

Luz Karime Polo Osorio

Respostas bioquímicas, celulares e fisiológicas da macroalga marrom *Sargassum cymosum* submetida à diferentes tratamentos com radiação ultravioleta e gradientes de salinidade

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas

Orientadora: Profa. Dra.: Zenilda Laurita Bouzon
Co-orientador: Dr. Éder Carlos Schmidt

Florianópolis
2014

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

Polo, Luz Karime

Respostas bioquímicas, celulares e fisiológicas da macroalga marrom Respostas bioquímicas, celulares e fisiológicas da macroalga marrom Sargassum cymosum submetida à diferentes tratamentos com radiação ultravioleta e gradientes de salinidade submetida à diferentes tratamentos com radiação ultravioleta e gradientes de salinidade / Luz Karime Polo ; orientador, Zenilda Laurita Bouzon ; co-orientador, Eder Carlos Schmidt. - Florianópolis, SC, 2014.

103 p.

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

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Radiação ultravioleta. 3. Salinidade. 4. Sargassum cymosum. 5. Fotoproteção. I. Bouzon, Zenilda Laurita. II. Schmidt, Eder Carlos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Respostas bioquímicas, celulares e fisiológicas da macroalga marrom *Sargassum cymosum* submetida à diferentes tratamentos com radiação ultravioleta e gradientes de salinidade

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

Florianópolis, 18 de Fevereiro de 2014.

Prof.^a, Dr.^a. Maria Alice Neves

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Zenilda Laurita Bouzon
Orientadora Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Eder Carlos Schmidt
Co-Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a. Aurea Maria Randi
Universidade Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.. Evelise M. Nazari
Universidade Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Leonardo Tavares Salgado
Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Quero dedicar meu trabalho à meu irmão Carlos Andres *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha orientadora Zenilda Bouzon e co-orientador Eder Schmidt por ter me dado a oportunidade de trabalhar com eles e compartilhar comigo todos os seus conhecimentos neste processo.

A meus amigos e colegas do LABCEV, Marthi, Fer, Carmen, Tici e Rodri, com os que compartilhei dentro e fora do laboratório e fizeram tudo mais divertido.

Às meninas IC, Mari, Deb e Giulia pela grande ajuda.

Ao Professor Marcelo Maraschin, Fernanda Ramlov e Regina do laboratório de Morfogêneses e Bioquímica.

À minha querida professora Fungyi Chow pela constante ajuda, disposição e paciência.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, ao Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC, ao Laboratório Algas Marinhas (LAM) e ao Laboratório de Biologia Celular da USP.

Aos professores e ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB) pelo financiamento das missões de estudo realizadas na USP.

A meus amigos queridos Clau e Lele que alegraram minha vida nesta etapa.

A Pablo que mesmo de longe sempre esteve comigo.

Por último quero agradecer infinitamente a meus pais Carlos e Giovanna e meu irmão Juan por sempre me apoiar no meu processo de formação.

RESUMO

As respostas de fotoaclimação da macroalga parda *Sargassum cymosum* foram estudadas para determinar a sua organização ultraestrutural e citoquímica, assim os como seu desempenho e pigmentos fotossintéticos, as respostas bioquímicas, teor de proteínas, poliaminas (PAs), e os níveis de CHN. *S. cymosum* foi cultivada *in vitro* em três salinidades (30, 35 e 40 ups) e quatro tratamentos de irradiação: controle, PAR+UVA, PAR+UVB e PAR+ UVA+UVB. As plantas controle foram expostas a $70 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, PAR+UVB a $0,35 \text{ W m}^{-2}$ e PAR+UVA a $0,70 \text{ W m}^{-2}$, 3 horas por dia durante 7 dias. Nenhum tipo de radiação e salinidade afetou significativamente a taxa de crescimento. A quantidade de pigmentos em *S. cymosum* foi significativamente influenciado pela interação dos tratamentos com salinidade e radiação. Comparado ao controle, os tratamentos com radiação UV modificaram os padrões de cin\u00e9tica da curva de fotoss\u00edntese / irradi\u00e2ncia. Ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 radia\u00e7\u00e3o UV, *S. cymosum* apresentou um aumento da espessura da parede celular e a presen\u00e7a de compostos fen\u00f3licos. O n\u00famero de mitoc\u00f4ndria aumentou, enquanto que o n\u00famero de cloroplastos apresentou poucas altera\u00e7\u00f5es. Embora *S. cymosum* mostrou insensibilidade \u00e0s varia\u00e7\u00f5es da salinidade, pode concluir-se que as amostras tratadas sob quatro regimes de irradia\u00e7\u00e3o mostraram altera\u00e7\u00f5es estruturais, que foram mais evidentes. Comparado ao controle, os tratamentos com radia\u00e7\u00e3o UV mostraram mudan\u00e7as negativas no teor de prote\u00edna, poliaminas e n\u00edveis de CHN e perfil metab\u00f3lico. Pode concluir-se que *S. cymosum* \u00e9 insens\u00edvel \u00e0s mudan\u00e7as na salinidade e que amostras tratadas sob quatro regimes de irradia\u00e7\u00e3o apresentaram sinais de altera\u00e7\u00e3o, por\u00e9m n\u00e3o foram graves.

Palavras chaves: Radia\u00e7\u00e3o UV, organiza\u00e7\u00e3o ultraestrutural, desempenho fotossint\u00e9tico, compostos fen\u00f3licos, prote\u00ednas, CHN, PAs, perfil metab\u00f3lico.

ABSTRACT

The photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* were studied to determine its cytochemical and ultrastructural organization, as well as photosynthetic pigments and performance, biochemical responses, protein content, polyamines, and CHN levels of the brown macroalga. *S. cymosum* was cultivated in three salinities (30, 35 and 40 psu) under four irradiation treatments: PAR-only, PAR+UVA, PAR+UVB and PAR+UVA+UVB. Plants were exposed to PAR at $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PAR+UVB at 0.35 Wm^{-2} and PAR+UVA at 0.70 W m^{-2} for 3 h per day during 7 days *in vitro*. Growth rate was not significantly affected by any type of radiation or salinity. The amount of pigments in *S. cymosum* was significantly influenced by the interaction of salinity and radiation treatments. Compared to PAR-only, UVR treatments modified the kinetics patterns of the photosynthesis/irradiance curve. After exposure to UVR, *S. cymosum* increased cell wall thickness and the presence of phenolic compounds. The number of mitochondria increased, while the number of chloroplasts showed few changes. Although *S. cymosum* showed insensitivity to changes in salinity, it can be concluded that samples treated under four irradiation regimes showed structural changes, which were more evident. Compared to PAR-only, UVR treatments showed negative changes in protein content, polyamines, CHN levels and metabolic profile. It can be concluded that *S. cymosum* is insensitive to changes in salinity and that samples treated under four irradiation regimes showed signs of alteration, however they were not severe.

Keywords: UV radiation, salinity, ultrastructural organization, photosynthetic performance, phenolic compounds, protein, CHN, polyamines, metabolic profile.

SUMÁRIO

Introdução.....	1
1.1 Visão geral das algas.....	1
1.2 O gênero <i>Sargassum</i> C. Agardh.....	2
1.3 Diminuição da camada de ozônio (O ₃) e aumento da radiação UV	5
1.4 Estudos dos efeitos da radiação UV e estratégias de defesa nas algas pardas.....	7
1.5 Efeitos da salinidade sob as algas.....	10
1.6 Justificativa.....	11
1.7 Hipóteses.....	12
2 Objetivos.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 Materias e Métodos.....	15
3.1 Coleta e processamento do material biológico.....	15
3.2 Condições de cultivo.....	15
3.3 Efeito da radiação UV no crescimento de segmentos apicais dos controles e dos expostos.....	17
3.4 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes.....	18
3.4.1 Extração e Dosagem de Clorofila <i>a</i> e <i>c</i>	18
3.4.2 Extração de carotenoides totais.....	18
3.4.3 Extração de compostos fenólicos.....	18
3.4.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.....	19
3.4.4.1 Inibição dos radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	19
3.5 Processamento para análise em microscopia.....	19
3.5.1 Microscopia de luz (ML) e citoquímica.....	19
3.5.2 Citoquímica.....	20
3.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	20
3.6 Medida In vivo da fluorescência da clorofila <i>a</i>	21
3.7 Quantificação tecidual de CHN.....	21
3.8 Análises bioquímicas.....	22
3.8.1 Preparação das amostras para avaliação do complexo da cadeia respiratoria	22

3.8.2 Determinação da atividade da enzima NADH dehidrogenase).....	22
3.8.3 Determinação de succinate-2,6-diclorofenol (DCIP) oxidoreductase (complexo II).....	22
3.8.4 Determinação de proteínas totais.....	23
3.9 Determinação de poliaminas.....	23
3.10 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio transformada de Fourier (FTIR) e análise quimiométrica.....	24
3.11 Análises e interpretação dos dados	24
*4 Capítulo I. Photoacclimation responses of the brown macroalga <i>Sargassum cymosum</i> to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance.....	25
*5 Capítulo II. Perfil metabólico da alga parda <i>Sargassum cymosum</i> (Phaeophyceae, Fucales) sob condições de radiação UV e salinidade em laboratório: níveis de carbono e nitrogênio, proteínas, poliaminas, carboidratos, fenólicos e atividade da NADH deidrogenase e complexo II.....	28
6 Discussão geral e conclusões.....	31
7 Referências bibliográficas gerais.....	36

*Ver versão impressa

INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral das algas

As algas são de grande importância nos ambientes marinhos por serem os produtores primários dos oceanos. Como resultado das atividades fotossintéticas, elas geram uma a maior parte do oxigênio presente na atmosfera da Terra e produzem uma alta quantidade de carbono orgânico (Wilcox, 2009) e, desta maneira, compõem a biomassa e determinam a produtividade primária para os demais organismos da cadeia trófica (Norton *et al.*, 1996). São alimentos para os herbívoros e os detritívoros, como também constituem uma área de berçário e habitat para peixes e invertebrados (Lippert *et al.*, 2001).

As algas também são grandes contribuintes para biodiversidade global, cada espécie apresenta uma única combinação de características, desempenhando assim um ou mais funções no ecossistema, estão interconectadas com outros organismos nos ciclos biogeoquímicos, na cadeia alimentar e em associações simbióticas (Wilcox, 2009).

Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída às algas. Destacam-se os avanços biotecnológicos onde tem sido desenvolvidas novas formas de gerar combustíveis sustentáveis utilizando algas. Estes biocombustíveis poderão ajudar diminuir a dependência que os humanos têm dos combustíveis fósseis. Também, compostos presentes na parede celular das macroalgas marinhas como (polissacarídeos): alginatos, agaranas e carragenanas, são utilizados em setores economicamente importantes, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, apresentando alto potencial biotecnológico e despertando interesse mundial, devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter & Rudolph, 1997).

Dentro das algas, a classe Phaeophyceae (algas pardas) apresenta espécies predominantemente marinhas. Se encontram desde a zona supralittoral até a zona infralitoral. São abundantes na zona de entre-marés na parte superior da zona infralitoral. Esta classe ocorre desde as regiões equatoriais e tropicais até as regiões subpolares, mas é nas regiões frias que se observa sua maior diversidade, tanto em número de espécies como em variedades de tipos morfológicos (Reviere, 2006).

