

Mariana Atanes Jussiani

**Uso de efluente como bioestimulante para o incremento da produtividade
da macroalga *Ulva flexuosa***

São Vicente - SP
2026

Mariana Atanes Jussiani

**Uso de efluente como bioestimulante para o incremento da produtividade
da macroalga *Ulva flexuosa***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Biologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto

**São Vicente - SP
2026**

J96u Jussiani, Mariana
Uso de efluente como bioestimulante para o incremento da produtividade da macroalga *Ulva flexuosa* / Mariana Jussiani. -- São Vicente, 2026
47 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Milton Costa Lima Neto

1. Macroalgas. 2. Fisiologia Vegetal. I. Título.

Dedico este trabalho às experiências, aprendizados
e pessoas que fizeram parte desta trajetória,
tornando esta conquista resultado de uma
caminhada marcada por crescimento e dedicação.

Agradecimentos

Depois de tantos anos de desafios, aprendizados e momentos marcantes, encerro um ciclo muito importante da minha vida com gratidão e orgulho por tudo o que vivi e conquistei ao longo dessa trajetória.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me dado força e sabedoria para seguir em frente mesmo diante das dificuldades.

À minha família, especialmente aos meus pais e às minhas irmãs, agradeço por todo amor, apoio, incentivo e compreensão durante todos esses anos. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos e colegas, obrigada pelos momentos compartilhados, pelas conversas, risadas e pelo companheirismo que tornaram essa caminhada mais leve e especial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto, agradeço pela orientação, dedicação, paciência e pelos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Metabolismo de Plantas e ao PIBIC, agradeço pelo acolhimento, aprendizado e pela oportunidade de crescimento acadêmico e científico.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho. Esta conquista representa o encerramento de uma etapa e o início de novos desafios e sonhos.

*"O mar não é apenas água, é a própria
assinatura de Deus escrita em movimento, onde
cada pequena vida nos ensina a imensidão da
criação." — Adaptado de Victor Hugo*

*"O importante é não parar de questionar. A
curiosidade tem a sua própria razão de existir."
— Albert Einstein*

Resumo

A eutrofização de lagoas costeiras urbanas representa um dos principais desafios ambientais, decorrente do lançamento inadequado de efluentes domésticos ricos em nitrogênio e fósforo. O trabalho investigou o potencial dos efluentes da Lagoa da Saudade (Santos, SP) como bioestimulantes para o crescimento da macroalga *Ulva flexuosa*. O experimento foi conduzido em laboratório durante 30 dias, utilizando cinco concentrações de efluente (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), em quadruplicata. Foram analisados a Taxa de Crescimento Relativo (TCR), parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm, Y(II), ETR e NPQ) e indicadores de equilíbrio osmótico e turgor celular, como o Conteúdo Relativo de Água (CRA). Os resultados demonstraram resposta positiva e dose-dependente da TCR ao enriquecimento nutricional, variando de 0,25% dia⁻¹ no controle a 4,85% dia⁻¹ no tratamento com 100% de efluente, sem comprometimento fisiológico detectável nos parâmetros fotossintéticos ou hídricos. O Fv/Fm permaneceu estável em todos os tratamentos, indicando ausência de fotoinibição ou danos ao Fotossistema II. Os achados evidenciam o potencial de *Ulva flexuosa* para aplicações em sistemas integrados de biorremediação e produção de biomassa de valor agregado, enquanto os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e proteínas solúveis totais aumentaram progressivamente com a concentração de efluente. Estes achados contribuem para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 2, 12 e 14.

Palavras-chave: macroalga; biorremediação; eutrofização; *Ulva flexuosa*; bioestimulante; fluorescência da clorofila *a*; biomassa.

Abstract

Eutrophication of urban coastal lagoons is one of the major environmental challenges resulting from the inadequate discharge of domestic effluents rich in nitrogen and phosphorus. This study investigated the potential of effluents from Lagoa da Saudade (Santos, São Paulo, Brazil) as biostimulants for the growth of the macroalga *Ulva flexuosa*. The experiment was conducted under laboratory conditions over a 30-day period using five effluent concentrations (0%, 25%, 50%, 75%, and 100%), with four replicates per treatment. The Relative Growth Rate (RGR), chlorophyll *a* fluorescence parameters (Fv/Fm, Y(II), ETR, and NPQ), and indicators of osmotic balance and cellular turgor, such as Relative Water Content (RWC), were evaluated. The results demonstrated a positive, dose-dependent response of RGR to nutrient enrichment, ranging from 0.25% day⁻¹ in the control treatment to 4.85% day⁻¹ in the 100% effluent treatment, without detectable physiological impairment in photosynthetic or water-status parameters. Fv/Fm remained stable across all treatments, indicating the absence of photoinhibition or damage to Photosystem II. The findings highlight the potential of *Ulva flexuosa* for applications in integrated bioremediation systems and the production of value-added biomass. In addition, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoid, and total soluble protein contents increased progressively with increasing effluent concentration. These findings contribute to the achievement of the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs) 2, 12, and 14.

Keywords: macroalga; bioremediation; eutrophication; *Ulva flexuosa*; biostimulant; chlorophyll *a* fluorescence; biomass.

Lista de Figuras

Figura 1: Curvas de crescimento de biomassa (g) de <i>Ulva flexuosa</i> ao longo de 30 dias de cultivo em condições controladas, sob diferentes concentrações de efluente (0%, 25%, 50%, 75% e 100%)	20
Figura 2: Parâmetros de fluorescência da clorofila a de <i>Ulva flexuosa</i> sob diferentes concentrações de efluente (0%, 25%, 50%, 75% e 100%)	23
Figura 3: Curvas de indução fotossintética de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), ao longo de 20 minutos de exposição contínua à luz actínica	24
Figura 4: Curvas rápidas de luz (RLC) de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), em resposta a gradientes crescentes de irradiância (13 a 750 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	25
Figura 5: Concentração de pigmentos fotossintéticos de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%)	29
Figura 6: Proteínas solúveis totais de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%).	31

Lista de Tabelas

Tabela 1: Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente	19
Tabela 2: Conteúdo Relativo de Água (CRA) de <i>Ulva flexuosa</i> cultivada sob diferentes concentrações de efluente	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMT: Ammonium Transporters (Transportadores de Amônio)

ANOVA: Análise de Variância

BSA: Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)

CAGR: Taxa de Crescimento Anual Composta (Compound Annual Growth Rate)

CRA: Conteúdo Relativo de Água

ETR: Taxa de Transporte de Elétrons (Electron Transport Rate)

FSW: Água do Mar Filtrada (Filtered Sea Water)

GS/GOGAT: Glutamina Sintetase/Glutamato Sintase

IMTA: Aquicultura Multitrófica Integrada (Integrated Multi-Trophic Aquaculture)

NPQ: Quenching Não Fotoquímico (Non-Photochemical Quenching)

ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

PAR: Radiação Fotossinteticamente Ativa (Photosynthetically Active Radiation)

PEAD : Polietileno de Alta Densidade

PHT: Transportadores de Fosfato (Phosphate Transporters)

PSII: Fotossistema II (Photosystem II)

RLC: Curva Rápida de Luz (Rapid Light Curve)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)

TCR: Taxa de Crescimento Relativo

Y(II): Rendimento Quântico Efetivo do PSII

Sumário

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	9
1 Revisão Bibliográfica	1
1.1 Macroalgas: Biologia, Diversidade e Relevância Biotecnológica	1
1.1.1 Características Gerais e Classificação	1
1.1.2 Potencial Econômico e Industrial	2
1.2 O Gênero <i>Ulva</i> e a Espécie <i>Ulva flexuosa</i>	3
1.2.1 Taxonomia e Morfologia	3
1.2.2 Distribuição Geográfica e Ecologia	4
1.2.3 Crescimento, Produtividade e Fisiologia	5
1.3 Macroalgas como Biofiltros e Biorremediação de Efluentes	7
1.3.1 Reaproveitamento de Efluentes como Estratégia Sustentável	7
1.3.2 Eficiência de Biorremediação em Sistemas Integrados	9
1.3.3 Mecanismos de Assimilação de Nitrogênio	10
1.3.4 Mecanismos de Assimilação de Fósforo	11
2 Hipótese	12
3 Objetivos	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4 Material e Métodos	13
4.1 Material Biológico	13
4.2 Coleta e Armazenamento do Efluente	14
4.3 Desenho Experimental e Condições de Cultivo	15
4.4 Crescimento e Produtividade da Biomassa	16
4.5 Análise de Fluorescência da Clorofila a	17
4.6 Conteúdo Relativo de Água (CRA)	17
4.7 Análises Bioquímicas	18
4.8 Análise Estatística	18
5 Resultados e Discussão	19
5.1 Crescimento e Produtividade da Biomassa	19
5.2 Análise de Fluorescência da Clorofila a	21
5.3 Conteúdo Relativo de Água	25
5.4 Concentração de Pigmentos Fotossintéticos	27
5.5 Proteínas Solúveis Totais	29
6 Considerações Finais	30

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Macroalgas: Biologia, Diversidade e Relevância Biotecnológica

1.1.1 Características Gerais e Classificação

As macroalgas são organismos fotossintéticos macroscópicos pertencentes a diferentes linhagens evolutivas independentes: *Chlorophyta* (algas verdes) e *Rhodophyta* (algas vermelhas), tradicionalmente associadas ao reino *Plantae/Archaeplastida*, e *Phaeophyceae* (algas pardas), atualmente classificadas na divisão Ochrophyta (reino *Chromista/Stramenopila*), grupo taxonomicamente distinto das plantas (GRAHAM; WILCOX, 2000). Ao contrário das plantas vasculares, as macroalgas não possuem tecidos condutores verdadeiros, raízes ou órgãos reprodutivos diferenciados, realizando a absorção de nutrientes, água e gases dissolvidos diretamente da coluna d'água por toda a superfície do talo (GRAHAM; WILCOX, 2000). Essa estratégia de absorção superficial é fundamental para compreender tanto sua eficiência metabólica quanto sua capacidade de resposta rápida às variações ambientais, tornando-as organismos modelos para estudos de fisiologia em ambientes dinâmicos (HURD et al., 2014).

