



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARIANA FONTES DE CARVALHO

**CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Gelidium floridanum* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO: EFEITOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

Florianópolis, 2019

MARIANA FONTES DE CARVALHO

**CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Gelidium floridanum* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO: EFEITOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Ciências Biológicas do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do
Título de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Dra. Carmen Simioni

Florianópolis, 2019

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

Carvalho, Mariana Fontes de
CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Gelidium floridanum* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO: EFEITOS
MORFOFISIOLÓGICOS / Mariana Fontes de Carvalho ;
orientador, Carmen Simioni, 2019.
34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia Celular . 3. Algas
Marinhas . 4. Cultivo. 5. Biorremediação. I. Simioni,
Carmen. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Mariana Fontes de Carvalho

**CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Gelidium floridanum* EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO: EFEITOS
MORFOFISIOLÓGICOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado e adequado para obtenção do Título de Bacharel em Biologia, e aprovado em sua forma final pelo curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 13 de novembro de 2019.

Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Carmen Simioni
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Luciane Cristina Ouriques
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Débora Tomazi Pereira
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais.

Agradecimentos

Os quatro anos e meio de graduação não foram fáceis, e muitos obstáculos e dificuldades apareceram nessa trajetória. Entretanto, muitas pessoas foram importantes e fundamentais para minha vida pessoal e acadêmica, me dando suportes e motivação para resolver as situações da vida. Agradeço meus amigos de turma Gabriel, Isis, Fernanda Yumi, Gabriela Pinto, Débora, que desde o início do curso estiveram e estão ao meu lado, nos momentos bons e ruins. A Poliana e Laura, obrigada pelas ajudas que sempre me deram quando precisei, além dos momentos divertidos que tivemos. Meu amigo André que foi minha inspiração, um ombro amigo e parceiro para tudo, que me ajudou a estar nessa etapa que cheguei. Não poderia deixar de agradecer meus amigos de longa data, Franchescolly e Barbara, que mesmo distantes sempre foram presentes.

Aos integrantes do LABCEV, especialmente o Deonir, Thiago, João, que me ajudaram e acompanharam na construção deste trabalho. Um enorme agradecimento também para a integrante do laboratório, a Gabriela, que me ajudou em algumas etapas do experimento. Um especial agradecimento a minha orientadora Carmen Simioni por aceitar ser sua orientada, aluna e amiga. Sou muito feliz pelo vínculo e amizade que construímos fruto deste trabalho. És uma pessoa querida que me inspira e me ensina sobre muitas coisas da vida. Ao meu ex-orientador e professor Paulo Horta, que me inspirou a ser uma pesquisadora e lutar pela ciência e educação.

Aos meus pais, que mesmo morando e estudando longe deles, sempre estão presentes todos os dias, telefonando, preocupados com minhas rotinas pessoais e acadêmicas. Muito obrigada por todo o apoio que me deram e o esforço para concluir o curso, além também de incentivarem o meu crescimento profissional. Vocês são pais incríveis, e sou muito grata por estarem em minha vida e, com certeza, sem vocês eu não seria capaz de estar onde estou. Obrigada pela UFSC pelos auxílios financeiros de permanência estudantil e ao CNPQ pelos programas de iniciação científica no qual pude participar e que me ajudaram nesta e em outras pesquisas já realizadas.

E por fim, agradeço a minha pessoa, que nunca desistiu mesmo com tantas dificuldades que a vida dá. Sei que a pequena Mariana está orgulhosa da grande mulher que hoje se tornou. **Jamais desista de ser feliz!**

“O conhecimento adquirido é como uma semente lançada em solo fértil: até pode demorar algum tempo, mas acaba sempre por dar fruto.”

Autor desconhecido

RESUMO

Gelidium floridanum (W.R. Taylor, 1943) é uma alga vermelha de grande importância econômica e possui compostos na parede celular que são utilizados na indústria alimentícia, cosmética e na biotecnologia de produtos. Atualmente, grande parte dos ambientes aquáticos está sendo poluída por efluentes oriundos da ação antrópica, originados pela indústria, agricultura e principalmente por efluentes domésticos. Por causa da grande exploração e forte utilização desse organismo, esse presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do nitrato (NO_3^-) no cultivo de *G. floridanum*, a fim de conhecer as mudanças morfofisiológicas causadas pelas concentrações desse composto. Foram utilizados $1.0 \pm 0,05$ g de alga em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL em concentrações de 0, 25, 50 e 100 mM de NO_3^- durante 7 dias. Após o cultivo, foram realizadas as análises de taxa de crescimento, de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, carotenoides e ficobiliproteínas) e viabilidade celular. Análises em microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) também foram feitas para observar os efeitos estruturais e ultraestruturais nos talos, após o tratamento com diferentes concentrações de NO_3^- . As análises da taxa de crescimento e viabilidade celular se apresentaram melhor no cultivo com 25 mM de NO_3^- e os pigmentos fotossintetizantes foram maiores nas concentrações de 50 e 100 mM. As análises em ML utilizando métodos histoquímicos (Reativo de Schiff (PAS) e Azul de Toluidina (AT-O)) apresentaram maiores quantidades de grãos de amido nas células corticais em 0 mM de NO_3^- sem a formação de uma parede celular organizada. Em MET, as concentrações de 25, 50 e 100 mM apresentaram uma parede celular espessa e presença de plastoglóbulos. Conclui-se que a macroalga *G. floridanum* obteve um ótimo crescimento e desenvolvimento na concentração alta de NO_3^- de 25 mM, porém a ausência e as maiores concentrações causaram um estresse para o talo.

Palavras-chave: Carotenoides; efluentes; pigmentos fotossintetizantes; ultraestrutura.

ABSTRACT

Gelidium floridanum (W.R. Taylor, 1943) is a red seaweed of great economic importance because of its cellular wall compounds used in the food, cosmetics and biotechnology industries. Currently, most of the aquatic environments have been polluted by anthropic effluents from industries, agriculture and mainly domestic. Because of exploration and usage of this organism, the present study focusses on evaluating the effects of nitrate on the cultivation of *G. floridanum* and understand the morphophysiological changes caused the nitrate concentrations. For the cultivation, it was used $1.0 \pm 0,05$ g of seaweed in a 250 mL Erlenmeyer bottle with nitrate concentrations of 0, 25, 50 and 100 mM during 7 days. Analyses of growth rate, photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, carotenoids and phycobiliproteins) and cell viability were made after the cultivation. light microscope (ML) and transmission electronic microscope (TEM) analyzes were made to better study the cellular structural and ultrastructural effects of the nitrate concentrations of the stalk. The growth rate and cell viability analyzes were better on the 25 mM nitrate concentration. While the photosynthetic pigments showed better numbers on the 50 mM and 100 mM. The Light Microscope analyzes using histochemical methods (Schiff Reactive (PAS) and Toluidine Blue (TBO)) showed greater quantities of starch grains on the cortical cells of the 0 mM nitrate concentration, without signs of an organized cellular wall. A thick cellular wall with plastoglobules was present on the 25, 50, 100 mM nitrate concentrations. In conclusion, the seaweed *G. floridanum* had an optimal growth and development on the 25 mM nitrate concentration. While the absence or higher concentrations of nitrate caused seedling stress.

