

Caroline de Faveri

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA URBANIZAÇÃO E
EXTREMOS DE TEMPERATURA SOBRE A FISIOLOGIA E
MORFOLOGIA DE *Hypnea musciformis* J. V. LAMOUREUX
(GIGARTINALES, RHODOPHYTA)-UMA AVALIAÇÃO DO
EFEITO SINÉRGICO**

Dissertação submetida ao programa ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zenilda Laurita Bouzon
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta

Florianópolis

2012

Caroline de Faveri

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA URBANIZAÇÃO E
EXTREMOS DE TEMPERATURA SOBRE A FISIOLOGIA E
MORFOLOGIA DE *Hypnea musciformis* J. V. LAMOUREUX
(GIGARTINALES, RHODOPHYTA)- UMA AVALIAÇÃO DO
EFEITO SINÉRGICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F273a Favari, Caroline de
Avaliação do impacto da urbanização e extremos de
temperatura sobre a fisiologia e morfologia de *Hypnea
musciformis* j.v.lamouroux (gigartinales, rhodophyta)
[dissertação] : uma avaliação do efeito sinérgico /
Caroline de Favari ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon. -
Florianópolis, SC, 2012.
87 p. : grafs., tabs., mapas

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

Inclui referências

1. Biologia vegetal. 2. Urbanização. 3. Morfologia
(Biologia). I. Bouzon, Zenilda Laurita. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal. III. Título.

CDU 57

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, alicerce de minha vida.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pela educação que me foi dada e pelo exemplo de dignidade e humildade, meu muito obrigada eterno!

Aos meus irmãos e melhores amigos pelo incentivo e apoio, sempre atenciosos, compreensivos e muito pacientes.

Aos meus orientadores Prof.^a Zenilda e Prof. Paulo, pela atenção, estímulo e oportunidade. Agradeço por me enriquecerem com suas experiências e por todo o suporte que me foi dado durante esses dois anos! Grandes exemplos profissionais!

A todos meus amigos e companheiros dos laboratórios LAFIC e LAMAR, que por sinal são muitos, pelos momentos de descontração proporcionados nesta jornada, então não ousaria citar tantos nomes! Muito obrigada!

Aos queridos amigos de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela companhia dentro e fora dos laboratórios.

Em particular agradeço a Cíntia Martins pelas análises de água, pela atenção dada na conclusão da dissertação e pela amizade.

À Carmen pela ajuda nas análises de microscopia confocal.

Ao Eder pela paciência, dedicação e ensinamentos em microscopia.

À Cintia Lhullier pela leitura crítica e auxílio ao final com a redação.

Aos meus amigos, em especial Mariana e Luyza amigas e irmãs de longa data que mesmo a distância sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins.

Aos membros da banca pelas críticas construtivas.

Ao PNADB - CAPES (Programa nacional de apoio e desenvolvimento da botânica) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal: funcionários e professores.

Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado. Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou. A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo.

Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

- Eu sei como ele conseguiu. Todos perguntaram:

- Pode nos dizer como?

- É simples: - respondeu o velho.

- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz.

Albert Einstein

Resumo

O efeito sinérgico dos fatores temperatura e impactos da urbanização foram testados *in vitro* em uma espécie de macroalga vermelha de importância econômica para extração de *kappa* carragenana, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux. Múltiplos ensaios de 96 hs foram realizados expondo a alga a extremos de temperaturas e a águas de ambientes urbanos considerando regiões com e sem saneamento básico, para verificação dos danos fisiológicos e morfológicos causados. Utilizou-se a fluorometria de pulso modulado (PAM), Oxigênio dissolvido, taxa de crescimento vegetativo, concentração de pigmentos, microscopia confocal e de luz para a caracterização e avaliação dos efeitos dos fatores em análise combinados e isoladamente sobre o desempenho fisiológico da planta. Os resultados indicam que houve estresse fisiológico em *Hypnea musciformis* com fotoinibição principalmente quando combinados temperaturas extremas e ambientes urbanos não saneados. Os danos maiores causados foram os relacionados aos tratamentos da temperatura extrema de 35°C sobre os parâmetros fotossintéticos (F_{max} , F_v/F_m , β , α) os quais sofreram drásticas reduções quando comparados aos tratamentos de 25°C. O mesmo padrão de resultados foi observado para o oxigênio, onde os menores valores de oxigênio dissolvido para *H.musciformis* ocorreu na temperatura de 35°C e maiores para incubações de *H.musciformis* com máximo obtido 5,12 mg.L⁻¹. Considerando a análise de componentes principais (PCA), o fator temperatura representou o eixo II explicativo responsável pelo entendimento de 19% da distribuição dos dados. O eixo I representou 65,03% da variação do conjunto de dados correlacionados, representado pelos nutrientes (nitrato, fosfato e nitrogênio amoniacal). A exposição aos tratamentos provocou o aumento da espessura da parede celular, redução do amido das florídeas e o aumento de algas endofíticas após o rompimento da mucilagem. As concentrações dos pigmentos fotossintetizantes, carotenóides e ficobiliproteínas tiveram estímulos a sua síntese, sofrendo reduções somente a 35°C em relação ao controle. A clorofila *a* manteve suas

concentrações constantes em relação ao controle com redução na temperatura mais elevada para os tratamentos, principalmente na área urbana não saneada. Conclui-se que os impactos derivados da urbanização em áreas não saneadas e temperaturas extremas afetaram negativamente o desempenho fisiológico e a organização celular de *H.musciformis*.

Palavras chave: Urbanização, Desempenho fotossintético, Morfologia, Extremos de Temperatura.

Abstract

The synergistic effect of temperature factors and impacts of urbanization were tested *in vitro* with a species of red seaweed of economic importance for the extraction of kappa carrageenan *Hypnea musciformis*. Multiple assays were performed 96 hours exposing the algae to extreme temperatures and water environments considering urban regions with and without basic sanitation, for verification of the physiological and morphological damage caused. We used a pulse-modulated fluorometry (PAM), dissolved oxygen, its growth rate, pigment concentration, and Light Confocal Microscopy for the characterization and assessment of the effects of factors combined and analyzed separately on the physiological performance of the plant. The results indicate that there were physiological stress in *Hypnea musciformis* photoinhibition especially when combined with extreme temperatures in urban environments and not sanitized. The damage caused were more related to the treatment of extreme temperature of 35°C on the photosynthetic parameters (F_{\max} , F_v / F_m , β , α) who suffered drastic reduction when compared to treatments of 25°C. The same pattern of results was seen for the oxygen dissolved, where the lowest values for the *H.musciformis* to occur at a temperature of 35°C and values were higher for incubations *H.musciformis* obtained with a maximum 5,12 mg L⁻¹. Considering the principal component analysis (PCA), the temperature factor represented axis II explanatory responsible for understanding 19% of the data distribution. Axis I represented 65.03% of the variation of the set of correlated data, represented by the nutrients (nitrate and ammonium phosphate). The exposure treatment caused an increase of the cell wall thickness, starch reduction, blooms of endophytic algae after the breaking of wall. The concentrations of photosynthetic pigments, carotenoids and phycobiliproteins were stimulus their synthesis, suffering only cuts at 35°C compared to control. The chlorophyll *a* concentrations remained

constant in their relation to the control with a reduction in the higher temperature for treatments, mainly in urban areas was wiped out. We concludes that the impacts arising from urbanization in areas and extreme temperatures affected negatively the performance of physiological and cellular organization *H.musciformis*.

Keywords: Urbanization, photosynthetic performance, Morphology, Temperature Extremes.

Lista de Figura

- Figura 1. Mapa da área de estudo, com destaque para área 1 (Praia de Ponta das Canas), área 2 (Centro, Ponte Hercílio Luz) e área 3 (Saco dos Limões), Florianópolis, Santa Catarina. Fonte:Google Earth..... 21
- Figura 2. Análise Post-Hoc Tukey para os valores das médias do nutriente nitrato, fosfato e nitrogênio amoniacal nas Áreas 1, 2 e 3 das coletas realizados em Março, Abril e Maio. As letras representam as diferenças entre os locais ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão ($n=9$)..... 34
- Figura 3. Médias dos parâmetros fotossintéticos de *H.musciformis* após experimento de 96h, para os experimentos realizados em Março, Abril e Maio em triplicatas. Parâmetros : F_{max} =Fotossíntese máxima; F_v/F_m =rendimento quântico potencial; β =fotoinibição; α =eficiência fotossintética. Letras minúsculas correspondem a diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). Barras verticais indicam erro padrão ($n=9$)..... 36
- Figura 4. Médias das concentrações de oxigênio dissolvido para as incubações de *Hypnea musciformis* para as três áreas nas temperaturas 15°C, 25°C e 35°C dos experimentos realizados em Março, Abril e Maio em triplicatas. Barras verticais correspondem aos valores de erro padrão ($n=9$)..... 37
- Figura 5. Teste Post-hoc (Tukey) para análise das diferenças entre amostra controle e tratamentos. Médias das concentrações de pigmentos fotossintéticos (ficoeritrina, ficocianina, Aloficianina, carotenóides e clorofila a) após tratamentos (96h) para as três áreas nas temperaturas 15°C, 25°C e 35°C para os três experimentos realizados. Letras minúsculas correspondem a diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). Barras verticais erro padrão ($n=4$)..... 41
- Figura 6. Análise das componentes principais dos parâmetros fotossintéticos (α, β, f_{max} e F_v/F_m) nutrientes da água (nitrato, fosfato e N-amoniacal) e temperatura (15°C ,25°C e 35°C) para todos tratamentos. Porcentagem explicativa para eixo 1=65%; eixo 2=19% 43

- Figura 7. Seções transversais do talo de *H. musciformis*, de plantas controle e após 96 horas de exposição aos tratamentos. Seções coradas com azul de toluidina (AT-O). A: Detalhe das células do controle coradas com AT-O. As paredes celulares (PC), células corticais (CC) e células subcorticais (CS) com reação metacromática. Note o aumento da espessura da parede celular e a reação metacromática nas células corticais e subcorticais dos tratamentos. Presença de algas endofíticas nas células corticais e na mucilagem (flechas). C: Observe rupturas na parede celular e aumento nas células corticais. D: Células subcorticais em divisão celular. Escala = 10µm..... 46
- Figura 8. Seções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A: As paredes celulares (PC) da planta controle, células corticais (CC) e células subcorticais (CS) com reação positiva ao PAS. Células corticais e subcorticais ricas em grãos de amido das florídeas (A). Presença de algas endofíticas nas células corticais e na mucilagem (flechas). Aumento da parede celular e ruptura da parede celular em todos tratamentos exceto controle. A;B;C;E;F;G;I: redução na quantidade de amido das florídeas nas células corticais e subcorticais. H: Aumento na quantidade de células corticais (CC). Escala = 10µm. 48
- Figura 9. Densidade média de pixels por µm² dos tratamentos em *H. musciformis* através da análise das imagens pelo programa ImageJ. Letras minúsculas correspondem diferenças entre tratamentos (p>0,05). Barras verticais representam o erro padrão (n=50). 50
- Figura 10. Seções transversais de microscopia confocal do talo de *H. musciformis* após 96 horas de exposição aos tratamentos. A: Células corticais (CC) da planta controle. Autofluorescência das algas endofíticas (flechas). A;F: Maiores valores de intensidade da autofluorescência dos cloroplastos H;I: Redução na intensidade da autofluorescência dos cloroplastos nas células Corticais (CC) e subcorticais (CS). Escala: 30µm 51
- Figura 11. Resposta morfológica de *H. musciformis* após 96 horas de exposição aos tratamentos. G;H,I: Intensa despigmentação dos talos. I: mudança na coloração dos ramos. Escala=1cm. 32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias das taxas de crescimento de <i>H. musciformis</i> exposta aos tratamentos Local vs. Temperatura após 96h (n=9). Área 1=Ponta das canas; Área 2= Ponte Hercílio Luz; Área 3= Saco dos Limões. \pm desvio padrão	31
Tabela 2. Parâmetros físicos da água para as Áreas 1, 2 e 3 nos meses de Março, Abril e Maio correspondentes aos meses de experimento*ups:Unidades práticas de Salinidade; unt: Unidade Nefelemétrica de Turbidez.n=9.....	33
Tabela 3. Tabela 2 ANOVA bifatorial dos parâmetros fotossintéticos de <i>Hypnea musciformis</i> em resposta as variáveis independentes. Temp:Temperatura ; Fmax: taxa fotossintética máxima; β : fotoinibição; α : eficiência fotossintética; F_v/F_m : Rendimento quântico potencial. NS : não significativo $p>0,05$	35
Tabela 4 ANOVA fatorial Oxigênio Dissolvido de <i>Hypnea musciformis</i> em resposta as variáveis independentes. Temp: Temperatura. NS= $p>0,05$	37
Tabela 5. ANOVA bifatorial para concentrações de pigmentos fotossintético Aloficocianina,Ficocianina, Ficoeritrina,Clorofila a e Carotenóides de <i>Hypnea musciformis</i> após tratamento (96h) em resposta as combinações dos efeitos de temperaturas e locais. NS= $p>0,05$	39
Tabela 6. Autovalores e porcentagem da variância total dos dois primeiros eixos extraídos do PCA usando dados fotossintéticos (α, β, f_{max} e F_v/F_m), nutrientes dissolvidos (nitrato, fosfato e N-amoniaco) e temperatura (15°C ,25°C e 35°C) para todos os tratamentos.....	44
Tabela 7. Pesos das variáveis selecionadas extraídos dos dois componentes principais. Valores com módulos menores que 0, 1 foram omitidos	44

Lista de Abreviaturas e Siglas

Área 1 : Ponta das Canas

Área 2: Ponte Hercílio Luz

Área 3: Saco dos Limões

F_v/F_m : Rendimento Potencial Quântico

F_{max} : Fotossíntese Máxima

α : Eficiência Fotossintética

β : Fotoinibição

Cl *a*: Clorofila *a*

ML: Microscopia de Luz

TC: Taxa de Crescimento

PAM: Fluorímetro de Pulso Modulado

PCA: Análise Componentes Principais

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract.....	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Urbanização e Poluição antrópica.....	9
1.2 Mudanças Climáticas	12
1.3 Algas vermelhas	14
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Área de estudo	19
4.3 Taxa de Crescimento (TC).....	23
4.4 Análises físico-química da água	23
4.5 Análise da fluorescência da Clorofila a	24
4.7 Extração de clorofila a e carotenóides totais.....	26
4.8 Ficobiliproteínas	27
4.10 Análise em Microscopia de Luz (ML).....	29
4.10.1 Testes Citoquímicos	30

4.11 Análise em Microscopia Confocal.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Taxa de Crescimento e Morfologia Externa	31
5.2 Análise da água.....	33
5.3 Fluorescência da Clorofila	35
5.4 Quantificações do Oxigênio dissolvido	36
5.5 Pigmentos Fotossintéticos	38
5.5 PCA.....	42
5.7 Observações em microscopia de luz e citoquímica	45
5.8 Análise em Microscopia Confocal.....	49
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Análise químico-físico de água.....	52
6.2 Parâmetros Fisiológicos.....	54
6.3 Citoquímica e Taxa de Crescimento	59
6 CONCLUSÃO	62
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
8 REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Urbanização e Poluição antrópica

A urbanização de um modo geral está vinculada ao desenvolvimento de áreas economicamente mais ativas. O crescimento de uma região metropolitana é reflexo da atração dos centros, nos quais estão as mais diversificadas funções econômicas. As grandes aglomerações urbanas se caracterizam pela ocupação que muitas vezes é mal planejada e degradante no que diz respeito ao meio ambiente e aos recursos naturais. Dessa forma, estes processos desordenados de ocupação não só degradam o meio como também trazem uma baixa qualidade de vida para a população local (Moraes *et al.* 2009).

O acelerado processo de urbanização mundial exige maior atenção em países em desenvolvimento. Contabiliza-se que mais de 50% da população mundial vive em áreas urbanas em comparação com apenas 15% em 1900. A vida na cidade deve reduzir a vulnerabilidade em vários aspectos importantes da sociedade, incluindo redução nas taxas de doenças infecciosas e, muitas vezes aumento nos rendimentos individuais e melhores acessos a serviços de saúde e de saneamento básico. No entanto, populações urbanas, especialmente de baixa renda, compartilham de vulnerabilidades importantes. Estima-se que mais de 900 milhões de pessoas, um terço da população urbana global, e mais de 70% das populações urbanas dos países em desenvolvimento, agora vive em favela com condições semelhantes. Estes são caracterizados por baixos rendimentos, condições precárias de habitação e de prestação de serviços básicos, sem regulamentação eficaz sobre a poluição ou degradação do ecossistema (Campbell-Lendrum e Corvala 2007).