Estima-se a existência de aproximadamente 10.000 espécies de macroalgas com distribuição global, desde zonas tropicais até regiões subpolares, habitando principalmente ambientes costeiros marinhos e estuarinos na zona fótica (GUIRY; GUIRY, 2024). A diversidade morfológica é expressa por talos filamentosos, foliáceos, crostosos ou ramificados, mas todas as formas compartilham a dependência da luz solar como fonte primária de energia e dos nutrientes inorgânicos dissolvidos como matéria-prima para a síntese de biomassa (GRAHAM; WILCOX, 2000). Do ponto de vista ecológico, as macroalgas atuam como produtoras primárias de grande relevância em ecossistemas costeiros, fornecendo abrigo, substrato e alimento para uma vasta gama

de organismos marinhos, e participando ativamente nos ciclos biogeoquímicos do carbono, do nitrogênio e do fósforo (HURD et al., 2014).

No litoral brasileiro, a diversidade ficológica é considerável, com destaque para gêneros comogêneros como *Ulva* Linnaeus, *Gracilaria* Greville, *Sargassum* C.Agardh, *Hypnea* J.V.Lamouroux e *Caulerpa* J.V.Lamouroux, amplamente representados na zona entremarés e no infralitoral raso de todas as regiões costeiras (PAULA; PEREIRA, 2015). Esse patrimônio biológico representa um recurso estratégico com imenso potencial ainda pouco explorado para aplicações biotecnológicas nacionais, especialmente em um contexto de crescente demanda global por insumos de origem marinha, sustentáveis e renováveis (BOLTON et al., 2016).

1.1.2 Potencial Econômico e Industrial

O interesse científico e industrial nas macroalgas cresceu exponencialmente nas últimas décadas, impulsionado pela demanda global por ingredientes naturais, funcionais e de baixo impacto ambiental (HURD et al., 2014). As principais aplicações comerciais da biomassa de macroalgas incluem a produção de coloides industriais como ágar, carragena e alginatos, amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos; suplementos alimentares ricos em minerais, vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados ômega-3; biofertilizantes e bioestimulantes de crescimento vegetal; ingredientes para ração animal; e matéria-prima para produção de biocombustíveis de segunda e terceira geração (BOLTON et al., 2016).

O mercado global de macroalgas foi avaliado em aproximadamente USD 16,7 bilhões em 2022, com taxa de crescimento anual composta (CAGR) projetada acima de 10% até 2030, impulsionada principalmente pelo aumento da demanda por alimentos funcionais, cosméticos naturais e bioplásticos (GRAND VIEW RESEARCH, 2023). A produção mundial é dominada por países asiáticos, como China, Indonésia, Filipinas e Coreia do Sul, que respondem por mais de 90% do volume global; contudo, há crescente interesse no desenvolvimento de ficocultura sustentável

em países do Atlântico (HURD et al., 2014). O Brasil, com aproximadamente 8.500 km de linha costeira, clima favorável ao longo do ano e rica biodiversidade ficológica, representa uma fronteira estratégica para o cultivo de macroalgas em escala industrial (PAULA; PEREIRA, 2015). Além das aplicações diretas, sistemas integrados de aquicultura multitrófica (IMTA), nos quais macroalgas absorvem os nutrientes excretados por peixes e camarões cultivados simultaneamente, têm emergido como modelos produtivos mais sustentáveis e economicamente eficientes, gerando uma segunda corrente de receita a partir da biomassa algal (TROELL et al., 2009).

1.2 O Gênero *Ulva* e a Espécie *Ulva flexuosa*

1.2.1 Taxonomia e Morfologia

O gênero *Ulva* L. (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*, *Ulvales*) é um dos mais amplamente distribuídos e estudados entre as macroalgas marinhas (GUIRY; GUIRY, 2024). Popularmente denominadas "alface-do-mar", as espécies desse gênero caracterizam-se pelo talo foliáceo biestratificado, composto por exatamente duas camadas de células clorenquimáticas dispostas simetricamente, de coloração verde, com margens geralmente onduladas, lisas, denticuladas ou laceradas, e fixação ao substrato por meio de rizoides discoides ou hapteras basais (JOLY, 1965; GUIRY; GUIRY, 2024). A revisão taxonômica molecular do grupo consolidou *Ulva* como gênero único, incorporando as espécies antes descritas sob *Enteromorpha*, simplificação fundamentada em análises filogenéticas de marcadores plastidiais e nucleares (HAYDEN et al., 2003).

A espécie *Ulva flexuosa* Wulfen (sin. *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen) J.Agardh) distingue-se das demais espécies congêneres pelo talo laminado com bordas marcadamente onduladas e textura relativamente delicada, podendo apresentar aspecto tubular em partes jovens do talo (JOLY, 1965). A identificação morfológica é realizada com base em características como espessura do talo (40–100 µm), diâmetro celular, número e posição dos pirenoides no cloroplasto e arquitetura geral da lâmina, seguindo as chaves taxonômicas de Joly (1965) e os registros

atualizados de Guiry e Guiry (2024). O cloroplasto é único por célula, em forma de copa ou placa estrelada, e contém um ou poucos pirenídeos centrais associados ao amido de cloroplasto (JOLY, 1965; GUIRY; GUIRY, 2024).

A composição bioquímica do talo inclui celulose e ulvana, um polissacarídeo sulfatado exclusivo do gênero, como principais componentes da parede celular, além de clorofilas *a* e *b*, β -caroteno, luteína e zeaxantina como pigmentos fotossintéticos, e aminoácidos livres como reguladores osmóticos (ROBIC et al., 2009). A ulvana tem despertado crescente interesse farmacêutico e biomédico por suas propriedades imunomoduladoras, anticoagulantes e antioxidantes documentadas *in vitro* e *in vivo*, ampliando consideravelmente o portfólio de aplicações da biomassa de *Ulva* além dos usos tradicionais na aquicultura e agricultura (PENGZHAN et al., 2003).

1.2.2 Distribuição Geográfica e Ecologia

A macroalga *Ulva flexuosa* apresenta ampla distribuição cosmopolita, sendo registrada em litorais tropicais, subtropicais e temperados de todos os oceanos (GUIRY; GUIRY, 2024). No Brasil, a espécie ocorre ao longo de toda a costa, com populações abundantes na zona entremarés de costões rochosos, planícies de maré arenosas e lamas estuarinas, frequentemente associada a ambientes com elevada carga de nutrientes antropogênicos (PAULA; PEREIRA, 2015). Sua capacidade de colonizar rapidamente substratos perturbados e ambientes hipereutrofizados a torna uma das macroalgas mais comuns em zonas costeiras impactadas por atividades humanas, fenômeno denominado floração (ou maré verde) de *Ulva* (CECCHERELLI; CINELLI, 1997). Paradoxalmente, essa mesma competência de assimilação acelerada de nutrientes torna a espécie especialmente atraente para aplicações de biorremediação controlada em sistemas de cultivo (NEDERLOF et al., 2022).

A ecologia de *Ulva flexuosa* é caracterizada por ampla tolerância a variações ambientais, abrangendo salinidade de 5 a 45 ppt, temperatura de 5 a 35 °C, pH entre 6,5 e 9,5 e irradiância de 10 a 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (MATA et al., 2010). Essa plasticidade fisiológica é sustentada por mecanismos eficientes de ajuste osmótico, regulação enzimática e aclimação fotossintética, que permitem à espécie prosperar em condições extremamente variáveis (ANDRADE et al., 2006). A elevada capacidade de assimilação de nutrientes inorgânicos dissolvidos, associada a essa tolerância ambiental, torna *U. flexuosa* particularmente apta para cultivo em sistemas integrados de tratamento de efluentes, nos quais temperatura, salinidade e concentração de nutrientes podem oscilar consideravelmente ao longo do tempo (MATA et al., 2010; NEDERLOF et al., 2022).

1.2.3 Crescimento, Produtividade e Fisiologia

As taxas de crescimento relativo de *Ulva* spp. em condições controladas de laboratório variam amplamente em função da disponibilidade de nutrientes, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e densidade de cultivo (MATA et al., 2010). Schol (2022) documentou taxas superiores a 25% ao dia em *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada cultivada em sistemas integrados com aquicultura, enquanto estudos com *Ulva lactuca* e *Ulva rigida* relatam valores entre 5% e 20% ao dia (MATA et al., 2010). Entretanto, esses valores não refletem apenas condições ideais, mas também a capacidade do organismo em modular seu metabolismo frente a variações ambientais, especialmente em sistemas com efluentes, onde há flutuação na disponibilidade de nutrientes e presença de compostos potencialmente estressantes (NEDERLOF et al., 2022).

A produtividade da biomassa está diretamente relacionada não apenas à densidade inicial e à renovação do meio, mas também à eficiência de assimilação de nutrientes e à capacidade fisiológica da alga de lidar com excessos ou limitações nutricionais (HURD et al., 2014). Em ambientes enriquecidos, como efluentes aquícolas, *Ulva* spp. frequentemente apresenta crescimento

acelerado devido à alta disponibilidade de nitrogênio, especialmente na forma de amônio, que é energeticamente mais favorável à assimilação (PEDERSEN; BORUM, 1996; NALDI; WHEELER, 2002). No entanto, concentrações excessivas podem levar a desequilíbrios metabólicos, incluindo acúmulo de compostos nitrogenados, aumento da respiração e possível estresse oxidativo (RANDALL; TSUI, 2002; RAVEN et al., 2005).

