). O metabolismo do nitrogênio e a atividade fotossintética são processos intimamente ligados, e uma escassez de nitrogênio afeta a fotossíntese, especialmente a absorção de luz devido à redução nos níveis de clorofila (Geider *et al.*, 1993).

A eficiência fotossintética também foi analisada por meio da microscopia confocal de varredura a laser, que permite observar a autofluorescência da clorofila. Moléculas de clorofila apresentam autofluorescência através de seus anéis de porfirina (Lamb *et al.*, 2018). Esse método evidenciou uma maior eficiência fotossintética no tratamento com 25 mM e somada às descobertas descritas anteriormente, indicam que essa concentração é a mais eficiente para esse parâmetro. Em plantas, a autofluorescência é utilizada para medir o estado fisiológico de culturas ou parcelas experimentais por meio da fluorescência da clorofila, podendo ser aplicada em bioquímica e biotecnologia vegetal (Donaldson, 2020). Além disso, observou-se a menor taxa fotossintética no tratamento sem adição de nitrato, corroborando com a clorose indicada nas observações macroscópicas e com a quantificação bioquímica de pigmentos, o mesmo foi observado por Pereira, *et al.*, 2020, que usou as mesmas concentrações de nitrato na alga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis*. Compreender essas nuances nas respostas fotossintéticas das algas aos diferentes tratamentos é crucial para identificar padrões e mecanismos subjacentes que impactam a concentração de pigmentos e a taxa de crescimento. É importante notar que o tratamento com 100 mM de nitrato de sódio resultou em uma redução na produção de biomassa e na concentração de clorofila *a*, comparado com as concentrações intermediárias, mostrando um padrão de desenvolvimento semelhante ao controle positivo. No entanto, são necessárias investigações mais aprofundadas para entender completamente esse fenômeno. Entretanto, pode-se sugerir que o excesso deste nutriente pode se tornar um fator limitante em concentrações mais altas.

Outros pigmentos investigados nesta pesquisa foram os carotenoides totais, que apresentaram um perfil de resposta semelhante ao da clorofila. As concentrações foram maiores nos tratamentos que continham nitrato de sódio, com o tratamento de 25 mM apresentando o maior conteúdo. Isso evidencia a influência da disponibilidade de nitrato também sobre esses pigmentos, corroborando os achados de Pereira *et al.* (2020) em *P. acanthophora* var. *brasiliensis* e de Korbee *et al.* (2010) na macroalga *Heterocapsa* sp em respostas a diferentes concentrações de NaNO₃. Além de atuarem como fotoprotetores, os carotenoides também estão intrinsecamente relacionados à fotossíntese, pois ampliam a faixa de comprimentos de onda de luz que a estimula, absorvendo a região azul-esverdeada do espectro solar e transferindo essa energia para as clorofilas (Hashimoto *et al.*, 2016). Portanto, pode-se supor que os níveis

semelhantes dos pigmentos quantificados estão relacionados a uma maior eficiência fotossintética, uma vez que as algas deste estudo não estavam sob estresse luminoso, não necessitando dos carotenoides como fotoproteção.

Neste estudo, foi observado, por meio do teste citoquímico com azul de toluidina, e confirmado pela microscopia eletrônica de transmissão, um aumento na espessura da parede celular nas algas cultivadas na ausência de nitrato de sódio. Este dado pode ser interpretado como uma resposta da alga à baixa disponibilidade deste macronutriente. Visto que, o nitrogênio é essencial e atua como um fator limitante para a produtividade e o crescimento das algas marinhas (Suthar *et al.*, 2019). A parede celular é uma estrutura que proporciona proteção e suporte às células vegetais, sendo principalmente composta por polissacarídeos e o seu espessamento pode ser uma estratégia para reforçar a integridade celular contra possíveis danos físicos ou químicos (Le Gall *et al.*, 2015). Alguns dos polissacarídeos presentes na parede celular do gênero *Ulva* incluem celulose, ulvana e xiloglucano. A ulvana é composta por ramnose, xilose, ácido glucurônico e ácido idurônico (Wahlstrom *et al.*, 2020). Esses componentes ácidos podem ser identificados por meio de uma reação metacromática com azul de toluidina (Epstein *et al.*, 1992). Desta forma, avalia-se que a reação metacromática mais intensa nos espécimes cultivados com 0mM de nitrato de sódio foi resultado de uma maior concentração de compostos ácido na parede celular. Além da parede celular, granulações metacromáticas também são observadas no vacúolo, indicando a presença de componentes ácidos, como mecanismo de reserva.