Key-words: carotenoids; effluents; photosynthetic pigments; ultrastructure.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Esquema do ciclo de vida trifásico e isomórfico de <i>Gelidium floridanum</i>	14
Figura 2: Taxas de crescimento e viabilidade celular dos talos de <i>G. floridanum</i> após o tratamento com NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM).	21
Figura 3. Concentrações de carotenóides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) dos talos de <i>Gelidium floridanum</i> após exposição à diferentes tratamentos de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM)	22
Figura 4. Microscopia de luz das secções longitudinais dos talos de <i>Gelidium floridanum</i> após o tratamento com diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM)	23
Figura 5. Eletromicrografias dos talos de <i>Gelidium floridanum</i> expostos a diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100mM) observados na microscopia eletrônica de transmissão	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de pigmentos fotossintetizantes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca), clorofila <i>a</i> e ficobiliproteínas (aloficianina, ficocianina e ficoeritrina) de <i>Gelidium floridanum</i> expostos a diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM)	22
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURA	10
LISTA DE TABELAS.....	11
SUMÁRIO	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1 Coleta e Processamento do Material Biológico	17
3.2 Condições de Cultivo	17
3.3 Morfologia e Taxa de Crescimento	17
3.4 Viabilidade Celular (MTT)	18
3.5 Análise dos Pigmentos Fotossintetizantes	18
3.5.1 Ficobiliproteínas	18
3.5.2 Clorofila a e Carotenóides	19
3.6 Análise Estrutural e Ultraestrutural	19
3.7 Análise Estatística	20
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

As algas são um grupo diversificado de organismos fotossintéticos que vão desde formas unicelulares (microalgas) a pluricelulares (macroalgas) e habitam ambientes de água doce e salgada (BHARATHIRAJA *et al.*, 2015). Segundo McHugh *et al.*, (2003), esses organismos podem crescer até 60 metros de altura. As algas são organismos dominantes em ambientes aquáticos, onde podem ser os contribuintes mais importantes para a produtividade desse ecossistema, desempenhando um papel ecológico comparável aquele exercido pelas plantas nos ambientes terrestres (RAVEN, 2014), ou seja, por meio da fotossíntese, são responsáveis pela produção de oxigênio. Podem ser usadas em uma variedade de processos industriais, como mitigação da eutrofização para o manejo de nutrientes, biorremediação, utilização do seu extrato como fertilizante, produção de biocombustível rico em energia, alimentos frescos comestíveis, entre outros (ARUMUGAN *et al.*, 2018).

As macroalgas estão divididas em três grandes grupos, as algas pardas (Phaeophyceae), vermelhas (Rhodophyta) e verdes (Chlorophyta), com grande diversidade de formas e tamanhos. Dentre as macroalgas, as algas vermelhas diferenciam-se das demais por apresentarem características marcantes: a presença de clorofila *a* e de ficobiliproteínas em seus cloroplastos, ausência de flagelos em todas as fases do ciclo de vida, e acúmulo de grãos de amido das florídeas em seu citoplasma (OLIVEIRA, 2003). Os pigmentos acessórios, como as ficobiliproteínas, mascaram a cor da clorofila *a* e dão às algas vermelhas sua coloração característica. Estas algas vermelhas têm uma ampla importância como recurso alimentar marinho, pois são ricas em vitaminas, sais minerais, proteínas com baixo teor de gordura e, por isso, com grande valor comercial.

Além disso, a produção de compostos extraídos da parede celular das macroalgas vermelhas, os ficocolóides agaranas e carragenanas também apresentam inúmeras aplicações industriais. A maioria destas aplicações, quase 90 %, é na indústria alimentícia como emulsificantes, estabilizantes e gelificantes, para a clarificação de bebidas, como elementos suspensores, entre outros usos. São também utilizadas na indústria cosmética, de medicamentos, biotecnologia, entre outras (ARMISÉN & GALATAS, 1987; OLIVEIRA & BERCHEZ, 1993).

Neste estudo destacamos a macroalga vermelha *Gelidium floridanum* W.R. Taylor, que pertence à família Gelidiaceae, distribuída amplamente entre as zonas intertidal e subtidal,

com ocorrência na maioria dos oceanos e em localidades com águas quentes e frias, com exceção apenas a ambientes polares (BOO *et al.*, 2013). Essa família apresenta o maior número de espécies presentes no gênero *Gelidium* J. V. Lamouroux, com 135 espécies (GUIRY & GUIRY, 2019b). Nesta família há algumas algas produtoras de ágar mais importante do mundo, incluindo o gênero *Gelidium* (FRIEDLANDER, 2007). A *G. floridanum* é encontrada em áreas costeiras da América do Norte, Central e do Sul (GUIRY & GUIRY, 2019a). Já no litoral brasileiro, pode ser encontrada desde o Espírito Santo até o estado do Rio Grande do Sul (KREUSCH *et al.*, 2018).

Gelidium floridanum é uma espécie que apresenta importância comercial, pois seu ágar é utilizado em diversos produtos com propriedades gelificantes e bacteriológicas (SCARIOT, 2010). Cerca de 40 % do ágar produzido no mundo é proveniente de espécies de *Gelidium* (MCHUGH, 1991). A espécie em estudo apresenta ciclo de vida trifásico isomórfico, constituído por uma fase gametofítica haploide (gametófito) e duas fases esporofíticas diploides: o carposporófito e o tetrasporófito (OURIQUES, 2002), conforme esquema abaixo (Fig. 1). Segundo Scariot (2010), os talos da macroalga crescem em pequenos tufos, com eixo principal evidente e com coloração vermelho-violácea. Seu talo pode atingir 1,5 mm de espessura e 5 a 15 cm de altura. Como apressório apresenta um conjunto de eixos cilíndricos, os rizóides. Os ramos eretos são achatados e a célula apical é saliente na depressão (CORDEIRO-MARINO, 1978).

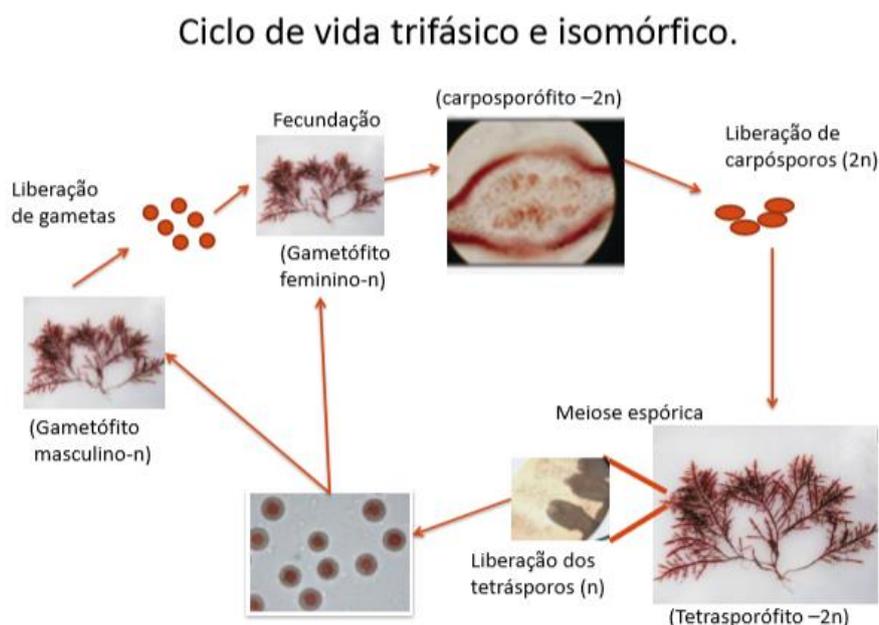


Figura 1: Esquema do ciclo de vida trifásico e isomórfico de *Gelidium floridanum* (Retirado de SIMIONI, 2014).

As algas são organismos que podem assimilar grandes quantidades de nutrientes em seus tecidos durante o crescimento e desenvolvimento. Portanto, são reconhecidas como a abordagem mais promissora para minimizar os efeitos negativos da maricultura animal, atividades antropogênicas na eutrofização e proliferação de algas nocivas (BAGHOUR, 2017).

Mas, para o sucesso do cultivo de algas marinhas para essa finalidade, requer um conhecimento dos requisitos de nitrogênio das algas (HANISAK, 1990). A forma e a concentração em que o nitrogênio é fornecido têm efeitos na produção de metabólitos secundários (FUJITA *et al.*, 1981). Segundo Martins *et al.*, (2011) na ausência desse nutriente, muitas algas podem apresentar alterações no crescimento celular (HWANG *et al.*, 1987; COLLÉN *et al.*, 2004); diminuição do conteúdo de proteínas solúveis e ficobiliproteínas (COLLÉN *et al.*, 2004); diminuição no teor de nitrato, nitrito e aminoácidos (HWANG *et al.*, 1987); diminuição da atividade fotossintética e enzimática (COLLÉN *et al.*, 2004) e diminuição na atividade do nitrato redutase, envolvida na assimilação do nitrogênio (WHEELER & WEIDNER, 1983).