Do ponto de vista fisiológico, a resposta de *Ulva* às condições de cultivo está ligada à sua eficiência fotossintética e à capacidade de dissipação de energia (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A fluorescência da clorofila *a* constitui uma das ferramentas mais empregadas para avaliar o estado fisiológico de macroalgas, sendo o parâmetro F_v/F_m amplamente utilizado como indicador da integridade do Fotossistema II (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Organismos fotossinteticamente saudáveis tendem a apresentar valores de F_v/F_m entre 0,5 e 0,8; quedas abaixo desse intervalo geralmente refletem processos de fotoinibição ou comprometimento do aparato fotossintético primário (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Em *Ulva*, esse parâmetro é especialmente sensível às condições do meio de cultivo, respondendo tanto ao excesso quanto à limitação de nutrientes essenciais.

Em condições de elevada disponibilidade de nitrogênio, como as encontradas em efluentes domésticos, pode ocorrer incremento da eficiência fotossintética associado à maior síntese de pigmentos e proteínas dos complexos de reação (FIGUEROA et al., 2022). Contudo, quando os teores de fósforo ou compostos nitrogenados excedem determinados limiares, o balanço metabólico pode ser comprometido, resultando em declínio do F_v/F_m e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Nederlof et al. (2022) observaram colapso da eficiência fotossintética em *Ulva* exposta a concentrações de fosfato superiores a $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$, evidenciando a existência de um limiar de toxicidade para esse nutriente.

O rendimento quântico efetivo $Y(II)$ e a taxa de transporte de elétrons ETR complementam a análise do estado fotossintético, refletindo a eficiência operacional do PSII sob iluminação ativa (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Ambos os parâmetros respondem positivamente ao enriquecimento nutricional moderado, dado que a assimilação de nitrogênio demanda maior fluxo de energia pela cadeia fotossintética (FIGUEROA et al., 2022). Em situações de estresse, como excesso de nutrientes, alterações bruscas de pH ou presença de compostos orgânicos dissolvidos em efluentes, pode ocorrer desacoplamento parcial do transporte de elétrons, reduzindo a eficiência global do processo (NEDERLOF et al., 2022).

O quenching não fotoquímico (NPQ) representa a fração da energia luminosa absorvida que é dissipada termicamente, funcionando como mecanismo de proteção contra a foto-oxidação do PSII (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Elevações no NPQ são frequentemente registradas em *Ulva* submetida a condições adversas, incluindo excesso de irradiância ou presença de substâncias potencialmente tóxicas no meio (SOUZA et al., 2021). A análise conjunta de F_v/F_m , $Y(II)$, ETR e NPQ permite, portanto, caracterizar tanto o desempenho fotossintético quanto os mecanismos de aclimação de *Ulva* frente a diferentes composições de efluente, sendo essa abordagem integrativa especialmente relevante para sistemas de biorremediação (MAXWELL; JOHNSON, 2000; NEDERLOF et al., 2022).

1.3 Macroalgas como Biofiltros e Biorremediação de Efluentes

1.3.1 Reaproveitamento de Efluentes como Estratégia Sustentável

O reaproveitamento de efluentes como meio de cultivo para macroalgas tem sido amplamente investigado não apenas como estratégia de economia circular, mas como uma abordagem capaz de otimizar simultaneamente a produção de biomassa e a remoção de nutrientes (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). No caso do gênero *Ulva*, diversos estudos demonstram que o crescimento e a produtividade estão diretamente relacionados à concentração e à forma dos

nutrientes disponíveis, especialmente nitrogênio (N) e fósforo (P), além da presença de compostos orgânicos dissolvidos característicos desses efluentes (NEDERLOF et al., 2022; MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014).

Em condições controladas, o crescimento de *Ulva* spp. aumenta significativamente com a disponibilidade de nitrogênio, principalmente na forma de amônio (NH_4^+), que é preferencialmente assimilado em relação ao nitrato (NO_3^-) devido ao menor custo energético (PEDERSEN; BORUM, 1996). Concentrações moderadas de nitrogênio promovem aumento na taxa de crescimento, no conteúdo proteico e na atividade fotossintética (COHEN; NEORI, 1991; NEORI et al., 2004). No entanto, concentrações excessivas podem levar a efeitos negativos, como desequilíbrio metabólico, aumento da respiração e redução da eficiência fotossintética, especialmente quando associadas a limitações de outros nutrientes (RAVEN et al., 2005).

De forma semelhante, o fósforo exerce papel fundamental na regulação do crescimento (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). Estudos com *Ulva* spp. indicam que concentrações adequadas de ortofosfato estimulam a divisão celular e a síntese de biomassa, enquanto a limitação de fósforo pode restringir o crescimento mesmo em condições de alta disponibilidade de nitrogênio (RAVEN, 1984). Por outro lado, concentrações elevadas de fosfato podem induzir efeitos tóxicos, incluindo degradação tecidual e colapso da eficiência fotossintética, como demonstrado por Nederlof et al. (2022), que observaram efeitos deletérios em concentrações superiores a $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$.

Além da concentração absoluta de nutrientes, a relação N:P do meio é um fator determinante para o metabolismo de *Ulva* (RAVEN, 1984). Desequilíbrios nessa razão podem alterar profundamente a composição bioquímica da biomassa, favorecendo o acúmulo de proteínas em ambientes ricos em nitrogênio ou de carboidratos sob limitação desse nutriente (RAVEN, 1984).

Essa plasticidade metabólica é particularmente relevante em efluentes, cuja composição varia ao longo do tempo (NEDERLOF et al., 2022).

Nesse contexto, estudos utilizando efluentes reais demonstram que o desempenho de *Ulva* frequentemente supera aquele observado em meios sintéticos com concentrações equivalentes de N e P (MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014). Macchiavello e Bulboa (2014) observaram maior crescimento de *Ulva* cultivada em efluentes aquícolas em comparação com meios artificiais, sugerindo que esses efluentes contêm compostos adicionais que atuam como bioestimulantes. Entre esses compostos, destacam-se vitaminas, aminoácidos livres, micronutrientes e matéria orgânica dissolvida, que podem atuar como cofatores metabólicos e estimular vias fisiológicas relacionadas ao crescimento e à fotossíntese (MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014; NEORI et al., 2004).

Adicionalmente, a presença de matéria orgânica dissolvida nos efluentes pode influenciar indiretamente o crescimento algal, seja por meio da alteração da disponibilidade de carbono inorgânico, seja pela interação com a microbiota associada, que pode liberar metabólitos promotores de crescimento (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). Esses fatores não estão presentes em meios sintéticos convencionais, o que ajuda a explicar o desempenho superior observado em sistemas reais (MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014). Dessa forma, o uso de efluentes como meio de cultivo para *Ulva* não deve ser interpretado apenas como substituição de insumos, mas como um sistema complexo no qual a interação entre nutrientes inorgânicos, compostos orgânicos e fatores microbiológicos determina o desempenho fisiológico da alga (NEDERLOF et al., 2022; TURCIOS; PAPENBROCK, 2014).

1.3.2 Eficiência de Biorremediação em Sistemas Integrados

A eficiência de remoção de nutrientes pelas macroalgas em sistemas de biorremediação é função direta da taxa de crescimento, da concentração inicial de nutrientes, do volume de meio por unidade de biomassa e do tempo de exposição (TURCIOS; PAPENBROCK,

2014). Schol (2022) documentou remoção de até 4,28 g de nitrogênio por metro quadrado por dia em *Ulva ohnoi* cultivada em efluentes aquícolas diluídos, valores que superam significativamente os obtidos com outras tecnologias de tratamento biológico. McGovern (2021) avaliou o crescimento de *U. ohnoi* em diferentes concentrações de efluente de biofoco de camarão (25%, 50% e 75%), demonstrando que a alga apresentou crescimento positivo em todas as diluições testadas, com variações nas taxas de crescimento e eficiência de remoção de acordo com a concentração do efluente.

A seletividade das macroalgas na assimilação de nutrientes pode ser modulada pelas condições de cultivo (RAVEN, 1984). Estudos com *Ulva* spp. demonstraram que a relação N:P do meio de cultivo influencia tanto a composição bioquímica do talo, com maior acúmulo de proteínas em ambientes ricos em N e de carboidratos em ambientes ricos em P, quanto a eficiência de remoção relativa de cada nutriente (RAVEN, 1984). Essa plasticidade metabólica é uma vantagem adicional para aplicações de biorremediação, pois permite que as algas respondam adaptativamente à composição química variável dos efluentes, operando eficientemente mesmo sem condicionamento prévio do meio (NEDERLOF et al., 2022).

1.3.3 Mecanismos de Assimilação de Nitrogênio

A assimilação de nitrogênio inorgânico pelas macroalgas ocorre predominantemente nas formas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), sendo o amônio a fonte preferencial devido ao menor custo energético de assimilação (PEDERSEN; BORUM, 1996). O transporte de NH_4^+ para o interior celular é mediado por proteínas da família AMT (Ammonium Transporters), caracterizadas por alta afinidade pelo substrato, permitindo a absorção eficiente mesmo em baixas concentrações de nitrogênio dissolvido (GLASS; BHAGWAT, 2011).

Em *Ulva* spp., essa preferência pelo amônio tem sido amplamente demonstrada experimentalmente. Pedersen e Borum (1996), trabalhando com *Ulva lactuca*, observaram que a

assimilação de NH_4^+ ocorre de forma mais rápida que a de NO_3^- , resultando em maiores taxas de crescimento quando o amônio é a principal fonte de nitrogênio. De forma semelhante, Naldi e Wheeler (2002) demonstraram que o enriquecimento com amônio promove aumento significativo na taxa de crescimento e na acumulação de nitrogênio intracelular em espécies do gênero *Ulva*, evidenciando a eficiência desse mecanismo em condições eutrofizadas.