1.2. O gênero *Sargassum* C. Agardh

O gênero *Sargassum*, família Sargassaceae, apresenta grande importância como componente da flora marinha de regiões tropicais e subtropicais de ambos hemisférios do planeta (Paula, 1988; Széchy *et al.*, 2006). Está amplamente distribuído em águas temperadas, subtropicais e tropicais, tanto na zona de intermarés como na zona de submarés. Constitui um dos mais representativos gêneros, dentro os 41 gêneros da ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta), possuindo um número estimado de 485 espécies (De Reviere, 2006). Pode se propagar rapidamente em outras zonas devido a sua capacidade de flutuação conferida pela presença de vesículas de ar no talo.

As espécies do gênero *Sargassum* apresentam dominância por cobertura de áreas costeiras de substrato consolidado, tanto em áreas tropicais, quanto subtropicais, muitas vezes formando os chamados bancos de *Sargassum* (De Wreede, 1976; Széchy & Paula, 2000). Trabalhos realizados na costa brasileira destacam espécies do gênero *Sargassum* como mais abundantes no limite inferior da região entremarés e no infralitoral de ecossistemas costeiros (Eston *et al.*, 1986; Paula & Eston, 1987; Paula, 1989; Eston & Bussab, 1990; Coimbra, 1998; Coimbra & Berchez, 2000; Széchy & Paula, 2000; Széchy *et al.*, 2006; Ghilardi *et al.*, 2006).

É importante ressaltar o papel ecológico destas algas como abrigo, proteção e recurso alimentar para diversas espécies marinhas (Mountouchet, 1979; Masunari, 1987; Silva-Dubiasky & Masunari, 1995, 2000; Haddad & Chiaverini, 2000; Széchy *et al.*, 2001). As espécies deste gênero são frequentemente consideradas como hospedeiras, pois a sua ocorrência disponibiliza micro-habitats para diversas outras algas e componentes da fauna marinha (hidrozoários, anfípodos, copépodos, entre outros).

Outro aspecto de grande relevância ecológica neste gênero refere-se à atuação de metabólitos secundários produzidos por estas algas, os quais reduzem a palatabilidade das algas para os herbívoros. Porém, os estudos realizados com as espécies de ocorrência na costa brasileira reportam baixos teores de polifenóis (Coimbra, 2006). O potencial econômico do gênero *Sargassum* deve-se ao seu uso como fonte de alginato, um ficocolóide encontrado na parede celular de algumas algas pardas. Este ficocolóide apresenta ampla utilização

comercial, sendo aproveitado nas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica, como espessante e emulsificante (Oliveira Filho & Paula, 1979). No âmbito alimentar, pode-se citar uma diversidade de produtos em que o uso deste ficocolóide incrementa o valor comercial dos mesmos.

Dentro do gênero, a espécie *Sargassum cymosum* C. Agardth (Figura 1) destaca-se pela importância ecológica nos ecossistemas costeiros, particularmente nas comunidades de costões rochosos, que abrigam um grande número de invertebrados marinhos juvenis. Esta espécie é encontrada principalmente em costões rochosos, exposta parcial ou completamente durante marés baixas. Em costões protegidos, formam populações densas de plantas bem desenvolvidas, com porções terminais flutuantes na superfície da água.

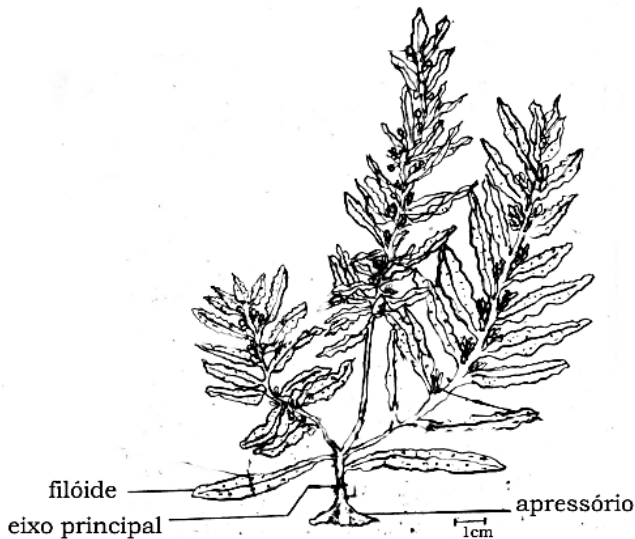


Figura 1. Detalhe dos espécimes de *Sargassum*. Baseado em Paula (1988).

Considerando a importância de *Sargassum*, a tabela 1 apresenta diferentes pesquisas realizadas no mundo e no Brasil com o gênero.

Tabala 1. Seleção de trabalhos com diferentes abordagens do gênero *Sargassum*

Referência	Espécie	Abordagem
Fourest & Volecky (1995)	<i>Sargassum fluitans</i> (Borgeren) Borgeren	Formação de complexos de metais pesados por biomassa seca
Costa <i>et al.</i> , (1997)	<i>Sargassum</i> sp.	Bioabsorção de zinco e cálcio
De Lara & Alvarez (1998)	<i>Sargassum</i> sp.	Atividade aglutinante de extratos
Yang & Volecky (1998)	<i>Sargassum</i> sp.	Bioabsorção de urânio
Széchy & Paula (1999)	<i>Sargassum</i> sp.	Descrição da estrutura biológica dos bancos. (São Paulo e Rio de Janeiro)
Jacobucci, & Leite (2002)	<i>Sargassum cymosum</i> C.Agardh	Estudo da distribuição na profundidade e flutuação sazonal da macrofauna associada (Ubatuba, São Paulo)
Mafra & Cunha (2002)	<i>Sargassum cymosum</i> C.Agardh	Quantificação de bancos e avaliação do rendimento da alga em alginato.
Davis <i>et al.</i> , (2003)	<i>Sargassum</i> sp	Comparação de seis diferentes espécies não vivas com base no seu equilíbrio de absorção de Cd e Cu
Silva (2003)	<i>Sargassum</i> SP	Estudo da absorção de dois íons de metais, Cr (III) e Cu (II), em componentes únicos e binários
Yabur <i>et al.</i> , (2006)	<i>Sargassum sinicola</i> Setcheil & N.L.Gardner	Extração de alginato e utilizado como matéria prima para a co-immobilização da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>
Mesquita-Viera <i>et al.</i> , (2006)	<i>Sargassum filipendula</i> C.Agardh	Bioabsorção de chumbo
Zahra <i>et al.</i> , (2007)	<i>Sargassum boveanum</i> J.Agardh	Preparação extratos de água e etanol para obtenção de compostos fenólicos

1.3 Diminuição da camada de ozônio (O3) e aumento da radiação ultravioleta (UV)

O ozônio (O3) compõe a atmosfera em quantidades mínimas (uma molécula de ozônio para 2,5 milhões de moléculas presentes na atmosfera), concentrando-se principalmente na estratosfera, entre 15 a 25 km acima da superfície terrestre. Esta região é conhecida como ozonoesfera, sendo responsável pela absorção de parte da radiação UV solar incidente. O ozônio é formado constantemente na estratosfera e corresponde à união química de uma molécula de O2 com um átomo de oxigênio, este último proveniente da foto dissociação do O2 por um fóton de radiação UV com comprimento de onda inferior a 242 nm (Okuno *et al.*, 1996).

No que se refere à influência antrópica sobre a camada de ozônio, sabe-se que a produção de compostos com cloro (metilclorofórmio, halons e clorocarbonados) tende a reagir com a molécula de ozônio, decompondo-a, resultando na sua diminuição o que leva a um aumento da radiação UV que atinge a superfície terrestre. Estes compostos são estáveis e tem vidas atmosféricas suficientemente longas para ser transportadas pelo vento dentro da estratosfera. Quando essas substâncias que diminuem a camada de ozônio (*ODS da sigla em inglês Ozone-depleting substances*), são rompidas na atmosfera, liberam cloro ou bromo, os quais atacam o ozônio. Cada átomo de cloro ou bromo reage com o ozônio, se combinando repetidamente com ele e quebrando cerca de 100.000 moléculas de ozônio durante sua vida estratosférica (EPA, 2010).

Os altos níveis de radiação ultravioleta UV podem ser danosos aos organismos marinhos, especialmente às algas bentônicas. Estas ficam expostas à radiação por períodos prolongados durante horas de maré baixa por estarem fixas e restritas ao seu local de crescimento. O risco da ocorrência de efeitos prejudiciais aumenta quando as algas recebem níveis elevados de radiação ultravioleta UV nos meses de primavera-verão na Antártica e parte da América do Sul (Cabrera *et al.*, 1995).

O impacto do aumento da radiação ultravioleta na superfície da Terra tem sido investigado por vários grupos de pesquisadores, avaliando-se o efeito natural e artificial dessa radiação no crescimento e nos demais aspectos fisiológicos dos organismos fotossintetizantes (Schmidt *et al.*, 2009).

Os efeitos danosos da radiação ultravioleta seriam causados principalmente pela radiação UVB. A radiação UVA, que atinge a

superfície da Terra em quantidade comparativamente maior do que a UVB contribuiria para processos de reparo dos danos causados pela UVB (Britt, 1995).

O processo relacionado aos efeitos biológicos da radiação ultravioleta é iniciado com a absorção fotoquímica por parte de biomoléculas importantes. A energia contida num fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda, podendo ser suficiente para quebrar ligações químicas. Fótons altamente energéticos da faixa da radiação ultravioleta podem ser absorvidos por ácidos nucleicos, lipídios, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (Diffey, 1991; Franklin & Forster 1997). São relatados efeitos negativos da radiação ultravioleta nos organismos, particularmente quando absorvidos pelos ácidos nucleicos e proteínas, os quais podem ocasionar fotooxidação e mudanças conformacionais destas moléculas que resultam em várias alterações metabólicas vitais como a transcrição, duplicação de DNA e tradução (Lao & Glazer, 1996; Buma *et al.*, 2000).

Além disto, a biologia e fisiologia celular também podem ser afetadas, conduzindo à crescente mortalidade (Franklin & Forster, 1997). A radiação ultravioleta no meio ambiente, particularmente UVB, é a chave de muitos efeitos deletérios em processos biológicos (Worrest, 1982), como a fotossíntese e crescimento de plantas terrestres (Tevini & Teramura, 1989) e fitoplâncton (Bühlmann *et al.*, 1987), absorção de nitrato em diatomáceas (Döhler & Biermann, 1987), locomoção em protistas (Häder & Häder, 1988), crescimento e fotossíntese em culturas de zooxantelas (Jokiel & York, 1982; Lesser & Shick, 1989), e crescimento de macroalgas (Wood, 1987; Schmidt *et al.*, 2009) e pode ter um impacto significativo para as macroalgas que resulta em uma série de efeitos biológicos em níveis moleculares, celulares, individuais e de comunidade.