Na interface entre os mares e continentes, ou ainda de maneira genérica nas regiões costeiras as cidades de médio porte com até 600 mil habitantes, representam a maioria dos pólos de atração das migrações, sejam provenientes da zona rural ou das metrópoles, devido

ao desemprego, violência ou alta densidade populacional. Nesta perspectiva, as zonas costeiras, estão ameaçadas pelo ritmo acelerado da transformação de áreas naturais ou com cobertura florestal em centros urbanos (Castro *et al.* 2006). Pode se afirmar que ecossistemas costeiros têm sido amplamente ameaçados por impactos antrópicos ao longo de décadas, expostos no mundo moderno, a diferentes tipos de distúrbios (como poluição) os quais levam a várias mudanças funcionais e estruturais das comunidades (Vitousek *et al.* 1997; Orfanidis *et al.* 2001).

O Brasil possui uma população estimada em 190.763.694 de habitantes de acordo com o censo do ano de 2010 (IBGE 2011), destes 45.731.614 residem em zonas costeiras, correspondendo a 24% da população. No ano de 2010, o Brasil produziu cerca de 60,8 milhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos, uma quantia de 6,8% superior ao registrado em 2009 e seis vezes superior ao índice de crescimento populacional urbano apurado nos mesmos períodos. Dessas, 6,5 milhões de toneladas não foram coletadas e acabaram em rios, córregos e terrenos baldios (ABRELPE 2010). O esgoto doméstico é outra fonte de poluição que afeta os ecossistemas aquáticos. O uso de águas superficiais contaminadas com esgotos ocorre em diversas partes do mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que na América Latina aproximadamente 40 milhões de metros cúbicos de águas residuárias por dia são lançados nas águas superficiais, sendo que menos de 10% deste volume passam por tratamento prévio (CEPIS 1997). A capacidade de tratamento de resíduos é muito limitada, menos de um quinto das águas residuais do Brasil e do México são tratadas (PNDU 2006). Este cenário repete em intensidades semelhantes de prejuízos sócio-ambientais em países do continente africano e asiático. Grande parte da África Subsariana tem uma baixa cobertura de redes de esgotos, menos de 10% da população urbana possuem acesso. O mesmo acontece em países com médias de rendimentos altas. Cidades como Jacarta e Manila têm níveis de cobertura de esgotos mais baixos (8%-10%) do que cidades da África Ocidental como Dacar e Abidjan (PNDU 2006).

Outras fontes de contaminantes do ambiente marinho além dos esgotos sanitários domésticos e resíduos sólidos são: poluentes orgânicos, radioatividade, metais pesados, nutrientes (eutrofização),

óleos e movimentação de sedimentos. De fato, a problemática social e a problemática ambiental urbana são indissociáveis. A sustentabilidade das cidades tem que ser situada na conjuntura e dentro das opções de desenvolvimento racional. A sua viabilidade depende das estratégias de promoção da sustentabilidade integrar os planos, projetos e ações governamentais de desenvolvimento urbano, nos quais políticas públicas têm o papel indutor fundamental na promoção do desenvolvimento sustentável (Schenini 2000).

Por ser um ambiente de transição entre continente e oceano, as baías e os estuários são grandes sorvedouros, mas principalmente vítimas da poluição aquática nas regiões costeiras. Elevadas concentrações de metais pesados, compostos orgânicos e detergentes são seqüestrados pelos sedimentos e podem persistir por longo tempo no ambiente. Nesta situação, os organismos bênticos são úteis como indicadores de alterações ambientais, pois estão diretamente expostos aos impactos ambientais, pois assim como as macroalgas são sésseis (Pagliosa 2004). Respostas obtidas a partir do monitoramento biológico podem fornecer informações sobre quando e onde os estudos das fontes potenciais de poluição devem ser mais intensificados (Lowe e Pan 1996). No entanto, sistemas de bioindicadores de poluição baseados em animais são limitados, dado que a sua maioria pode se movimentar e mudar-se de local (Fjerdingstad 1971). O mesmo ocorre com fitoplâncton que comumente é deslocado pela correnteza. Em particular, as macroalgas, componentes dos bentos, possuem diferentes adaptações aos fatores ambientais, podendo reagir de várias formas às alterações do meio resultando em efeitos indesejáveis ao meio onde se encontram, ou a sua extinção frente a estas transformações, atuando assim como indicadores ecológicos (Borowitzka 1972).

Na década passada, um grande número de estudos foram realizados com o intuito de desenvolver técnicas rápidas e sofisticadas para análise de nutrientes e contaminantes orgânicos persistentes. Ao mesmo tempo desenvolveram-se muitos métodos biológicos para avaliar o impacto ambiental dessas substâncias, utilizando em alguns casos macroalgas marinhas. Segundo Gorostiaga e Diez (1996) estes produtores primários oferecem mais vantagens em relação a outros

organismos: são observáveis a olho nu e algumas vezes identificáveis no local; constituem um grupo ecologicamente importante em ecossistemas aquáticos; são sensíveis a mudanças no ambiente e apresentam respostas relativamente rápidas às mudanças ambientais.

1.2 Mudanças Climáticas

Desde a década de 1970, evidências científicas sobre a possibilidade de mudança do clima em nível mundial vêm despertando o interesse no público e principalmente da comunidade científica. A ação do homem desde a Revolução Industrial tem sido considerada um fator destrutivo e/ ou modificador preponderante em nosso planeta, pois vem causando incontáveis perdas de espécies em todos os seus biomas (Buckeridge 2007). Todo o debate sobre as mudanças climáticas ganhou força principalmente após a divulgação do quarto relatório do IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas), no ano de 2007 que apresentou evidências de mudanças de clima com extremos climáticos, que podem afetar significamente o planeta com ênfase nos países subdesenvolvidos na região tropical. Nesse contexto é importante lembrar que a terra sempre passou por ciclos naturais de aquecimento e resfriamento, da mesma forma que períodos de intensa atividade geológica lançaram à superfície quantidades colossais de gases que formavam de tempos em tempos uma espécie de bolha gasosa sobre o planeta, criando um efeito estufa natural (Marengo 2008).

Ocorre que agora nas últimas décadas algumas evidências sinalizam que as atividades humanas estão afetando o clima terrestre, trazendo a possibilidade da instalação de uma nova era geológica. Presenciamos uma época de mudanças climáticas em escala global e regional que acontece de maneira rápida e sinérgica a outras pressões ambientais. Tal fenômeno não pode ser considerado natural, pois é substancialmente decorrente das atividades humanas, e difere das grandes extinções em massa que ocorreram no passado, não só nas causas, mas também na índole do fenômeno, como o crescimento

desmedido da população, esgotamento de recursos e à degradação ambiental entre outros (Marengo 2008, Praia e Gil-Pérez 2008).

No entanto, há evidências científicas de que as mudanças no clima datam de períodos anteriores a Revolução Industrial. Segundo Crutzen e Stoerme (2000), as mudanças climáticas promovidas pela ação do homem datam de 1800 a.C. em uma nova era geológica denominada pelos autores como Antropoceno. Essa nova era tem sido estudada e defendida por pesquisadores como a adoção de um novo tempo geológico moldado pela influência humana. Atualmente, a Terra passa pelo Holoceno, iniciado com o fim da última glaciação, há cerca de 10 mil anos. Os principais argumentos para a aceitação do ingresso no Antropoceno será proposto pelos cientistas e debatido na Conferência Rio+20, que acontecerá em 2012, sob a perspectiva de que a humanidade provoca mudanças significativas na biodiversidade da Terra.

Segundo Zalasiewicz (2011), as emissões de CO₂ levar a fenômenos como o aquecimento global e a acidificação do oceano. Algumas dessas mudanças estão em andamento. Outras, como o aumento do nível do mar que provavelmente resultará do atual aquecimento global apenas começaram e acontecerão durante os próximos séculos e milênios. O aumento das temperatura médias globais do mar e do oceano é uma das variáveis climáticas mais debatidas no momento. Em comparações com dados paleoclimáticos, Hanse *et al* (2006) afirmam que a média de temperaturas dos oceanos como um todo, está tão quentes quanto ao do período do Holoceno máximo e $\approx 1^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura média dos últimos milhões de anos.

Observações desde 1961 mostram que a temperatura média do oceano global aumentou em profundidade de até pelo menos 3000 m e que o oceano tem absorvido mais de 80% do calor acrescentado ao sistema climático (IPCC 2007). Além disso, com o aumento da temperatura em algumas regiões do globo, as águas dos oceanos também estão se aquecendo, de forma que os gases naturalmente dissolvidos na água podem ser emitidos de volta para a atmosfera. Pouco a pouco esses gases vão “escapando”, pois quanto mais quente, menor a quantidade que se dissolve. A emissão de gás carbônico -

dissolvido nos oceanos, para a atmosfera - aumentará a concentração desse gás de efeito estufa, elevando mais ainda a temperatura global (Jones *et al.* 1999).

Por outro lado, diretamente ou indiretamente à temperatura está relacionada com outros fatores que devem ser considerados, como a ação sinérgica de fatores químicos, físicos e biológicos (Russel *et al.* 2009)

1.3 Algas vermelhas

A Divisão Rhodophyta compreende as algas vermelhas que formam um grupo primitivo. Os membros que constituem esta divisão apresentam extrema complexidade no seu desenvolvimento reprodutivo e histórico de vida, além disso, também apresentam várias características primitivas que incluem a presença dos pigmentos acessórios, as ficobiliproteínas, e a falta de células flageladas, ambos características de algas procarióticas (Lobban e Wynne 1981).

Sua distribuição, composição e abundância dependem de fatores físicos, químicos e biológicos (Luning 1990). Turbidez, sedimentação, elevada concentração de nutrientes derivado de águas residuais são fatores desestabilizadores para Rhodophyta e a vegetação marinha em geral. Quando estes fatores aumentam no ambiente, comunidades algáceas respondem através de uma simplificação da sua estrutura, por meio de abundância decrescente de riqueza de espécies de algas. Esse quadro tende a se agravar ainda mais com os impactos potenciais das mudanças climáticas antropogênicas, com o aumento da temperatura, a distribuição e abundância de espécies mudará de acordo com sua tolerância térmica e capacidade de adaptação (Harley *et al.* 2006).

As variações ambientais, decorrentes da atividade antrópica, resultam, muitas vezes, em mudanças drásticas no meio, acarretando em danos severos aos organismos (Davison e Pearson 1996). Os efeitos adversos de poluentes sobre os meios aquáticos geralmente são identificados pelos seus efeitos agudo e letal sobre os organismos

aquáticos. A possibilidade de alterações em um organismo pode ser categorizada por modificações sobre a sua bioquímica, fisiologia, morfologia, comportamento e reprodução. Alterações na qualidade da água causadas por poluentes ou mudanças bruscas sobre os fatores ambientais podem atuar em seqüência de tempo e serem observados em vários graus da organização biológica. Organismos expostos apenas horas ou dias são afetados, inicialmente, nos mecanismos celulares, bioquímicos e fisiológicos em resposta a uma exposição aguda. Exposições do tipo crônicas (meses, anos e décadas) podem impactar populações e causar mudanças na estrutura e na dinâmica da comunidade em longo prazo (Lobban e Harrison 1994). Nas células de organismos fotossintetizantes mecanismos de defesa estão mais fortemente desenvolvidos em comparação com outras células, uma vez que as membranas fotossintéticas, os tilacóides, são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídeos não saturados como elementos estruturais majoritários. Portanto, vários mecanismos de proteção são desenvolvidos nessas células (Rocha 2007).

A biologia celular das algas possui características únicas, mas similares em muitos aspectos a outras células eucarióticas. Por serem produtores primários avasculares, as algas não possuem tecidos verdadeiros quando comparado com plantas superiores (Reviere 2006), no entanto as algas desenvolveram sistemas superiores para os processos como secreção, diferenciação e expressão gênica, comum às células eucarióticas (Lobban e Wynne 1981).

Estudos envolvendo a organização celular em algas vermelhas têm confirmado muitas características únicas e interessantes. A grande maioria dos trabalhos possui caráter descritivo com foco dos estudos concentrados sobre mecanismos e controle da reprodução e do desenvolvimento. Nas décadas de 70 e 80 houve um aumento do interesse sobre os mecanismos de divisão celular e diferenciação das estruturas reprodutivas (e.g. Waaland 1978; Scott *et al.* 1980). Estudos mais recentes envolvendo propriamente a organização celular têm sido realizados em algas em respostas aos fatores físicos-químicos e impactos ambientais em experimentos de curto e longo prazo (e.g. Schmidt *et al.* 2009, 2010, 2011).

O gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) inclui cerca de 50 espécies que estão distribuídas pelas costas tropicais e subtropicais (Masuda *et al.* 1997) com distribuição no Oceano Atlântico (Taylor 1960), Oceano Índico (Ramarao 1970, Mshigeni e Lorri 1977) e Oceano Pacífico (Chapman 1971, Mshigeni e Lorri 1977). Para o Brasil, são citadas seis espécies: *H. cenomyce* J. Agardh, *H. cornuta* J. V. Lamouroux; *H. musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamouroux; *H. nigrescens* Greville ex J. Agardh; *H. spinella* (C. Agardh) Kuetzing; e *H. valentiae* (Turner) Montagne (Schenkman 1986, Nunes 2005).

No Brasil *H. musciformis* também apresenta extensa distribuição ao longo do litoral ocorrendo desde o estado do Rio Grande do Sul estendendo ao Maranhão (Oliveira 1977, Nunes 2005), podendo ser encontrada em regiões do infralitoral e mesolitoral, sobre rochas ou como epífita, tem como principal substrato *Sargassum* spp. (Schenkman 1989; Reis *et al.* 2006) podendo também ocorrer sobre outros gêneros de algas. Por ocorrer na região do mesolitoral, *H. musciformis* está sujeita à variações ambientais e apresenta ampla tolerância à temperatura (18°C a 30°C) salinidade (20 a 50 unidades padrão de salinidade) e intensidades de luz (Yokoya e Oliveira 1992 a,b) com melhor crescimento de massa algácea a temperaturas de 20 °C e 25 °C (Bravin e Yoneshingue-Valentin 2002).

Seus representantes reproduzem-se sexuada e assexuadamente, sendo a fecundação seguida por duas gerações assexuadas que produzem esporos, denominadas gerações carposporofítica e tetrasporofítica. Uma característica diagnóstica dessa espécie é a presença de ramos em forma de ganchos nas porções terminais dos eixos principais, cuja função é fixar como gavinhas, a alga sobre outras algas suporte ou outros substratos (Fritsch 1965; Berchez 1990)

É uma espécie de grande interesse econômico utilizada como fonte de alimento e para extração da de *kappa*-carragenana extraída da sua parede celular, polissacarídeo com alta qualidade espessante, possuindo ainda substâncias com potencial farmacêutico, as quais têm atividade antiviral (Santos *et al.* 1999), vermífuga, anti-inflamatória e mio-relaxante (Schenkman, 1989). Há alguns anos, observou-se um declínio do estoque natural dessa carragenófita no litoral brasileiro.

Atualmente, o extrativismo se encontra em declínio e em várias regiões. A possibilidade de esgotamento da massa algácea em seu hábitat natural levou à publicação de diversos trabalhos sobre suas taxas de crescimento e estudos populacionais (Rao 1970; Mshigeni 1977, Shenckman 1989; Wallner *et al.* 1992, Reis , Yoneshigue-Valentin 1998; Faccini e Berchez 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais impactos da urbanização e extremos de temperatura sobre aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de *Hypnea musciformis*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito sinérgico dos impactos da urbanização com extremos de temperatura sobre o desempenho fisiológico de *H. musciformis*;
- Avaliar a eficiência fotossintética e o rendimento fotossintético durante os períodos experimentais nas diferentes condições;
- Avaliar as variações nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos após os respectivos tratamentos.
- Analisar as possíveis alterações morfológicas e citoquímicas após a exposição a extremos de temperatura em diferentes graus de poluição;
- Avaliar as alterações na autofluorescência dos cloroplastos;
- Avaliar as taxas de crescimento após a exposição a extremos de temperatura em diferentes graus de poluição;
- Correlacionar os impactos da urbanização com extremos de temperatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Foram selecionadas três áreas na Ilha de Florianópolis, nas quais área 1 corresponde a região menos impactada pela urbanização (condição controle), e áreas 2 e 3 localizadas em região urbanizada (condição de impacto) sendo localizadas na Baía Norte central e Baía Sul, respectivamente.