Uma vez no interior celular, o amônio é incorporado ao metabolismo por meio da via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase), resultando na formação de aminoácidos que servirão como base para a síntese de compostos nitrogenados essenciais (GLASS; BHAGWAT, 2011). Em condições de alta disponibilidade de nitrogênio, como em efluentes, essa via é intensamente ativada, favorecendo o acúmulo de proteínas na biomassa algal (COHEN; NEORI, 1991; NEORI et al., 2004).

Cohen e Neori (1991), ao avaliarem o cultivo de *Ulva lactuca* em efluentes de piscicultura, observaram aumento significativo no teor proteico da biomassa, diretamente associado à elevada disponibilidade de amônio no meio. Resultados semelhantes foram reportados por Neori et al. (2004), que demonstraram que o cultivo de *Ulva* em sistemas IMTA resulta em biomassa com alto conteúdo proteico, evidenciando a incorporação eficiente do nitrogênio dissolvido. Entretanto, a assimilação excessiva de amônio pode levar a efeitos negativos: altas concentrações podem causar toxicidade celular, associada ao acúmulo de amônio livre e ao desequilíbrio do pH intracelular, além de aumento na demanda energética para manutenção do metabolismo (RANDALL; TSUI, 2002). Em *Ulva*, esse excesso pode resultar na redução da taxa de crescimento e em alterações na eficiência fotossintética, especialmente quando há desequilíbrio com outros nutrientes, como o fósforo (NEDERLOF et al., 2022; RAVEN et al., 2005).

1.3.4 Mecanismos de Assimilação de Fósforo

A assimilação de fósforo ocorre predominantemente na forma de ortofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) por transportadores de alta afinidade da família PHT (Phosphate Transporters) (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). O fósforo assimilado é incorporado à síntese de ATP, ácidos nucleicos, fosfolipídeos de membrana e moléculas de sinalização celular (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). Particularmente relevante para aplicações de biorremediação é o fenômeno do *luxury uptake*: a capacidade das macroalgas de armazenar fósforo na forma de polifosfato intracelular em períodos de disponibilidade abundante no meio, acumulando estoques que suprem a demanda metabólica em períodos de limitação (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014). Esse mecanismo amplifica consideravelmente a eficiência de remoção de fósforo em sistemas com pulsos de alta concentração, como os efluentes aquícolas (TURCIOS; PAPENBROCK, 2014; SCHOL, 2022).

Nederlof et al. (2022) realizaram avaliação sistemática dos efeitos de diferentes concentrações de ortofosfato sobre múltiplas espécies de *Ulva*, identificando que concentrações superiores a $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ causam degradação progressiva do tecido algal, manifesta por branqueamento, perda de integridade celular e colapso da eficiência fotossintética. Esse limiar de toxicidade por excesso de fósforo é de fundamental importância para o planejamento de sistemas de biorremediação, indicando que a diluição adequada dos efluentes é condição indispensável para preservar a viabilidade fisiológica das algas (NEDERLOF et al., 2022).

2 Hipótese

A exposição da macroalga *Ulva flexuosa* a concentrações diferentes do efluente da Lagoa da Saudade promove um efeito positivo em seu crescimento e eficiência fotossintética, evidenciando o papel bioestimulante deste efluente.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produtividade e o crescimento da macroalga *Ulva flexuosa* exposta a diferentes concentrações de efluentes provenientes da Lagoa da Saudade (Santos, SP).

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a taxa de crescimento relativo e a produtividade da biomassa de *Ulva flexuosa* sob diferentes concentrações de efluentes da Lagoa da Saudade.
- Avaliar os rendimentos quânticos fotossintéticos por meio de fluorescência da clorofila a.
- Determinar a concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) e proteínas solúveis totais.

4 Material e Métodos

4.1 Material Biológico

A macroalga *Ulva flexuosa* utilizada no experimento foi coletada manualmente no litoral de São Paulo. Foram selecionados exemplares morfológicamente saudáveis e bem aderidos a substratos naturais rochosos, evitando indivíduos com sinais visíveis de senescência, herbivoria ou epifitismo excessivo. Após a coleta, as algas foram acondicionadas em recipientes contendo água do mar coletada no próprio local, com o objetivo de preservar as condições fisiológicas originais e evitar choques osmóticos e térmicos durante o transporte até o laboratório.

Durante o transporte, os espécimes permaneceram submersos, protegidos da exposição à luz solar direta e de variações bruscas de temperatura, em recipientes de polietileno adequadamente vedados, seguindo procedimentos semelhantes aos descritos por Souza et al. (2021).

No laboratório, as algas foram cuidadosamente triadas, sendo removidos manualmente organismos epifíticos associados (fauna e microalgas) sem causar dano mecânico ao talo.

As macroalgas utilizadas nos experimentos foram provenientes de estoque mantido em cultivo laboratorial sob as mesmas condições experimentais descritas a seguir, o que permitiu que os organismos chegassem fisiologicamente estabilizados ao início dos tratamentos, eliminando a necessidade de período prolongado de aclimação e reduzindo a variabilidade interindividual nos resultados.

4.2 Coleta e Armazenamento do Efluente

O efluente utilizado nos experimentos foi proveniente da Lagoa da Saudade, corpo d'água urbano localizado no município de Santos (SP), caracterizado por elevada carga de matéria orgânica e nutrientes dissolvidos, com florações recorrentes de macrófitas aquáticas (plantas superiores adaptadas ao ambiente aquático, como plantas flutuantes ou emergentes) e condições hipereutróficas resultantes do aporte contínuo de efluentes domésticos e escoamento urbano (COTOVICZ JUNIOR et al., 2013).

As amostras de água foram coletadas manualmente, utilizando garrações de polietileno de alta densidade (PEAD) de 5 litros, previamente descontaminados com solução de ácido clorídrico diluído e enxaguados com água deionizada e, posteriormente, com a própria água da lagoa. A coleta foi realizada diretamente na superfície da lagoa, procedimento adequado para a captura representativa de nutrientes dissolvidos na coluna d'água superficial (GRASSHOFF et al., 1999).

Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas e mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso. O congelamento é método amplamente adotado para preservar a composição físico-química de amostras aquáticas ricas em nutrientes inorgânicos, especialmente amônio e

ortofosfato, minimizando a degradação microbiana e as alterações nas concentrações de nitrogênio e fósforo dissolvidos durante o armazenamento (DORE et al., 1996). Antes do uso, as amostras foram descongeladas em temperatura controlada e filtradas em papel de filtro qualitativo para remoção de partículas em suspensão.

4.3 Desenho Experimental e Condições de Cultivo

O cultivo da macroalga foi conduzido em aquários de 20 litros com condições ambientais controladas, servindo como sistema-mãe de manutenção do estoque biológico. Os experimentos propriamente ditos foram realizados em recipientes de 500 mL, contendo 6 g de biomassa fresca de *Ulva flexuosa* (densidade de 12 g L⁻¹) e uma das cinco concentrações de efluente testadas: 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, com o volume complementado por água do mar filtrada (FSW, do inglês *Filtered Sea Water*). O tratamento de 0% correspondeu ao controle experimental, constituído pela água do próprio cultivo da macroalga (água do mar enriquecida com meio f/2 e mantida sob as mesmas condições ambientais), permitindo distinguir a remoção de nutrientes promovida pela atividade biológica da *Ulva flexuosa* daquela decorrente de processos abióticos, sem introduzir condições artificiais de carência nutricional no controle.

Cada tratamento contou com quatro réplicas biológicas, totalizando 20 unidades experimentais. O experimento teve duração de 30 dias, com pesagens realizadas no dia 0 (início), no dia 15 (intermediário) e no dia 30 (final do período experimental), permitindo o acompanhamento da dinâmica de crescimento ao longo do tempo.

A temperatura foi mantida entre 24 e 26 °C, valores compatíveis com as condições naturais do litoral paulista no período de verão. O pH foi ajustado para 8,2, utilizando hidróxido de potássio (KOH) para correções alcalinas e ácido clorídrico (HCl) para correções ácidas; a escolha desses reagentes visou especificamente evitar a introdução de compostos nitrogenados exógenos que pudessem interferir nas concentrações de nitrogênio mensuradas (SOUZA et al., 2021). A

salinidade foi controlada em 33 ppt, simulando as condições do ambiente marinho costeiro, com ajustes realizados por meio da adição de água doce ou salgada conforme necessário.

A aeração suave foi mantida continuamente com o objetivo de garantir o suprimento de CO² e carbono inorgânico dissolvido para a fotossíntese, prevenir a alcalinização do meio pelo consumo de bicarbonato pelas algas e promover a quebra da camada limite difusiva nos talos, favorecendo a absorção de nutrientes e a homogeneização da exposição luminosa. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com intensidade luminosa de aproximadamente 150 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas de LED nas faixas do espectro azul e vermelho, adequadas à absorção fotossintética (LI et al., 2024). A irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) foi mensurada com o fluorômetro Junior-PAM (Walz GmbH, Alemanha), utilizando o sensor integrado ao equipamento.

4.4 Crescimento e Produtividade da Biomassa

A biomassa inicial de cada unidade experimental foi determinada por pesagem em balança analítica de precisão (0,001 g), após remoção cuidadosa do excesso de água superficial por papel absorvente padronizado. O experimento teve duração de 30 dias, com pesagens realizadas nos dias 0, 15 e 30, permitindo o acompanhamento da dinâmica de crescimento em dois intervalos temporais.