O acúmulo de poluentes orgânicos e inorgânicos representa uma séria ameaça ao meio ambiente aquático, pois podem causar sérios problemas, afetando negativamente a estabilidade desse ecossistema, causando efeitos adversos a plantas, animais e à saúde humana (BAGHOUR, 2017). Quando estes poluentes estão presentes na água e/ou sedimentos, se acumulam na cadeia trófica, podendo ser metabolizados pelos organismos e gerar efeitos tóxicos ou morfológicos nas espécies marinhas. As grandes concentrações de nitrogênio e fósforo utilizados, por exemplo, nos adubos e fertilizantes, constituem um tipo muito comum de poluição da água, no qual enxurradas transportam os fosfatos e nitratos para os rios ou mares (SILVA, 2006). Outra forma desses nutrientes chegarem até os corpos d'água é através do despejo de descargas de águas municipais, industriais, agroindustriais, causado pela falta de sistema de esgoto adequado para as cidades. Essa alta carga de nutrientes na água causa a eutrofização, gerando redução da concentração de oxigênio no meio, proveniente do aumento de organismos presentes nesse corpo d'água, como por exemplo, florescências de fitoplâncton indesejáveis, quando combinadas com altas concentrações de fosfato (PO_4^{3-}) (VIDAL *et al.*, 2002).

Recentemente, há um crescente interesse no uso da biorremediação como tecnologia mais desejável que usa algas e outros organismos para remoção de poluentes ambientais para torná-los inofensivos (BAGHOUR, 2017). Alguns organismos marinhos, como algas e

algumas macrófitas, são amplamente utilizados como indicadores convencionais da poluição da água (BAGHOUR, 2017). Além de contribuírem para uso industrial e biotecnológico, as algas são amplamente exploradas e crescentemente utilizadas no tratamento de águas residuais como um organismo adsorvente de compostos, como demonstram estudos que utilizaram as espécies *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva (PEDRA *et al.*, 2017) *Ulva lactuca* Linnaeus (MADEIRA, 2013), *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh (CARNEIRO, 2007) e *Gracilaria birdiae* E.M.Plastino & E.C.Oliveira (RAPOSO, 2013).

Algumas espécies de *Gelidium*, como *G. amansii* e *G. sesquipedale* já foram usadas como biofiltros para remoção de nitrogênio de efluentes (SALINAS, 1991; LIU *et al.*, 2004) e apresentaram mais de 70 % de eficiência na remoção de amônia (NH₄₊) durante seu cultivo. Com a espécie *G. floridanum*, não há registros bibliográficos utilizando esse organismo em cultivos com concentrações elevadas de nitrato.

Com a crescente demanda por produtos à base desses organismos e as alternativas na área de biorremediação que estão surgindo, é importante o conhecimento sobre sua morfofisiologia frente a diversos fatores ambientais. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo cultivar *G. floridanum* com adição de diferentes concentrações de nitrato e avaliar os efeitos na morfofisiologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar os efeitos de diferentes concentrações de nitrato no desenvolvimento dos talos de *Gelidium floridanum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a taxa de crescimento e viabilidade celular dos talos após o cultivo com a presença do nitrato;
- Avaliar a presença de amido das florídeas e dos polissacarídeos ácidos após os tratamentos;
- Quantificar os pigmentos fotossintetizantes e carotenoides após os tratamentos;
- Analisar as alterações estruturais e ultraestruturais após os tratamentos;

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta e Processamento do Material Biológico

Os espécimes de *G. floridanum* foram coletados na Praia da Ponta do Sambaqui (27°29'18.8" S e 48°32'12.9" O), Florianópolis, Santa Catarina, de janeiro a julho de 2019. As amostras foram coletadas a partir do costão rochoso e transportadas em temperatura ambiente em recipientes para o LABCEV-UFSC (Laboratório de Biologia Celular Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). As algas foram cuidadosamente limpas utilizando uma escova pequena juntamente com a água do mar filtrada para eliminar macroepífitas e invertebrados presentes nas amostras.

Ramos saudáveis foram selecionados e cultivados com água do mar esterilizada acrescida de meio von Stosch 50 % (EDWARDS, 1970) durante 7 dias em condições controladas, sendo este período o de aclimação. As condições da sala de cultivo foram: temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, aeração constante, irradiância de $70 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (l\u00e2mpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil), salinidade 35 ‰ e fotoper\u00edodo de 12 h.

3.2 Condi\u00e7\u00f5es de Cultivo

Logo ap\u00f3s a aclima\u00e7\u00e3o, por\u00e7\u00f5es de *G. floridanum* de aproximadamente $1,0 \pm 0,05$ g foram cultivadas por 7 dias em frascos do tipo erlenmeyer com 250 mL de \u00e1gua do mar filtrada e esterilizada, acrescida de meio von Stosch 50 % modificado sem nitrato (EDWARDS, 1970) e concentra\u00e7\u00f5es de 0 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM de nitrato (concentra\u00e7\u00f5es baseadas em outros trabalhos com algas (DO & CORMIER, 1991; JEANFILS *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2011). Foram feitas quatro r\u00e9plicas para cada grupo experimental nas condi\u00e7\u00f5es citadas acima.

No t\u00e9rmino do experimento foram realizadas an\u00e1lises da taxa de crescimento, viabilidade celular, an\u00e1lises citol\u00f3gicas, quantifica\u00e7\u00e3o dos pigmentos fotossintetizantes e carotenoides.

3.3 Morfologia e Taxa de Crescimento

As taxas de crescimento foram apresentadas como porcentagem de crescimento di\u00e1rio, sendo calculadas segundo a f\u00f3rmula (YONG & ANTON, 2013):

$$\text{TC} = [(M_f/M_i)^{1/t} - 1] * 100 \text{ onde, TC \u00e9 taxa de crescimento (\% dia}^{-1}\text{), } M_f \text{ \u00e9 a massa final em gramas, } M_i \text{ \u00e9 a massa inicial em gramas e (t) tempo em dias.}$$

3.4 Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade mitocondrial foi determinada através da redução do sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio de brometo (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)) em formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais, as quais reduzem o MTT em um composto insolúvel púrpura. A concentração de formazan foi determinada espectrofotometricamente, uma vez que este é proporcional à quantidade de mitocôndrias ativas e, por consequência, o número de células vivas. Os segmentos de alga foram incubados com uma solução de 30 μL de MTT (0,17 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MTT) em tubos de ensaio com água do mar esterilizada (3 mL de volume final), os quais se mantiveram a 24 °C durante 3 h. Após, fragmentos da alga foram lavados em água destilada e transferidos para um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) (MENDES *et al.*, 2013). A absorbância foi determinada a 570 nm.

3.5 Análise dos Pigmentos Fotossintetizantes

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras provenientes dos experimentos foram armazenadas em freezer -20 °C.

3.5.1 Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas [aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE)] foi realizada através da trituração de amostras de 0,5 g (massa fresca) em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 3 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4 °C. A solução passou por uma centrifugação por 20 min (2000 x g a 4° C) e o sobrenadante retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; $\lambda = 498,5, 615$ e 651 nm) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC - Florianópolis. A determinação das concentrações das ficobiliproteínas foi realizada utilizando as fórmulas descritas por Kursar *et al.* (1983).

Aloficocianina: $(181,3 \times \text{abs } 651) - (22,3 \times \text{abs } 615)$

Ficocianina: $(151,1 \times \text{abs } 615) - (99,1 \times \text{abs } 651)$

Ficoreritrina: $(155,8 \times \text{abs } 498,5) - (40 \times \text{abs } 615) - (10,5 \times \text{abs } 651)$

3.5.2 Clorofila *a* e Carotenoides

Amostras de 0,5 g (massa fresca, n = 4) foram separadas e adicionado 3 mL de DMSO 90 % por um período de 45 min na estufa a 40 °C (HISCOX & ISRAELSTAM, 1979). Após esse procedimento, o extrato foi colocado em uma microplaca e lido em espectrofotômetro no LAMEB, (modelo Multileitora Infinite M200 TECAN) nos comprimentos de onda de 665 e 480 nm.