O primeiro sistema de esgotos do município de Florianópolis teve sua obra iniciada em fevereiro de 1911, sendo concluída em setembro de 1916 abrangendo apenas a área central da Ilha. O expressivo crescimento da cidade verificado a partir da década de 70 e a consolidação do turismo mais recentemente culminaram no adensamento dos bairros mais afastados do centro, no surgimento de inúmeras áreas de invasão por população de baixa renda e na consolidação de vários núcleos urbanos (e.g. bairro Saco dos Limões-área 3 do estudo). No período de 1996 a 1998, foram beneficiadas 10 comunidades de baixa renda do município. O índice de população urbana atendida atualmente com serviços de coleta e tratamento de esgotos no município encontra-se numa proporção de 40%, denotando ainda a necessidade de grandes investimentos, sobretudo para bairros urbanos de baixa renda, onde ainda há o contínuo crescimento de favelas (PMF 2010).

A presença do impacto e a escolha dos locais foram consideradas seguindo as características fisiográficas e pelo grau de poluição obtido pelo relatório nº 8 da FATMA (Fundação do Meio Ambiente – Governo de Santa Catarina) de balneabilidade do litoral de Santa Catarina, conforme a resolução CONAMA Nº 274/200 no qual a água é considerada própria quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas nas últimas cinco semanas anteriores, no mesmo

local, houver no máximo 800 *Escherichia coli* por 100 mililitros. Os seguintes locais foram selecionados (Figura 1):

Área 1-Ponta das Canas (27°23'34.40"S e 48°26'10.71"O) o distrito mais para fora da Baía Norte, possui uma pequena população residente, embora ela aumente substancialmente durante o verão visto que é um importante destino para turistas. Contudo, a área tem algumas pequenas praias inabitadas onde foram realizadas as coletas para as experimentações. Essas praias não têm acesso a veículos motorizados, são cercadas por restinga e recebem uma maior influência do mar aberto. A área onde foram realizadas as coletas foi considerada como potencialmente não poluída pelo relatório de balneabilidade da FATMA, portanto usada como controle.

Área 2 - Baía Norte, na localidade próxima ao trapiche na Ponte Hercílio Luz no centro da cidade (27°36'52.85"S e 48°33'47.61"O). Esta região central recebeu o primeiro sistema de esgoto sanitário de Florianópolis com implementação em 1911 com data de conclusão em 1916. A área central atendida da Ilha de Santa Catarina inicialmente correspondia uma extensão de rede coletora de 30.000 metros. No entanto, essa região ainda apresenta situação sanitária preocupante em alguns pontos que possuem ligações clandestinas de esgoto, ocasionando a contaminação e poluição orgânica por efluentes domésticos, além dos danos causados pela impermeabilização do solo ao longo da costa com tráfego de veículos intenso e valas pluviais. Ao redor desta baía está à principal avenida de Florianópolis, a Beira-mar Norte com dezenas de edifícios residenciais de alto padrão, além de vários bairros importantes.

Área 3-Saco dos Limões (27°35'30.37"S e 48° 33'47.61"O) apesar de não estar localizado no centro da cidade está contido em um gradiente de poluição urbana e diretamente das áreas adjacentes. O bairro consiste em uma planície costeira banhada por uma enseada da Baía Sul. É banhado pela praia de mesmo nome e utilizado por coletores de organismos e pescadores. Foi aterrado para construção da Via Expressa Sul, possui cerca de 7,3 km de extensão (Google Earth) e declividade baixa. As características fisiográficas da Baía Sul dão conta de um ambiente de baixa hidrodinâmica, impróprio para diluição e

dispersão de efluentes lançados na Baía. Para as regiões localizadas na Baía Sul da Ilha, os inícios das obras de saneamento começaram a partir de 1995 levando 12 anos para ser concluída. A situação sanitária nesta região é dramática, recebendo grande volume de efluentes sanitários lançados diretamente na Baía. Trata se de uma região habitada por comunidades de média e baixa renda, ocupada por inúmeras favelas no entorno dos morros sem atendimento pela rede coletora de esgoto.

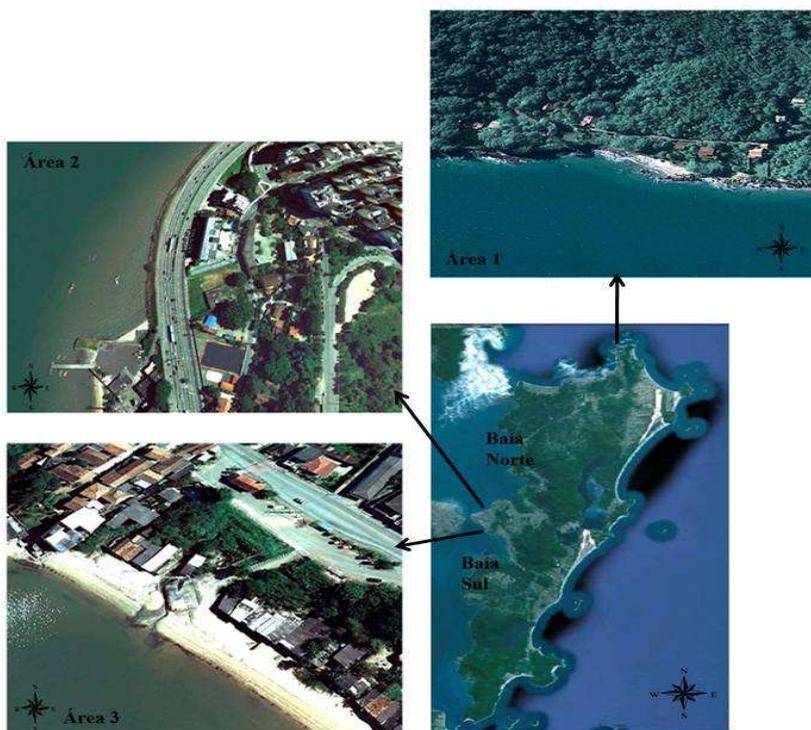


Figura 1. Mapa da área de estudo, com destaque para área 1 (Praia de Ponta das Canas), área 2 (Centro, Ponte Hercílio Luz) e área 3 (Saco dos Limões), Florianópolis, Santa Catarina. Fonte:Google Earth.

4.2 Desenhos amostrais

Os experimentos foram realizados em laboratório para se testar respostas de curto período em condições controladas. Um total de três repetições experimentais foi realizado nos meses Março, Abril e Maio. Os experimentos realizados em cada repetição foram feitos em triplicatas. *Hypnea musciformis* foi coletada da área 1 e usada como modelo para comparar o seu desempenho fotossintético e morfologia em resposta ao procedimento experimental. As amostras foram transportadas em sacos plásticos, contendo água do mar em caixa de isopor para o laboratório, onde foram lavados com água do mar esterilizada e triados.

A água do mar foi coletada nestas três áreas e usada para incubar as macroalgas coletadas na área 1. As incubações foram realizadas após a aclimação das algas em laboratório sob aeração, durante 15 dias, em água do mar enriquecida com solução von Stosch 50 % Edwards (1970), salinidade 34 ups, temperatura de 24°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12h, com radiação fotossinteticamente ativa de 80 μmol fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Schmidt *et al.* 2011). A água utilizada para aclimação é coletada na Barra da Lagoa, em laboratório passou pelo processo de decantação por 7 dias, posteriormente filtragem em filtro de 5 μm e 1 μm , finalizando com esterilização por ultravioleta. Para os experimentos as algas foram incubadas em frascos de erlenmeyers de 250 mL com 1.0 \pm 0.05 g de amostras para cada tratamento. Diferentes faixas de temperaturas foram obtidas com a utilização de três câmaras de controle de temperatura configuradas com radiação fotossinteticamente e fotoperíodo iguais aos utilizados durante a aclimação. Foram avaliadas três diferentes temperaturas 15°C, 25°C, 35°C. A incubação foi realizada com alíquotas de água coletada nas três áreas estabelecidas. Os frascos tiveram suas posições aleatorizadas e sofreram agitação manual a cada 3 horas durante a fase clara do fotoperíodo. As medições dos parâmetros fisiológicos (evolução do oxigênio (O₂) e da fluorescência *in vivo* da clorofila) foram feitas seguindo-se 24 e 96 horas de incubação.

4.3 Taxa de Crescimento (TC)

O efeito dos fatores temperatura e águas naturais dos locais impactados, médio e pouco impactados no crescimento dos talos de *H. musciformis* foi avaliada através de medidas de massa fresca no início do experimento, o qual foi estabelecido peso de 1.0g \pm 0.5 para todas as réplicas, e obtido os pesos no final do experimento (após 96h). A taxa de crescimento foi calculada segundo a formula de Penniman *et al.* 1986.

$$TC = [(Mf/Mi)^{1/t} - 1] \times 100$$

Taxa de crescimento (TC)% dia⁻¹
Mf= Massa final em gramas
Mi=Massa inicial em gramas

T= Tempo em dias

4.4 Análises físico-química da água

Considerando que a poluição direta observada na área em questão é derivada de efluentes domésticos, a qualidade da água foi monitorada, de Março a Maio de 2011, mesmo período de experimentação, considerando como parâmetros os nutrientes inorgânicos dissolvidos nitrogenados e fosforados. Amostras em triplicatas foram manualmente coletadas nas três áreas selecionadas do trabalho usando garrafas plásticas de polietileno de um litro. A frequência de amostragem dependeu das condições climáticas (não ocorrência de chuvas). As amostras de água foram mantidas em uma caixa térmica com gelo e transportadas para o laboratório. Para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos uma fração das amostras foi filtrada com auxílio de um kit para filtração (Dist), acoplado em bomba de vácuo (Marconi) e microfiltro de fibra de vidro de 0,45 μ m de porosidade GF/F whatman. As amostras foram imediatamente congeladas após filtração e analisadas os parâmetros físicos. Os nutrientes inorgânicos dissolvidos (Nitrogênio

amoniaco, fosfato e nitrato) foram medidos para avaliação, seguindo-se as metodologias propostas por Grasshoff *et al.* (1983). Turbidez (Turbidímetro Microprocessado Plus), pH (Phmetro Portátil digital, pH 206-LUTRON), salinidade (Resolução para salinidade RTS-101ATC equipamentos) foram medidos em laboratório.

4.5 Análise da fluorescência da Clorofila *a*

O analisador submersível Walz de rendimento fotossintético Diving-PAM (Diving PAM underwater fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany) é um fluorímetro que realiza quantificação do sinal da fluorescência dos elétrons da clorofila *a* do fotossistema II (PS II). Esse par de elétrons é chamado de par especial, e está localizado no centro de reação do PS II.

Antes das realizações das medidas, as algas foram mantidas no escuro por 10 minutos sendo as leituras realizadas em seguida. As medidas foram obtidas com a aplicação de uma série de oito exposições de 10 s cada, a níveis ascendentes de irradiância actínica usando a opção “Rapid Light Curve” (RLC) do Diving PAM.

As medições dos parâmetros fotossintéticos pela técnica de fluorescência da clorofila foram feitas a partir das triplicatas de cada tratamento (somente as algas no claro da técnica de oxigênio). Foram construídas curvas rápidas de luz (White e Critchley 1999) em nove níveis crescentes de irradiância (0, 26, 55, 87, 123, 167, 263, 361 e 560 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

As curvas de Fotossíntese-Irradiância foram geradas com base na ETR relativa e os respectivos parâmetros foram calculados pela equação de Platt *et al.* (1980): eficiência fotossintética (α ETR), taxa de fotossíntese máxima (F_{max}), fotoinibição (β ETR).

O ETR representa a taxa de transporte de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I e apresenta tipicamente uma relação direta com a taxa de fixação de CO_2 ou de liberação de O_2 em condições saturantes de CO_2 e baixa concentração de O_2 . O ETR pode

ser estimado a partir do rendimento quântico efetivo. Portanto seguindo a fórmula temos $ETR = \Delta F/F'_m \times \text{irradiância (PAR)} \times 0,15 \times 0,84$ onde $\Delta F = F_m' - F_t$; F_m é a fluorescência máxima de uma amostra iluminada; F_t é a fluorescência transitória (Schreiber *et al.* 1994). Assumindo-se ainda que para o fotossistema II em rodofíceas 0,15 é o fator dos quanta de luz aproveitado pela clorofila *a* (Figueroa *et al.* 1997) e 0,84 é um ETR-fator, baseado na média de luz que é realmente absorvida por plantas e PAR é a radiação fotossinteticamente ativa (Diving-PAM underwater fluorometer handbook of operation, Heins Walz GmbH 1998).

Inicialmente um pulso de luz saturante é aplicado para determinação do rendimento quântico potencial ($RQP = F_v/F_m$) onde:

F_m = Fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro, possuindo todos os centro de reação fechado para transferência dos elétrons;

F_v = fluorescência variável. Este parâmetro indica a eficiência fotoquímica (eficiência de captura de energia) dos centros de reação abertos do fotossistema II de uma planta iluminada.

Calculou-se a média do ETR relativa de três medições por réplica. Para as medições plantas não foram retiradas dos erlenmeyers, foram posicionadas o mais próximo do vidro para realização das medidas com a extremidade do cabo de fibra óptica do fluorômetro.

4.6 Quantificações do Oxigênio dissolvido

A produção de oxigênio de *H. musciformis* foi determinada através de incubações em laboratório por meio das análises de oxigênio dissolvido feita através do método da evolução do oxigênio (método das garrafas claro/escuro) (Winkler 1988). As concentrações de oxigênio dissolvido (OD) no início e final das incubações foram medidas com uso do oxímetro Yellow Springs, modelo 5000, com agitação manual. Todo experimento foi realizado em triplicatas. Inicialmente as medidas foram realizadas em período claro e, posteriormente os frascos foram

embrulhados em papel alumínio por 4 horas para a medição final no escuro.

Os frascos (claro e escuro) com ramos de *H. musciformis*, foram incubados frascos (claro e escuro) com águas dos três diferentes locais em alga ($1g \pm 0,05$ de alga em 250 ml de água) , para determinar a produção de oxigênio líquida.

Durante a incubação, a concentração inicial de oxigênio dissolvido (FI) foi medida nos frascos escuros em resposta ao consumo de oxigênio e, a princípio, a medição nos frascos claros com o aumento da produção. Os valores da produção líquida (PL), em unidade de volume por unidade de tempo, foram determinados a partir dos seguintes cálculos, segundo Oliveira (1995):

Produção Líquida:

$$PL = (F_t - F_i) \text{ em mg L}^{-1}$$

Onde:

F_t = Frasco claro;

F_i = Frasco inicial;

4.7 Extração de clorofila *a* e carotenóides totais

As extrações de clorofila *a* e carotenóides dos talos foram realizados utilizando o método de Hiscox e Israelstam (1979). A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras com aproximadamente 1g de massa fresca em cada réplica, ou seja, nos três experimentos. Os talos foram acrescidos com 3mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a clorofila foi extraída na solução sem macerar a 65 °C por 30 minutos. Todo o processo foi realizado no escuro a 4 °C.

A dosagem da concentração de clorofila *a* foi realizada com 3 mL das amostras e transferidas para cubetas de vidro. A leitura foi realizada

em espectrofotômetro Shimadzu 2031 em 630nm, 647nm e 664 nm e comprimentos de onda.

As análises foram realizadas em quadruplicatas (n=4) para confecção das médias e erro padrão.

A determinação da concentração da clorofila *a* foram feitos utilizando a equação descrita por Jeffrey e Humphrey (1975).

Para a análise dos carotenóides, usou-se o comprimento de onda de 480nm e aplicou a fórmula por Welburn (1994):

$$Cl-a = 11,85 A_{664} - 1,54 A_{647} - 0,08 A_{630}$$

$$Carotenóides = 1000 A_{480} - 2,14 Cl-a / 220$$

4.8 Ficobiliproteínas

A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras com aproximadamente 1g de massa fresca em cada repetição. Todo o processo foi realizado no escuro a 4 °C.