A Taxa de Crescimento Relativo (TCR), também denominada na literatura ficológica como taxa de crescimento específico, foi calculada com base na variação da massa entre o início e o final do experimento, conforme descrito por Nederlof et al. (2022), utilizando a seguinte equação:

$$\text{TCR} = (\ln(\text{Pf}) - \ln(\text{Pi})) / t \times 100$$

em que: Pf = peso final (g); Pi = peso inicial (g); t = tempo de cultivo em dias (t = 30).

Esse índice expressa a taxa instantânea de crescimento exponencial, sendo amplamente utilizado

para comparações entre tratamentos em experimentos com macroalgas, por ser independente da biomassa inicial e permitir comparações entre experimentos de diferentes durações.

4.5 Análise de Fluorescência da Clorofila *a*

A eficiência fotossintética foi avaliada por fluorescência da clorofila *a*, utilizando o fluorômetro Jr PAM III (Walz, Alemanha). Antes de cada medição, as algas foram submetidas à adaptação ao escuro por 30 minutos, período suficiente para a oxidação total dos centros de reação do PSII e a obtenção de valores de fluorescência mínima (F^0) representativos. Após a adaptação, um pulso de luz saturante foi aplicado para obtenção da fluorescência máxima (F_m) e cálculo do F_v/F_m .

Em seguida, as algas foram expostas à luz actínica de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mesma intensidade utilizada no cultivo, para as medições de fluorescência em estado estacionário (F_s) e determinação dos parâmetros em condições de iluminação ativa. Foram mensurados os seguintes parâmetros: F_v/F_m (eficiência quântica potencial do PSII), $Y(\text{II})$ (eficiência quântica efetiva do PSII), ETR (taxa de transporte de elétrons) e NPQ (quenching não fotoquímico), conforme protocolos descritos por Maxwell e Johnson (2000).

Adicionalmente, foram realizadas curvas de indução fotossintética (20 minutos de exposição contínua à luz actínica) e curvas rápidas de luz (RLC), com exposição a gradientes crescentes de irradiância de 13 a $750 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para caracterizar as respostas fotossintéticas das algas em diferentes regimes de iluminação.

4.6 Conteúdo Relativo de Água (CRA)

O Conteúdo Relativo de Água (CRA) foi determinado segundo a metodologia clássica de Barrs e Weatherley (1962), adaptada para macroalgas marinhas conforme Souza et al. (2021). Para cada unidade experimental, foram utilizados 200 mg de biomassa fresca, dos quais foi

determinada a massa fresca (Mf) imediatamente após a remoção do excesso de água superficial. Em seguida, as amostras foram imersas em água do mar filtrada por 12 horas em câmara escura a 4 °C, para atingir a turgidez máxima, e pesadas (massa túrgida, Mt). Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 60 °C até peso constante (massa seca, Ms). O CRA foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{Mf} - \text{Ms}) / (\text{Mt} - \text{Ms}) \times 100$$

4.7 Análises Bioquímicas

A determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos foi realizada por extração em acetona 80%, mantida a 4 °C no escuro por 12 horas, com leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 470, 653 e 666 nm para obtenção das concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, conforme Lichtenthaler e Wellburn (1983). A quantificação de proteínas solúveis totais foi conduzida pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, utilizando curva de calibração com equação $y = 717,46x + (-98,74)$ e coeficiente de determinação $R^2 = 0,9418$, indicando adequada linearidade no intervalo de concentrações avaliado.

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$), para identificação de diferenças significativas entre os tratamentos. Os valores de TCR, de fluorescência e de pigmentos foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão ($n = 4$). As curvas de indução fotossintética e as curvas rápidas de luz foram analisadas de forma descritiva, por representarem respostas temporais e a gradientes de irradiância, para os quais a ANOVA ponto a ponto seria metodologicamente inadequada. As análises foram realizadas no software R (versão 4.x) ou equivalente.

5 Resultados e Discussão

5.1 Crescimento e Produtividade da Biomassa

Os resultados de crescimento e produtividade de *Ulva flexuosa* evidenciaram resposta positiva e dose-dependente à adição de efluente.

Concentração	TCR (% dia ⁻¹)	Desvio Padrão
0%	0,25	± 0,06
25%	2,01	± 0,50
50%	2,60	± 0,32
75%	3,78	± 0,11
100%	4,85	± 0,09

Tabela 1. Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 4).

O padrão observado indica que o aporte crescente de nutrientes inorgânicos presentes no efluente, especialmente nitrogênio e fósforo, atuou como bioestimulante direto do crescimento de *Ulva flexuosa*, corroborando o papel central desses macronutrientes na regulação do metabolismo algal (NEDERLOF et al., 2022). O ganho proporcional entre os tratamentos foi decrescente ao longo do gradiente de concentração, sugerindo tendência de saturação na assimilação de nutrientes nas concentrações mais elevadas, padrão compatível com cinética de Michaelis-Menten amplamente descrita para macroalgas do gênero *Ulva* em condições laboratoriais (PEDERSEN; BORUM, 1996).

O tratamento de 100% de efluente resultou na maior TCR registrada no experimento ($4,85 \pm 0,09\%$ dia⁻¹), consolidando o padrão dose-dependente observado ao longo dos demais tratamentos. A ausência de sinais de toxicidade ou inibição de crescimento nessa concentração máxima sugere que *Ulva flexuosa* possui elevada capacidade de assimilação de nutrientes mesmo

sob carga orgânica intensa. Esse resultado diverge parcialmente do observado por Nederlof et al. (2022), que relataram danos teciduais em *Ulva* exposta a concentrações elevadas de ortofosfato acima de $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$. Tal divergência pode ser explicada pela composição específica do efluente utilizado no presente estudo, possivelmente com concentrações de fosfato inferiores ao limiar de toxicidade identificado por aqueles autores, hipótese que, embora plausível, não pôde ser diretamente verificada pela ausência de caracterização química detalhada do efluente, o que representa uma limitação metodológica a ser considerada na interpretação dos resultados.

As curvas de biomassa evidenciam divergência crescente entre os tratamentos ao longo do período experimental, reforçando o efeito dose-dependente do efluente sobre o acúmulo de biomassa. Esses achados são compatíveis com dados reportados para outras espécies do mesmo gênero em sistemas de aquicultura multitrófica integrada (IMTA), reforçando o potencial desta macroalga como biofiltro produtivo (SCHOL, 2022; MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014).

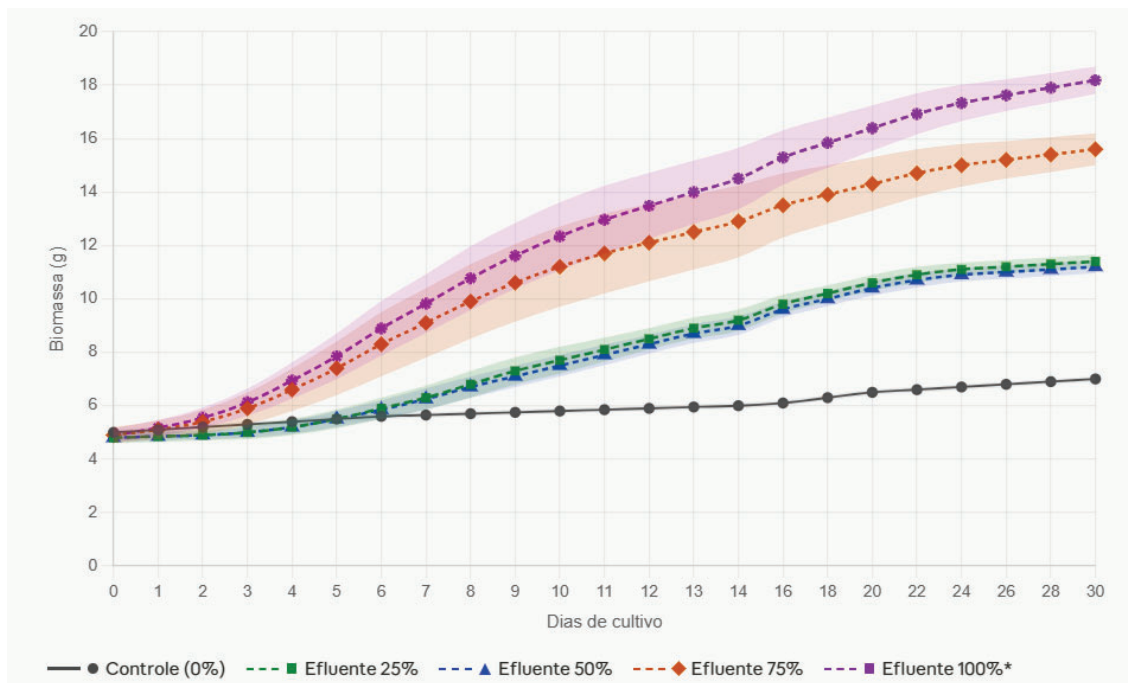


Figura 1. Curvas de crescimento de biomassa (g) de *Ulva flexuosa* ao longo de 30 dias de cultivo em condições controladas, sob diferentes concentrações de efluente (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). As linhas representam a média das réplicas ($n = 4$) e as áreas sombreadas indicam o desvio padrão.

5.2 Análise de Fluorescência da Clorofila *a*

A avaliação da eficiência fotossintética por fluorescência da clorofila *a* revelou respostas distintas entre os parâmetros analisados (ETR, F_v/F_m , $Y(II)$ e NPQ), oferecendo uma visão abrangente dos efeitos dos diferentes níveis de efluente sobre o aparato fotossintético de *Ulva flexuosa*, conforme metodologia descrita por Maxwell e Johnson (2000).