A expressão mais comum do estresse físico causado pela alta radiação solar e a temperatura sobre os organismos fotossintetizantes é a formação elevada e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas naturalmente por todas as células como produto de processos oxidativos biológicos e a partir de compostos endógenos. Mas, também, podem ser estimulados por diversos fatores externos, gerando assim diferentes radicais livres (Suganthy *et al.*, 2010). Níveis basais e homeostáticos de EROs são essenciais para o controle (por indução ou repressão) dos diferentes processos

metabólicos dos organismos e sob essas concentrações não causam danos celulares. Níveis tóxicos e danosos são alcançados quando os sistemas de controle antioxidativos não conseguem neutralizar esses radicais e começam a se acumular em concentrações prejudiciais para as células. Consequentemente, a capacidade para reduzir o estresse oxidativo define a maior parte dos mecanismos de tolerância exibidos pelas macroalgas que habitam a região entremarés (Collen e Davison, 1999; Aguilera *et al.*, 2002; 2002; Choo *et al.*, 2005; Rautenberger e Bischof, 2006; Cruces, 2013).

No que tange à fotossíntese, este processo é potencialmente prejudicado depois da exposição à radiação ultravioleta UVB devido ao dano à proteína D1 (Vass, 1997) ou para a enzima Rubisco (ribulose 1,5-bifostato carboxilase), ou perda de pigmentos (Bischof *et al.*, 2000), como também a redução na expressão dos genes (Lütz *et al.*, 1997; Holzinger *et al.*, 2004).

Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de radiação UV é a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como as substâncias fenólicas e aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). Alguns estudos (Talarico, 1996; Talarico & Maranzana, 2000, Schmidt *et al.*, 2009) sugerem que o espessamento da parede celular seja também um mecanismo de defesa à exposição de radiação UV. Outros estudos apontam alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias (Poppe *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2006, Bouzon *et al.* 2012). Estudos realizados por Schmidt *et al.*, (2009) em duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *Kappaphycus alvarezii* apontam alterações ultraestruturais nos cloroplastos, a formação de corpos membranosos com membranas concêntricas, aumento no número de ribossomos livres, aumento de plastoglóbulos no interior dos cloroplastos e diminuição na quantidade de grãos de amido das florídeas. Também neste estudo e no de Zaremba *et al.*, (1984) foi verificado o aumento da espessura da parede celular após a exposição à radiação UVB.

1.4 Estudos dos efeitos da radiação UV e estratégias de defesa nas algas pardas.

O grupo das algas pardas tem desenvolvido uma série de compostos (metabolitos secundários) que participam em diversos processos biológicos, chamados compostos fenólicos encontrados dentro

de vesículas conhecidas como fisóides. Estes são cruciais para muitos aspectos da vida das algas. Eles podem desempenhar um papel estrutural em diferentes tecidos de suporte ou de proteção contra UV, podem estar bloquear a poliespermia e se ligar a metais. Recentemente, os compostos fenólicos têm sido estudados devido a possíveis interações com polissacarídeos da parede celular. Entretanto, existem poucas evidências sobre estas interações e sua influência em processos fisiológicos (Pessoa, 2012).

Porém, a maioria das pesquisas relacionados com os danos causados por UV tem como foco as espécies de algas pardas que habitam nas zonas do Ártico e da Antártica e principalmente, muitos desses estudos estão direcionados aos diferentes estágios no processo de desenvolvimento dos zigotos. Hanelt *et al.* (1997) estudaram no campo a influência da radiação UV na fotossíntese de algas do Ártico. Foi observada a variação na sensibilidade da fotossíntese de macroalgas coletadas em diferentes profundidades no fiorde Kongsfjord de Spitsbergen em experimentos de campo sob índices equilibrados de UV/PAR, expostas a diferentes faixas espectrais de radiação UV solar natural. Foi observado que a radiação UV atrasa o processo de recuperação da fotoinibição, que é induzida principalmente por PAR. Bischof *et al.*, (1998) estudaram a inibição e recuperação da fotossíntese em macroalgas de diferentes profundidades após a transferência para tratamentos de radiação PAR, UVA e UVB com taxas controladas de fluxo. Os resultados demonstram que as macroalgas podem se aclimatar efetivamente quando expostas a altos níveis de irradiância, tanto fotossinteticamente ativa como radiação UV.

O estudo realizado por Aguilera *et al.*, (1999) teve como objetivo investigar as alterações no crescimento, produção fotossintetizante de oxigênio e no consumo de oxigênio por respiração de macroalgas coletadas em Spitsbergen (Noruega) e subsequentemente expostas a radiação solar natural e tratamentos com taxas de radiação UV artificial. Wiencke *et al.*, (2000) estudaram o impacto da radiação UV sobre a viabilidade, características fotossintetizantes e DNA de zoósporos em quatro espécies de algas pardas: *Laminaria saccharina* (Linnaeus) J.V Lamouroux, *L. digitata* (Hudson) J.V Lamouroux, *Alaria esculenta* (Linnaeus) Greville e *Chordaria flagelliformis* (O.F Muller) C. Agardh.

Em geral, zoósporos expostos a PAR+UVA+UVB apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas que os expostos a PAR+UVA ou PAR. Em *Fucus serratus* Linnaeus, tem sido reportado que a redução do crescimento está relacionada como a fase de desenvolvimento do zigoto, mostrando um efeito mais forte quando é usada radiação UVB (*versus* UVA), num período de tempo de 5-10 horas após a fertilização, o que sugere que o processo de polarização pode ser a fase mais sensível do desenvolvimento à radiação UV (Altamirano *et al.*, 2003). Henry e Alstynne (2004), testaram o efeito de níveis ambientais de UV-B e UV-A no crescimento e na produção de florotaninos em juvenis e embriões estabelecidos de *Fucus gardeneri* Silva, em 4 tratamentos de luz. Após um período de três semanas, o tratamento com UV-B inibiu o crescimento, enquanto, o tratamento com UV-A ajudou no aumento nos embriões, porém o crescimento nos juvenis não foi afetado. Foi concluído que os embriões *F. gardeneri* são susceptíveis à luz UV, mas desenvolvem uma tolerância (aumento de florotaninos) enquanto passavam pelo processo de maturação. Roleda *et al.*, (2006) estudaram o impacto da radiação UV sobre a estrutura celular, compostos que absorvem UV, fotossíntese, dano no DNA e germinação de zoósporos na alga *Saccorhiza dermatodea* (Bachelot de la Pylaie) J. Agardh. Os resultados deste estudo mostraram que o impacto da radiação UV sobre as células reprodutivas podem ser mitigados por meio de mecanismos de proteção e reparo. Salgado *et al.*, (2007), investigaram as interações entre os compostos fenólicos de *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonder e os alginatos e a influência destas interações na capacidade de absorção de UV pelos compostos fenólicos. Foram utilizadas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas para o isolamento, a caracterização e a determinação da capacidade de absorção de UV dos compostos estudados. A capacidade de absorção de UV dos compostos fenólicos ligados aos alginatos foi mantida por um tempo mais longo do que a do extrato de compostos fenólicos puros. Os resultados obtidos demonstram que há uma forte ligação entre compostos fenólicos e alginatos e que estas ligações preservam a capacidade de absorção de UV dos compostos fenólicos ao longo do tempo. Holzinger *et al.*, (2011), avaliaram esporófitos férteis de *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E.Lane em relação a sua sensibilidade a radiação ultravioleta. O efeito negativo da radiação UV foi mais evidente nos cloroplastos do tecido vegetativo comparado com o tecido reprodutivo. Mesmo sendo observado um aumento dos fisóides no tecido vegetativo,

este não contribuiu uma proteção contra fotoinibição da fotossíntese quando tratadas com radiação UV.

Xia *et al.*, (2012), estudaram o efeito da radiação UV-B nas atividades das enzimas de estresse oxidativo, tais como: glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST) em *Sargassum thunbergii* (Mertens ex Roth) Kuntze. Os dados obtidos neste estudo, indicam que *S. thunbergii*, carece de tolerância contra doses relativamente altas de radiação UV-B, embora as enzimas relacionados a GSH poderiam ter um papel importante contra o dano oxidativo causado pela radiação.

Harnita *et al.*, (2013), examinaram a atividade antioxidante de extratos naturais de florotaninos (PFSH) provenientes da alga parda *Sargassum hystrix v. buxifolium* Chauvin, através da peroxidação lipídica induzida pela radiação UV. Cruces *et al.*, (2013), avaliaram os efeitos interativos da radiação UV e temperatura, em relação á fotossíntese, indução de florotaninos e a atividade antioxidante das algas pardas *Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent e *Durvillaea antarctica* (Chamisso) Hariot. As aproximações experimentais foram baseadas em exposições a radiação solar natural para determinar a extensão da fotoinibição dos florotaninos e nas exposições contínuas com radiação UV-B no laboratório para determinar a diminuição no desempenho fotossintético.

1.5 Efeitos da salinidade sob as algas

A flutuação da salinidade em ambientes marinhos é outro fator que pode ter um efeito deletério sobre os organismos aquáticos. Condições hiper/hiposalinas podem ocorrer devido à evaporação, ou excesso de precipitação. Os dados apresentados no Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) demonstraram que mudanças na precipitação têm acontecido. Na América do Sul, essas mudanças incluem um aumento das chuvas no sudeste do Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e em algumas partes da Bolívia (Schermer *et al.*, 2012). Os aumentos de precipitação em áreas costeiras e bacias de drenagem podem levar a um maior volume de água doce em direção ao mar, e diminuindo a salinidade pode aparecer ao longo da costa (Schermer, 2012). As mudanças da salinidade podem levar a alterações ecológicas em comunidades de algas, ocasionando perda da riqueza e a alteração na distribuição das espécies (Martins, 1999; Wilkinson *et al.*, 2007; Steen, 2004; Wilkinson *et al.*, 2007, 2009). As mudanças de salinidade podem afetar aos organismos de três maneiras: (a) estresse osmótico com um impacto direto sobre o potencial hídrico celular, (b)

estresse iônico (sal) causado pela absorção ou perda de íons, que ao mesmo tempo é uma parte da aclimação, (c) a mudança das relações iônicas celulares, devido à permeabilidade iônica seletiva da membrana (Kirst, 1989).

A salinidade assim como a radiação UV, faz com que o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) sejam amplificados (Ledford & Niyogi, 2005). Portanto, sob estresse salino, as algas aumentam as concentrações de enzimas antioxidantes e ficobiliproteínas ao mesmo tempo em que pode ocorrer uma redução do crescimento. Muitos processos fisiológicos das algas pardas podem ser afetados por esta variação, por exemplo, em *Sargassum muticum* foi relatado mudanças nos padrões de reprodução (Norton, 1996; Hales, 1990). Em *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* e *Fucus serratus* foram observadas alterações nas taxas de crescimento (Gordillo, 2002). Outros aspectos, tais como conteúdo de compostos fenólicos de *Fucus ceranoids* Linnaeus (Munda, 1964) e teor de manitol em *F. serratus* e *F. vesiculosus* (Munda, 1977; Gylle, 2009) foram reportados. Karsten *et al.*, 1991 avaliaram a tolerância à salinidade das macroalgas *Ulothrix implexa*, *Ulothrix subflaccida*, *Enteromorpha bulbosa* e *Acrosiphonia arcta*. Após a incubação em condições hipersalinas, todas as espécies apresentaram uma forte redução das taxas de crescimento e fotossintéticas.