As amostras foram maceradas até a formação de um pó fino em almofariz congelado em nitrogênio líquido. O pó diluído em um total de 4ml de tampão fosfato pH 5,5. A solução foi centrifugada a 44000 xg por 20 minutos. O sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi retirado e transferido para cubetas de vidro para leitura no espectrofotômetro Shimadzu 2031 nos comprimentos de onda 498 nm, 615 nm e 651 nm.

A concentração de ficobiliproteínas foi determinada usando as equações descritas por Kusar *et al.* (1983).

$$AFC \text{ (aloficocianina)} = 181,3 A_{651} - 22,3 A_{615}$$

$$FC \text{ (ficocianina)} = 151,1 A_{615} - 99,1 A_{651}$$

$$FE \text{ (ficoeritrina)} = 155,8 A_{498} - 40 A_{614} - 10,5 A_{651}$$

Para as análises foram utilizadas número amostral igual a 4, após as leituras foram realizadas as médias e calculados os erros padrão.

4.9 Análise Estatística

Os efeitos da poluição por esgotos em comunidades biológicas marinhas têm sido geralmente estudados usando análises univariadas ou multivariadas, enquanto poucos estudos se beneficiaram de uma combinação de ambos. O uso de análises distintas torna a detecção de efeitos em diferentes componentes mais robustas (Terlizzi *et al.* 2002). Análises univariada e mutivariada foram utilizadas para as análises dos dados.

Para os testes univariados testou inicialmente a homogeneidade das variâncias usando o teste de Cochran. Foram utilizadas análises de variância bifatorial (two-way ANOVA) para comparação das médias entre os tratamentos. Para análise dos dados univariados optou-se na não transformação de dados o que permitiu que a uma análise mais conservativa, além disso, a transformação de dados somente é utilizada como recurso complementar, destinado a suprir a necessidade de testes estatísticos nos casos em que alguma restrição desaconselha o uso da estatística paramétrica, ou quando a própria natureza dos dados impossibilita a aplicação do teste (Underwood 1997). Para diferenças significativas as análises *a posteriori* foram realizadas utilizando-se o teste *Post-hoc Tukey*, usando o programa de análise estatística STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004).

As análises *a posteriori* (*Post-Hoc Tukey* bi-fatorial) para dados de fluorescência da clorofila, produção primária e pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a*, Carotenóides e ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foram efetuados nas amostras com o intuito de averiguar diferenças entre temperaturas (15°C, 25°C e 35°C) vs. um mesmo local, verificando assim o efeito da temperatura, e para diferenças entre locais (área 1, 2 e 3) vs. uma única temperatura, para verificação da atuação do local sobre os tratamentos. As análises foram realizadas através das médias dos dados obtidos para os parâmetros analisados.

O conjunto de dados multivariado foi analisado no software MVSP 3.2 (MultiVariate Statistical Package for Windows) (Kovach 2005), sendo aplicada a técnica estatística de Análise de Componentes Principais (PCA – Principal Components Analysis). Foram selecionadas dez variáveis para a realização desta análise: Temperatura, Nitrato, Fosfato, Nitrogênio amoniacal, Eficiência Fotossintética Potencial (F_v/F_m), eficiência fotossintética (α), fotoinibição (β), taxa de fotossíntese máxima (F_{max}), e Taxas de Fotoprodução e Respiração. Como estas variáveis possuem diferentes escalas de mensuração, recorreu-se à transformação por log 10. Matrizes de Covariância e Biplots com distância euclidiana foram utilizadas. Os autovetores produzidos a partir da biplot euclidiano foram usados para identificar as faixas individuais que contribuíram para a formação de grupos. A soma dos valores absolutos do eixo x e coordenada y para cada autovetor foram utilizadas para classificar as bandas como determinantes forte ou fraco, considera-se que quanto maior o autovetor maior o efeito. Para maior clareza somente os valores dos dois primeiros eixos da análise foram apresentados.

Para a verificação da existência de diferenças entre as concentrações de nutrientes inorgânicos dissolvidos nos locais amostrados foram utilizadas análises de variância unifatorial (ANOVA).

4.10 Análise em Microscopia de Luz (ML)

Os materiais tratados e o controle (algas coletadas do campo de estudo sem passagem por procedimentos) de *H. musciformis* foram processados para análises citoquímica e morfológica em microscopia de luz. Fragmentos do talo das amostras com aproximadamente 5mm foram fixados em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, *overnight* (Schmidt *et al.* 2009). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Secções com 5 μ m de espessura

foram corada com diferentes testes citoquímicos e fotografados com o microscópio Epifluorescente (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

4.10.1 Testes Citoquímicos

As secções dos controles e dos tratamentos foram coradas com os seguintes testes: Ácido Periódico de Schiff (PAS) utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (Gahan 1984), Azul de Toluidina (AT-O) para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (Gordon e McCandless 1973, McCully 1970).

4.11 Análise em Microscopia Confocal

As amostras de *H. musciformis* foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Alemanha). Para a captura das imagens foi utilizada objetiva de óleo de imersão 63x/1.4-0.6 (HCX PLAPO lambda) e a autofluorescência dos cloroplastos foi observada em um comprimento de onda de excitação com laser argônio de 488 nm (violeta) em um espectro de emissão de 639 a 701 nm. A intensidade da autofluorescência do controle e do tratamento das células corticais foi mensurada utilizando o microscópio confocal combinado com o programa de análise de imagens Image J (versão 1.43), baseado nos métodos utilizados Shimizu *et al.* (2008). A intensidade de pixels foi medida em 50 células de cada tratamento.

5 RESULTADOS

5.1 Taxa de Crescimento e Morfologia Externa

Após o período de experimentação (96h), foram verificadas alterações nas taxas de crescimento e na pigmentação de *H. musciformis* (Tabela 1 e Figura 2). Alguns segmentos da alga apresentaram, além do processo de despigmentação, necrose principalmente nos tratamentos na temperatura de 35°C (Figura 2 G;H;I). Como consequência da necrose, ocorreu um declínio na taxa de crescimento por perda de massa fresca. Nas temperaturas de 15°C e 25°C, dos três locais de coleta, apresentaram taxas de crescimento positiva (Tabela 1).

Tabela 1. Médias das taxas de crescimento de *H. musciformis* exposta aos tratamentos Local vs. Temperatura após 96h (n=9). Área 1=Ponta das canas; Área 2= Ponte Hercílio Luz; Área 3= Saco dos Limões. \pm desvio padrão

Local	Temperatura	Taxa de crescimento % dia ⁻¹
Área 1	15 °C	1,6 \pm 0,74
	25 °C	1,3 \pm 0,28
	35 °C	-0,99 \pm 1,32
Área 2	15 °C	0,39 \pm 0,77
	25 °C	1,20 \pm 0,26
	35 °C	-5,55 \pm 0,85
Área 3	15 °C	1,60 \pm 0,87
	25 °C	1,40 \pm 0,49
	35 °C	-4,78 \pm 1,1

Figura 2. Resposta morfológica de *H.musciformis* após 96 horas de exposição aos tratamentos. G;H,I: Intensa despigmentação dos talos. I: mudança na coloração dos ramos. Escala=1cm.

5.2 Análise da água

Os resultados dos parâmetros físicos da água, para as três áreas, apresentaram valores de salinidade com maiores variações entre as amostras da área 3 com valores entre 28 e 36 ups, para área 1 entre 36 e 37 ups, para área 2 obteve variação entre 31 e 36 ups (Tabela 2).

Os valores de pH variaram entre 7 a 8,5 para as três áreas. A turbidez apresentou valores maiores para as áreas 2 e 3 apresentando assim a menor transparência da água (Tabela 2). Estatisticamente para os três áreas não foram observadas diferenças significativas para salinidade e pH entre os locais. Somente para turbidez foi detectado diferença para os locais ($F= 5,83$ $p=0,03$). A análise *a posteriori* por *Post hoc* (tukey) mostrou que há diferenças entre área 1 e área 3 para os meses de Março e Maio.

Tabela 2. Parâmetros físicos da água para as Áreas 1, 2 e 3 nos meses de Março, Abril e Maio correspondentes aos meses de experimento*ups: Unidades práticas de Salinidade; unt: Unidade Nefelemétrica de Turbidez.n=9

Meses	Área 1			Área 2			Área 3		
	Salinidade ups*	pH	Turbidez unt*	Salinidade ups	pH	Turbidez unt	Salinidade ups	pH	Turbidez unt
Março	36	7,83	2,79	31	8,06	6,15	28	8,13	8,13
Abril	36	8,18	2,43	31	8,15	5,59	30	8,2	8,2
Maio	37	7,7	4,92	36	8	13,39	36	8,26	8,26

A análise nutriente foi caracterizada por diferenças entre as áreas (Figuras 3). Entre os nutrientes dissolvidos, as concentrações de Nitrogênio amoniacal ($N-NH^4$) foram mais elevadas na estação poluída por esgoto doméstico (área 3) não tratado com valores máximos variando ao redor de $50,52 \mu M.L^{-1}$. Para áreas 1 e 2 não foram observadas diferenças significativas apesar da urbanização da área 2 (Figura 3).

Os valores de fosfato inorgânico foram mais elevados para área 3 com $6,8 \mu M.L^{-1}$, sendo que não foram observadas diferenças

significativas entre os valores observados na área 1 ($0,83 \mu\text{M.L}^{-1}$) e 2 ($0,37 \mu\text{M.L}^{-1}$). Este padrão espacial se manteve para concentrações de nitrato (Figuras 3).

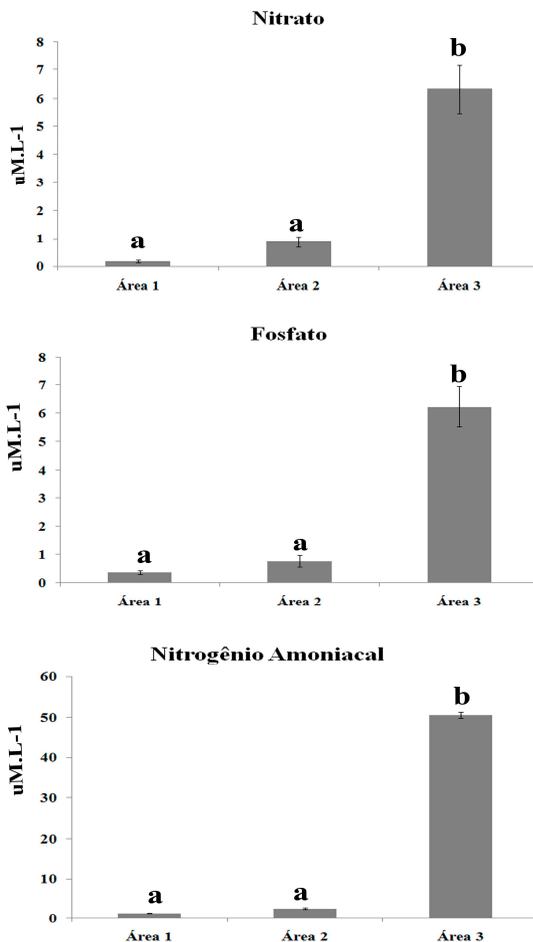


Figura 3. Análise *Post-Hoc Tukey* para os valores das médias do nutriente nitrato, fosfato e nitrogênio amoniacal nas Áreas 1, 2 e 3 das coletas realizados em Março, Abril e Maio. As letras representam as diferenças entre os locais ($p < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão ($n=9$).

5.3 Fluorescência da Clorofila

Hypnea musciformis apresentou maior eficiência fotossintética (α), valores de fotoinibição (β) e fotossíntese máxima (F_{\max}) nos tratamentos para as três áreas na temperatura de 25°C, nas temperaturas simuladas a 35°C obtiveram os menores valores (Figura 3). De acordo com a ANOVA bifatorial para os parâmetros α , β e F_{\max} , não houve diferenças significativas entre os locais. A interação local vs. temperatura, somente foi verificada diferença entre o fator temperatura (Tabela 3). O rendimento quântico potencial (F_v/F_m), obtido como primeira medida em uma curva de luz, apresentou influencia nos tratamentos tanto para o fator local, temperatura e para interação local vs. temperatura apresentando diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3. ANOVA bifatorial dos parâmetros fotossintéticos de *Hypnea musciformis* em resposta as variáveis independentes. Temp: Temperatura ; Fmax: taxa fotossintética máxima; β : fotoinibição; α : eficiência fotossintética; F_v/F_m : Rendimento quântico potencial. NS : não significativo $p > 0,05$.

	Fmax		β		α		F_v/F_m	
	F	p	F	p	F	p	F	P
Local	0,829	NS	1,190	NS	1,576	NS	3,329	0,038
Temperatura	78,218	0,000	37,026	0,000	61,676	0,000	118,480	0,000
Local*Temp.	2,071	NS	1,797	NS	1,208	NS	2,620	0,037

Com o teste *a posteriori* (Tukey) foi possível observar o efeito das temperaturas sobre os tratamentos, os quais apresentaram diferenças significativas entre alguns tratamentos para o fator temperatura (Figura 4). Entre áreas para mesma temperatura não apresentaram diferenças significativas com exceção do parâmetro F_v/F_m para áreas 1 e 3 na temperatura de 35°C. Observou-se uma tendência ao decréscimo dos valores dos parâmetros fotossintéticos da área mais impactada (área 3)

para as áreas menos impactadas (área 2 > área 1) na temperatura de 35°C (Figura 4).

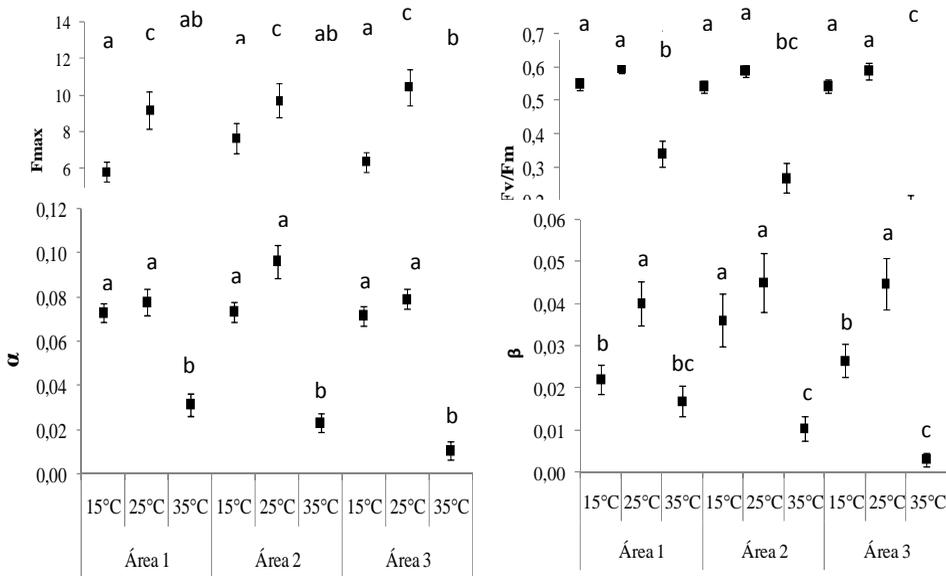


Figura 4. Médias dos parâmetros fotossintéticos de *H.musciformis* após experimento de 96h, para os experimentos realizados em Março, Abril e Maio em triplicatas. Parâmetros :Fmax=Fotossíntese máxima; F_v/F_m=rendimento quântico potencial;β=fotoinibição;α=eficiência fotossintética. Letras minúsculas correspondem a diferença entre os tratamentos (p<0,05). Barras verticais indicam erro padrão (n=9).

5.4 Quantificações do Oxigênio dissolvido

As concentrações mensuradas para o oxigênio dissolvido nos frascos com incubação de *H.musciformis* variaram entre 5,12 mg L⁻¹ e 1,1 mg L⁻¹, onde o valor máximo obtido ocorreu para o tratamento área 3-15°C e o inferior para área 3-35°C (Figura 5).

Estatisticamente não houve diferenças para os tratamentos entre locais e a interação local vs. temperatura, somente temperaturas afetaram significativamente a Oxigênio Dissolvido (Tabela 4).