Clorofila *a*: (12,47 x abs 665) - (3,62 x abs branco)

Carotenoides: (1000 x abs 480) - (2,14 x abs 665) /220)

3.6 Análise Estrutural e Ultraestrutural

Para a análise na microscopia de luz (ML) as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, à temperatura de 4° C, *overnight*. Em seguida, foram lavadas utilizando o mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de álcool *etílico* (concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100 %) (BOUZON, 2006). O material foi infiltrado em historesina (Leica Historesin) e as amostras foram seccionadas, com espessura de 4 µm, em um micrótomo rotativo modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. Posteriormente, o material foi submetido aos seguintes testes citoquímicos:

- Azul de Toluidina (AT-O): Para identificação dos polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O a 0,5 %, acidificada com HCl 1 N para pH 3,0 por 30 s, lavadas em água destilada e secas ao ar (MCCULLY, 1970; GORDON & MCCANDLESS, 1973).
- Ácido Periódico Schiff (PAS): Para identificação da presença de polissacarídeos neutros. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1 % durante 20 min, lavados em água corrente e corados com reativo Schiff por 20 min (GAHAN, 1984).

Após os procedimentos citoquímicos, as lâminas coradas foram observadas em microscópio de luz (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) equipado com Image Q Capture Pro 5.1 software (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), localizado no LAMEB.

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5 %, tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2 e sacarose 0,2 M (OURIQUES & BOUZON, 2003). A pré-fixação foi realizada *overnight* a 4 °C e seguida por três lavagens no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 (PUESCHEL, 1979). Em seguida, o material foi lavado três

vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e desidratado em acetona (concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100 %). Após esta etapa, o material foi infiltrado em resina Spurr (SPURR, 1969). O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70° C por 24 h e, posteriormente, secções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila, de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). Após todas essas etapas, as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC - Florianópolis.

3.7 Análise Estatística

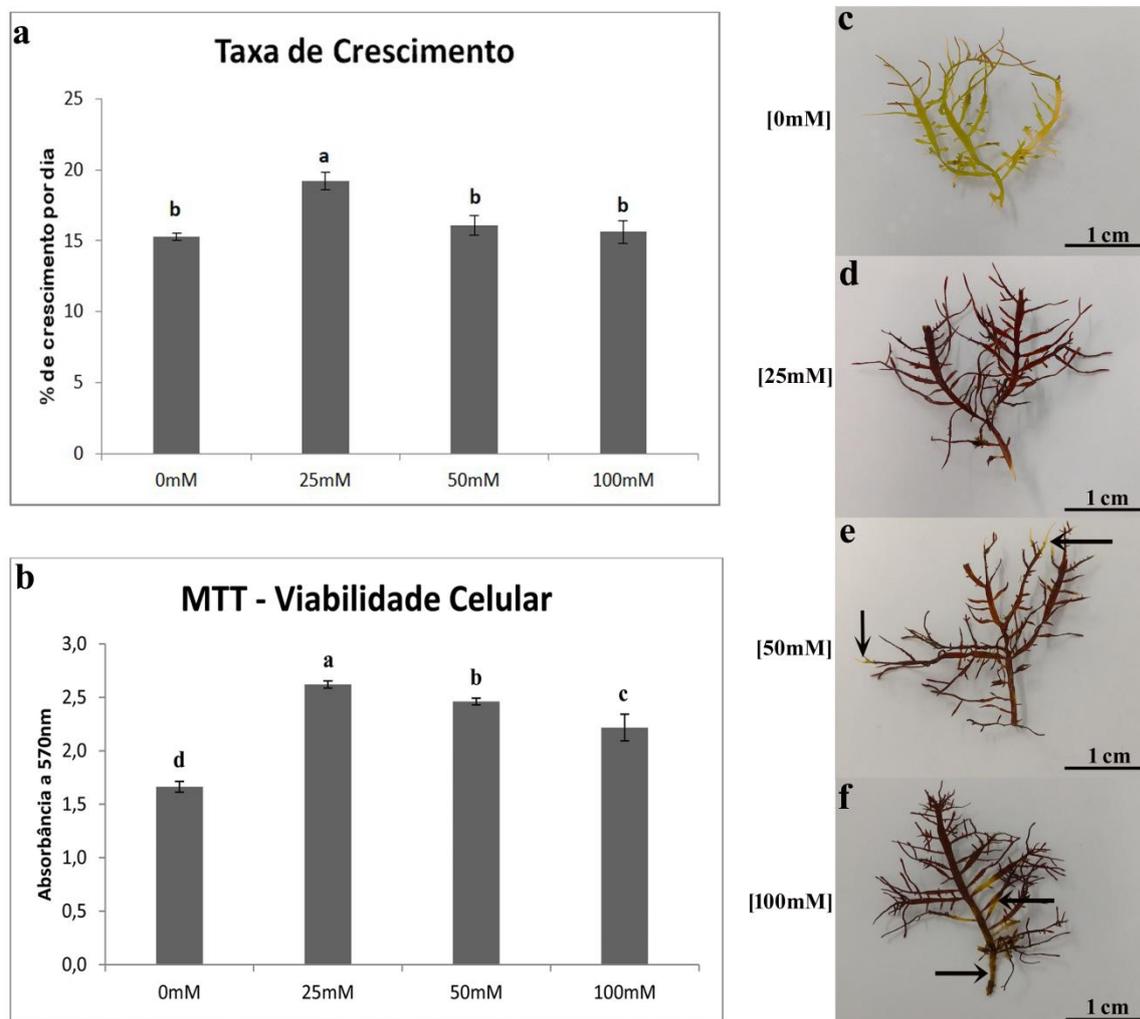
Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos dados e a análise de variância unifatorial (ANOVA). Posteriormente, foi feito o teste Tukey para comparação das médias. Toda análise estatística foi realizada no programa Statistica (versão 7.0).

4. RESULTADOS

Após os tratamentos, as amostras de *G. floridanum* apresentaram diferenças estatísticas quanto à taxa de crescimento ao dia, a qual foi calculada em porcentagem e apresentou um crescimento da massa algal acima de 15 % (Fig. 2a). O tratamento com 25 mM de nitrato apresentou o maior crescimento ($19 \pm 0,64$ nm) em comparação as demais concentrações. Em 0, 50 e 100 mM, não teve diferenças estatísticas em relação a taxa de crescimento. Já na análise da viabilidade celular das amostras (Fig. 2b), os tratamentos com 25 e 50 mM apresentaram os maiores valores, $2,62 \pm 0,03$ nm e $2,45 \pm 0,03$ nm, respectivamente. O tratamento com 0 mM apresentou o menor valor de viabilidade celular, com $1,6 \pm 0,05$ nm.

No cultivo com 0 mM de NO_3^- , os talos de *G. floridanum* apresentaram uma perda dos seus pigmentos fotossintetizantes, resultando numa coloração esverdeada. Em 25 mM, os talos se mantiveram numa coloração típica da espécie (talos com coloração vermelha). Já em 50 e 100 mM, há algumas ramificações sem pigmentação (Fig. 2c-f, setas).

Figura 2: **a-** Taxas de crescimento e viabilidade celular **(b)** (com absorvância em 570 nm) por ensaio de MTT. Valores apresentados com média (n=4, média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$) **c-f:** Morfologia externa dos talos de *G. floridanum* após o tratamento com NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM).