1.6 Justificativa

Os ecossistemas aquáticos são os componentes principais do planeta Terra, e são responsáveis por mais de 50% da produção do oxigênio atmosférico e pela incorporação da mesma quantidade de CO₂ atmosférico que os ecossistemas terrestres (Zepp *et al.*, 2007). Os produtores primários em ecossistemas marinhos e de água doce constituem a base das cadeias alimentares, fornecendo energia para os consumidores primários e secundários.

A exposição à radiação solar UV pode reduzir a produtividade, afetar a reprodução e desenvolvimento e aumentar a taxa de mutação em fitoplâncton, macroalgas, ovos e estágios larvais de peixes e outros animais aquáticos. As consequências da diminuição da produtividade são uma capacidade de absorção reduzida para o dióxido de carbono atmosférico e efeitos negativos sobre a diversidade de espécies, a

estabilidade do ecossistema, interações tróficas e, finalmente, os ciclos biogeoquímicos globais.

Muitos processos de vida de produtores primários marinhos são afetados pela radiação UV a partir do nível de moléculas até o nível comunidades. Danos de biomoléculas como o DNA e proteínas, a supressão da fisiologia e metabolismo das algas, e mudanças na estrutura das comunidades marinhas tem sido reportada; e estas alterações podem afetar a divisão celular, a mortalidade e consequentemente, a produtividade marinha (Hader *et al.*, 1998). Em Santa Catarina, foi constatado que no decorrer dos últimos anos, a incidência da radiação ultravioleta aumentou consideravelmente (Hader *et al.*, 2007).

Baseado no antecedente descrito, propusemos analisar neste projeto os efeitos da radiação sobre parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos da macroalga *Sargassum cymosum* como modelo de organismos vegetais. Desta forma foi possível verificar as alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas e decorrentes da radiação UV e diferentes salinidades. O presente trabalho poderá servir também como parâmetro para possíveis cultivos de *S. cymosum*, bem como fonte de dados para outras pesquisas relacionadas à ultraestrutura, bioquímica e a fisiologia de algas com os tratamentos acima citados.

Com os antecedentes descritos, o presente estudo amplia os conhecimentos das possíveis alterações da macroalga *S. cymosum*, que é uma macroalga de importância econômica e ecológica, fonte de ficocolóides amplamente utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos. Consequentemente esse trabalho visa à produção de um modelo de estudo, tendo em vista os escassos conhecimentos referentes às alterações celulares decorrentes de impactos ambientais por radiação ultravioleta na região sul do Brasil.

1.7 Hipóteses

- A exposição à radiação ultravioleta e salinidade devem alterar os processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (fotossíntese, respiração, conteúdo pigmentar e enzimático) da espécie de *Sargassum cymosum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as alterações da radiação ultravioleta (PAR+UVA, PAR+UVB, PAR+UVA+UVB) e das diferentes salinidades (30, 35, 40 ups) na bioquímica, na fisiologia, na morfologia e na organização celular da macroalga *Sargassum cymosum* avaliando os mecanismos de fotoaclimatação e fotoproteção.

2.2 Objetivos específicos

Determinar e comparar as taxas de crescimento na macroalga, *S. cymosum* após o cultivo com a radiação UV (PAR+UVA, PAR+UVB, PAR+UVA+UVB) e salinidade (30, 35, 40 psu);

Analisar as alterações ultraestruturais causadas pela a radiação UV e diferentes salinidades nas porções vegetativas de *S. cymosum* em especial na organização de cloroplastos e mitocôndrias;

Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e clorofila *c*) após a exposição à radiação UV e diferentes salinidades;

Determinar as concentrações de carotenoides e fenólicos após a exposição à radiação UV e diferentes salinidades;

Determinar atividade antioxidante de extratos organosolventes após o cultivo com radiação UV e diferentes salinidades;

Determinar o conteúdo protéico total e as atividades da enzima mitocondrial NADH desidrogenase após a exposição à radiação UV e diferentes salinidades;

Avaliar o efeito da radiação UV na eficiência fotossintética e no transporte de elétrons após a exposição com radiação UV e diferentes salinidades;

Analisar o perfil metabólico, via espectroscopia vibracional de infravermelho médio transformada de Fourier (FTIR), com ênfase em compostos lipídicos, protéicos, glicídicos (amido) e fenólicos;

Avaliar o conteúdo de Poliaminas: Putresina, Cadaverina, Espermidina e Espermina da alga *S. cymosum* após a exposição com radiação UV e diferentes salinidades.

Avaliar o conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) da alga *S. cymosum* após a exposição com radiação UV e diferentes salinidades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e processamento do material biológico

Para avaliar os efeitos da radiação ultravioleta em *Sargassum cymosum*, as amostras destas algas foram coletadas na praia Armação (Figura 2), Ilha de Santa Catarina-Florianópolis (27°44'38"S e 48°30'16"W). Nos meses de Novembro e Dezembro de 2012 e Janeiro e Fevereiro de 2013.

Talos das algas foram transportados em recipientes plásticos contendo água do mar, posteriormente colocados em sacos pretos e recipientes contendo gelo para evitar que ocorra fotooxidação. No Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), da UFSC, os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada, e removidos os contaminantes.



Figura 2. A. Mapa do local de coleta. Armação, Ilha de Santa Catarina-Florianópolis, Brasil; B-C-D. Detalhe do local de coleta (costa rochosa).

3.2 Condições de cultivo

A irradiância fotossinteticamente ativa ao dia foi de 80 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Li-cor light meter 250, Estados Unidos de América, EUA) com uma temperatura de 24 °C (± 2 °C) e o fotoperíodo de 12 h, sendo que o período de luz inicia às 8 h da manhã, com aeração contínua. A água do mar utilizada foi esterilizada em banho-maria por 1

hora. Após seu completo resfriamento, essa água foi enriquecida com o meio *von Stosch* (Edwards, 1970). As plantas foram mantidas em cultura por 2 a 3 semanas para a aclimatação às condições do laboratório de cultura. Os segmentos apicais com peso de aproximadamente 2.00g (± 0.05 g) de *S. cymosum* foram cultivados em béqueres de 600 mL no laboratório em câmara de cultivo por um período de 7 dias, tanto o controle (sem radiação UV, somente a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) quanto os tratamentos (com radiação UVA+PAR, UVB+PAR e UVA+UVB+PAR). Porções apicais saudáveis foram selecionadas e cultivadas em 500 mL água do mar esterilizada em meio *von Stosch* (50%), salinidade de 34 ups (± 1 ups) (unidade padrão de salinidade). A radiação ultravioleta artificial foi fornecida pela lâmpada (Vilber Lourmat VL-6LM, França), que emite o comprimento de ondas de 312 nm (UVB) e 365 nm (UVA) e irradiância de 0.35 Wm⁻² e 0.70 Wm⁻² respectivamente, e possui acoplado um filtro para os demais comprimentos de onda. As doses totais de irradiância PAR, UVA e UVB foram: 657.40 k.J m⁻², 7.56 k.J m⁻², 3.78 k.J m⁻² respectivamente. As plantas foram cultivadas em diferentes salinidades de 30, 35 e 40 ups (unidade padrão de salinidade) para cada tratamento diferente. A exposição à radiação ultravioleta foi de três horas por dia (iniciando às 12:00 h e terminando às 15:00 h). Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento (n=4). Durante a exposição, a aeração foi aumentada nos tratamentos e nos controles para que os fragmentos movimentam-se de forma constante, com a finalidade de expor a todos os ramos a radiação. Foi realizado um rodízio aleatório dos béqueres para que todos os eles recebam a mesma intensidade luminosa. Concomitante à radiação UV, as plantas receberam a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), através das lâmpadas fluorescentes (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil).



Figura 3. Desenho experimental de *S. cymosum*. Observe as 4 réplicas utilizadas para cada tratamento com radiação UV e salinidade.

Durante os períodos de exposição, a câmara de cultivo contendo a lâmpada emissora de radiação UV, foi isolada externamente com plásticos transparentes espessos de forma que a mesma ficou restrita aos tratamentos. As plantas controle também foram submetidas às mesmas condições, exceto pela ausência da emissão da radiação UV.

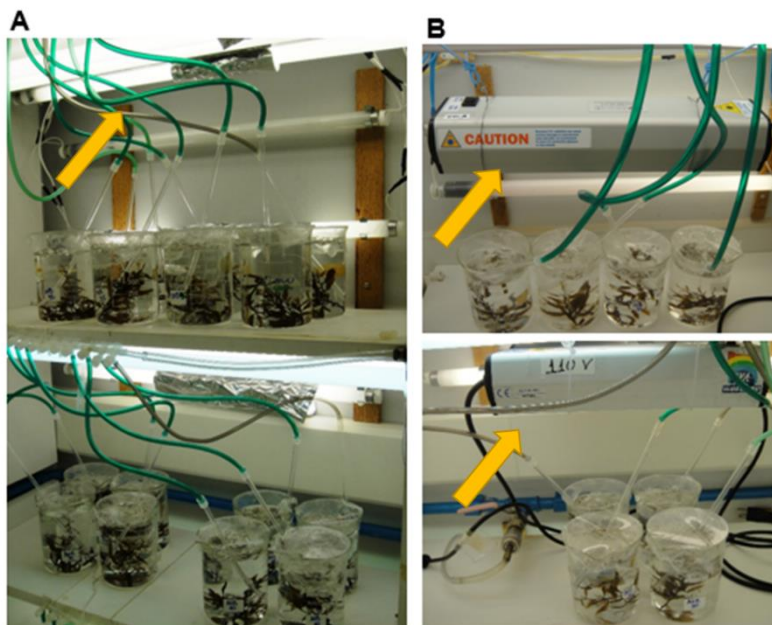


Figura 4. Exposição de amostras de *S. cymosum*. A. Note as lâmpadas fluorescentes da radiação fotossinteticamente ativa (PAR, seta); B. Observe a lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM geradora da radiação ultravioleta (setas).

3.3 Efeitos da radiação UV no crescimento de segmentos apicais dos controles e dos expostos

O efeito da radiação UV no crescimento de segmentos apicais da macroalga *S. cymosum* foram avaliados através de medidas de peso da matéria fresca. As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da biomassa fresca e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculadas segundo a fórmula de Penniman *et al.*, 1986:

$$\text{TCM} = [(Mf / Mi) 1/t - 1] * 100$$

Taxa de crescimento (Tcm) % dia⁻¹
 Massa final (Mf) em gramas
 Massa inicial (Mi) em gramas
 Tempo (t) em dias

3.4 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras provenientes dos expostos à radiação ultravioleta e dos controles foram armazenadas em nitrogênio líquido. As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Itacorubi-Florianópolis) do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

3.4.1 Extração e Dosagem de Clorofila *a* e *c*

A extração de clorofila *a* e *c* dos talos foram realizadas utilizando o método de Hiscox e Israelstam (1979). A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 1g de massa fresca para cada repetição. A determinação da concentração de clorofila *a* e *c* foram feitas utilizando-se a equação descrita por Jeffrey e Humphrey (1975).