Tabela 4 ANOVA fatorial Oxigênio Dissolvido de *Hypnea musciformis* em resposta as variáveis independentes. Temp: Temperatura. NS= $p>0,05$

Fatores/Variáveis	Oxigênio Dissolvido	
	F	p
Temperatura	20,276	0
Local	1,368	NS
Temperatura vs. Local	11,086	NS

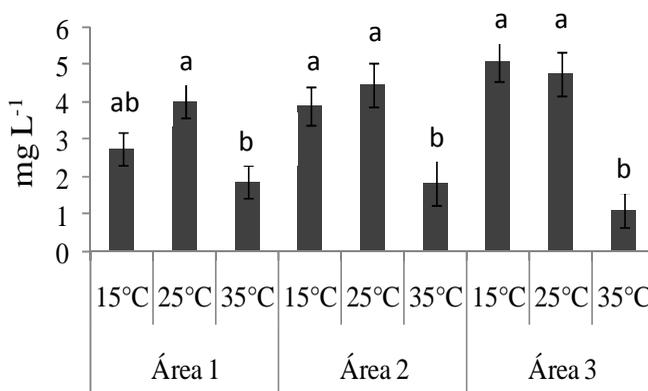


Figura 5. Médias das concentrações de oxigênio dissolvido para as incubações de *Hypnea musciformis* para as três áreas nas temperaturas 15°C, 25°C e 35°C dos experimentos realizados em Março, Abril e Maio em triplicatas. Barras verticais correspondem aos valores de erro padrão (n=9).

5.5 Pigmentos Fotossintéticos

Para os pigmentos fotossintéticos, em geral, foi verificado a interferência significativa nos tratamentos pela temperatura e pouca diferença foi constatada pelo local. Para clorofila *a* e carotenóides a interação local vs. temperatura foi significativa (Tabela 5). Observa-se reduções e estímulo na síntese dos pigmentos fotossintéticos após exposição aos tratamentos comparado ao tratamento área 1-25°C entre os tratamentos (Figura 6). Em relação ao tratamento área 1-25°C (controle) ficou evidente a síntese das ficobiliproteínas nos tratamentos, principalmente para os tratamentos da área 2, para os três pigmentos (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foram observados diferenças entre os tratamentos.

A concentração de clorofila *a* apresentou diferenças significativas para três tratamentos (Figura 6). As amostras tratadas na temperatura de 35°C apresentaram drástica redução comparadas ao controle, citando-se o tratamento área 3 na temperatura de 35°C que apresentou a menor quantidade de clorofila *a* 43 ug/g.

Para os carotenóides, pode-se constatar um aumento na concentração de carotenóides indicando a sua síntese. Foram constatadas diferenças significativas entre o controle e uma amostra (Figura 6).

Tabela 5. ANOVA bifatorial para concentrações de pigmentos fotossintético Alococianina, Ficocianina, Ficoeritrina, Clorofila *a* e Carotenóides de *Hypnea musciformis* após tratamento (96h) em resposta as combinações dos efeitos de temperaturas e locais. NS= $p>0,05$.

Pigmentos Fotossintéticos		
Alococianina	F	p
Temperatura	0,4637	NS
Local	4,7375	0,017237
Localvs.Temperatura	1,7404	NS
Ficocianina		
Temperatura	5,3999	0,010649
Local	0,2468	NS
Localvs.Temperatura	1,7964	NS
Ficoeritrina		
Temperatura	2,9248	0,012982
Local	0,3468	NS
Localvs.Temperatura	1,7876	NS
Clorofila <i>a</i>		
Temperatura	12,49	0,000144
Local	222,68	0,000000
Localvs.Temperatura	211,27	0,000000
Carotenóides		
Temperatura	16,462	0,000021
Local	0,754	NS
Localvs.Temperatura	15,929	0,000001

Nas análises cruzada (local vs. temperaturas), não houve diferenças significativas para os pigmentos ficoeritrina, ficocianina e aloficocianinas. Entretanto, para o pigmento clorofila *a* foi observado às maiores diferenças entre temperatura em uma mesma área como observado na figura 6.

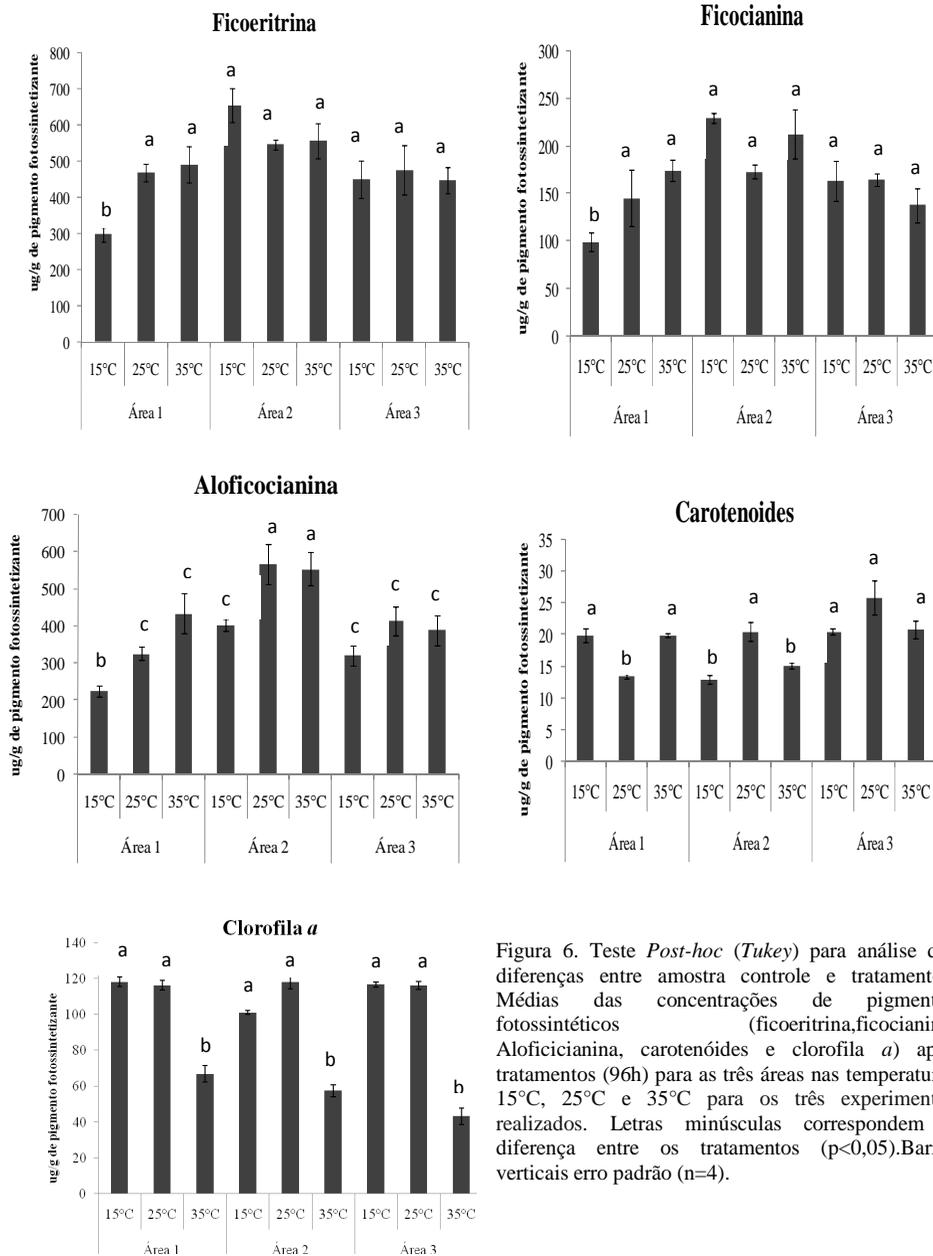


Figura 6. Teste *Post-hoc* (Tukey) para análise das diferenças entre amostra controle e tratamentos. Médias das concentrações de pigmentos fotossintéticos (ficoeritrina, ficocianina, Aloficocianina, carotenóides e clorofila *a*) após tratamentos (96h) para as três áreas nas temperaturas 15°C, 25°C e 35°C para os três experimentos realizados. Letras minúsculas correspondem a diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). Barras verticais erro padrão ($n=4$).

Em um segundo momento analisando *a posteriori* sob o foco de verificar diferenças entre os locais (locais vs. temperatura) para as ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foi observado um mesmo padrão de resultados para os três pigmentos, onde houve diferenças significativas somente entre o tratamento Área1-15°C e Área 2-15°C ($p < 0,05$).

A clorofila *a* e carotenóides foram os pigmentos que apresentaram mais diferenças. Entre os tratamentos para clorofila *a* foram detectadas diferenças significativas, destacando os tratamentos nas temperaturas de 15°C e 35°C que obteve diferença significativa para área 1 em relação as área 2 e 3 (impactadas) (Figura 6).

Entre tratamentos para carotenóides foram observados diferenças entre áreas nas temperaturas de 15°C e 25°C (Figura 6).

5.5 PCA

Análises da análise de ordenação mostraram que o primeiro componente (Eixo I) contribui com 65,03% da variação do conjunto de dados correlacionados com os fatores nutrientes (nitrato, fosfato e N-amoniaco) que agrupou as amostras da área 3, mostrando uma clara separação das áreas 1 e 2, e portanto, refletindo na separação entre locais impactados e menos impactados (Figura 6). Já o segundo componente 19% (Eixo II) representou e esta correlacionado com fatores de parâmetros fotossintéticos (F_v/F_m , F_{max} , Taxas de fotoprodução, taxas de respiração) alocando as amostras da área 1 e 2 para o eixo II. O fator temperatura obteve correlação negativa em relação ao eixo II. Ambos os eixos apresentaram 84,9% da contribuição dos autovalores, sendo então adotados como eixos explicativos (Tabela 6). As variáveis α e β não obtiveram correlações significativas para os eixos explicativos 1 e 2 (Tabela 7).

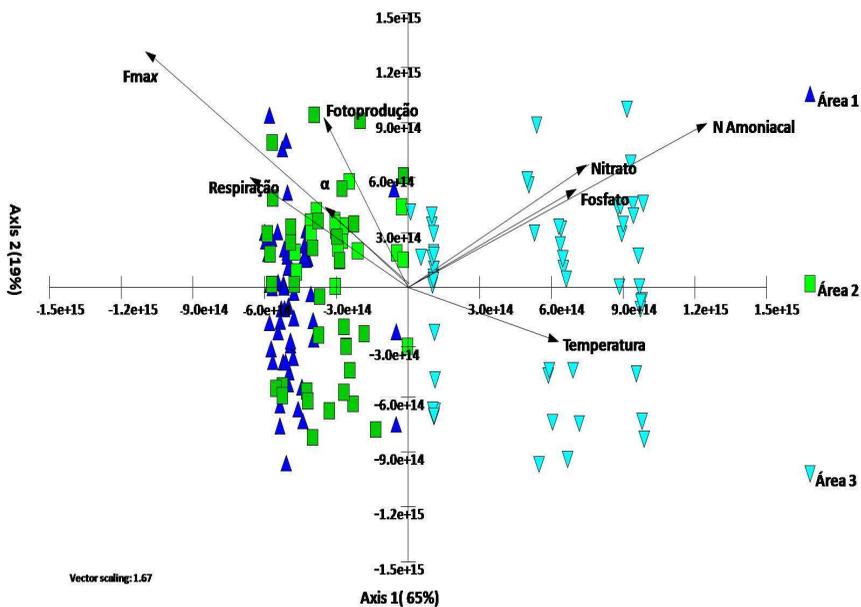


Figura 7. Análise das componentes principais dos parâmetros fotossintéticos (α , β , f_{\max} e F_v/F_m) nutrientes da água (nitrato, fosfato e N-amoniaco) e temperatura (15°C , 25°C e 35°C) para todos tratamentos. Porcentagem explicativa para eixo 1=65%; eixo 2=19%

Tabela 6. Autovalores e porcentagem da variância total dos dois primeiros eixos extraídos do PCA usando dados fotossintéticos (α, β, f_{\max} e F_v/F_m), nutrientes dissolvidos (nitrato, fosfato e N-amoniaco) e temperatura (15°C , 25°C e 35°C) para todos os tratamentos.

	Eixo 1	Eixo 2
Autovalores(%)	0,628	0,195
Porcentagem (%)	65,036	19,902
Porcentagem acumulada (%)	65,036	84,937

Tabela 7. Pesos das variáveis selecionadas extraídos dos dois componentes principais. Valores com módulos menores que 0, 1 foram omitidos

Variáveis	Eixo 1	Eixo 2
Temperatura	-	-0,118
Nitrato	0,460	-
Fosfato	0,434	-
N-Amoniaco	0,770	-
F_v/F_m	-	0,114
alfa (α)	-	-
beta (β)	-	-
F_{\max}	-	0,709
Respiração	-	0,363
Fotoprodução	-	0,526

5.7 Observações em microscopia de luz e citoquímica

A região cortical de *H. musciformis* é formada por duas ou três camadas de células pequenas, que são envolvidas por uma espessa parede celular (Figura 8J). Na camada mais externa, as células corticais são alongadas, enquanto que as células da segunda e terceira camadas são mais esféricas. Todas as células corticais são envolvidas por uma espessa mucilagem. As células subcorticais são mais vacuolizadas, quando comparado com as células corticais (Figura 8J) e esta vacuolização aumenta em direção a região medular. As amostras controle de *H. musciformis* quando coradas com Azul de Toluidina (AT-O) mostraram uma reação metacromática na parede celular, indicando a presença de polissacarídeos ácidos, tais como a carragenana do tipo *kappa* (Figura 8J). Esta reação é mais intensa na mucilagem que reveste as células corticais. A parede celular das células subcorticais e medulares apresentaram espessamento lenticulado (Figura 8J).

Nas plantas tratadas foram observadas mudanças na morfologia celular e redução do volume das células (Figura 8A-I). Uma das principais alterações foi o aumento na espessura da parede celular das células corticais e subcorticais destas plantas (Figura 8A-I).

As plantas em águas provenientes das três áreas, cultivadas com temperaturas diferentes, reagiram de forma distinta para cada sinergismo. As plantas cultivadas com água proveniente das áreas 1 e 2, com temperatura de 15 °C mostraram baixa resistência a entrada de endófitas (Figura 8A e B). Por outro lado, as cultivadas com água da área 3 em 15 °C apresentaram alterações na organização das células da camada cortical, onde pequenas ilha de células foram observadas (Figura 8C). Também foi possível verificar a acumulação de endófitas entre as células das plantas cultivadas com água proveniente das áreas 2 e 3, com temperatura de 25 e 35°C (Figura 8F e G, H e I). Quando corados com AT-O, as plantas tratadas apresentaram uma reação semelhante na parede celular, que a observada nas plantas controle (Figura 8A-I). Observa-se que apesar de em todos tratamentos apresentarem aumento da espessura da parede, nos tratamentos para as três áreas na temperatura de 35°C é observado um aumento mais expressivo na região cortical quando comparados para temperaturas de 15 e 25 °C. (Figura 8E-I)

Figura 8. Seções transversais do talo de *H. musciformis*, de plantas controle e após 96 horas de exposição aos tratamentos. Seções coradas com azul de toluidina (AT-O). A: Detalhe das células do controle coradas com AT-O. As paredes celulares (PC), células corticais (CC) e células subcorticais (CS) com reação metacromática. Note o aumento da espessura da parede celular e a reação metacromática nas células corticais e subcorticais dos tratamentos. Presença de algas endofíticas nas células corticais e na mucilagem (flechas). C: Observe rupturas na parede celular e aumento nas células corticais. D; Células subcorticais em divisão celular. Escala = 10µm.

As amostras coradas com ácido periódico de Schiff (PAS), nas células corticais e subcorticais das plantas controle de *H. musciformis*, apresentaram reação positiva no citoplasma, com polissacarídeos neutros, principalmente com muitos grãos de amido das florídeas (Figura 9J). As paredes celulares também reagiram positivamente, indicando a presença de celulose (Figura 9). Pela reação de PAS foi possível detectar a diminuição da densidade dos grãos de amido nas células corticais e subcorticais e um aumento na espessura das plantas nos diferentes tratamentos (Figura 9A-B, C, D, E, F, G e I). Entretanto, as plantas cultivadas com água proveniente das áreas 1 e 2 com temperatura de 25°C e 35°C respectivamente, também apresentaram reação positiva no citoplasma, para grãos de amido das florídeas (Figura 9D e H). As células das endofíticas também apresentaram reação PAS-positiva especialmente na parede celular (Figura 9A-I).