O ETR, que reflete a taxa efetiva de transporte de elétrons na cadeia fotossintética e representa a atividade fotoquímica operacional do PSII, apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2A). Os valores aumentaram progressivamente com a concentração de efluente, com o controle diferindo significativamente dos tratamentos mais elevados, e o tratamento de 100% apresentando os maiores valores registrados. O aumento dose-dependente do ETR é fisiologicamente coerente com o incremento na disponibilidade de nitrogênio. Esse nutriente participa diretamente da estrutura de componentes centrais do aparato fotossintético: integra o anel porfirínico da clorofila, compõe aminoácidos presentes nos complexos antena e é constituinte das proteínas D1 e D2, responsáveis pela estabilidade do centro de reação do PSII (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Assim, o maior aporte de nitrogênio via efluente favoreceu progressivamente a expansão e o funcionamento da maquinaria fotoquímica, resultando em maior capacidade de captura e conversão da energia luminosa disponível nos tratamentos mais concentrados.

O parâmetro F_v/F_m , considerado o indicador padrão da integridade fotossintética e do estado fisiológico das algas (MAXWELL; JOHNSON, 2000), não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos, incluindo a concentração de 100% (Figura 2B). Os valores

mantiveram-se dentro da faixa considerada saudável para o gênero *Ulva* (0,5–0,8), indicando que nenhuma das concentrações testadas causou dano estrutural ao centro de reação do PSII. Esse resultado é particularmente relevante do ponto de vista ecotoxicológico, pois demonstra que mesmo a maior concentração de efluente avaliada não induziu fotoinibição ou dano irreversível ao aparato fotossintético primário da macroalga, reforçando a tolerância de *Ulva flexuosa* a ambientes enriquecidos com nutrientes (BOLTON et al., 2016; NEDERLOF et al., 2022).

O Y(II) não diferiu significativamente entre os tratamentos em estado estacionário (Figura 2C), resultado que merece interpretação cuidadosa. O Y(II) medido em condição de iluminação estável representa a eficiência fotoquímica instantânea do PSII sob uma única intensidade luminosa fixa, sendo influenciado pelo estado de aclimação da alga àquela irradiância específica. Nesse sentido, a ausência de diferença significativa entre tratamentos não contradiz o incremento de ETR observado. Essa aparente contradição se resolve quando se considera a escala temporal das medições: enquanto o ETR integra a resposta fotossintética ao longo de gradientes de irradiância nas curvas RLC, o Y(II) em estado estacionário é uma medida pontual mais suscetível à variabilidade de aclimação individual (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A curva de indução fotossintética (Figura 3) reforça essa interpretação, demonstrando que os tratamentos com efluente, especialmente nas concentrações mais altas, mantiveram valores de Y(II) mais estáveis ao longo do período de medição, enquanto o controle apresentou declínio mais acentuado após a exposição inicial à luz. A curva rápida de luz (Figura 4) corrobora esse padrão, evidenciando resposta mais homogênea dos tratamentos com efluente em todo o gradiente de PAR testado (13 a 750 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), o que sugere maior capacidade de manutenção da eficiência fotossintética sob variações de irradiância nos tratamentos nutricionalmente enriquecidos.

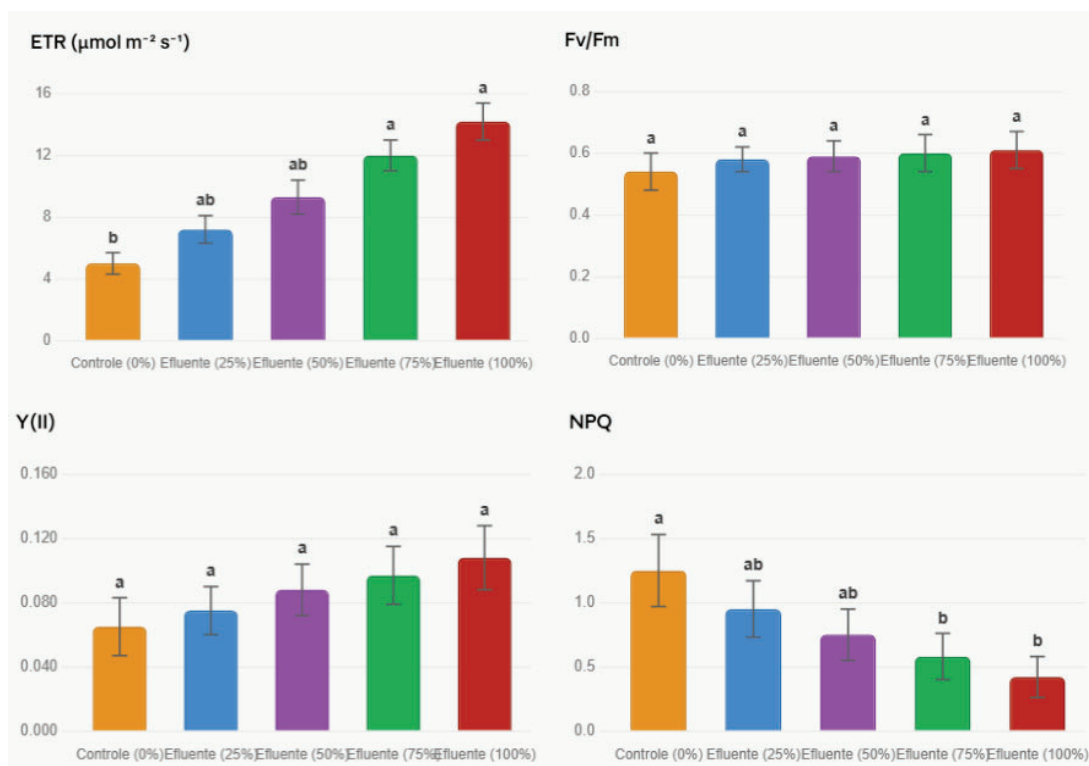


Figura 2. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de *Ulva flexuosa* sob diferentes concentrações de efluente (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). (A) ETR ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (B) Fv/Fm; (C) Y(II); (D) NPQ. Barras representam médias $\pm$ desvio padrão (n = 4). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P < 0,05).

O NPQ não diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 2D), mas apresentou tendência de redução com o aumento da concentração de efluente, sendo os menores valores observados no tratamento de 100%. Essa tendência é fisiologicamente coerente com o incremento de pigmentos fotossintéticos observado nos mesmos tratamentos: a maior disponibilidade de nitrogênio favoreceu a síntese de clorofila e a expansão dos complexos antena, aumentando a eficiência na utilização da energia luminosa absorvida e reduzindo proporcionalmente a fração dissipada como calor (SOUZA et al., 2021). Esse padrão de redução do NPQ associado ao enriquecimento com nitrogênio foi documentado em macroalgas verdes por

Eismann et al. (2020), que observaram em espécies de *Ulva* que condições de maior disponibilidade nutricional resultam em menor ativação dos mecanismos fotoprotetores dependentes de carotenoides, refletindo um estado fisiológico de menor estresse energético. A curva rápida de luz do NPQ (Figura 4) corrobora essa interpretação, mostrando valores similares e sobrepostos entre os tratamentos ao longo de todo o gradiente de irradiância testado.

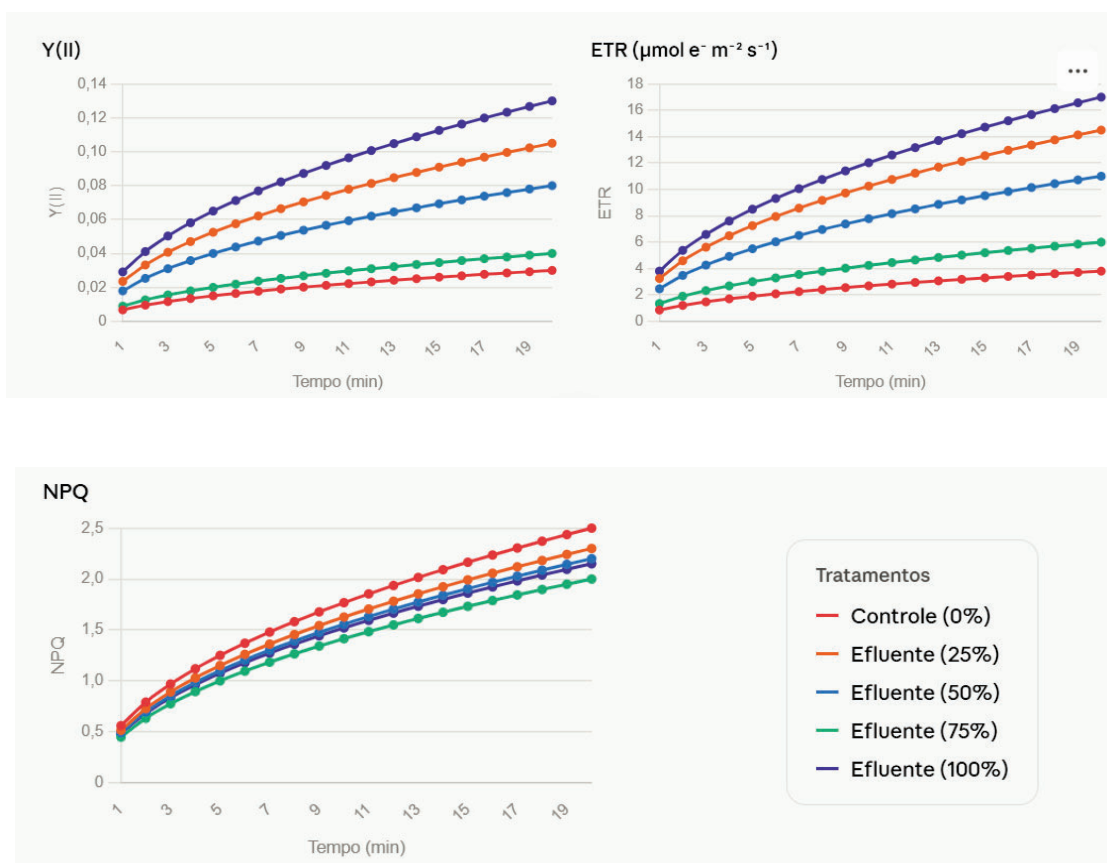


Figura 3. Curvas de indução fotossintética de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), ao longo de 20 minutos de exposição contínua à luz actínica ($150 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Painéis: Y(II): eficiência quântica efetiva do PSII; ETR: taxa de transporte de elétrons ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); NPQ: quenching não fotoquímico. Os pontos representam médias ($n = 4$) e as barras de erro indicam o desvio padrão.