3.4.2 Extração de carotenóides totais

Os carotenóides foram extraídos, fazendo uma extração exaustiva a partir de amostras de aproximadamente 1 g de massa fresca (n=4) utilizando 10 ml de metanol P.A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os extratos metanólicos foram evaporados para concentrá-los. A absorvância específica foi determinada através do espectrofotômetro de microplaca Tecan (Infinite® M200 PRO, Männedorf, Suíça) a 450 nm. As concentrações totais de carotenóides foram calculadas baseado na curva padrão de β -caroteno ($1 - 300 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0.00365x$; $r^2 = 0.999$).

3.4.3 Extração de compostos fenólicos

A análise dos compostos fenólicos foi realizada usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu baseado em Waterman e Mole (1994). Os compostos fenólicos foram extraídos a partir de amostras de aproximadamente 400 mg de massa (n=4) usando 4mL de metanol 80%. Os extratos foram centrifugados durante 10 min a 750 g. Alíquotas de 50 ml provenientes do sobrenadante dos extratos foram adicionadas a uma solução concentrada de 180 mL de água destilada, 10 mL de Folin e 30 ml de carbonato de sódio 20 % (Na_2CO_3) e incubados durante a hora a temperatura ambiente. A absorvância da reação foi

medida a través do espectrofotômetro de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China) a 750 nm. O fluroglucinol (Sigma, P3502) foi usado como um padrão em concentrações de 4 a 20 $\mu\text{ mL}^{-1}$. Os compostos fenólicos excretados pela alga durante o experimento na água do mar, também foram avaliados medindo o espectro de absorvância (300-700) do cultivo de água do mar filtrado para cada tratamento (n=4).

3.4.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

3.4.4.1 Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A fim de avaliar a capacidade antioxidante, o extrato metanólico foi submetido ao teste do DPPH, que se baseia na remoção deste radical estável do meio de reação pela ação dos antioxidantes presentes na amostra. O método utilizado foi o descrito por Kuhnén *et al.*, (2009).

Uma alíquota de 2.9 mL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida a 0.1 mL da amostra (em metanol 80%). O decréscimo da absorvância em 517 nm foi medido em espectrofotômetro (Hiatachi U-1800) após 30 minutos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade do sequestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

% de inibição: [(Abs controle - Abs final da amostra) / Abs controle] x 100

3.5. Processamento para análise em microscopia

3.5.1 Microscopia de luz (ML) e citoquímica

Os materiais tratados e os controles foram processados para análises citoquímica e morfológica. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, durante 6 a 8 h, à temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca, seguido da desidratação em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes, com duas trocas de 15 minutos em cada concentração à temperatura ambiente. A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante 4 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. As amostras foram seccionadas em

micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 5 μ m foram distendidas em placa de Petri com água à temperatura ambiente, coletados com lâminas de vidro ou coletados nas lâminas sobre gotas de água destilada e secos em estufa a 37°C por 30 minutos.

3.5.2 Citoquímica

O material foi submetido ao seguinte teste histoquímico:

A) Azul de toluidina (AT-O). Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3.0, por 30 segundos a 2 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar (Gordon & McCandless, 1973).

3.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras provenientes dos expostos à radiação ultravioleta e os controles foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 %, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio a 5 mM, tamponada com cacodilato 0.075 M (pH 7,2). A pré-fixação foi realizada em overnight na geladeira. A pré-fixação foi seguida por três lavagens, no mesmo tampão. Depois das lavagens os espécimes foram pós-fixados em OsO₄ (tetróxido de ósmio) a 1% em tampão cacodilato 0.075M, pH 7.2, durante 4 h à temperatura ambiente (Pueschel, 1979).

Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,075M, pH 7,2 (30 minutos cada lavagem) em seguida lavado em água destilada (30 minutos) e desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona, sendo 30 minutos em cada etapa; na última série de acetona 100% trocada três vezes. Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969).

A infiltração foi realizada em 7 etapas, durante 4 dias em resina Spurr diluída em acetona em concentrações crescentes. O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70° C por 24 h. As secções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico

de transmissão modelo Jeol (JEM)1011 no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-LCME da UFSC.

3.6 Medida In vivo da fluorescência da clorofila a

O desempenho fotossintético foi estimado como fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II (FSII) *in vivo* usando um fluorímetro portátil de modulação de pulsos PAM- 2500 (Walz, Alemanha). Este procedimento foi realizado duas vezes: após 7 dias de exposição à radiação UV e diferentes salinidades; e após em período de aclimação de 24h em luz PAR e salinidade de 35 ups. O rendimento quântico máximo (F_v / F_m) foi medido adaptando as algas a 10 min no escuro e calculado de acordo com Schreiber *et al.*, (1986). O rendimento quântico efetivo ($Y(II)$) foi medido a partir de algas adaptadas a luz e calculado de acordo com Schreiber e Neubaer (1990). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi estimada através de curvas de fotossíntese - irradiância (PI) de talos irradiados com sete intensidades crescentes de irradiância actínica de PAR (E; 0, 24, 61, 108, 236, 456, e 752 mol fótons $m^{-2} s^{-1}$) fornecida pelo dispositivo de PAM e calculada como $ETR = Y(II) * E * A * 0,8$, onde A é a absortância do talo e 0,8 é a fração de clorofila associada ao FSII (Grymski *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 2003). A absorção foi determinada situando as algas em um sensor de PAR (LI-COR Quantum LI -1000, EUA), medido com um medidor de luz PAR (LI-COR LI -250, EUA), e calculando a transmissão de luz como $A = 1 - (E_t / E_o)$, onde E_t é a irradiância abaixo da alga (luz transmitida) e E_o é a irradiância inicial. A partir das curvas P-I foi determinada o ETR fotossintético como taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max} , ETR máxima a irradiância saturada), eficiência fotossintética (α , declive inicial da curva P-I que indica a eficiência do transporte de elétrons), a saturação da luz (I_k , a intensidade da luz da aproximação no início da saturação fotossintética) e fotoinibição (β , declive inicial da curva P-I no final da fase de saturação), encaixando as curvas P-I para um modelo de tangente hiperbólica com o parâmetro de fotoinibição de Platt *et al.*, (1980). Quatro réplicas foram usadas para estimar cada parâmetro.

3.7 Quantificação tecidual de carbono, Hidrogênio e nitrogênio

A quantificação tecidual de CHN foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da USP utilizando o analisador de elementos CHN Perkin Elmer (EUA) modelo 2400. Amostras de *S.*

cymosum foram secas em estufa até massa constante e trituradas (1 mg) foram carbonizadas a 926°C em presença de oxigênio puro, promovendo a completa oxidação da matéria. Todo o carbono das amostras foi convertido em gás carbônico (CO₂), o hidrogênio em água (H₂O) e o nitrogênio formou vários óxidos (N_xO_x), que em seguida foram reduzidos para gás nitrogênio (N₂). Esses elementos resultantes da combustão foram arrastados por gás hélio até uma coluna cromatográfica de redução (a 640°C), que separa os produtos e os detecta por condutividade térmica. Os resultados dessas análises foram calculados de acordo com o percentual dos elementos obtidos na análise CHN e expressos em miligramas por grama de massa seca (mg.g MS⁻¹).

3.8 Análises bioquímicas

As extrações foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas. As análises foram realizadas em quadriplicatas. Amostras das amostras provenientes dos expostos à radiação ultravioleta e dos controles foram homogeneizadas em tampão fosfato 20 mM, pH 7.4 e centrifugadas a 1.000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e utilizado para determinação dos níveis protéicos.

3.8.1 Preparação das amostras para avaliação da atividade do complexo da cadeia respiratória

Amostras dos controles e dos tratamentos das macroalgas foram homogeneizadas em 10 volumes de 50 mM de tampão fosfato pH 7.4, contendo 0.3 M de sacarose, 5mM de MOPS, 1mM de EGTA e 0.1% de soro de albumina bovina. Os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 xg por 10 min a 4 °C: o precipitado foi descartado e os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade da enzima NADH desidrogenase.

3.8.2 Determinação da atividade da enzima NADH desidrogenase

A atividade da enzima NADH desidrogenase foi avaliada a partir do sobrenadante, considerando a taxa de redução do ferricianeto NADH-dependente em 420 nm (1mm-1cm⁻¹) como, descrito previamente por Cassina & Radi (1996). O método descrito para determinar atividade da enzima NADH desidrogenase foi ligeiramente

modificado, como detalhado no manuscrito de Latini *et al.*, (2005). A atividade da enzima foi calculada como nmol/proteína/mg/minuto.

3.8.3 Determinação de succinate-2,6-diclorofenol (DCIP) oxidoreductase (complexo II)

A atividade da enzima de succinate-2,6-diclorofenol (DCIP) oxidoreductase (complexo II) foi determinada segundo o método de Fischer *et al.* (1985). O método descrito para determinar a atividade foi modificado ligeiramente conforme o detalhado por Latini *et al.* (2005). A atividade da enzima foi calculada como nmol/min/mg proteína.

3.8.4 Determinação de proteínas totais

Aproximadamente 200mg provenientes de amostras de algas do controle e tratadas foram maceradas e homogeneizadas em 600 μ l de tampão fosfato 50 mM pH 7.4 com nitrogênio líquido e sonicadas durante 5 min. Foi adicionado 25 μ L de butil hidroxitolueno (BHT) 10mM, homogeneizado durante 8 min e centrifugado a 5.000 \times g durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes de baixa velocidade (S1) foram separados e usados para avaliar o conteúdo de proteínas. A quantificação de proteínas totais presente nas amostras foi determinada utilizando a técnica de Lowry *et al.*, (1951).

3.9 Determinações Poliaminas Livres

A quantificação de poliaminas livres, foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da USP. As poliaminas putrescina (Put), cadaverina (Cad) espermidina (Spd) e espermina (Spm) foram determinados de acordo com os procedimentos descritos por Silveira *et al.*, (2004). Todas as manipulações foram realizadas a 4 ° C e as análises foram realizadas em triplicatas. As amostras (200 mg massa fresca) foram submersas em 3 ml de ácido perclórico 5% (v / v). Após 1 h, as amostras extraídas foram centrifugadas durante 20 min a 15000 \times g a 0 ° C. O sobrenadante contendo o PAs livres foi removido e os peletes foram re-extraídos. Os sobrenadantes foram combinados e os peletes eliminados. As poliaminas livres foram determinadas diretamente a partir do sobrenadante e foram derivadas com cloreto de dansilo composto por acetona a uma concentração de 5 mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 40 μ L de amostra foi adicionada a 100 μ L de cloreto de dansilo, 20 μ L diaminoheptano 0,05

mM e 50 μ L de carbonato de sódio saturado. As amostras foram incubadas no escuro durante 50 min a 70 ° C. Após 30 min de incubação, as poliaminas densiladas foram extraídas com 200 μ L de tolueno. A fase de tolueno foi recolhida e seca com nitrogênio líquido. As poliaminas densiladas foram dissolvidas em 200 μ L de acetonitrila. Vinte μ L de poliaminas densiladas foram separados com coluna de fase reversa C-18 em cromatografia Líquido de Alta Eficiência (HPLC), (Shimadzu Shin -pack CLC ODS, tamanho de partícula 5 μ m, Lx I.D 25 cm x 4,6 milímetros). O gradiente foi desenvolvido por mistura de proporções crescentes de acetonitrila absoluta a 10 % de acetonitrila em água (pH 3,5). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65 % durante os primeiros 10 minutos, de 65 a 100% entre 10 e 13 min e 100% entre os 13 e 21 min. O fluxo foi de 1 mL min a 40 ° C. O detector de fluorescência foi fixado a 340 nm (excitação). e 510 nm (emissão). Uma mistura de Put, Cad, Spd e Spm foi utilizada como padrão. Todos os reagentes e solventes de grau analítico utilizados na determinação PAs foram da Sigma-Aldrich ou Merck e foram utilizados ou preparados conforme o recomendado pelo produtor.