Figura 9. Seções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A: As paredes celulares (PC) da planta controle, células corticais (CC) e células subcorticais (CS) com reação positiva ao PAS. Células corticais e subcorticais ricas em grãos de amido das florídeas (A). Presença de algas endofíticas nas células corticais e na mucilagem (flechas). Aumento da parede celular e ruptura da parede celular em todos tratamentos exceto controle. A;B;C;E;F;G;I: redução na quantidade de amido das florídeas nas células corticais e subcorticais. H: Aumento na quantidade de células corticais (CC). Escala = 10 μ m.

5.8 Análise em Microscopia Confocal

Pela quantificação da intensidade da fluorescência foi possível verificar diferenças entre os tratamentos estudados (Figura 10). Para a amostra controle foi observada intensa autofluorescência nas células corticais (Figura 11 J). O tratamento para área 1 na temperatura de 15°C apresentou a maior intensidade de autofluorescência (203,70 pixels/ μm^2) em relação aos tratamentos (Figura 11), seguido do tratamento para área 3 na temperatura de 25°C (187,63 pixels/ μm^2) (Figura 11F). Os tratamentos das áreas 1,2 e 3 na temperatura de 35°C (Figura 11G;H;I) obtiveram os valores mais baixos de autofluorescência com 116,70 pixels/ μm^2 , 79,40 pixels/ μm^2 , 70,50 pixels/ μm^2 , respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram valores semelhantes comparados entre si (Figura 11), com exceção dos tratamentos da área 3 (Figura 11C;F;I; Figura 10) onde a fluorescência foi maior para o tratamento da área 3-25°C, as maiores intensidades da fluorescência do cloroplasto deram-se da menor temperatura para as maiores (Figura 10). Os tratamentos diferiram tanto para local (ANOVA, $F=30,427, p<0,01$) para temperatura (ANOVA, $F=33,972, p<0,01$) e para interação local vs. temperatura (ANOVA, $F=67,015, p<0,01$). Diferenças significativas entre tratamento são apresentadas na figura 9, segundo teste *a posteriori*.

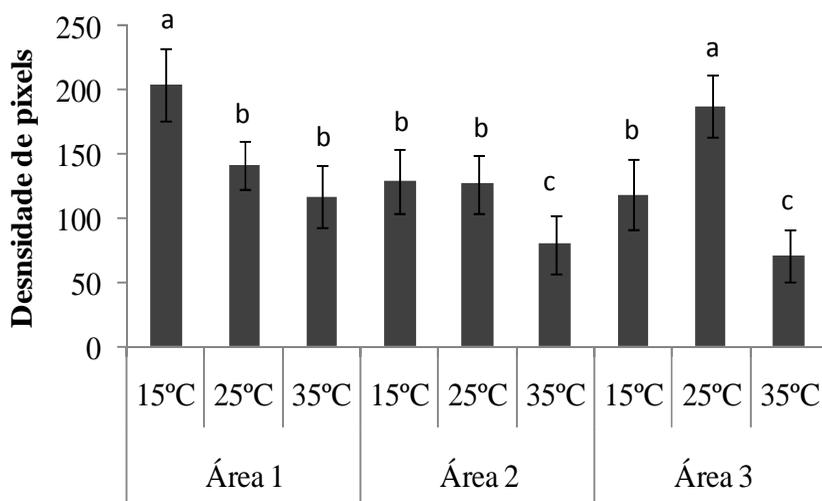


Figura 10. Densidade média de pixels por μm^2 dos tratamentos em *H. musciformis* através da análise das imagens pelo programa ImageJ. Letras minúsculas correspondem diferenças entre tratamentos ($p > 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão ($n=50$).

Figura 11. Seções transversais de microscopia confocal do talo de *H. musciformis* após 96 horas de exposição aos tratamentos. A: Células corticais (CC) da planta controle. Autofluorescência das algas endofíticas (flechas). A;F: Maiores valores de intensidade da autofluorescência dos cloroplastos H;I: Redução na intensidade da autofluorescência dos cloroplastos nas células Corticais (CC) e subcorticais (CS). Escala: 30µm

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise químico-físico de água

O estado da qualidade ecológica das massa da água, que é uma expressão geral da estrutura e função de sua comunidade biológica deve levar em conta fatores naturais, fisiográficos, geográficos e climáticos, juntamente com as condições físicas e químicas resultantes ou não de atividades humanas (Panayotis *et al.* 2004). De fato, através das análises física e química das três áreas de estudo foi possível atribuir diferenças importantes entre os locais. Para as três áreas amostrais os locais mais impactados foram os localizados nas regiões centrais da baía Norte e Sul da Ilha de Florianópolis. Estes ambientes estão sujeitos a uma série de fenômenos, como o aumento da turbidez da água, diminuição na salinidade e processos de eutrofização como observado nas análises dos parâmetros químico-físico avaliados. Em ambientes costeiros a eutrofização pode ser caracterizada pelas altas concentrações de nutrientes inorgânicos dissolvidos. Pelo fato destas substâncias como fósforo, nitrato e nitrogênio amoniacal serem nutrientes para processos biológicos, o excesso destes em esgotos sanitários e efluentes industriais conduzem a processos de eutrofização das águas naturais (de Jonge *et al.* 2002). Quando comparados dados dos valores dos nutrientes inorgânicos entre as três áreas torna-se evidente o elevado grau de poluição nas áreas 2 e 3 (Ponte Hercílio Luz e Saco dos Limões, respectivamente) correspondentes as regiões centrais. Embora, para área 3 os valores de nutrientes foram mais elevados comparado com área 2. Ambas as áreas amostradas estão localizadas em centros urbanos diferenciadas pela desigualdade social. A desigualdade social é um elemento cada vez mais presente no cotidiano das grandes cidades. Este fenômeno tem se caracterizado como marca dos grandes centros urbanos, que são capazes de congregam, em uma mesma localidade, diferentes grupos sociais com interesses econômicos, políticos e sociais antagonicos.

A forma mais reduzida do nitrogênio inorgânico dissolvido, o nitrogênio amoniacal, apresentou valores significativamente importantes

na caracterização da água nas estações centrais, explicando inclusive a forte relação num gradiente espacial de urbanização nas baías. As características fisiográficas da Baía Sul e Norte dão conta de ambientes de baixa hidrodinâmica, impróprio para diluição e dispersão de efluentes lançados. Estudos realizados anteriormente em regiões costeiras de Santa Catarina revelam o enriquecimento de nutrientes nos ambientes mais urbanizados quando comparados a áreas com menor grau de antropização. Bouzon (2005) estudou a flora da ilha de Santa Catarina em ambientes preservados e urbanizados e destacou a importância das regiões centrais com registros de elevada concentração de nutrientes inorgânicos como nitrogênio amoniacal. São destacadas pela autora as regiões localizadas nas áreas centrais que apresentaram elevadas concentrações deste nutriente, sendo que na estação amostral de Saco dos Limões, quando comparada a uma estação distante do centro urbanizado apresentou cerca de vinte e cinco vezes mais nitrogênio amoniacal na água. No presente trabalho a área 3 apresentou cerca de 70 vezes mais o nutriente em comparação com a área 1 (Ponta das Canas). Nos pontos mais impactados amostrados pela autora, que inclui a área 3 do presente estudo, algas do porte de *H.musciformis* não foram detectadas, além de apresentarem baixa biomassa algácea, sendo a comunidade composta por algas oportunistas. Trabalhos mais recentes como de Martins *et al.* (2012) também apontam para as elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal em ambientes urbanizados significativamente superiores em relação aos ambientes mais preservados, com a proliferação de algas oportunistas nos locais mais impactados. Pagliosa *et al.* (2004) obtiveram para estuários das áreas urbanizadas dentro das Baías Norte e Sul da Ilha valores de até 161,3 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de nitrogênio amoniacal. O nitrogênio amoniacal é característico de áreas enriquecidas porque ele pode ser decorrente de processos de mineralização da matéria orgânica tanto aeróbica como anaerobicamente (Odebrecht e Caruso 1987).

Inseridos nas análises ecológicas, aspectos ficogeográficos (Índices de Feldman (1937) e Cheney (1977)) são utilizados para estudo da flora nos padrões e províncias geográficas definidos por Horta *et al.* (2001). Áreas impactadas em geral demonstram estar fora dos padrões

ficogeográficos, devido à vulnerabilidade de alguns grupos que requerem elevada qualidade ambiental. Conhecidas como algas do tipo perene esses grupos são considerados bons organismos indicadores de ambientes não perturbados. O declínio de algas perenes em ambientes poluídos tem sido extensivamente discutido por diversos autores (Teixeira *et al.* 1987; Berchez e Oliveira 1992; Taouil e Yoneshigue-Valentin 2002; Terlizzi *et al.* 2002) sendo estas substituídas por algas do tipo anual ou oportunistas ao longo do tempo. A descarga de esgoto modifica significativamente o padrão de distribuição espacial de alguns táxons, influenciando também na dinâmica temporal da comunidade e na estrutura do conjunto (Underwood e Chapman 1996).

A litoralização impôs um fardo sobre os habitats costeiros e comunidades vulneráveis a uma variedade de estressores, naturais e antrópicos (Marques *et al.* 2004). Em países em desenvolvimento que enfrentam o crescimento econômico são mais propensos a sofrer graves impactos, com mudanças drásticas. Estressores múltiplos incluindo poluentes, nutrientes, turbidez e habitats alterados podem impactar recursos por meio de processos individuais, cumulativos e sinérgicos (Adams 2005). Dentre os fatores ambientais que regem a distribuição das macrófitas, a temperatura usada no presente estudo como segundo fator de avaliação, é sugerida como um dos mais relevantes à escala mundial geográfica (Luning 1990). E de fato, foi a mais atuante nas alterações fisiológicas e morfológicas de *H.musciformis* no presente estudo.

6.2 Parâmetros Fisiológicos

Os parâmetros fotossintéticos α , β e F_{\max} apresentaram alterações significativas em relação ao fator temperatura. Segundo Bautista e Necchi (2007), várias algas possuem sensibilidade fotossintética a temperaturas extremas da água agindo este como um fator estressante e limitante para estes organismos. Em todas as temperaturas testadas (15°C, 25°C e 35°C) foi evidenciada a fotoinibição durante as curvas de luz, no entanto, para temperaturas extremas a fotoinibição foi mais

acentuada quando comparada aos tratamentos de temperatura de 25°C . Dawes *et al.* (1976) ao testar os efeitos da temperatura de inverno e verão sobre a fotossíntese de *H.musciformis*, observou que todas as plantas apresentaram fotossíntese na faixa de 36°C-40°C. D'Ambrosio *et al.* (2006) ao avaliar a fotossíntese e a dissipação de energia de excitação para a assimilação de carbono em diferentes temperaturas (faixa de 5°C-35 °C) em plantas de *Beta vulgaris* (beterraba) obteve resultados semelhantes ao presente estudo com redução nas taxas fotossintética em temperaturas extremas. Somente F_v/F_m ,apresentou diferenças significativas entre os locais. A fluorescência variável (diferença entre a fluorescência mínima e máxima) é uma medida aproximada da quantidade de energia luminosa que é absorvida pelo fotossistema II (FSII) e que seria utilizada no processo fotoquímico (Schreiber 1997, Lazár 1999, Lichtenthaler *et al.* 2005). A F_v/F_m indica a eficiência em que a energia luminosa, captada pelo complexo antena e pelas moléculas de clorofila *a* do centro de reação P680, é encaminhada em direção ao restante do desenvolvimento do processo fotoquímico que é diretamente relacionado com a taxa de consumo dos produtos do transporte fotossintético de elétrons (ATP e NADPH) (Baker e Rosenqvst 2004). Um estresse ambiental que afeta a eficiência no FSII tende a levar a uma diminuição característica da taxa de transporte de elétrons. Essa queda nos valores de F_v/F_m segundo Maxwell e Johnson(2000) pode ser considerada como um diagnóstico da fotoinibição induzindo um desequilíbrio entre a absorção de energia e sua utilização. Temperaturas extremas tendem a afetar negativamente o crescimento das plantas em vários aspectos, a fotossíntese é considerada como um dos processos mais sensíveis ao calor (Bury e Bjorkman 1980; Schoeder *et al.* 2004). O fotossistema II é sensível aos danos causados por altas temperaturas. Estresse por calor (e.g. entre 35°C e 40 °C) tem sido relacionado com o aumento do fluxo de elétrons do fotossistema I cíclico e a conduta de prótons do tilacóide, reduzindo a taxa fotossintética (Pastenes e Horton 1996, Zhang e Sharkey 2009).

Diante de todos esses aspectos mencionados em relação à eficiência fotossintética, pode se afirmar que a alta temperatura atuou alterando a fisiologia de *H.musciformis* provavelmente inibindo a

atividade da evolução do oxigênio no fotossistema II em resposta a exposição aguda (curto período), sendo mais atuante estatisticamente quando comparada aos efeitos dos locais sobre os tratamentos. Para Scherner (2010) impactos em ambientes urbanos causam efeitos negativos em espécies estruturadoras de comunidades em longo prazo. Esses efeitos são causados pela acumulação crônica de poluentes que são descarregados freqüentemente em ambientes urbanos, mas com intensidades variáveis ao longo do tempo, do que por exposições isoladas, agudas, de curto período.

Os processos fotossintéticos estão diretamente relacionados com a produtividade primária e, com o aumento ou diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido no meio aquático. As menores concentrações de oxigênio dissolvido foram mensuradas nos tratamentos de maior temperatura seguindo o mesmo padrão de resposta entre os locais. Isto pode estar relacionado com uma regulação discreta dos níveis de oxigênio dissolvido através da temperatura. Em geral o aumento da temperatura e o excesso de matéria orgânica promovem a aceleração do processo de depleção do oxigênio dissolvido podendo causar mortandade maciça da biota (Boynton *et al.* 1982; Abreu *et al.* 1995). Ressalta-se que em um corpo d'água saudável, há o equilíbrio entre produção de oxigênio pela fotossíntese e seu consumo pela respiração. Observa-se ainda que a depleção do oxigênio nos tratamentos para a temperatura mais elevada corroborou com a redução nos valores dos parâmetros fotossintéticos, os quais também sofreram decaimentos visíveis.

O PCA evidenciou os efeitos dos nutrientes sobre os tratamentos. O enriquecimento por nutrientes, principalmente o nitrogênio amoniacal pode ser responsável pelo deslocamento das amostras da área 3 para o eixo 1, confirmando o seu efeitos sobre o desempenho fisiológico de *H.musciformis*, agrupando todas amostras correspondentes da área 3. Esse deslocamento também implicou sobre os parâmetros fotossintéticos, estando estes relacionados inversamente a área mais impactada. A relação entre as amostras das áreas 1 e 2 pode ser explicada pela semelhança em termos dos valores de F_{max} , α , β ,

fotoprodução e respiração em ambos tratamentos que desempenharam na análise um papel marginal sendo representativos para o eixo II.

Nesse sentido, também é relacionado à eficiência fotossintética as concentrações de pigmentos fotossintéticos que permitida à captura de luz ao fotossistema II. As algas possuem a capacidade de desenvolver mecanismos diferenciados para captura de luz solar e de regular seu conteúdo pigmentar em resposta a quantidade e a qualidade da luz, a variação de nutrientes e temperatura, exigindo da alga mecanismos fisiológicos que assegurem sua sobrevivência (López-Figueroa e Niell 1990). A clorofila *a* está presente em todas as macroalgas, sendo um dos principais pigmentos na resposta fotossintética as quais permite adaptação a uma ampla faixa de variação ambiental (Koch e Lawrence 1987). No entanto para os tratamentos na temperatura de 35°C observaram-se reduções nos conteúdos pigmentares fotossintéticos, destacando-se a diminuição nos valores da clorofila *a*, podendo esse mecanismo ser considerado como uma prevenção para redução de absorção de luz e energia (Ishida *et al.* 2000).