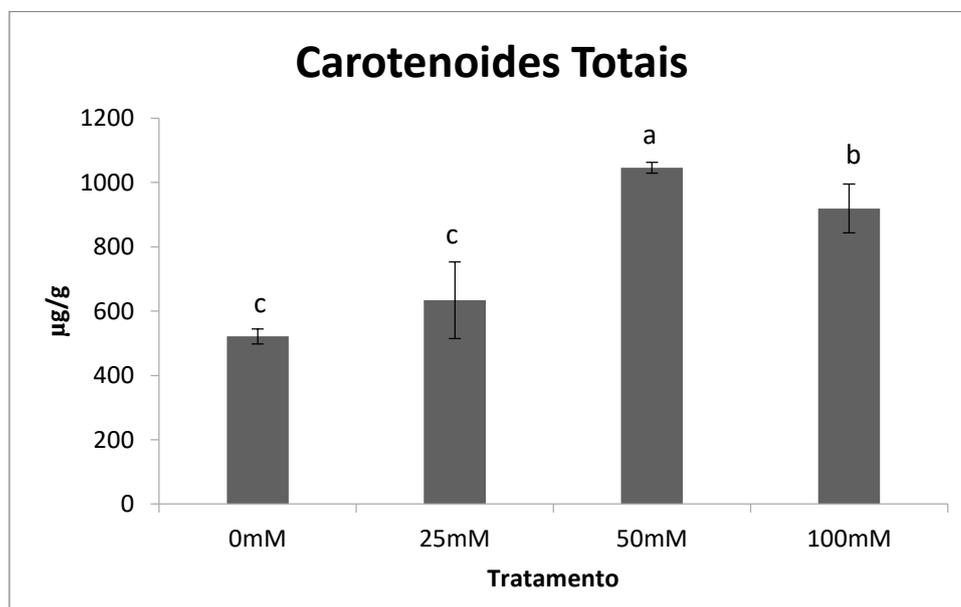
As concentrações de pigmentos fotossintetizantes presente nos talos da alga *G. floridanum*, clorofila *a* e as ficobiliproteínas (alocianina, ficocianina e ficoeretrina) também apresentaram diferenças estatísticas. Para clorofila *a*, as concentrações de 25 e 50 mM de NO_3^- foram as que apresentaram as maiores concentrações nos talos, com $0,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente (Tab.1). O cultivo com 0 mM de NO_3^- foi o tratamento que apresentou menor quantidade de clorofila *a*, com $0,29 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Já em relação a quantificação das ficobiliproteínas, o tratamento com 50 mM de NO_3^- apresentou maior concentração desses pigmentos, e a menor concentração se deu em 0 mM de NO_3^- .

Tabela 1. Concentrações de pigmentos fotossintetizantes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca), clorofila *a* e ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) de *Gelidium floridanum* expostos a diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) (n=4, média \pm DP).

Tratamento	Clorofila <i>a</i>	Aloficocianina	Ficocianina	Ficoeritrina
0 mM	0,29 \pm 0,00 ^c	0,12 \pm 0,02 ^c	0,17 \pm 0,02 ^d	0,71 \pm 0,05 ^d
25 mM	0,70 \pm 0,03 ^a	0,15 \pm 0,01 ^c	0,36 \pm 0,00 ^c	1,68 \pm 0,02 ^c
50 mM	0,69 \pm 0,01 ^a	0,31 \pm 0,03 ^b	0,67 \pm 0,02 ^a	2,83 \pm 0,05 ^a
100 mM	0,63 \pm 0,02 ^b	0,64 \pm 0,02 ^a	0,41 \pm 0,02 ^b	1,89 \pm 0,08 ^b

As concentrações de carotenoides nos talos de *G. floridanum* apresentaram-se maiores nos tratamentos com 50 e 100 mM de NO_3^- , com $1046 \pm 17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $919 \pm 76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente (Fig.3), com diferenças estatísticas. Já o menor valor se deu em 0 mM de NO_3^- , com $521 \pm 22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, não apresentando diferenças estatísticas quando comparado ao tratamento de 25 mM.

Figura 3. Concentrações de carotenoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) dos talos de *Gelidium floridanum* após exposição à diferentes tratamentos de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM). Valores apresentados com média (n=4 \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial seguida de teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

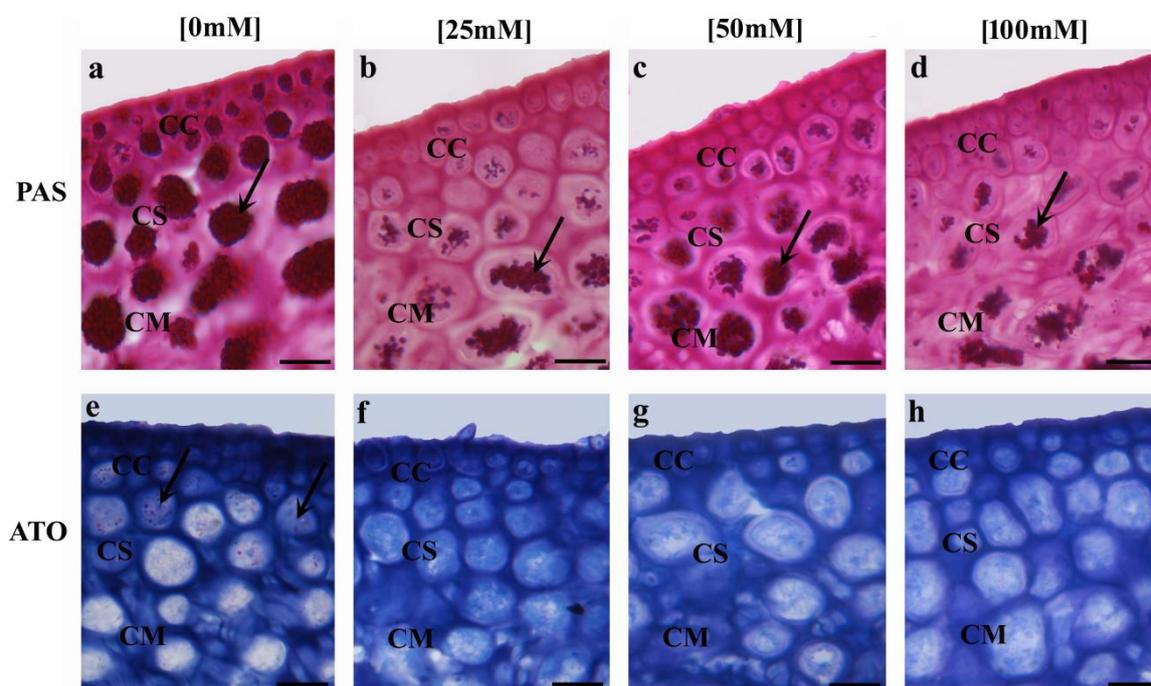


Na microscopia de luz, por meio do teste histoquímico PAS, amostras de 0 mM de NO_3^- (Fig 4a) apresentaram reação positiva ao corante na região central do citoplasma evidenciando uma grande quantidade de grãos de amido das florídeas, tanto nas células corticais, como nas subcorticais e medulares. Já nos outros tratamentos, 25, 50 e 100 mM de

NO_3^- (Fig 4 b-d) a presença de grãos de amido foi maior nas células subcorticais e medulares, sendo pouco observados nas células corticais.

Através do teste histoquímico AT-O, observamos reação na parede celular de todas as amostras (Fig 4e-h) evidenciando a presença de polissacarídeos ácidos. Pode-se observar uma presença destes compostos em maior quantidade na parede celular nas amostras de 0 mM de NO_3^- , também se percebe pequenas pontuações em roxo (setas) destacando a presença de compostos fenólicos nessas amostras (Fig. 4e).