3.10 Espectroscopias vibracional de infravermelho médio transformada de Fourier (FTIR) e análise quimiométrica

A espectroscopia vibracional foi realizada na Central Analítica da USP. Amostras de algas frescas (1 g) foram secas a 45 ° C durante 24 h foram maceradas com cadinho até formar pó e utilizadas para confeccionar pastilhas de KBr, pra análise em espectroscopia de infravermelho (IR). FATR-FTIR espectros foram registrados entre 4,000 centímetros-1 e 400 cm-1 utilizando 64 varreduras com uma resolução de 4 cm-1, por um espectrômetro Bomem (MB-100) com um detector DTGS. Um espectro de fundo tinham sido previamente adquiridos, e as amostras (100 mg) foram espalhadas e medidas diretamente depois pressionando-os no cristal. Três espectros de repetição (128 scans co-adicionados antes da transformada de Fourier) foram recolhidas para cada amostra para um total de 130 espectros. Espectros foram normalizados, e a linha de base foi corrigida na região de interesse (3000 a 600 cm-1), traçando uma linha reta antes de melhoramento de resolução (k fator de 1,5), utilizando Fourier auto-deconvolution (Opus v 5.0, Bruker BioSpin).

3.11 Análise e interpretação dos dados

Os dados foram submetidos à Análise da variância-bifatorial ANOVA, considerando a exposição à radiação e níveis de salinidades como variáveis independentes. ANOVAs unifatoriais foram realizadas para avaliar o efeito isolado da radiação e ou salinidade e depois comparadas com o teste a posteriori de Tukey. Todas as análises serão realizadas no software Statistica (Release 10.0) considerando $p \leq 0.05$.

4. CAPÍTULO I: Repostas de fotoaclimação da macroalga parda *Sargassum cymosum* ao efeito combinado de radiação UV e salinidade: organização citoquímica e estrutural e desempenho fotossintético

Journal of Photochemistry and Photobiology

Early View (Online Version of Record published before inclusion in an issue)

Please cite this article as doi: 10.1111/php.12224

Publication History

Accepted manuscript online: 14 DEC 2013

Manuscript Accepted: 3 DEC 2013

Manuscript Received: 18 SEP 2013

Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance

Luz K. Polo^a, Marthiellen R. de L. Felix^a, Marianne Kreuzsch^b, Debora T. Pereira^b, Giulia B. Costa^b, Carmen Simioni^a, Luciane C. Ouriques^a, Fungyi Chow^c, Fernanda Ramlov^d, Marcelo Maraschin^d, Zenilda L. Bouzon^e & Éder C. Schmidt^{f*}

^aPlant Cell Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^bScientific Initiation-PIBIC-CNPq, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^cInstitute of Bioscience, Department of Botany, University of São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

^dPlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^eCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^fPostdoctoral Research of Postgraduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55 48 3721 5149

E-mail address: edcash@ccb.ufsc.br (E.C. Schmidt)

ABSTRACT

The photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* were studied to determine its cytochemical and ultrastructural organization, as well as photosynthetic pigments and performance. *S. cymosum* was cultivated in three salinities (30, 35 and 40 psu) under four irradiation treatments: PAR-only, PAR+UVA, PAR+UVB and PAR+UVA+UVB. Plants were exposed to PAR at $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PAR+UVB at 0.35 W m^{-2} and PAR+UVA at 0.70 W m^{-2} for 3 h per day during 7 days *in vitro*. Growth rate was not significantly affected by any type of radiation or salinity. The amount of pigments in *S. cymosum* was significantly influenced by the interaction of salinity and radiation treatments. Compared to PAR-only, UVR treatments modified the kinetics patterns of the photosynthesis/irradiance curve. After exposure to UVR, *S. cymosum* increased cell wall thickness and the presence of phenolic compounds. The number of mitochondria increased, while the number of chloroplasts showed few changes. Although *S. cymosum* showed insensitivity to changes in salinity, it can be concluded that samples treated under four irradiation regimes showed structural changes, which were more evident, but not severe, under PAR+UVB treatment.

Keywords: UV radiation, salinity, ultrastructural organization, photosynthetic performance, phenolic compounds.

RESUMO

As respostas da fotoaclimação da macroalga parda *Sargassum cymosum* foram estudadas para determinar sua organização ultraestrutural e citoquímica, assim como seus pigmentos e desempenho fotossintéticos. *S. cymosum* foi cultivada em três salinidades (30, 35 e 40 UPS) e quatro tratamentos de irradiação: controle, PAR+UVA, PAR+UVB e PAR+ UVA+UVB. As plantas foram expostas a PAR a $7 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, PAR + UVB a $0,35 \text{ W m}^{-2}$ e PAR+UVA a $0,70 \text{ W m}^{-2}$ por 3 horas diárias durante 7 dias *in vitro*. A taxa de crescimento não foi afetada significativamente pela radiação UV ou salinidade. A quantidade de pigmentos em *S. cymosum* foi significativamente influenciada pela interação entre salinidade e radiação. Comparado ao controle, os tratamentos com radiação UV modificaram os padrões de cinética da curva de fotossíntese/ irradiância. Após a exposição à radiação UV, *S. cymosum* aumentou a espessura da parede celular e a presença de compostos fenólicos. O número de mitocôndria aumentou, porém o número de cloroplastos mostrou poucas alterações. Embora *S. cymosum* mostrou insensibilidade a mudanças na salinidade, pode-se concluir que as amostras tratadas sob quatro regimes de irradiação apresentaram mudanças estruturais, que foram mais evidentes, mas não graves, quando tratadas com PAR+UVB.

Palavras-chave: radiação UV, salinidade, organização ultra-estrutural, desempenho fotossintético, compostos fenólicos.

5. CAPÍTULO II: Perfil metabólico da alga parda *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) sob condições de radiação UV e salinidade em laboratório: níveis de carbono e nitrogênio, proteínas, poliaminas, carboidratos, fenólicos e atividade da NADH desidrogenase e complexo II

Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions: carbon and nitrogen levels, proteins, polyamines, carbohydrates, phenolics and NADH dehydrogenase and complex II activities.

Luz K. Polo^a, Marthiellen R. L. Felix^a, Marianne Kreusch^b, Debora T. Pereira^b, Giulia B. Costa^b, Carmen Simioni^a, Roberta de Paula Martins^c, Alexandra Latini^c, Eny S. I. Floh^d, Fungyi Chow^e, Fernanda Ramlov^f, Marcelo Maraschin^f, Zenilda L. Bouzon^g & Éder C. Schmidt^{*h}

^aPlant Cell Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^bScientific Initiation-PIBIC-CNPq, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^cLaboratory of Bioenergetics and Oxidative Stress, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^dPlant Cell Biology Laboratory, Department of Botany, Institute of Biosciences, University of São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

^eLaboratory of Marine Algae, Department of Botany, Institute of Bioscience, University of São Paulo, 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

^fPlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^gCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

^hPostdoctoral Research of Postgraduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author: Tel: +55 48 3721 5149
E-mail address: edcash@ccb.ufsc.br (E.C. Schmidt)
E-mail address: luzkapologmail.com (L.K. Polo)

Abstract

The metabolic profile studied as carbon, hydrogen and nitrogen levels (CHN), protein contents, free polyamines (PAs), carbohydrates, phenolics and enzymatic activities of NADH dehydrogenase and complex II of the brown macroalga *Sargassum cymosum* was analyzed after seven days of laboratory cultivation in three salinities (30, 35 and 40 psu) and four irradiation treatments for 3 h per day: PAR-only (control; $70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), PAR+UVA (0.70 W m^{-2}), PAR+UVB (0.35 W m^{-2}) and PAR+UVA+UVB. Treatments showed variations on CHN levels, with significant reduction of C and H and non-evident trend for N, probably related to carbon nitrogen balance allocation for basic biological maintenance and stress defense metabolism. Three different PAs were detected (PUT, SPD and CAD), its level showed reduction probably due to the amount of PAR used during experiment, PAs bounded to phenolic compounds migrating through the cell wall and being degraded and chlorophyll degradation. It can be concluded that *S. cymosum* is less affected to changes in salinity than when treated with UVR. Further studies are required for better understanding of variations in PAs under stress conditions. Distinct metabolic profiles were detected through ATR-FTIR/PCA, mostly as metabolism of carbohydrates, proteins and phenolics. The starchy fraction of the algae revealed sensibility to the treatments, showing difference in their protein and phenolic metabolisms. We suggest that *S. cymosum* could be exploited like a complementary compound in fertilizer and studies related to natural products with antioxidant properties and biological activity for human food, animal feed, nutraceutical, and pharmacological markets.

Keywords: antioxidant activity, carbon and nitrogen balance, polyamines, photoprotection, *Sargassum cymosum*, ultraviolet radiation.

Abbreviations: ATR-FTIR, Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy; CAD, cadaverine; CHN, Carbon-Hydrogen-Nitrogen; CNBH, carbon nutrient balance hypothesis; DW, dry weight; FW, fresh weight; IR, infrared radiation; PAR, photosynthetically active radiation; PAs, polyamines; PUT, putrescine; ROS, reactive oxygen species; SPD, spermidine; SPM, spermine; UVA, ultraviolet A; UVB, ultraviolet B; UVC, ultraviolet C; UVR, ultraviolet radiation.