Além da clorofila *a*, o caroteno também possui papel importante na eficiência fotossintética, no crescimento e aclimação das macroalgas aos diversos ambiente, atua duplamente, na captação de luz e como um fotoprotetor do aparato fotossintético (Gómez-Pinchetti *et al.* 1992). O estímulo a síntese de carotenóides na maioria dos tratamentos pode ter ocorrido em decorrência do estresse sofrido nos tratamentos pela ação sinérgica de fatores como forma de proteção, atuando na fotoproteção dos cloroplastos, na extinção de espécies de oxigênio reativo e na absorção e dispersão do excesso de energia segundo Sze (1997). Schimdt *et al.*(2011) relata que em rodofíceas carragenófitas, como *H. musciformis*, os mecanismos de proteção são do tipo pigmentar contra danos causados por estressores ambientais, estimulando sua síntese em condições adversas. Frente a sua presença ou ausência ou até mesmo sua concentração relativa em organismos fotossintetizantes o perfil dos carotenóides pode fornecer informações da fotoaclimação e respostas de fotoproteção (Schubert *et al.* 2006).

Além da clorofila *a* e carotenóides as algas vermelhas possuem pigmentos acessórios que são proteínas formadas por uma cadeia aberta

de um grupo tetrapirrol prostético covalentemente ligado a uma proteína (Gantt 1980). Eles formam agregados supramoleculares, ficobiliproteínas, ligados ao lado do estroma da membrana do tilacóide. As ficobiliproteínas são eficientes na transferência de energia para o centro de reação do fotossistema II. A energia é transferida via ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina para o fotossistema II através dos cromóforos diretamente posicionados ao longo do canal de transferência de energia (Schirmer *et al.* 1987). Esses pigmentos protéicos possuem relação na síntese ou na diminuição do seu conteúdo pigmentar pela disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fosfato no ambiente. Geralmente, a adição de nitrogênio tende a aumentar a atividade fotossintética e o crescimento de algas. O nitrogênio (N) é um elemento indispensável incorporadas a muitas macromoléculas orgânicas (proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos). A síntese de clorofila *a* (Chl *a*) e ficoeritrina (FE) também exige N (Lobban e Harrison 1994).

Por se tratar de experimentos onde a incubação das algas foram realizadas com águas naturais de ambientes super enriquecidos com elevada concentração de nutrientes avaliados pelas análises químicas principalmente nas áreas 2 e 3, foi constatada a possível influência da concentração elevada destes sobre a síntese das ficobiliproteínas quando comparadas ao controle nas temperaturas de 15°C e 25°C. Essas temperaturas podem ter influenciada a síntese pigmentar agindo como um potencializador para a incorporação dos nutrientes. No entanto a temperatura de 35°C causou uma redução nas ficobiliproteínas. Kim *et al.* (2007) avaliaram o efeito da temperatura e de nutrientes em diversas espécies de *Porphyra* e observaram que o efeito da temperatura influenciou significativamente as taxas de crescimento de todos os espécies. A taxa de crescimento de *Porphyra leucosticta* foi superior a 10°C e 15°C do que a 20°C ($p = 0,01$). *Porphyra linearis* e *P. umbilicalis* obteve maior taxa de crescimento na temperatura de 10 °C. No entanto, *P. amplissima* apresentou valores crescimento taxa a 20°C do que nas temperaturas mais baixas. A disponibilidade de nutrientes também influenciou significativamente a taxa de crescimento. As taxas de crescimento de *P. linearis* e *P. umbilicalis* foram significativamente

mais elevadas em amônia a $250\mu\text{mL}^{-1}$ do que $25\mu\text{mL}^{-1}$ de concentração de amônio ($p \leq 0,022$). O pigmento ficoeritrina (FE) em *P. linearis* e *P. umbilicalis* apresentaram teores significativamente mais elevados em temperatura de 10°C e 15°C . O conteúdo de FE e *P. linearis* *P. umbilicalis* foi, em média, 90% superior a $250\mu\text{mL}^{-1}$ do que a $25\mu\text{mL}^{-1}$ de concentração de amônia em todas as temperaturas.

Outro fator que pode ser atribuído a indução pigmentar pode estar relacionado aos valores mais elevados de turbidez registrados para área 2 e 3 durante o período de estudo, o qual pode ter contribuído para redução da luminosidade pelas algas nos erlenmeyers, induzindo a alga a sintetizar outros pigmentos mais específicos para baixa incidência de luz, como as ficobiliproteínas em detrimento da clorofila *a* (López-Figueroa e Niell 1990). De fato, a interação sinérgica entre elevados graus de urbanização (alta concentração de nutrientes) em conjunto com temperaturas extremas promoveram modificações na concentração pigmentar de *H. musciformis*.

6.3 Citoquímica e Taxa de Crescimento

Com relação à morfologia da alga observou-se que após a exposição aos tratamentos (96h de exposição) *H. musciformis* apresentou um leve aumento nas taxas de crescimento nos tratamentos nas temperaturas de 15°C e 25°C , obtendo o valor máximo de $1.6\% \text{ dia}^{-1}$ no tratamento da área 3 na temperatura de 15°C . Entretanto, nos tratamentos da área 3 com a temperatura de 35°C , apresentaram uma redução nas taxas de crescimento $-5.5\% \text{ dia}^{-1}$. Conforme Yokoya *et al.* (2007) descrevem que a linhagem marrom de *H. musciformis* (mesma linhagem do presente estudo) é mais sensível à alta temperatura (30°C), apresentando uma diminuição significativa nas taxas de crescimento. Sendo que as maiores taxas de crescimento ocorreram nas temperaturas de 20°C e 25°C , confirmando o que foi verificado no presente estudo, corroborando com a hipótese de que os fatores ambientais são os que mais contribuem para o aumento da biomassa desta espécie (Reis e Yoneshigue-Valentin 1998).

Os maiores valores taxas de crescimento de *H. musciformis* foram observados no local mais rico em nutrientes (área 3). Schaffelke e Klumpp (1998) observaram respostas positivas a pulsos de nutrientes de curtos períodos no crescimento de *Sargassum baccularia* (Mertens) C. Agardh. Os maiores aumentos no crescimento foram observados em uma faixa de concentrações de 8/1 a 20/2 μM de amônia/fosfato, ou seja, maiores e menores concentrações de nutrientes levaram a menores taxas de crescimento indicando que existem quantidades ideais de nutrientes para o crescimento. Isso está de acordo com o presente resultado de curto período, o que reflete os efeitos positivos nas algas de águas enriquecidas por um curto período de tempo a temperaturas amenas. No entanto, Martins e Yokoya (2010) avaliando o efeito do amônio sobre as taxas de crescimento em dois morfos pigmentares marrons de *H. musciformis* no período de 28 dias de incubação em laboratório observaram que os resultados foram inversamente proporcionais às concentrações de amônio, e aquelas maiores do que 15 μM foram letais, mostrando que em longo prazo o efeito do amônio pode torna se tóxico.

Cada organismo apresenta uma sensibilidade e tolerância da interação de fatores ambientais. A temperatura extrema de 35 °C em conjunto com águas ricas em nutrientes como elevadas concentrações do íon amônio como o do presente estudo pode ter causado uma inibição da atividade fotossintética. Apesar da perda de biomassa, o tratamento para área 2 a 35 °C (local de médio impacto) apresentou menores valores de com redução de -0,99% ao fim do experimento. Dentro deste contexto, é possível inferir, como alguns estudos demonstraram o aumento da sensibilidade de macrofitas aquáticas a vários fatores ambientais em águas eutrofizadas (Ralph 1999). Além disso, determinados níveis de poluentes podem causam alterações bioquímicas nos organismos, aumentando a síntese da energia para demanda de reparos nos constituintes celulares, aumentando seu metabolismo. Assim, conseqüentemente, há um decréscimo de energia disponível para a macroalga crescer e manter seu ciclo reprodutivo, como conseqüência reduzindo sua forma fenotípica (Lobban e Harrison 1994).

Durante todo processo de análises das imagens em microscopia de luz, uma das características marcantes o aumento da espessura da parede celular, verificado através de métodos citoquímicos para polissacarídeos ácidos e neutros. É provável que o estresse provocado em *H. musciformis* através do sinergismo entre diferentes temperaturas e águas eutrofizadas provocou modificações no metabolismo celular. Essas modificações podem ser explicadas como possível mecanismo de proteção celular em *H. musciformis*, aumentando a espessura da parede celular protegendo contra o aumento dos nutrientes e variação de salinidade (área 3- 28 a 34 ups).

Com a citoquímica para polissacarídeos neutros, o ácido periódico de Schiff foi verificado uma diminuição na quantidade grão de amido das florídeas Schmidt *et al.* (2011) observaram o mesmo resultado na carragenófito *Chondracanthus teedei* expostas à RUVB descrevendo que a diminuição dos grãos de amido das florídeas pode estar relacionada a uma mudança na via de biossíntese de enzimas do ciclo de Calvin, possivelmente através da ativação da via de catabólica. Os processos de degradação podem ser utilizados para ativar a biossíntese de compostos de defesa. A inibição da síntese dos grãos de amido das florídeas por meio da molécula UDP-glucose, pode também estar relacionada com um desvio da rota metabólica para produção de componentes da parede celular, tais como a celulose e a carragenana, que também usam a UDP-glucose como precursor para a biossíntese destes polissacarídeos.

Associações entre algas são comum na natureza, nesse contexto, numerosas espécies de algas filamentosas verdes, marrons e vermelhas tem sido relatadas vivendo entre as paredes celulares de hospedeiras. Devido ao peculiar habitat, essas algas invasoras são conhecidas como endofíticas. Estudos experimentais recentes têm estabelecido que o número de algas endofíticas possa induzir lesões tumorais ou a degradação em rodofíceas hospedeiras (Correa 1994). Com a alteração da camada de mucilagem que reveste o talo das plantas tratadas, aumentou o número e a profundidade em que as endófitas foram observadas. Assim, podemos sugerir que esta região possui um papel

importante na proteção do talo, além disto, esta região é facilmente alterada em condições ambientais adversas.

O microscópio confocal permite a análise dos cloroplastos pela autofluorescência. No presente trabalho foram estipulados os comprimentos de onda da faixa do espectro de luz entre 639 a 701nm. É provável que as amostras tenham emitido a fluorescência do conjunto de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a* e ficobiliproteínas que compreendem uma grande faixa do espectro. Sabe-se que os comprimentos de onda para clorofila *a* giram em torno de 665 nm a 465 nm. E ficobiliproteínas compostas pela ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina entre os espectros de 450nm e 660nm, regiões espectrais complementares às das clorofilas (Lee 1999; Talarico e Maranzana 2000) o que pode explicar a elevada autofluorescência nas amostras para área 1-15 °C e área 3-25 °C. Visto que a síntese de ficobiliproteínas foram estimuladas em todos os tratamentos nas temperaturas de 15 °C e 25 °C e uma redução na temperatura de 35 °, os resultados de análise de autofluorescência corroboram com valores dos pigmentos obtidos. Salienta-se, ainda, que nas temperaturas de 35°C as amostras sofreram degradação, e quando comparadas aos valores das médias entre as três áreas para esta temperatura a redução da fluorescência ocorre em ordem decrescente para as áreas mais impactadas.

6 CONCLUSÃO

O efeito das temperaturas extremas sobre o aparato fotossintético de *H. musciformis* foi o principal fator estressante provocando danos aos fotossistemas. A temperatura de 35°C apresentou um claro efeito sobre α , β , F_v/F_m , produção primária e pigmentos, quando comparado a temperaturas de 15°C e 25°C, consequência dos baixos valores de rETR.

O efeito sinérgico entre temperatura x local nos experimentos foi significativo somente para F_v/F_m e pigmentos. Como verificado nas análises de água, a área 3 possuía valores de nutrientes discrepantes quando comparados as áreas 1 e 2. Os elevados valores de nutrientes atuaram significativamente sobre os pigmentos ficobiliproteínas. Estas que possuem uma relação direta com a disponibilidade de compostos nitrogenados e fosfato do meio, os quais podem tornar-se limitantes para o desenvolvimento de macroalgas vermelhas.

Para medições de produção primária observou que nos tratamentos das áreas 2 e 3 as taxas de respiração (consumo de O_2) superaram os valores de produção de O_2 para maioria dos tratamentos, evidenciando os efeitos causados pela matéria orgânica das águas nesses locais pelo despejo de esgoto. Amostras na temperatura de 35°C tiveram a depleção abrupta de oxigênio.

Através das análises das técnicas de Microscopia foram observadas alterações celulares como espessamento de parede, ruptura na parede celular e mucilagem, diminuição de grãos de amido e o aumento do número e a profundidade das endófitas na mucilagem. Alterações na intensidade da autofluorescência dos cloroplastos nos diferentes tratamentos foram visualizadas, com reduções para temperaturas de 35 °C para as três áreas. Nas análises qualitativas para as taxas de crescimento ficou evidente o estresse sofrido por *H.musciformis*, principalmente nas temperaturas de 35 °C onde um processo de despigmentação ocorreu em conjunto com a perda de biomassa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Confrontado com a ameaça das alterações climáticas e com as crescentes pressões sobre os recursos naturais mundiais, a falta de saneamento tirou mais vidas ao longo do último século do que qualquer outro fenômeno, e em muitos países em desenvolvimento assim continua a acontecer causado principalmente pela ausência de liderança política. As políticas públicas de saneamento são tão relevantes para o estado de uma nação como a gestão econômica, a defesa ou o comércio e, no entanto, o saneamento é uma prioridade de segunda ou terceira ordem (PNDU 2006).

Esses distúrbios em ambientes costeiros causam perda da biodiversidade, no entanto pouco ou nenhum progresso em relação à preservação do habitat aquático é esperado, a menos que o planejamento e uso sustentável sejam tomados como uma prioridade pelos decisores políticos. Novas estratégias para promover a gestão ambiental integrada devem ser desenvolvidas. Caso contrário, é provável que os habitats continuem sendo cada vez mais modificados e os recursos mais escassos, como provável consequência os conflitos sócio-econômicos e perdas de ecossistemas serão agravados.

8 REFERÊNCIAS

Adams S.M. 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. **Marine Pollution Bulletin**, 51:649-657.

Abreu P.C., Hartmann C., Odebrecht C. 1995. Nutrient-rich saltwater and its influence on the phytoplankton of the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 40: 219-229.

ABRELPE -Associação Brasileira de Empresa de limpeza Pública e Resíduos Especiais. 2010. **Produção de lixo cresce seis vezes mais que população.**

http://www.abrelpe.org.br/noticias_clipping.cfm

Baker N.R., Rosenqvist C. E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 55:1607-1621.

Bautista A.I.N., Necchi O. Jr. 2007. Photoacclimation in three species of freshwater red algae. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 19: 23-34.

Berchez F.A.S. 1990. **Ensaio de maricultura da alga *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) no litoral do Estado de São Paulo.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Berchez F.A.S., Oliveira E.C. 1992. **Temporal changes in the benthic marine flora of Baía de Santos, SP, Brazil, over the last four decades.** In: Cordeiro-Marino M., Azevedo M.T.P., Sant'Anna C.L., Yamaguishi-Tomita N., Plastino E.M. (eds) *Algae and Environment*: 120-131.

Berry J.A., Bjorkman O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 31:491-543.

Borowitzka M.A.1972.Intertidal algal species diversity and the effect of pollution. **Australian Journal of Marine Freshwater Research**, 23: 73-84.

Boynton W.R., Kemp W.M., Keefe C.W.1982. **A comparative analysis of nutrients and other factors influencing estuarine phytoplankton production**. In: KENNEDY, VS (ed.). Estuarine Comparisons. Academic Press, New York, 69-90 p.

Bouzon J.L.2005.Composição e estrutura espacial da comunidade macrofitobêntica de fundos consolidados das Baías da Ilha de Santa Catarina – subsídios para a avaliação do impacto da urbanização. 69p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina .

Bravin I.C., Yoneshigue-Valentin Y. 2002. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento *in vitro* de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica** 25:469-474.

Buckeridg M.S. 2007 Mudanças climáticas, biodiversidade e sociedade:como a teoia de redes pode ajudar a compreender o presente e planejar o futuro? Multiciência UNICAMP (on line), 8:88-107.

Castro A.M.G., Sicoli A.H., Sousa I.S.F., Yeganiantz L., Alvares L.M.A.R., Ribeiro R. M.A.2006.**Migração rural-urbana,agricultura familiar e novas tecnologias: coletânea de artigos revistos** / Editor técnico, Eliseu Alves. - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 181 p.