A variação na quantidade de grãos de amido foi outra resposta fisiológica observada nos tratamentos, evidenciada pelo teste citoquímico com ácido periódico de Schiff, pela microscopia de luz de campo claro, com e sem tratamento com lugol, que cora os grãos de amido, e pela microscopia eletrônica de transmissão. Nas algas cultivadas sem a presença de nitrato de sódio, foi observado um aumento significativo no número de grãos de amido nos cloroplastos, juntamente com uma variedade de tamanhos e formas. Esse achado é consistente com o que foi descoberto por Prabhu e colaboradores (2019) quando cultivaram *U. ohnoi* sem nutrientes. O amido é composto por polissacarídeos de glicose e serve como uma forma de armazenamento de energia para períodos de escassez ou alta demanda (Prabhu *et al.*, 2019). As concentrações de 25 mM e 50 mM, que demonstraram taxas de crescimento mais elevadas e maior produção de pigmentos fotossintéticos, apresentaram os níveis mais baixos de produção de amido. Sugerindo rotas metabólicas distintas, onde o investimento energético foi utilizado na proliferação celular. Corroborando esses resultados, observou-se que a quantificação bioquímica revelou concentrações menores de grãos de amido nas algas cultivadas com 25 e 50

mM de nitrato de sódio. Esses dados sugerem que os compostos fotossintetizados nestes tratamentos, estão sendo direcionados para a formação de biomassa.

Apesar da quantificação dos açúcares solúveis totais revelar taxas positivas para todos os tratamentos, com diferença estatística entre o tratamento com 100 mM e os grupos controle e 50 mM, este parâmetro não parece estar correlacionado com os diferentes níveis de nitrato, já que não foi observado um padrão no teor de açúcares relacionado aos tratamentos. Em plantas, os açúcares solúveis estão envolvidos em diversos mecanismos metabólicos, inclusive na sinalização celular, onde regulam diferentes genes, principalmente envolvidos no processo fotossintético, metabolismo do açúcar e na produção de osmólitos (Rosa *et al.*, 2009). Isso pode indicar que o açúcar disponível estava sendo utilizado em vias alternativas, uma vez que tanto os tratamentos com alta taxa fotossintética quanto aqueles sob estresse apresentaram níveis variados dessas moléculas.

Em termos gerais, o cloroplasto foi a organela que experimentou as maiores mudanças em resposta aos diferentes níveis de nitrato. Além das flutuações na concentração de grãos de amido e clorofila *a*, os tilacoides também foram impactados. Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que na ausência de nitrato, os cloroplastos mostraram degradação do sistema de tilacoides, ao mesmo tempo em que houve um aumento no número de grãos de amido indicando que o sistema membranar foi convertido para estruturas de reserva. Essas observações foram também relatadas em um estudo conduzido com *Chlorella vulgaris* por Liu *et al.* (2022). Em contraste, na presença de nitrato, as algas apresentaram tilacoides intactos e organizados, corroborando a maior concentração de clorofila, pigmentos estes inseridos nas membranas dos tilacoides. Além do aumento da quantidade e tamanho dos grãos de amido sob condições de privação de nitrogênio, o aumento do número dos plastoglóbulos também representou resposta do metabolismo do cloroplasto a este nutriente. Plastoglóbulos são estruturas lipoprotéicas fixadas às membranas dos tilacoides, que participam do metabolismo do cloroplasto e respostas ao estresse como a privação de nitrogênio (Arzac *et al.*, 2022). A proporção de grânulos de amido e plastoglóbulos na matriz do estroma aumentou e o sistema de membrana interna foi bastante reduzido. Parece que o nitrogênio desempenha um papel importante na formação da estrutura do cloroplasto e, portanto, na intensidade fotossintética. De acordo com a análise de Mantri e colaboradores (2020), no gênero *Ulva*, é comum encontrar apenas um cloroplasto parietal em forma de taça em cada célula, acompanhado por um pirenoide. Esses achados estão em consonância com os resultados deste estudo. Entretanto, as amostras com maior disponibilidade de nitrogênio apresentaram 2 a 4 pirenoides por célula indicando grande produção de fotossintetizados. O pirenoide é uma