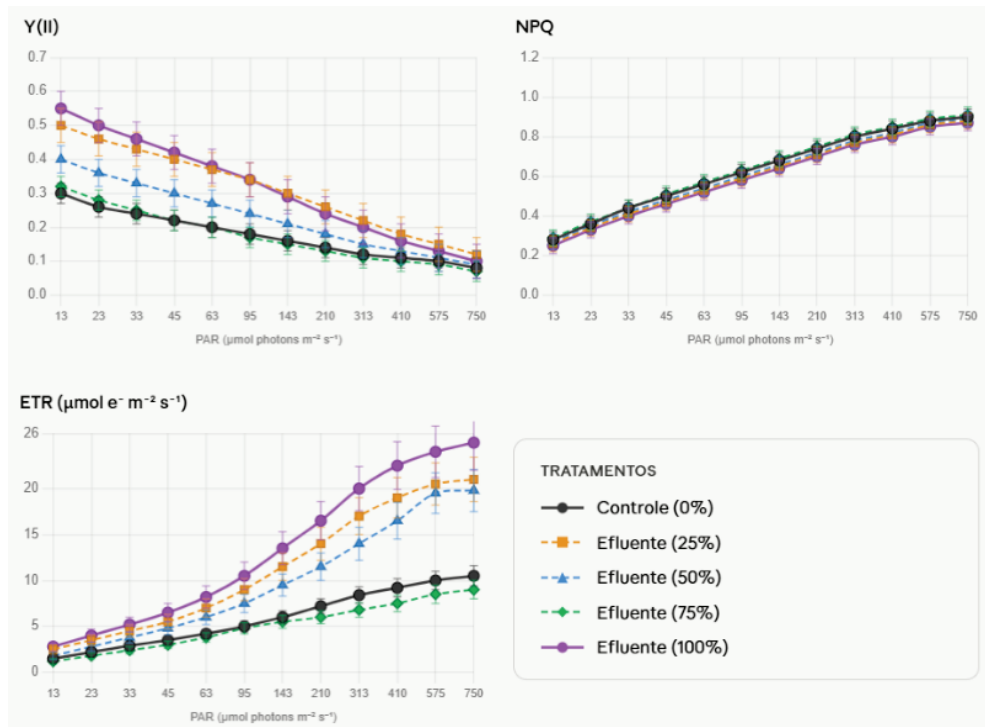


Figura 4. Curvas rápidas de luz (RLC) de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), em resposta a gradientes crescentes de irradiância (13 a 750 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Painéis superiores: Y(II), eficiência quântica efetiva do PSII; NPQ, quenching não fotoquímico. Painel inferior: ETR, taxa de transporte de elétrons ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os pontos representam médias ($n = 4$) e as barras de erro indicam o desvio padrão.

5.3 Conteúdo Relativo de Água

O CRA manteve-se elevado e uniforme em todos os tratamentos (Tabela 2), indicando que nenhuma concentração de efluente comprometeu a capacidade de retenção hídrica e o turgor celular de *Ulva flexuosa*.

Concentração (%)	CRA (%)
0%	99,87 ± 8,96
25%	91,90 ± 5,97
50%	97,09 ± 5,32
75%	98,17 ± 6,21
100%	98,50 ± 5,50

Tabela 2. Conteúdo Relativo de Água (CRA) de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente. Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 4).

O valor aparentemente superior a 100% registrado em uma réplica do controle (CRA = 112,55%) é de caráter metodológico, possivelmente decorrente de variação na pesagem ou na definição do ponto de turgidez máxima, não implicando em ganho real de água acima da capacidade celular máxima. Esse tipo de variação já foi relatado em estudos com macroalgas marinhas e é esperado em tecidos com estruturas de parede celular altamente higroscópicas (SOUZA et al., 2021).

A ausência de diferenças expressivas entre os tratamentos no CRA corrobora os dados de fluorescência (Fv/Fm), reforçando a conclusão de que nenhuma concentração de efluente causou estresse osmótico severo em *Ulva flexuosa*. Esses resultados são consistentes com a ampla capacidade osmorregulatória documentada para o gênero *Ulva*, que habitualmente tolera variações expressivas de salinidade e composição iônica em seus ambientes naturais, mantendo o equilíbrio celular por meio de ajustes osmóticos mediados por aminoácidos livres e íons inorgânicos (NEDERLOF et al., 2022; MATA et al., 2010).

5.4 Concentração de Pigmentos Fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais de *Ulva flexuosa* apresentaram padrão dose-dependente crescente ao longo do gradiente de enriquecimento nutricional, em acordo com os demais indicadores fisiológicos avaliados.

Os teores de clorofila *a* variaram de $0,68 \pm 0,09$ mg g⁻¹ PS no controle a $2,51 \pm 0,25$ mg g⁻¹ PS no tratamento com 100% de efluente (Figura 5A), valores compatíveis com os reportados por Figueroa et al. (2022) para *Ulva sp.* cultivada em efluente de maricultura sob alto suprimento de nitrogênio. O incremento de clorofila *a* em resposta ao nitrogênio disponível é esperado, pois esse pigmento tem o nitrogênio como constituinte obrigatório do anel porfirínico e está diretamente vinculado à densidade de centros de reação do PSII (MAXWELL; JOHNSON, 2000; NEDERLOF et al., 2022).

A clorofila *b* seguiu o mesmo padrão ascendente, com valores entre $0,25 \pm 0,04$ e $0,91 \pm 0,10$ mg g⁻¹ PS (Figura 5B). A razão Chl *a*/Chl *b* manteve-se estável em aproximadamente 2,75 em todos os tratamentos ($P > 0,05$), indicando ausência de aclimação cromática diferencial entre os grupos. Em *Ulva spp.*, alterações nessa razão são tipicamente associadas a respostas à irradiância, redução sob baixa luz para ampliar o complexo antena, e não à disponibilidade de nutrientes per se (HURD et al., 2014). A estabilidade observada confirma que o fotoperíodo e a intensidade luminosa padronizados ($150 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram os determinantes da razão Chl *a*/Chl *b*, independentemente do tratamento nutricional.

Os carotenoides totais apresentaram o menor incremento proporcional entre os pigmentos, variando de $0,09 \pm 0,01$ a $0,58 \pm 0,08$ mg g⁻¹ PS (Figura 5C). O incremento proporcionalmente menor dos carotenoides em relação às clorofilas, associado à tendência de redução do NPQ observada nos tratamentos mais concentrados, é fisiologicamente coerente: em condições de alta disponibilidade de nitrogênio, o organismo investe preferencialmente na expansão

do aparato de coleta de luz em detrimento dos pigmentos fotoprotetores, reduzindo a necessidade de dissipação energética como calor (SOUZA et al., 2021; EISMANN et al., 2020). Esse padrão foi documentado por Eismann et al. (2020) para espécies do gênero *Ulva* em resposta a variações de disponibilidade nutricional, reforçando que a proporção relativa de carotenoides reflete o equilíbrio entre demanda fotossintética e proteção contra foto-oxidação, e não apenas a quantidade absoluta de nutrientes disponíveis.

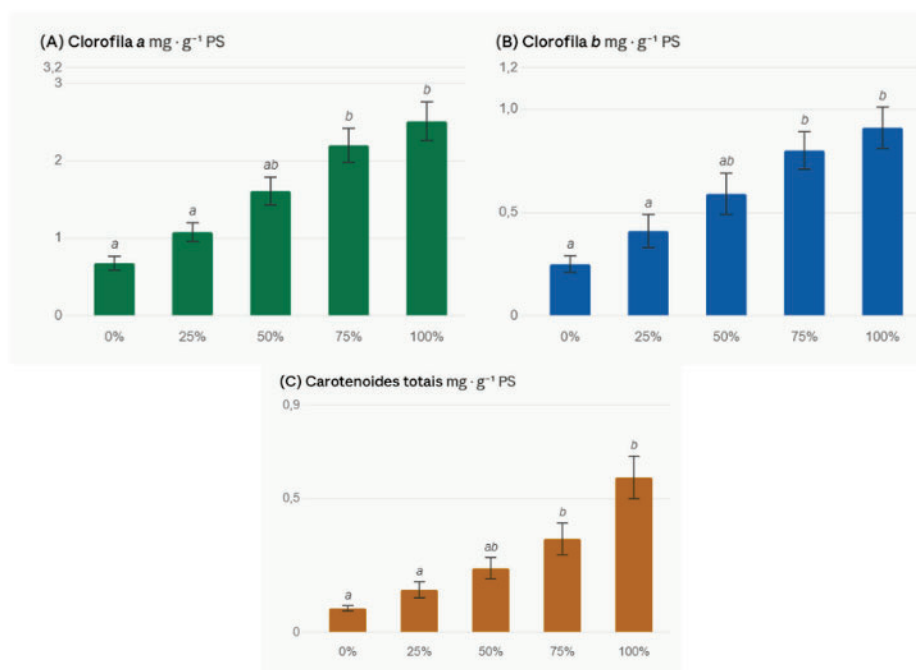


Figura 5. Concentração de pigmentos fotossintéticos de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). (A) Clorofila a (mg g⁻¹ PS); (B) Clorofila b (mg g⁻¹ PS); (C) Carotenoides totais (mg g⁻¹ PS). Barras representam médias ± desvio padrão (n = 4). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P < 0,05). PS = peso seco.