CEPIS - Centro Panamericano de Ingenieria Sanitaria y Ciencias del Ambiente.1997. "Repindex 53: Uso de Aguas Residuales". OPAS - Organizacion Panamericana de la Salud (OMS -Organización Mundial de la Salud). Homepage - www.cepis.org.pe

Chapman V.J. 1971. The marine algae of Fiji. **Revue Algologique**, 10:164-171.

Cheney, D.P. 1997. R&C/P-A new and improved ratio for comparing seaweed foras. **Journal of Phycology**: 13 (Suppl.),12.

CONAMA–Conselho Nacional do meio ambiente. Resolução número 274 de 29 de Novembro. Ministério do meio Ambiente.

Correa A.J.1994. Infections by pigmented algal endophytes: misuse of concepts and terminology. **Revista Chilena de Historia Natural**, 67:4-8.

Crooks S., Turner R.K.1999. Intergrated coastal management: sustaining estuarine natural resources. 241-289 p. In: Estuaries, edited by Nedwell D. B., Raffaelli D. G., Advances in ecological research vol. 29, Academic Press.

Crutzen P.I., Stoermer E.F. 2000. **The anthropocene**. IGBP Newsletter 41:12.

D'Ambrosio N., Arena C., De Santo A.V.2006. Temperature response of photosynthesis, excitation energy dissipation and alternative electron sinks to carbon assimilation in *Beta vulgaris* L. **Environmental and Experimental Botany**, 55:248–257.

Davison I.R., Pearson G.A.1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. **Journal of Phycology**, 32:197–211.

Dawes C.J., Chen C.P., Jewett-Smith J., Marsh A., Watts S.A. Effect of phosphate and ammonium levels on photosynthetic and respiratory responses of red alga *Gracilaria verrucosa*. **Marine Biology**, 78:325-328.

De Jonge V.N., Elliott M., Orive E. 2002. Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: eutrophication. **Hydrobiologia**, 475/476:1-19.

Faccini A.L., Berchez F. 2000. Management of natural beds and standing stock evaluation of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta) in south-eastern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, 12:101-103.

FATMA. 2010. Fundação do Meio Ambiente. Governo do Estado de Santa Catarina. Relatório de Balneabilidade do litoral de catarinense.

Feldman J. 1937. Recherches sur La vegetation marine de la Méditerranée: La cote des Albères. **Revue Algologique**, 10:1-339.

Figuerola F.L., Salles S., Aguilera J. Jimenez C., Mercado J., Vin B., Flores-Moya A., Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in red alga. **Marine Ecology Progress Series**, 151: 81-9.

Fjordingstad E. 1971. Microbiological criteria of environmental qualities. **Annual Review Microbiology**, 25:563:582.

Fritsch F.E. 1965. **The structure and reproduction of the algae**. Cambridge University Press, Cambridge.

Gahan P.B. 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: academia Press.

Gantt E., Lipschultz C.A., Zilinskas, B. 1976. Phycobilisomes in relation to the thylakoid membranes. **Brookhaven Symposium Biology**, 28: 347-357.

Gómez-Pinchetti J.L.; Ramazanov, Z.; Fontes, Z., García-Reina G., 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to β -Carotene content. **Journal of Applied**

Phycology, 4:11-15.

Gordon E.M., McCandless E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey MJ, McLachlan J (eds) *Chondrus crispus*. T. N. Scot.

Gorostiaga J.M., Díez I. 1996. Changes in the sublittoral benthic marine macroalgae in the polluted área of Abra de Bilbao and proximal coast (northern Spain). **Marine Ecology Progress Series**, 130:157-167.

Google Earth 4.3. Acesso em :27 de Janeiro de 2012

Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. 1983. **Methods of Seawater Analysis**, 2nd Edition, Verlag Chemie Standard Test Methods for Nitrite-Nitrate in Water.

Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo k., Lea D.W., Medina-Elizade M. 2006. Global temperature change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103: 14288-14293.

Harley C.D.G., Hughes A.R., Hultgren K.M., Miner B.G., Sorte C.J.B., Thornber C.S., Rodriguez L.F., Tomanek L., Williams S. 2006. The impact of climate change in coastal marine systems. **Ecology Letters**. 9:228-241.

Hiscox J.D., Israelstam G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, 57: 1332–1334.

Horta P.A., Amancio E., Coimbra C.S., Oliveira E.C. 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da fora de macroalgas brasileiras. **Hoehnea**, 28:243-265.

IBGE. 2010. Instituto brasileiro de Geografia Estatística-. **Primeiros resultados resultados definitivos do censo de 2010: população do Brasil é de 190.755.799 pessoas**. <http://www.censo2010.ibge.gov.br>

IPCC 2007. Documento técnico V de IPCC: **Mudanças Climáticas e Biodiversidade**. Bates, B.C., Z.W. Kundzewicz, S. Wu and J.P. Palutikof, Eds. IPCC Secretariat, Geneva. <<http://www.ipcc.ch>> Acesso em: 09/06/2010.

Ishida A., Toma T., Marjenah M. 2000. Leaf gas exchange and canopy structure under wet and drought years in *Macaranga conifera*, a tropical pioneer tree. **Ecological Studies**, 140: 129–142.

Jeffrey S.W., Humphrey G.F. 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2. **Biochemistry Physiology Pflanz**, 167: 194-204.

Jones P.D.M., New D.E. Martin S., Rigor I.G. 1999. Surface air temperature and its changes over the past 150 years. **Review of Geophysics**, 37:173-199.

Kim J.K., Kraemer G.P., Neefus C.D., Chung I.K., Yarish C. 2007. 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 Applied Phycology**, 19:431–440.

Koch E.W., Lawrence J. 1987. Photosynthetic and respiratory responses to salinity changes in red alga *Gracilaria verrucosa*. **Botanica Marina**, 30: 327-32

Kovach W.L. 2005. **MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows**, ver. 3.2. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.

Lazár D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, 1412:1-28.

Lee R.E. 1999. **Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, 3rd Edition. 614 p.

Lewin R.A. 1962. **Physiology and biochemistry of algae**. Academic Press, New York & London.

Lichtenthaler H. K., Buschmann C., Knapp M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM-fluorometer. **Photosynthetica**, 43: 379-393.

Lobban C.S., Wynne M.J. 1981. **The Biology of Seaweed**. Los Angeles: University of California Press, 786p.

Lobban C.S., Harrison P.J. 1994. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge University Press, New York, 336p.

López-Figueroa F., Niell F. X. 1990. Effects of light quality on chlorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. **Marine Biology**, 104: 321-327.

Lowe R.L., Pan Y. 1996. **Benthic Algal Communities as Biological Monitors**. In: Stevenson, R. J.; Bothwell, M.L.; Lowe, R. L. [eds.]. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. New York: Academic Press, 31-56 p.

Luning K. 1990. **Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology**. John Wiley, New York. 527 p.

Marengo J. A. 2008. **Água e mudanças climáticas**. Estudos avançados [online]. 22: 83-96. ISSN 0103-4014. São Paulo.

Marques M.,Costa M.F.C.,Mayorga M.I.O., Pinheiro P.R.C.2004. Water Environmental: Antropogenic Pressures and Ecosystem Changes in the Atlantic Drainage basins of Brazil. **Ambio**, 33:68-77.

Martins C.D.L.,Arantes N.,Faveri C.,Batista M.B.,Oliveira E.C.,Pagliosa R.R.,Fonseca A.L., Nunes J.M.C., Chow F.,Pereira S.B.,Horta P.A. 2012.The impact of coastal urbanization on the structure of phytobenthic communities in southern Brazil.**Marine Pollution Bulletin** , doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.031.

Martins A.P., Yokoya N.S.2010. Intraspecific variation in the colour morphs of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. **Hoehnea** (São Paulo), 37: 599-613.

Masuda M., Yamagishi. Y., Chiang M., Lewmanomont K. B.1997.**Overview of *Hypnea* (Rhodophyta, Hypneaceae)**. In: I. A. Abbott (ed.), Taxonomy of Economic Seaweeds. California Sea Grant College System, La Jolla, 6:127-133.

Maxwell K., Johnson G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, 51:659-668.

McCULLY M. E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York academy of Science**, 175:702-711.

Moraes E.C., Cardozo F.S., Krieger G.P., Pereira G., Prado B.R. 2009. **Estudo da evolução urbana da região conurbada da grande Florianópolis/SC (1985 a 2009)**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE.

Mshigeni K.E., Lorri W.S.M. 1977. Spore germination and early stages of development in *Hypnea musciformis*(Rhodophyta, Gigartinales). **Marine Biology**, 42:161-164

Nunes J.M.C. 2005. **Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil.** São Paulo, Tese (Doutorado) 410f. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Odebrecht C., Caruso Jr. C. G. 1987. Hidrografia e matéria particulada em suspensão na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, **Brasil. Atlântica**, 9 : 83-104.

Oliveira C.L.B. 1995. **Estudos hidrobiológicos no estuário do Rio Serinhaém** – Bahia. 86f. Dissertação (Mestrado em Produção Aquática) Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Oliveira Filho E.C.1977.**Algas marinhas bentônicas do Brasil.**Tese (Doutorado).407f. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Orfanidis S., Panayotidis P. ,Stamatis, N.2001. Ecological evaluation of transitional and coastal Waters: A marine benthic macrophytes-based model. **Mediterranean Marine Science**, 2:45-65.

Pagliosa, P. R. 2004. **Varição especial nas características das águas dos sedimentos e da macrofauna bentônicas em áreas urbanizadas e em Unidades de Conservação na Baía de Santa Catarina.** 100 p.Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

Panayotidis P., Montesanto B.,Orfanidis S.2004. Use of low-budget monitoring of macroalgae to implement the European Water Framework Directive. **Journal of Applied Phycology**, 16: 49–59.

Pastenes C., Horton P. 1996. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. . Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, 112: 1245–1251.

Penniman C. A., Mathieson A. C., Penniman C. E. 1986. Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales,

Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. **Botanica Marina**, 29: 147–154.

Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, 38: 687-701.

PMF- Prefeitura Municipal de Florianópolis. 2010. **Plano Municipal Integrado de Saneamento Básico do município de Florianópolis/SC**. Secretaria Municipal de Habilitação e Saneamento.

PNDU-Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. 2006. **Relatório do Desenvolvimento Humano 2006**. New York USA.

Ralph P.J. 1999. Light-induced photoinhibitory stress responses of laboratory-cultured *Halophila ovalis*. **Botanica Marina**, 42:11-22.

Ralph P.J. 1999. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. to combined environmental stress. **Aquatic Botany**, 65: 83-96.

Ramarao R. K. 1970. Studies on growth cycle and phycocolloid content in *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. **Botanica Marina**, 13: 163-165.

Reis R.P., Yoneshigue-Valentin Y. 1998. Variação espaço temporal de populações de *H. musciformis* (Rhodophyta– Gigartinales) na Baía de Sepetiba e Armação de Búzios, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, 12: 465-483.

Reis R.P., Caldeira A.Q., Miranda A.P.S, Barros-Barreto M.A. 2006. Potencial para maricultura da carragenófito *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales - Rhodophyta) na Ilha da Marambaia, Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, 20: 763-769.

Reviere B. de. 2006. *Biologia e Filogenia das Algas*. 1ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre.

Russell B., Thompson J-A.I., Falkenberg L.J., Connell, S.D. 2009. Synergistic effects of climate change and local stressors: CO₂ and nutrient-driven change in subtidal rocky habitats. **Global Change Biology**,15: 2153-2162.

Santos M.G.M., Lagrota M.H.C., Miranda M.F.S., Yoneshigue-Valentin Y., Wigg M.D. 1999. A screening for antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant Herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, 42:227-230.

Schrader S.M., Wise R.R., Wacholtz W.F., Ort D.R., Sharkey T.E. 2004. Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima Cotton. **Plant Cell and Environment**, 27: 725–735.

Scherner, F. 2010. Impacto da urbanização sobre a performance fotossintética de macroalgas marinhas. 37f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Schirmer T., Bode W., Huber R. 1987. Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution: A common principle of phycobilin-protein interaction. **Journal of Molecular Biology**, 196:677-695.

Schreiber U., Muller J. F., Haugl A., Gaderman R. 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. **Photosynthesis Research**,74:317–330.

Schaffelke B., Klumppl D.W. 1998. Short-term nutrient pulses enhance

growth and ratio RFD of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica** ,43: 379-393.

Schenkman R. P. F. 1986. *Hypnea musciformis* (Rhodophyta): ecological influence on growth. **Journal of Phycology** 25: 192-196.

Schenini, P. C. 2000. Agenda 21 Florianópolis. **Capítulo I - Desenvolvimento Sustentável Regionalizado**. In: Fórum Agenda 21 Florianópolis. (Org.). Fórum Agenda 21 Local do Município de Florianópolis - Agenda 21 Local do Município de Florianópolis: meio ambiente quem faz é a gente. 1 ed. Florianópolis: Prefeitura Municipal de Florianópolis,1: 35-113p.

Schmidt E.C., Scariot L.A., Rover T., Bouzon Z.L. 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, 40:860–869.

Schmidt E. C., Pereira B., Mansur-Lessa C., Santos R., Scherner F., Horta P. A., Martins R. P., Latini A., Maraschin M., Bouzon Z. L. 2011. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma** DOI: 10.1007/s00709-011-0286-1.

Schubert A., Zanin F.F., Pereira D.F., Athayde M.L. 2006. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (Erva-Mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, 29: 1233-1236.

Scot J.L., Bosco C., Schornstein K., Thomas J. 1980. Ultrastructure of cell division and reproductive differentiation of male plants in the

Florideophyceae (Rhodophyta) cell division in *Polysiphosia*. **Journal of Phycology**, 16:507-24.

Shimizu A., Morishima K., Masahiro K., Kunimoto M., Nakayama I. 2008. Identification of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) meiosis by DNA quantification using confocal laser scanning microscopy. **Journal of Applied Phycology**, 20:83–88.

Talarico L., Maranzana G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 56:1-11.

Taylor W.R. 1960. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas**. University of Michigan Press, Michigan.

Taouil, A., Yoneshigue-Valentin, Y. 2002. Alterações na composição florística das algas da Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ). **Revista Brasileira de Botânica**, 4: 405-412 .

Teixeira V.L., Pereira R.C., Júnior A.N.M., Leitão Filho C.M. Silva C.A.R. 1987. Seasonal variations in infralitoral seaweed communities under a pollution gradient in Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (Brazil). **Ciência e Cultura**, 39:423-228.

Terlizzi A., Fraschetti S., Guidetti P., Boero F. 2002. The effects of sewage discharge on shallow hard substrate sessile assemblages. **Marine Pollution Bulletin**, 44: 544-550.

Underwater Fluorometer Diving-Pam. 1998. Submersible photosynthesis. Yield Analyzer. Handbook of operation. Heinz Walz GmbH.

Underwood A.J. 1997. **Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variances**. Cambridge University Press, Cambridge.

Vilches A., Gil Pérez D. 2008. La construcción de un futuro sostenible en un planeta en riesgo. **Alambique**, 55: 9-1.

Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P. A., Schindler D.W., Schlesinger W.H., Tilman D. G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecology Applied**, 7:737–750.

Yokoya N.S.,Oliveira E.C. 1992a. Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. **Ciencias Marinas**, 18:49-64.

Yokoya N.S.,Oliveira E.C.1992b. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. **Journal of Applied Phycology**, 4:339-345.

Yokoya N.S., Necchi O. Jr., Martins A.P., Gonzalez S.F., Plastino E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, 19:197–205.

Zhang Y.H., Liu M.F., Ling T.J., Wei X.Y. 2004. Allelopathic sesquiterpene lactones from *Wedelia trilobata*. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, 12:533–537.

Wallner M., Lobo S., Boccanera N., Silva E.M. 1992. Biomass, carrageenan yield and reproductive state of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) under natural and experimental cultivated condition. **Aquaculture and Fisheries Management**, 23:443-451.

Wellburn A. R. 1994. The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as total carotenoids using solvents with spectrophometers of different resolution. **Journal of physiology**, 144: 307-313.

White A.J., Critchley C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus.

Photosynthesis Research, 59: 63-72

Winkler L.W. 1988. Die Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffes. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 21: 2843–2855.