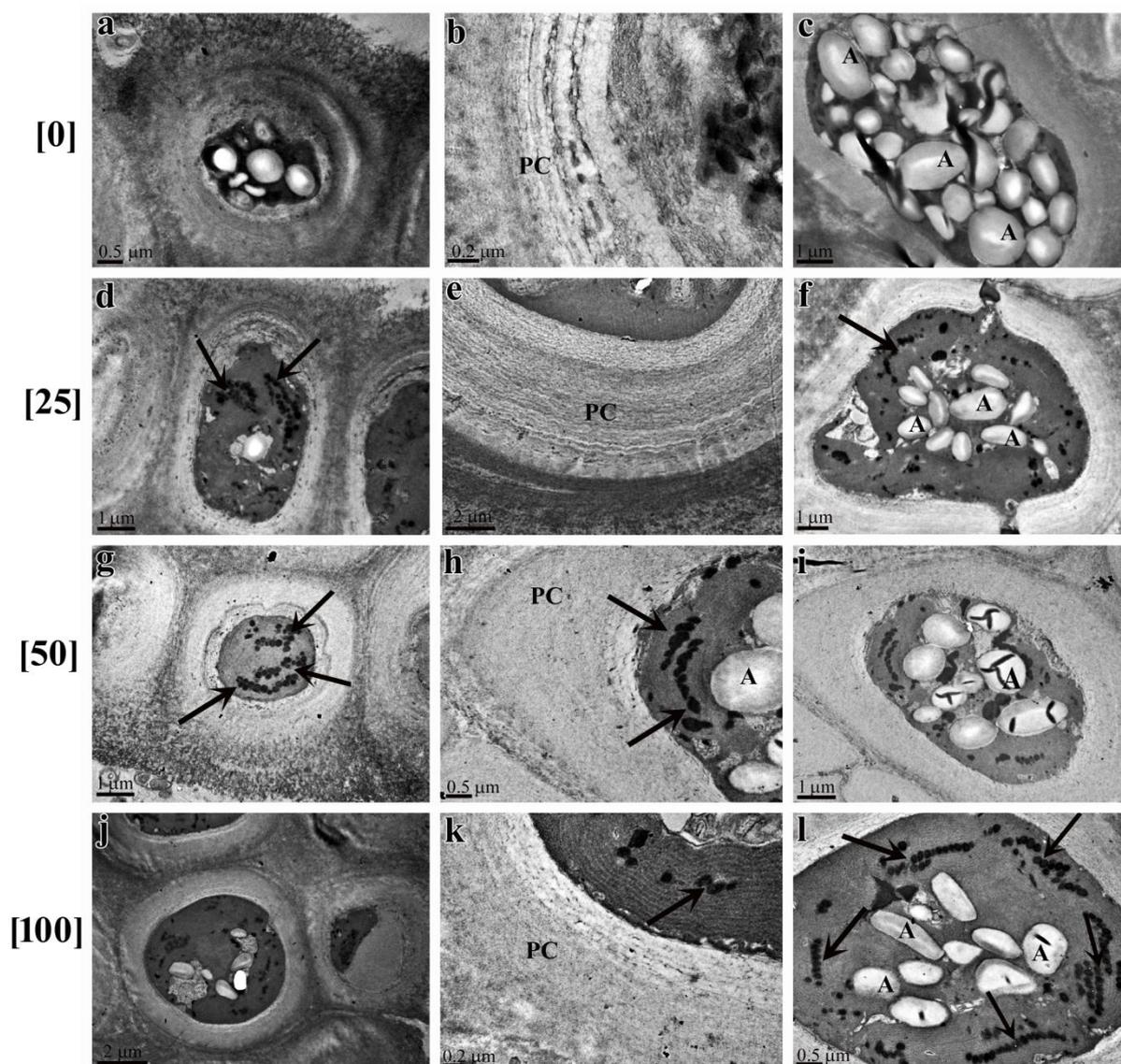
Figura 4. Microscopia de luz das secções longitudinais dos talos de *Gelidium floridanum* após o tratamento com diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM). **a-d.** Células corticais (CC), subcorticais (CS) e medulares (CM) coradas com reativo de Schiff (PAS). Detalhe para o acúmulo de grãos de amido com coloração mais forte (indicado por seta). **e-h.** CC, CS e CM coradas com Azul de Toluidina (AT-O). As células coradas não apresentaram diferenças citoquímicas com os tratamentos. Detalhe para a seta na figura e indicando acúmulo de compostos fenólicos. Escala: 50 μM .



Através da microscopia eletrônica de transmissão foram observadas alterações ultraestruturais nas células corticais (Fig 5). As amostras tratadas com 0 mM de NO_3^- (Fig 5a-c) apresentaram células corticais com parede celular espessa, porém com fibrilas de celulose desorganizadas. No citoplasma somente puderam ser observados uma grande quantidade de grãos de amido das florídeas. Nas amostras de 25 mM de NO_3^- (Fig 5d-f) as células corticais também apresentaram parede celular espessa, porém com fibrilas de celulose bem organizadas e seu citoplasma apresentou cloroplastos parietais e grãos de amido das florídeas na região central. As mesmas características também foram observadas nas amostras tratadas com 50 mM de NO_3^- (Fig 5g-i), porém o espessamento das paredes celulares foi mais evidente. Já nas

amostras tratadas com 100 mM de NO_3^- (Fig 5j-l) as células corticais apresentaram paredes espessadas e seu citoplasma apresentou cloroplastos parietais com uma quantidade maior de plastoglóbulos e presença dos grãos de amido das florídeas na região central.

Figura 5. Eletromicrografias dos talos de *Gelidium floridanum* expostos a diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100mM) observados na microscopia eletrônica de transmissão. **a-c.** 0 mM NO_3^- . **(a)** Visão geral da célula cortical, com parede celular (PC) espessa, porém com fibrilas de celulose desorganizadas **(b)** e com grande quantidade de grãos de amido das florídeas (A) ocupando praticamente todo o citoplasma **(c)** **d-f.** 25 mM NO_3^- . **(d)**, Visão geral da célula cortical, com parede celular com fibrilas de celulose organizadas **(e)** e citoplasma com cloroplastos parietais com presença de plastoglóbulos (setas) e grãos de amido das florídeas na região central **(f)**. **g-i** 50 mM NO_3^- . **(g)** Visão geral da célula cortical, com parede celular com maior espessamento **(h)** e citoplasma com cloroplastos parietais com presença de plastoglóbulos (setas) e grãos de amido das florídeas na região central. **j-l.** 100 mM NO_3^- . **(j)** Visão geral da célula cortical, com parede celular bem espessa **(k)** e citoplasma com cloroplastos parietais com grande quantidade de plastoglóbulos (setas) em seu interior e grãos de amido das florídeas na região central.



5. DISCUSSÃO

Um dos fatores críticos que determinam o sucesso ecológico das macroalgas é sua capacidade de manter a quantidade de carbono, nitrato e fosfato em proporções equilibradas (STERNER & ELSER, 2002). Atualmente as concentrações desses elementos no ambiente sofrem grandes alterações em decorrência da ação antrópica, e organismos como as macroalgas podem contribuir para minimizar os impactos, porém o conhecimento de sua tolerância é fundamental. Após o cultivo com as diferentes concentrações de NO_3^- , os talos de *G. floridanum* apresentaram respostas fisiológicas advindas do efeito desse composto, resultando em alterações fisiológicas, estruturais e ultraestruturais. Em relação a taxa de crescimento, a concentração de 25 mM de NO_3^- foi a que apresentou a maior taxa como também a melhor viabilidade celular. Resultados semelhantes também foram vistos em estudos com macroalgas vermelhas (ANDRIA *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2011) cultivadas com concentrações de nitrato, porém menores que as utilizadas nesse estudo. Para a viabilidade celular, o cultivo sem nitrato resultou em baixas taxas, corroborando ao estudo de Pereira (2019), onde a macroalga *Pyropia acanthophora* E.C. Oliveira & Coll apresentou melhor viabilidade mitocondrial nas amostras expostas a concentrações de nitrato.

Os dados da taxa de crescimento e da viabilidade celular também se confirmam quando observam-se os dados morfológicos da alga, pois nas altas concentrações de NO_3^- , há intensa pigmentação dos talos. Entretanto nas concentrações de 50 e 100 mM há pequenas regiões despigmentadas, o que contribuiu para a redução da viabilidade celular e consequente redução da atividade mitocondrial. A técnica do MTT resulta na interação com enzimas desidrogenases mitocondriais (BERRIDGE *et al.*, 2005), o que pode explicar que mesmo havendo talos mais pigmentados nessas concentrações, regiões sem coloração (mortas) influenciaram nas menores viabilidades quando comparada a concentração de 25 mM de NO_3^- .

Esta intensa pigmentação também está relacionada com as concentrações de pigmentos acessórios da macroalga, na qual se observou que quanto maior a quantidade de nitrato maior a quantidade desses pigmentos. Podemos afirmar que os talos *G. floridanum* tiveram ótima assimilação do nitrato, incorporando o elemento para a síntese de ficobiliproteínas. Resultados semelhantes também foram relatados em *Hypnea musciformis* J.V. Lamour. (MARTINS *et al.*, 2009, 2011) e *Hypnea cervicornis* J. Agardh (RIBEIRO *et al.*, 2013), que mostraram altos teores de proteínas nos talos quando a disponibilidade de nitrato aumentou. Cultivos sem a presença do nitrato causaram despigmentação dos talos, explicado pela perda de pigmentos acessórios (ficobiliproteínas). Segundo Elser *et al.*,

(2000a, b) a proporção de elementos nutricionais é fundamental para a taxa de crescimento da alga e, se há limitação desses nutrientes, conseqüentemente há impactos negativos em outros processos metabólicos, como por exemplo, eficiência fotossintética, síntese de pigmentos, aquisição de carbono e captação de nutrientes. Portanto a falta de nitrato causa ausência de pigmentos e como consequência ocorre uma diminuição da taxa de crescimento da macroalga e, conforme Kirst & Wiencke (1995) e Britto *et al.*, (2001) essa redução pode indicar a alocação de energia para outros processos celulares, como reparo celular ou processos metabólicos de proteção. Portanto, segundo Mabin *et al.* (2013), o nitrato também influencia o crescimento e a morfologia da alga.