Resumo

O perfil metabólico estudado como níveis de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), teores de proteína, poliaminas livres (PAs), carboidratos, compostos fenólicos e atividade enzimática da NADH desidrogenase e do complexo II da macroalga parda *Sargassum cymosum* foi analisado depois de sete dias de cultivo em laboratório em três salinidades (30, 35 e 40 UPS) e quatro tratamentos de irradiação durante 3 horas por dia : Controle (70 mol fótons m⁻² s⁻¹), PAR+UVA (0,70 W m⁻²), PAR + UVB (0,35 Wm⁻²) e PAR+UVA+UVB. Os tratamentos apresentaram variações nos níveis de CHN, com redução significativa de C e H e não mostrou uma tendência evidente para N, provavelmente relacionada com a alocação do balanço do nitrogênio e do carbono para uma manutenção biológica básica e do metabolismo de defesa de estresse. Três PAs diferentes foram detectadas (PUT, SPD e CAD), seus níveis apresentaram redução provavelmente devido à quantidade de PAR usada durante o experimento, sua ligação aos compostos fenólicos migrando através da parede celular e sendo degradados e a degradação da clorofila. Pode concluir-se que *S. cymosum* é menos afectada às mudanças na salinidade do que quando tratada com radiação UV. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão das variações das PAs sob condições de estresse. Diferentes perfis metabólicos foram detectados através do ATR-FTIR/PCA, principalmente como metabolismo de carboidratos, proteínas e compostos fenólicos. A fração de açúcar da alga revelou sensibilidade aos tratamentos, mostrando diferença nos metabolismos de proteínas e compostos fenólicos. Sugerimos que *S. cymosum* pode ser explorada como um composto complementar em fertilizantes e estudos relacionados com produtos naturais com propriedades antioxidantes e atividade biológica para a alimentação humana ou animal, nutracêuticos e mercados farmacológicos.

Palavras-chave: atividade antioxidante, balanço do carbono e nitrogênio, poliaminas, fotoproteção, *Sargassum cymosum*, radiação ultravioleta.

Abreviações: ATR-FTIR, Espectroscopia vibracional de infravermelho médio transformada de Fourier; CAD, cadaverina; CHN, Carbon-hidrogênio-nitrogênio; CNBH, hipótese do equilíbrio do carbono e nutrientes; DW, peso seco; FW, peso fresco; IR, radiação infravermelha; PAR, radiação fotossinteticamente ativa; PAs, poliaminas; PUT, putrescina; ROS, espécies reativas de oxigênio; SPD, espermidina; SPM, espermina; UVA, ultravioleta A; UVB, ultravioleta B; UVC, ultravioleta C; RUV, radiação ultravioleta.

6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos da radiação ultravioleta e de diferentes gradientes de salinidades na bioquímica, na fisiologia, na morfologia e na organização celular da macroalga produtora de alginato *Sargassum cymosum* avaliando seus mecanismos de fotoaclimação e fotoproteção.

Após 7 dias de tratamento *S. cymosum* apresentou uma variedade de mecanismos de respostas física (aumento da parede celular) e químicas como a produção de compostos fotoprotetores quando expostas a PAR + UVA, PAR+UVB e PAR + UVA + UVB. Também mostrou que embora a salinidade possa ser um fator que afeta o metabolismo de maneiras diferentes, não foi observado alterações claras neste estudo. Por outro lado destaca-se que a exposição de *S. cymosum* à radiação ultravioleta não teve efeito negativo (diminuição) nas taxas de crescimento, indicando que o tratamento não foi estressante para este parâmetro resultando em ganho de biomassa nas amostras tratadas quando comparadas as amostras controle. Assim, pode-se inferir que fatores como aumento na quantidade de mitocôndrias ou ativação de mecanismos protetores gerados pela radiação UVA podem ter influenciado no aumento na taxa de crescimento das amostras como também observado por Gao e Xu (2008).

O conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *c* (Chl *c*) de *S. cymosum* apresentou respostas diferentes nas três salinidades e tratamentos com radiação UV. Foi observado que clorofila *c* é mais sensível que a clorofila *a*, pois seu conteúdo decresceu em todas as plantas tratadas. Esta redução poderia estar relacionada com um mecanismo fotoprotetor em que o nível de pigmentos acessórios é diminuído para aliviar o excesso de energia dirigida ao centro de reação da fotossíntese, impedindo assim, o dano oxidativo do aparelho fotossintético nas amostras tratadas. Foi observado que as algas tratadas com PAR+UVA aumentaram o conteúdo de carotenóides sugerindo que o tratamento induziu defesa antioxidante das células através destes e também foi observado um aumento dos compostos fenólicos como um mecanismo fotoprotetor contra danos causados por radiação UV. Através da análise de microscopia, foi possível detectar estes compostos migrando através da parede celular e em processo de degradação. Também a varredura da água do mar de cada tratamento apresentou um aumento de compostos que absorvem entre 300 e 400 nm,

provavelmente relacionado com a secreção de compostos fenólicos e outros compostos de absorção de UV. A distribuição destes compostos em Phaeophyceae, perto das células corticais e paredes celulares, sugere ser esta organização uma importante característica responsável pelo sucesso evolutivo do grupo (Costa et al., 2002).

Através das análises microscópicas foi observado que a organização dos cloroplastos de *S. cymosum* não foi alterada após os tratamentos, apresentando estrutura típica de algas pardas, com tilacóides agregados em bandas três a três.

Os resultados baseados nas características fisiológicas e celulares de *S. cymosum* exposta à radiação UV, evidenciam uma alta aclimação fotoprotetora a esta condição de estresse, o que poderia representar uma característica de adaptação que permite suportar condições de estresse constantes quando exposta à radiação ao longo das zonas de intermarés e submarés do costão rochoso, ambos habitats comuns desta espécie.

Tem sido relatado que os processos fisiológicos da fotossíntese são os principais alvos da radiação UV, assim, pode ter vários efeitos sobre as algas (Holzinger e Lutz, 2006). As plantas de *S. cymosum* tratadas com as diferentes radiações e salinidades, apresentaram baixos padrões de fotoinibição, embora esta fotoinibição foi mais evidente nas algas tratadas com PAR + UVB, porém foi possível observar sinais de recuperação nos demais tratamentos confirmando que a espécie tem a capacidade de neutralizar os efeitos negativos causados pela radiação UV através de diferentes respostas adaptativas.

Os teores de carbono e de hidrogênio de *S. cymosum* exibiram uma oscilação entre os tratamentos, mas em geral foi observado uma diminuição significativa nas plantas expostas à radiação UV. Esta redução do conteúdo celular pode representar um mecanismo de defesa energética, usando fontes de armazenamento de carbono para ativar o sistema antioxidante e proteger a célula de danos causados pela radiação produzindo defesas à base deste, tais como fenóis ou aumento da espessura da parede celular (Lerdau, 2002). Por outro lado, o teor de N não mostrou uma tendência clara, no entanto, foi significativamente afetado. Esta flutuação na dinâmica do N tecidual pode ser relacionada com a alocação de energia (carbono) e de nutrientes (nitrogênio) para ativar os mecanismos de defesa em *S. cymosum* preservando assim, a

homeostase fisiológica e a integridade do organismo. Pesquisas sobre a influência do nitrogênio no metabolismo das macroalgas são importantes, uma vez que este composto é essencial para a manutenção de várias rotas metabólicas (Hooda et al., 2000; Hooda, 2008).

Embora a atividade da enzima NADH desidrogenase não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, a atividade do complexo II diminuiu após a exposição à radiação UV. Estes resultados estão relacionados com a alteração da função mitocondrial, provavelmente devido a um bloqueio no sistema de transporte de elétrons induzida pelos tratamentos.

Em relação as poliaminas (PAs), existe pouca informação sobre seu metabolismo nas macroalgas e muitas das pesquisas se concentram nas funções que desempenham no desenvolvimento celular ou em resposta à salinidade (Schweikert et al., 2011) e alguns estudos têm relacionado sua função com mecanismos de defesa por estresse abiótico. No presente estudo, foi possível detectar três tipos de PAs, putresina, espermidina, as quais decresceram significativamente quando tratados com radiação UV e salinidade; e cadaverina que não apresentou mudanças nos seus níveis. Esta diminuição pode estar relacionada com quantidade de PAR ministrada durante a exposição à radiação ($70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Em alguns estudos sobre plantas superiores foram observadas alterações no conteúdo de PAs quando exposta a radiação UVB e com níveis de PAR abaixo de $300 \mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kramer et al., 1992; Smith et al., 2001). Outro fator que poderia estar influenciando na diminuição dos níveis de PAs está relacionado com a capacidade que estas moléculas tem para se ligar a grupos fenólicos. Como foi discutido anteriormente, as análises microscópicas realizadas revelam a presença destes compostos migrando através da parede celular e sendo degradados e as substâncias liberadas para a água do mar dos tratamentos provavelmente está relacionada com o fluxo destes compostos fenólicos. Por tanto, esta poderia ser uma das razões pelas quais não foi possível a detecção de PAs conjugadas. Por último, a clorofila está intimamente associada com PAs e sua diminuição pode estar relacionada com a perda de clorofila observada também neste estudo.

Através das análises ATR-FTIR acoplado a quimiometria, foi observado que o metabolismo do açúcar da alga parece ser sensível as variações de salinidade e de radiação. A exposição a PAR+UVA+UVB

contribui para uma perturbação no seu metabolismo fenólico e proteico. Tomando em conjunto, os resultados desta abordagem metabolômica, se faz necessário mais estudos sobre os compostos fenólicos e metabolismo das proteínas de *S. cymosum* em resposta à exposição a uma alta salinidade e PAR+UVA+UVB.

Baseados nas hipóteses propostas para este estudo pode se concluir que:

1. O efeito combinado da salinidade e a radiação UV não foi um fator deletério importante para as plantas de *S. cymosum* e que a própria salinidade não é um fator predominante que afeta os parâmetros analisados.
2. Diferentes aspectos das plantas de *S. cymosum*, tais como taxa de crescimento, o conteúdo de pigmentos, CHN, proteínas, PAs, as atividade antioxidante, fotossintética e da NADH desidrogenase e o complexo II, não foram afetados drasticamente pela radiação UV.
3. Todas as plantas tratadas apresentaram aumento na quantidade de fisóides, provavelmente como um mecanismo fotoprotetor e foi mais evidente no tratamento com PAR+UVA, e o efeito negativo da radiação UV foi mais pronunciado nas plantas tratadas com PAR+UVB.
4. Todas as plantas tratadas apresentaram espessamento da parede celular como uma barreira contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Este mecanismo de proteção poderia complementar a fotoproteção contra o estresse oxidativo, tornando a defesa contra a radiação UV mais eficiente.
5. Os rendimentos quânticos do PSII não apresentaram reduções significativas, e todas as plantas tratadas apresentaram sinais de recuperação, exceto aqueles tratados com PAR+UVB.
6. A flutuação de CHN poderia ser explicada com a hipótese do Balanço Carbono- Nitrogênio, onde a alocação desses recursos é usada para manter as vias biológicas básicas como o crescimento e promover mecanismos de defesa como o espessamento da parede celular, compostos fenólicos e PAs.