estrutura densa que localizada no interior do cloroplasto, geralmente cercada por grãos de amido neste gênero, desempenha um papel central na concentração da enzima rubisco, fundamental para fixação de carbono (Prabhu, *et al.*, 2019). Sendo a rubisco uma proteína, mudanças na disponibilidade de nitrogênio, levaram a redução ou o aumento do tamanho e quantidade de pirenoides. Assim, mudanças nos compartimentos de assimilação e armazenamento foram observadas com a flutuação dos níveis de nitrogênio indicando o envolvimento direto deste macronutriente na fisiologia e organização celular na espécie alvo.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados indicaram que o nitrato desempenha um papel crucial em vários processos morfofisiológicos nas células de *U. ohnoi*, como a sua morfologia, produção de pigmentos e carboidratos de reserva, alterando significativamente a estrutura plastidial. As diferentes concentrações de nitrato podem ser selecionadas com base nos objetivos específicos do cultivo, como remoção de excesso de nitrogênio, levando a uma intensa proliferação celular aumentando a biomassa algal. A ausência do nitrato, pode ser considerada fator estressante, que reduz o incremento de biomassa, enquanto pode ser positivo para produção de amido. Concentrações intermediárias podem ser favoráveis em processos biotecnológicos em que demandam um maior volume algal como a produção de diversos bioprodutos. Esses aspectos podem ter implicações para a qualidade e a aplicabilidade da alga para fins industriais ou ambientais.

7. REFERÊNCIAS

- ARZAC, Miren I.; FERNÁNDEZ-MARÍN, Beatriz; GARCÍA-PLAZAOLA, José I. *More than just lipid balls: quantitative analysis of plastoglobule attributes and their stress-related responses*. *Planta*, v. 255, n. 3, p. 62, 2022.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press, 2005.
- BOUZON, Z. L. *Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de Hypnea musciformis (Wulfen) JV Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)*. *Brazilian Journal of Botany*, v. 29, p. 229-238, 2006.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. *Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 19, p. 360-369, 2013.
- CABRERA H. O. *Nuevos ingredientes alimentarios a partir del alga Ulva ohnoi: influencia de los procesos de conservación en su composición*. 2023. BS thesis. Universitat Politècnica de Catalunya.
- CARNEIRO, V. A. R. *Estudos morfológicos e moleculares do gênero Ulva L. (Ulvaceae, Chlorophyta) no sudeste do Brasil*. 2021. 195 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
- CARVALHO, M. F. de. *Cultivo da Macroalga Vermelha Gelidium floridanum em Diferentes Concentrações de Nitrato: Efeitos Morfofisiológicos*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- DAVISON, I. R. *et al. Response of Laminaria saccharina (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation*. *Journal of Phycology*, v. 43, n. 4, p. 636-646, 2007.
- DONALDSON, L. *Autofluorescence in plants*. *Molecules*, v. 25, n. 10, p. 2393, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>.
- 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.

FAO. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022*. Rome, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc2211en>.

FERRARA, L. *Seaweeds: A food for our future*. Journal of Food Chemistry & Nanotechnology, v. 6, p. 56-64, 2020.

GABRIELSON, P. In: GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. Publicação eletrônica mundial, Universidade Nacional da Irlanda, Galway, 30 dez. 2023. Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 21 maio 2024.

GAHAN, P. B. *Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction*. Academic Press, London, 1984.

GEIDER, R. J. *et al. Response of the photosynthetic apparatus of Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation*. Journal of Phycology, v. 29, n. 6, p. 755-766, 1993.

GORDON, E.; MCCANDLESS, E. *Ultrastructure and histochemistry of Chondrus crispus Stackhouse*. In: Harvey, New Scotia Institute of Science. p. 111-133, 1973.

GRUBER, N. *The marine nitrogen cycle: overview and challenges*. Nitrogen in the Marine Environment, v. 2, p. 1-50, 2008.

HASHIMOTO, H.; URAGAMI, C.; COGDELL, R. J. *Carotenoids and photosynthesis*. Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function, p. 111-139, 2016.

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

HOWARTH, R. W.; MARINO, R. *Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: evolving views over three decades*. Limnology and Oceanography, v. 51, n. 1part2, p. 364-376, 2006.

HURD, C. L.; HARRISON, P. J.; BISCHOF, K.; LOBBAN, C. S. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, 2014.

KHOO, C. G. *et al. Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products*. Bioresource Technology, v. 292, p. 121964, 2019.

- KIM, J. K. *et al.* *Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of Porphyra (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast.* Journal of Applied Phycology, v. 19, n. 5, p. 431-440, 2007.
- KORBEE, N.; MATA, M. T.; FIGUEROA, F. L. *Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in Heterocapsa sp. (Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability: mycosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle.* Limnology and Oceanography, v. 55, p. 899-908, 2010.
- KUMAR, A.; BERA, S. *Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation.* Bioresource Technology Reports, v. 12, p. 100584, 2020.
- LAMB, J. J.; RØKKE, G.; HOHMANN-MARRIOTT, M. F. *Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K.* Photosynthetica, v. 56, n. 1, p. 105-124, 2018.
- LAWTON, R. J. *et al.* *Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using Ulva: selecting target species and strains.* PLoS One, v. 8, n. 10, p. e77344, 2013.
- LE GALL, H. *et al.* *Cell wall metabolism in response to abiotic stress.* Plants, v. 4, n. 1, p. 112, 2015.
- LEE, E. H. *et al.* *Cellulose extraction from green algae, Ulva ohnoi, and its application to PVA-based antibacterial composite films incorporated with zinc oxide nanoparticles.* Packaging Technology and Science, 2024.
- LEWIS, Owen AM; LEWIS, Owen AM. *Plants and nitrogen.* Cambridge University Press, 1986.
- LIU, T. *et al.* *Biochemical and morphological changes triggered by nitrogen stress in the oleaginous microalga Chlorella vulgaris.* Microorganisms, v. 10, n. 3, p. 01-16, 2022.
- LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. *Seaweed ecology and physiology.* Cambridge University Press, 1994.
- MAGNUSSON, M. *et al.* *Enrichment processes for the production of high-protein feed from the green seaweed Ulva ohnoi.* Algal Research, v. 41, p. 101555, 2019.