Além dos pigmentos acessórios, a clorofila *a* também se apresentou alterada nos cultivos de *G. floridanum*, tanto no cultivo sem nitrato o qual apresentou quantidades muito baixas quanto na maior concentração de nitrato. A clorofila *a* é um metabólito primário, sendo o pigmento mais importante e mais protegido presente nas algas vermelhas (PARMAR *et al.*, 2013). Mesmo sendo uma molécula estrutural e extremamente estável, a falta e o excesso do nitrato interfere na manutenção e organização da estrutura fotossintética, corroborando ao observado nos talos onde ocorre a presença de regiões despigmentadas (mortas).

O experimento constatou que a alta disponibilidade de nitrato (50 e 100 mM) durante o cultivo aumentou as concentrações de carotenoides nos talos de *G. floridanum*. Os carotenoides são um dos principais metabólitos secundários presentes nas macroalgas vermelhas (ZENG *et al.*, 2001; APLE & HIRT, 2004; GANESAN *et al.*, 2008; DE LA COBA *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2011; CARRETO & CARIGAN, 2011; KOTTUPARAMBIL *et al.*, 2012). São compostos que não possuem função direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos organismos, mas sim são fundamentais na sua interação com o ambiente (VERPOORTE, 2000). Estudos com macroalgas que sofreram algum tipo de estresse por NO_3^- também relataram alta concentração de carotenoides (BARUFI *et al.*, 2011; KORBEE *et al.*, 2010). Esse aumento da concentração resulta do estresse que a macroalga sofre, e para tentar se proteger sintetiza metabólitos secundários que irão amenizar a condição estressante.

O cultivo com altas concentrações de nitrato também resultaram em alterações ultraestruturais observados em microscopia eletrônica de transmissão. Nos tratamentos com os maiores valores de NO_3^- , há um espessamento da parede celular da alga. Segundo Faveri *et al.*, (2015) em um estudo com *H. musciformis*, esse resultado pôde ser interpretado como um mecanismo de defesa física contra a concentração de nutrientes no meio, sendo uma saída protetora a alta concentração de NO_3^- que a macroalga não está habituada. Mesmo com essa resposta fisiológica, não houve impedimento do crescimento e desenvolvimento celular de *G.*

floridanum. O cultivo sem o nitrato resultou numa alteração na organização das microfibrilas de celulose, afetando a formação dessa estrutura protetora.

Alteração na quantidade de grãos de amido das florídeas também foi uma resposta fisiológica observada nos tratamentos. Na ausência de nitrato, a quantidade armazenada de grãos de amido das florídeas tanto nas células corticais como nas subcorticais e medulares aumenta em comparação as demais concentrações. O amido das florídeas é o material de reserva das algas vermelhas (LANG, 2006). Esse aumento da quantidade de amido observado nas células é uma resposta ao estresse fisiológico proveniente da falta de NO_3^- . Segundo Pereira (2019), o aumento ocorreu pois não houve a quebra de amido em açúcar, causando esse acúmulo energético nas células.

Com a presença de nitrato não houve um acúmulo de grãos de amido, mas sim um espessamento da parede celular. Segundo Pereira (2019), isso pode ser causado pela alteração na via de biossíntese de amido, na qual a degradação de amido em glicose libera moléculas energéticas para o metabolismo e síntese de componentes da parede celular, tornando-as espessadas (SCHMIDT *et al.*, 2012). Há estudos que demonstram que altas concentrações de nutrientes (à base de nitrogênio) para as macroalgas torna-as melhores tolerantes a condições de estresse e ao estresse oxidativo comparado a espécies com limitação de nitrogênio (CRONIN & LODGE, 2003; JORMALAINEN *et al.*, 2003; NAVARRO *et al.*, 2014).

O cultivo em altas concentrações de nitrato também geraram uma grande quantidade de corpos eletrondensos denominados plastoglóbulos. Conforme Austin *et al.*, (2006) os plastoglóbulos constituem uma estrutura com funcionalidade distinta dos tilacóides, que contêm proteínas e enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo lipídico e que estão sempre fisicamente acopladas às membranas tilacóides por meio de uma bicamada lipídica. Segundo Bréhélin *et al.*, (2007) essas estruturas dos tilacóides podem estar relacionadas ao aumento da síntese de proteínas e moléculas antioxidantes e participando ativamente de diversas vias secundárias de metabolismo, em resposta ao estresse oxidativo. Os resultados observados podem ser assim explicados pois nessas concentrações o nitrato é um agente estressor, resultando em aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e como consequência induzem a um aumento dos plastoglóbulos nos cloroplastos.

6. CONCLUSÃO

A macroalga *G. floridanum* obteve um ótimo crescimento e desenvolvimento na concentração de nitrato de 25 mM. Porém, maiores concentrações (50 e 100 mM) de NO_3^- causam um estresse para a planta alterando sua viabilidade celular, aumentando a quantidade de carotenoides, plastoglôbulos e o espessamento da parede celular. A ausência deste nutriente também inviabiliza seu crescimento celular. Portanto, *G. floridanum* pode ser um organismo utilizado para processos de biorremediação, suportando níveis até 25 mM de nitrato, sem apresentar alterações estruturais e ultraestruturais que alterem o desenvolvimento e crescimento do organismo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIA, J. R.; VERGARA, J. J.; PEREZ-LLORENS, J. L. Biochemical responses and photosynthetic performance, of *Gracilaria sp.* (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. **European Journal of Phycology**, v. 34, p.497–504, 1999.
- APLE, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species, metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ARMISEN, R; GALATAS, F. Production, properties and uses of agar. In: McHugh, D. J. (ed.), Production and utilization of products from commercial seaweeds. **FAO Fish. Tech. Pap.**, v.288, p.1–57, 1987.
- ARUMUGAM, N. *et al.* Treatment of Wastewater Using Seaweed: A Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 15, n. 12, p.1-17, 2018.
- AUSTIN, J. R. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. **The Plant Cell**, v. 18, 1693-1703, 2006.
- BAGHOUR, Mourad. **Algal Degradation of Organic Pollutants**. Handbook Of Ecomaterials, p.1-22, 2017.
- BARUFI, J. B. *et al.* Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. **Journal Applied Phycology**, v.23, p.457-466, 2011.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Ann. Ver.**, v.11, p.127-152, 2005.
- BHARATHIRAJA, B. *et al.* Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p.634-653, 2015.
- BOO, G. H. *et al.* Taxonomy and distribution of selected species of the agarophyte genus *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta). **Journal Of Applied Phycology**, v.26, n. 2, p.1243-1251, 2013.
- BORGES, J. C. *et al.* Membrana plasmática de espermatozóides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Rev. Bras. Reprodução Animal**, v.35, p.303-314, 2011.
- BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultraestrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Rhodophyta, Gigartinales). **Revista Brasileira de Botânica**, v.29(2), p.229-238, 2006.
- BREHELIN, C., KESSLER, F., & VANWIJK, K. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. **Trends in Plant Science**, 12(6), 260–266, 2007.
- BRITTO, D. T. *et al.* Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **PNAS - Plant Biology**, v.98, n°7, p.4255-4258, 2001.