Em conjunto, os dados de pigmentação reforçam o quadro fisiológico estabelecido pelos parâmetros de fluorescência (ETR, Fv/Fm) e pelas taxas de crescimento relativo: o efluente da

Lagoa da Saudade atuou como bioestimulante nutricional efetivo, promovendo expansão qualitativa e quantitativa do aparato fotossintético de *Ulva flexuosa* sem comprometimento fisiológico detectável em nenhuma das concentrações avaliadas.

5.5 Proteínas Solúveis Totais

Os teores de proteína solúvel acompanharam, de modo geral, o gradiente nutricional imposto pelos tratamentos (Figura 6). Em ambientes ricos em amônio, como o efluente da Lagoa da Saudade, a via metabólica GS/GOGAT é intensamente recrutada para incorporar o nitrogênio inorgânico à fração orgânica celular, resultando em acúmulo progressivo de aminoácidos e proteínas na biomassa (COHEN; NEORI, 1991; NEORI et al., 2004). Os dados obtidos corroboram esse mecanismo, indicando que *Ulva flexuosa* respondeu ao enriquecimento nutricional não apenas com maior crescimento, mas com reconfiguração qualitativa da composição bioquímica do talo, em acordo com o padrão amplamente descrito para o gênero em sistemas integrados de cultivo com efluentes (MACCHIAVELLO; BULBOA, 2014).

O valor aparentemente inferior registrado no tratamento de 25% em relação ao controle, acompanhado de elevado desvio padrão, pode refletir variabilidade biológica natural ou um período transitório de ajuste metabólico à nova composição do meio.

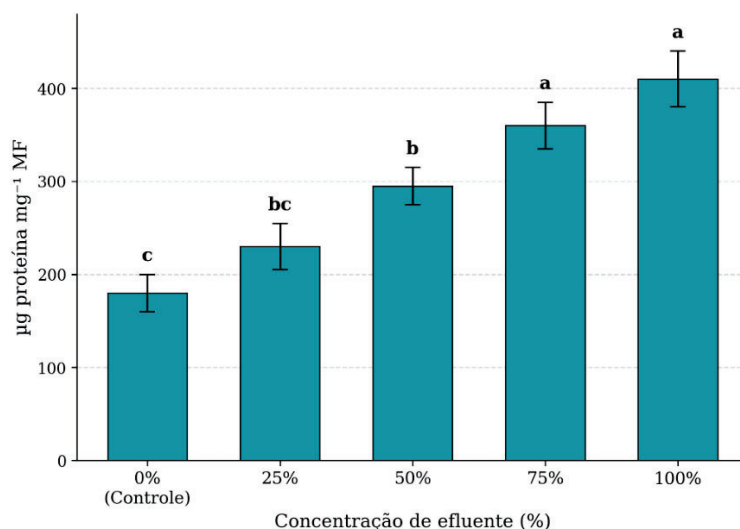


Figura 6. Proteínas solúveis totais de *Ulva flexuosa* cultivada sob diferentes concentrações de efluente da Lagoa da Saudade (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Barras representam médias $\pm$ desvio padrão ($n = 4$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). MF = massa fresca.

6 Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstram que os efluentes da Lagoa da Saudade exerceram efeito bioestimulante dose-dependente sobre *Ulva flexuosa*, promovendo incrementos significativos na TCR, nos teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, e na atividade fotossintética (ETR), sem comprometimento detectável da integridade do PSII (F_v/F_m), do equilíbrio osmótico (CRA) ou do balanço fisiológico geral da alga em nenhuma das concentrações avaliadas.

A espécie *U. flexuosa* demonstrou elevada plasticidade fisiológica e tolerância ao enriquecimento nutricional característico de efluentes domésticos, posicionando-a como candidata promissora para sistemas integrados de biorremediação e produção de biomassa de alto valor agregado. A integração desses sistemas com estratégias de economia circular e de gestão de lagoas

costeiras urbanas pode contribuir diretamente para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 2 (Fome zero e agricultura sustentável), 12 (Consumo e produção responsáveis) e 14 (Vida na água).

Referências

ANDRADE, L. R. et al. Seaweeds as biomonitors of heavy metals in coastal areas. *Ciência e Cultura*, v. 58, n. 3, p. 48–51, 2006.

BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 15, n. 3, p. 413–428, 1962.

BOLTON, J. J. et al. The seaweed resources of South Africa. *Botanica Marina*, v. 59, n. 2, p. 1–15, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CECCHERELLI, G.; CINELLI, F. Short-term effects of nutrient enrichment of the sediment and interactions between the seagrass *Cymodocea nodosa* and the introduced green alga *Caulerpa taxifolia* in a Mediterranean bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 217, n. 2, p. 165–177, 1997.

COHEN, I.; NEORI, A. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. *Botanica Marina*, v. 34, p. 475–482, 1991.

COTOVICZ JUNIOR, L. C. et al. Assessment of the trophic status of four coastal lagoons and one estuarine delta, eastern coast of Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, n. 3, p. 3297–3310, 2013.

- DORE, J. E. et al. Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. *Marine Chemistry*, v. 53, n. 3–4, p. 173–185, 1996.
- EISMANN, A. I. et al. *Ulva* spp. carotenoids: responses to environmental conditions. *Algal Research*, v. 48, p. 101916, 2020.
- FIGUEROA, F. L. et al. Effects of nutrient supply and irradiance on the biochemical composition of *Ulva rigida*. *Journal of Applied Phycology*, v. 34, p. 1–15, 2022.
- GLASS, A. D. M.; BHAGWAT, A. S. Nitrogen use efficiency of crops. In: HAWKESFORD, M. J. et al. (ed.). *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. p. 313–333.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. *Algae*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.
- GRAND VIEW RESEARCH. *Seaweed market size, share & trends analysis report*. San Francisco: Grand View Research, 2023.
- GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. *Methods of Seawater Analysis*. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. *AlgaeBase*. Galway: National University of Ireland, 2024.
- HAYDEN, H. S. et al. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology*, v. 38, n. 3, p. 277–294, 2003.
- HURD, C. L. et al. *Seaweed Ecology and Physiology*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

JOLY, A. B. *Gêneros de algas marinhas da costa atlântica latino-americana*. São Paulo:

Universidade de São Paulo, 1965.

LI, Y. et al. Effects of LED light spectra on the growth and biochemical composition of *Ulva lactuca*. *Aquaculture*, v. 578, p. 740087, 2024.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, v. 11, n. 5, p. 591–592, 1983.

MACCHIAVELLO, J.; BULBOA, C. Nutrient uptake efficiency of *Gracilaria chilensis* and *Ulva lactuca* in an IMTA system with the red abalone *Haliotis rufescens*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 42, n. 2, p. 523–533, 2014.

MATA, L. et al. *Ulva* spp. (Chlorophyta, Ulvales): worldwide potential. In: ISRAEL, A.; EINAV, R.; SECKBACH, J. (ed.). *Seaweeds and their Role in Globally Changing Environments*. Dordrecht: Springer, 2010. p. 225–240.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence, a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MCGOVERN, Malachy. *Domestication of the green seaweed Ulva ohnoi aka 'sea lettuce' for Biofloc effluent bioremediation*. 2021. Dissertação (Mestrado) — Universidade do Algarve, Faro, 2021. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/17433>.

NALDI, M.; WHEELER, P. A. ¹⁵N measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and ¹⁵N accumulation in algal tissue. *Journal of Phycology*, v. 38, n. 1, p. 135–144, 2002.

- NEDERLOF, M. A. J. et al. Effects of high phosphate concentrations on multiple *Ulva* species. *Journal of Applied Phycology*, v. 34, p. 2133–2148, 2022.
- NEORI, A. et al. Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture*, v. 141, n. 3–4, p. 183–199, 2004.
- PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L. *Macroalgas marinhas do litoral paulista*.
- PEDERSEN, M. F.; BORUM, J. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, v. 142, p. 261–272, 1996.
- PENGZHAN, Y. et al. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemic activity. *Journal of Applied Phycology*, v. 15, n. 1, p. 21–27, 2003.
- RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, v. 45, n. 1–12, p. 17–23, 2002.
- RAVEN, J. A. *Energetics and transport in aquatic plants*. New York: Alan R. Liss, 1984.
- RAVEN, J. A. et al. *Phycology*. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.
- ROBIC, A. et al. Structural and rheological investigation of ulvan, a polyanionic polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*, v. 91, n. 8, p. 652–664, 2009.
- SCHOL, Nikki Floor. *Performance of Ulva sp. (Chlorophyta) at different stocking densities in recirculating aquaculture systems*. 2022. Dissertação (Mestrado); Universidade do Algarve, Faro, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.1/19500>.

SOUZA, J. M. C. et al. Fisiologia de macroalgas em condições de estresse. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 44, n. 3, p. 1–15, 2021.

TROELL, M. et al. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*, v. 297, n. 1–4, p. 211–213, 2009.

TURCIOS, A. E.; PAPENBROCK, J. Sustainable treatment of aquaculture effluents; what can we learn from the past for the future? *Sustainability*, v. 6, n. 2, p. 836–856, 2014.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: MARIANA ATANES JUSSIANI

Título: "Uso de efluente como bioestimulante para o incremento da produtividade da macroalga *Ulva flexuosa*."

Orientador: Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto	Aprovado
Prof. Dr. Yoannis Dominguez Rodriguez	Aprovado

PARECER:

Condicionei a aprovação da aluna após realização das correções sugeridas pela banca.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente Mariana Atanes Jussiani obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 02 de julho de 2026.



Prof. Dr. Milton Costa Lima Neto



Prof. Dr. Yoannis Dominguez Rodriguez

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/nº - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7100 - diretor.clp@unesp.br