- MANTRI, V. A. *et al.* *Concise review of green algal genus Ulva Linnaeus*. Journal of Applied Phycology, v. 32, p. 2725-2741, 2020.
- MCCREADY, R. M. *et al.* *Determination of starch and amylose in vegetables*. Analytical Chemistry, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, 1950.
- MOHAN, E. H.; MADHUSUDAN, S.; BASKARAN, R. *The sea lettuce Ulva sensu lato: Future food with health-promoting bioactives*. Algal Research, p. 103069, 2023.
- 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.
- OUYANG, Y.; *et al.* *Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil*. Soil Biology and Biochemistry, v. 96, p. 4-15, 2016.
- OURIQUES, L.; BOUZON, Z. *Ultrastructure of germinating tetraspores of Hypnea musciformis (Gigartinales, Rhodophyta)*. Plant Biosystems, v. 137, p. 193-201, 2003.
- 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*. 1986.
- PEREIRA, L. *Guia ilustrado das macroalgas*. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2009.
- PEREIRA, D. T. *et al.* *Effects of ultraviolet radiation on the morphophysiology of the macroalga Pyropia acanthophora var. brasiliensis (Rhodophyta, Bangiales) cultivated at high concentrations of nitrate*. Acta Physiologiae Plantarum, v. 42, p. 61, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03057-5>.
- PRABHU, M. *et al.* *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.
- PRABHU, M. S. *et al.* *Integrated biorefinery process for sustainable fractionation of Ulva ohnoi (Chlorophyta): process optimization and revenue analysis*. Journal of Applied Phycology, v. 32, p. 2271-2282, 2020.

RAINA, R.; MAZAHAR, S. Capítulo do livro. In: YOUSUF, P. Y.; SHABIR, P. A.; HAKEEM, K. R. (Eds.). *Advances in Plant Nitrogen Metabolism*. 1. ed. CRC Press, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781003248361>. Acesso em: [21/05/2024].

RAYMUNDO, M. dos S.; HORTA, P.; FETT, R. *Antioxidant in vitro activity of extracts of some green seaweed (Chlorophyta) from southern Brazilian coast*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, p. 495-503, 2004.

RIBEIRO, A. L. N. *et al. 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.

REYNOLDS, E. *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. Journal of Cell Biology, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROSA, M. *et al. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants*. Plant Signaling & Behavior, v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>.

SANZ-LUQUE, E. *et al. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae*. Frontiers in Plant Science, v. 6, p. 163887, 2015.

SHANNON, J. C. *Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature Zea mays. Kernels following ¹⁴CO₂ treatment of intact plants*. Plant Physiology, v. 43, n. 8, p. 1215-1220, 1968.

SIMON, C.; MCHALE, M.; SULPICE, R. *Applications of Ulva biomass and strategies to improve its yield and composition: A perspective for Ulva aquaculture*. Biology, v. 11, n. 11, p. 1593, 2022.

STERNER, R.; ELSER, J. J. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, 2002.

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. 101583, 2019.

VON STOSCH, H. *Wirkungen von Jod und Arsenit auf Meeresalgen in Kultur*. In: International Seaweed Symposium, 14, Proceedings of the Fourth International Seaweed Symposium. Oxford: Pergamon Press, 1963. p. 142-150.

WAHLSTRÖM, N. *et al.* *Composition and structure of cell wall ulvans recovered from Ulva spp. along the Swedish west coast*. Carbohydrate Polymers, v. 233, p. 115852, 2020.

WICHARD, T. *et al.* *The green seaweed Ulva: a model system to study morphogenesis*. Frontiers in Plant Science, v. 6, p. 72, 2015.

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, p. 307-313, 1994.

ZITTA, C. S. *et al.* *Callus ontogeny of the Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain*. Journal of Applied Phycology, v. 25, p. 615-629, 2013.