- CARNEIRO, M. A. A. Estudo do crescimento, eficiência de biofiltração e cinética de absorção de nutrientes (N-NH, N-NO e P-PO₄³) da macroalga *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioecologia Aquática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 75 pgs., 2007.
- CARRETO, J. I.; CARIGAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. **Marine Drugs**, v.9, p.387-446, 2011.
- CHEN, M. *et al.* Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.1649-1655, 2011.
- COLLÉN, P.N. *et al.* Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v.40, p.305-314, 2004.
- CORDEIRO-MARINO, M. Rodofíceas bentônicas do estado de Santa Catarina. **Rickia**, v.7, p.37-38, 1978.
- CRONIN, G.; LODGE, D. M. Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. **Oecologia**, v.137, p.32-41, 2003.
- DE LA COBA, F. *et al.* Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. **Journal Applied Phycology**, v.21, p.161-169, 2009.
- DO, C. B.; CORMIER, F. Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v.9, n.9, p.500-504, 1991.
- EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. **Contributions in Marine Science**, v.15, p.1-228, 1970.
- ELSER, J. J. *et al.* The evolution of ecosystem processes: growth rate and elemental stoichiometry of a key herbivore in temperate and arctic habitats. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, p.845–853, 2000a.
- ELSER, J. J. *et al.* Biological stoichiometry from genes to ecosystems. **Ecology Letters**, v. 3, p.540–550, 2000b.
- FAVERI, C. *et al.* Effects of eutrophic seawater and temperature on the physiology and morphology of *Hypnea musciformis* J. V. Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta). **Ecotoxicology**, v.24, p.1040–1052, 2015.
- FRIEDLANDER, M. Advances in cultivation of Gelidiales. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v.20, n.5, p. 451-456, 2007.
- FUJITA, Y. *et al.* Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports**, v.1, p.61-63, 1981.
- GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: An Introduction**. Academic Press, California, 301 pgs., 1984.

- GANESAN, P. *et al.* Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2717-2723, 2008.
- GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proceedings of Nova Scotia Institute of Science**, v.27, p.111-133,1973.
- GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <<http://www.algaebase.org>> Acessado em: 01 Abril de 2019a.
- GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. **Algae Base**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <<http://www.algaebase.org>> Acessado em: 24 outubro de 2019b.
- HANISAK, M. D. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. **Hydrobiologia**, v.204, p.79-87, 1990.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F.. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Of Botany**, [s.l.], v. 57, n. 12, p.1332-1334, 1979.
- HWANG, S. P. L.; WILLIAMS, S. L.; BRINKHUIS, B. H. Changes in internal dissolved nitrogen pools as related to nitrate uptake and assimilation in *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta). **Botanica Marina**, v.30, p.11-19, 1987.
- JEANFILS, J.; CANISIUS, M-F.; BURLION, N.. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.369-374, 1993.
- JORMALAINEN, V. *et al.* Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? **Oikos**, v.103, p640-650, 2003.
- KIRST, G. O. & WIENCKE, C. Ecophysiology of polar algae. **Journal of Phycology**, v. 31, p.181–199, 1995.
- KORBEE, N. *et al.* Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in *Heterocapsa* sp. (Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability, micosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle. **Limnology and Oceanography**, v.55, p.899-908, 2010.
- KOTTUPARAMBIL, S. *et al.* UV-B affects photosynthesis, ROS production and mobility of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. **Aquatic Toxicology**, v.123, p.206-213, 2012.
- KREUSCH, M. *et al.* Ocean Warming and copper pollution: Implications for metabolic compounds of the agarophyte *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v.54, p.870–878, 2018.
- KURSAR, T. A.; VAN DER MEER, J. P.; ALBERT, R. S. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutation. **Plant Physiology**, [s.l.], v.73, n.2, p.353-360, 1983.
- LANG, K. L. *Investigação química e biológica da alga vermelha Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 123p., 2006.

LIU, D.; PICKERING, A. ; SUN, J. Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen source and its availability. **Journal of Ocean University of China**, v.3, p.75– 79, 2004.

MABIN, C. J. T. *et al.* Variation in the morphology, reproduction and development of the habitat-forming kelp *Ecklonia radiata* with changing temperature and nutrients, **Marine Ecology Progress Series**, v. 483, p.117–131, 2013.

MADEIRA, H. F. T. *Utilização de macroalgas verdes como biorremediadores em efluentes de indústrias agroalimentares: dinâmica das vias metabólicas relacionadas com os compostos azotados.* Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve, Faro, 84 pgs., 2013.

MARTINS, A. M. P.; CHOW, F.; YOKOYA, N. S. Ensaio in vitro da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, p.635–645, 2009.

MARTINS, A. M. P. *et al.* Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p.340–348, 2011.

MCCULLY, M. E. *The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds.* Ottawa, Canadá: Annals of the New York Academy of Sciences, v.175, n.1, p.702-711, 1970.

MCHUGH, D. J. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. **Hydrobiologia**, v.221, p.19-29, 1991.

MCHUGH, D. J. *A Guide to the Seaweed Industry.* FAO Fisheries Technical Paper - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, n.441, 105 pgs., 2003.

MENDES, L. F. *et al.* Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.1939-1947, 2013.

NAVARRO, N. P. *et al.* Short-term effects of solar UV radiation and NO₃⁻ supply on the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Pyropia columbia* (Bangiales, Rhodophyta) under spring ozone depletion in the sub-Antarctic region, Chile. **Botanica Marina**, v.57, p.9-20, 2014.

OLIVEIRA, E. C.; BERCHEZ, F. A. S.. Resource biology of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) populations in Brazil. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 260-261, n. 1, p.255-261, 1993.

OLIVEIRA, E. C. *Introdução a Biologia Vegetal.* Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo: Edusp, 2º ed. 272 pgs., 2003.

OURIQUES, L. C. *Padrões de germinação e aspectos ultraestruturais de esporos de Rhodophyta.* Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 107 pgs., 2002.

OURIQUES, L. C. & BOUZON, Z. L. Ultrastructure of germinating tetraspores of *Hypnea musciformis*. **Plant Biosystems**, v. 137, p.193–202, 2003.

PARMAR, A. *et al.* Influence of light on phycobiliprotein production in three marine cyanobacterial cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.1817-1826, 2013.

PEDRA, A. G. L. M. *et al.* Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, [s.l.], v. 479, p.297-303, 2017.

PEREIRA, D. T. Cultivo da macroalga vermelha *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*: efeito interativo da radiação UVA+UVB com elevadas concentrações de nitrato e diferentes fatores abióticos. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 114p., 2019.

PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, [s.l.], v.15, n.4, p.409-424, 1979.

RAPOSO, D. M. T. Avaliação do desempenho do camarão *Litopenaeus vannamei* e das macroalgas *Gracilaria birdiae* e *Ulva fasciata* num sistema de cultivo multitrófico integrado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 80 pgs., 2013.

RAVEN, H. P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 8º ed., p.634-635, 2014.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, [s.l.], v. 17, n.1, p.208-212, 1963.

RIBEIRO, A. L. N. L. *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.

SALINAS, J. M. Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. (Gelidiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v.221, p.107–117, 1991.

SCARIOT, L. A. *Efeitos da radiação ultravioleta-B na germinação e desenvolvimento dos tetrásporos de Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento, morfologia e ultraestrutura. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 93 pgs., 2010.

SCHMIDT, E. C. *et al.* Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic Botany**, v.100, p.8-17, 2012.

SILVA, F. *Biorremocão de nitrogênio, fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do efluente hidropônico, através do uso de Chlorella vulgaris*. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agrossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 87 pgs., 2006.

SIMIONI, C. *Análise dos mecanismos reguladores dos processos de polarização e germinação de esporos e, desenvolvimento de gametófitos jovens de Gelidium floridanum sob efeito da radiação ultravioleta e do metal pesado cádmio*. Tese de Doutorado - Programa de

Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, cap.1, 120 pgs., 2014.

SPURR, A. R. A. low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, [s.l.], v. 26, n.1-2, p.31-43, 1969.

STERNER, R. & ELSER, J. J. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 464p., 2002.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, p.323-343, 2000.

VIDAL, S.; ROCHA, C.; GALVÃO, H. A comparison of organic and inorganic carbon controls over biological denitrification in aquaria. **Chemosphere**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.445-451, 2002.

WHEELER, W. N.; WEIDNER, M. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. **Journal of Phycology**, v.19, p.92-96, 1983.

YONG, Y. S.; YONG, W. T. L.; ANTON, A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v.25, n.6, p.1831-1834, 2013.

ZENG, L. M. *et al.* Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. **Chinese Journal of Chemistry**, v.19, p.1097-1100, 2001.