7. A redução do teor de PAs pode estar relacionado com: 1) a quantidade de PAR fornecida durante a exposição à RUV; 2) PAs conjugadas aos compostos fenólicos degradados que migram através da parede celular; 3) Redução no conteúdo de clorofila que poderia favorecer uma diminuição nos níveis de PAs.
8. Sugere-se que *S. cymosum* poderia ser explorada como um composto complementar em fertilizantes comerciais para melhorar a saúde e o crescimento das plantas superiores e como bioestimulante natural devido aos níveis de PAs encontrados nesta espécie.
9. O fato de *S. cymosum* possui mecanismos de defesa eficazes contra UVR e salinidade faz com que seja uma espécie potencial para estudos relacionados a produtos naturais com propriedades antioxidantes e atividade biológica para alimentação humana ou animal e mercados farmacológicos.
10. Finalmente, foi observado que o forte mecanismo apresentado por *S. cymosum* contra estressores como a radiação UV, é o que permite a persistência desta espécie em condições altamente estressantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS:

- AGUILERA, J.; DUMMERMUTH, A.; KARSTEN, U.; SCHRIEK, R.; WIENCKE, R. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.*, v. 25, p. 432–444, 2002.
- AGUILERA, J.; KARSTEN, U.; LIPPERT, H.; VÖGELE, B.; PHILIPP, E.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 191, p. 109-119, 1999
- ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A.; FIGUEROA, FL. Effects of UV radiation and temperature on growth germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquat. Bot.*, v. 75, p. 9–20, 2003.
- BISCHOF, K.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta.*, v. 211, p. 555-562, 2000.
- BISCHOF, K.; HANELT, D. WIENCKE, C; BROUWER, P. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.*, v. 20, p. 388-395, 1998.
- BRITT, A.B. DNA damage and repair in plants. *Plant Mol. Biol.*, v. 47, p. 75-100, 1995.
- BÜHLMANN, B.; BOSSARD, P.; UEHLINGER, U. The influence of longwave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity (¹⁴C-assimilation) of phytoplankton. *J. Plankton Res.*, v. 9, p. 935-943, 1987.
- BUMA, A.G.J.; VAN OIJEN, W.H.; VAN DE POLL, M.J.W. On the high sensitivity of the marine prymnessiophyte *Emiliania huxleyi* to ultraviolet-B. *J. Appl. Phycol.*, v. 131 p. 296-303, 2000.
- CABRERA, S.; BOZZO, S.; H, FUENZALIDA. Variations in UV radiation in Chile. *J. Photochem. Photobiol.*, v. 28, p. 137-142, 1995.
- CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.*, v. 328, p. 309-316, 1996.
- CHOO, K.S.; NILSSON, J.; PEDERSEN, M.; SNOEIJS, P. Photosynthesis, carbon uptake and antioxidant defense in two coexisting filamentous green algae under different stress conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 292, p. 127–138, 2005.
- COIMBRA, C. S. Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul, 2006. 71 f. Teses (Doutorado), Instituto de Biociências da

Universidade de São Paulo. Depto. de Botânica, Universidade de São Paulo, 2006.

COIMBRA, C. S.; BERCHEZ, F. A. S. Habitat heterogeneity on tropical rocky shores: a seaweed study in southern Brazil. *J. Phycol.*, v. 36, p. 14-15, 2000.

COLLEN, J.; DAVISON, I.R. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell Environ.*, v. 22, p. 1143-1151, 1999.

COSTA, A.C.A.; FRANÇA, F.P. Biosorption of zinc, cadmium, and copper by a brown seaweed (*Sargassum* sp.) in a continuous fixed-bed laboratory reactor. *Bioseparation.*, v. 6, p. 335-341, 1997.

CRUCES, E. HOUVINEN.; GOMÉZ, I. Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Mar Biol.*, v. 160, p. 1-13, 2013.

DAVIS, T.A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.*, v. 37, p. 4311-4330, 2003.

DE LARA-ISASSI, G.R.; ALVAREZ-HERNANDEZ, S. evaluación de la actividad aglutinante de extractos de macroalgas presentes em las cosas del Atlántico Mexicano. *Hidrobiologia.*, v.8, p. 67-72, 1998.

DE REVIERS, B. *Bilogia de Filogenia das algas*. Artmed, 2006. 280 p.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Tech.*, v. 8, p. 389-395, 1997.

DE WREEDE, R. The phenology of three species of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyta) in Hawaii. *Phycologia.*, v. 15, p. 175- 183, 1976.

DIFFEY, B. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys. Med. Biol.*, v. 36, p. 299-328 1991.

DUBIASKI-SILVA, J.; MASUNARI, S. Ecologia dos fitais de Caiobá, Matinhos, Paraná, Brasil. *Rev Bras Zool.*, v. 12, p. 373- 396, 1995.

DUBIASKI-SILVA, J.; MASUNARI, S. Variação sazonal e vertical da biomassa de *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 (Phaeophyta) e da densidade de sua fauna vágil na Ponta das Garoupas, Bombinhas, Santa Catarina. *Anais do V Simpósio Brasileiro de Ecossistemas: conservação Vitória- ES, Brasil.*, v. 2, p. 110-117, 2000.

ESTON, V.; W. O. BUSSAB. An experimental analysis of ecological dominance in a rocky subtidal macroalgal community. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, v. 136, p. 179- 195, 1990.

ESTON, V. R.; MIGOTTO, A. E.; OLIVEIRA FILHO, E. C.; RODRIGUES.; S. A.; FREITAS, C. Vertical distribution of benthic

- marine organisms on rocky coasts of the Fernando de Noronha Archipelago (Brazil). B. Inst. Ocean. São Paulo., v. 34, p. 37-53, 1986.
- FIGUEROA, F.; NYGARD, C.; EKELUND, N.; GÓMEZ, I. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. J. Photochem. Photobiol., v. 72, p. 35-44, 2003.
- FOUREST, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. Env. Sci. Tech., v. 30, p. 277-282, 1996.
- FRANKLIN, L.A.; FORSTER, R.M. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. Eur. J. Phycol., v. 323, p. 207-232, 1997.
- GHILARDI, N. P.; FUJII, M. T.; ROSSO, S.; HADEL, V. F.; BERCHEZ, F. A. S. Utilização do método dos povoamentos na caracterização de comunidades bentônicas em trecho do infralitoral consolidado da Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba (SP). In: XI Congresso Brasileiro de Ficologia, Itajaí (SC). Resumos. p.90, 2006.
- GORDILLO, F.; DRING, M.; SAVIDGE, G. Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity. Mar. Ecol. Prog. Ser, v. 234, p. 111-118, 2002.
- GORDON, E.M.; MCCANDLESS, E.L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey, M.J., McLachlan, J. (ed.): *Chondrus Crispus*. Pp. 111-133. Nova Scotian Institute Science, Halifax 1973.
- GRYMSKI, J.; JOHNSEN, G.; SAKSHAUG, E. The significance of intracellular selfshading on the biooptical properties of brown, red and green macroalgae. J. Phycol., v. 33, p. 408-414, 1997.
- GYLLE, A.; NYGARD, C.; EKELUND, N. Desiccation and salinity effects on marine and brackish *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyceae). Phycologia., v. 48, p. 156-164, 2009.
- HADDAD, M. A.; CHIAVERINI, A. P. Repartição de espaço entre hidróides (Cnidaria, Hydrozoa) epifíticos em *Sargassum stenophyllum* (Phaeophyta, Fucales) de Guaratuba, Paraná. Anais do V Simpósio Brasileiro de Ecossistemas: Conservação., v. 109, p. 101- 109, 2000.
- HÄDER, D.P.; HÄDER, M. Inhibition of motility and phototaxis in the green flagellate, *Euglena gracilis*, by UV-B radiation. Arch. Microbiol., v. 150, p. 20-25, 1988.
- HÄDER, D. P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C.; WORREST, R. C. Effects on aquatic ecosystems. J. Photochem. Photobio B., v. 46, p. 53-68. 1998.

- HALES, J.; FLETCHER, R. Studies on the recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. V. Receptacle initiation and growth, and gamete release in laboratory culture. *Bot. Mar.*, v. 33, p. 241-249, 1990.
- HANELT, D.; WIENCKE, C.; NULTSCH, W. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobio.*, v. 38, p. 40-47, 1997.
- HARNITA, A. N. I.; SANTOSA, I. E., MARTONO, S.; WIDYARIN, S. S.; HARREN, F. J. M. Inhibition of lipid peroxidation induced by ultraviolet radiation by crude phlorotannins isolated from brown algae *Sargassum hystrix* v. *buxifolium* C. Agardh. *Indo. J. Chem.*, v. 13, p. 14-20, 2013.
- HENRY, B. E.; VAN ALSTYNE, K. L. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.*, v. 40, p. 527-533, 2004.
- HISCOX, J. D; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, v. 57, p.1332-1334, 1979.
- HOLZINGER, A.; LÜTZ, C. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Mícron.*, v. 37, p. 190-207, 2006.
- HOLZINGER, A.; LÜTZ, C.; KARSTEN, U.; WIENCKE, C.. The effect of ultraviolet radiation on ultrastructure and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic waters. *Plant Bio.*, v. 6, p. 568-577, 2004
- HOLZINGER, A.; DI PIAZZA, L.; LÜTZ, C.; ROLEDA, M. Sporogenic and vegetative tissues of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) exhibit distinctive sensitivity to experimentally enhanced ultraviolet radiation : photosynthetically active radiation ratio. *Phycol. Res.*, v. 59, p. 221-235, 2011.
- IPCC (2007) Intergovernmental panel on climate change. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment. Cambridge University Press, Cambridge, p 996.
- JACOBUCCI, G.B.; LEITE, F.P.P. Distribuição vertical e flutuação sazonal da macrofauna vágil associada a *Sargassum cymosum* C. Agardh, na praia do Lázaro, Ubatuba, São Paulo, Brasil. *R. Bras. de Zoo.*, v.19, p. 87-100, 2002.
- JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c 1 and c 2 in higher

- plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol.*, v. 167, p. 191-194, 197.
- JOKIEL, P.; YORK, R. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. *B. Mar. Sci.*, v. 32, p. 301-315, 1982.
- KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; CAMPESTRINI, L. H.; OGLIARI J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN M. Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food. *J Funct Foods.*, v. 1, p. 284-290, 2009.
- LÃO, K.; GLASER, A.N. Ultraviolet-B photodestruction of light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 93, p. 5258-5263, 1996.
- LATINI, A.; RODRIGUEZ, M.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; REIS DE ASSIS, D.; DA COSTA FERREIRA, G.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M. C.; BUZIN, L.; GIUGLIANI, R.; CASSINA, A.; RADI, R.; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience.*, v. 135, p. 111-120, 2005.
- LEDFORD, H.K.; NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.*, v. 28, p. 1037-1045, 2005.
- LESSER, M.P.; SHICK, J.M. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Bio.*, v.102, p. 243-255, 1989.
- LIPPERT, H.; IKEN K.; RACHOR.; WIENCKE, C. Epifauna associated with macroalgae in the Kongsfjord. *Polar Bio*, v. 24, p. 512-522; 2001.
- LOWRY, OH.; ROSEBOUGH, N.; FARR, AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LÜTZ, C.; SEIDLITZ, H.K.U. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Eco.*, v. 128, p.54- 64, 1997.
- MAFRA Jr., L.L.; CUNH, A.S.R. Bancos de *Sargassum cymossum* (Phaeophyceae) na enseada de Armação de Itapocoroy, Penha, SC: biomassa rendimento em alginato. *Notas Técnicas da FACIMAR.*, v. 6, p. 111-119, 2002.
- MARTINS, I.; OLIVEIRA, J.; FLINDT, M.; MARQUES, J. The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecol.*, v. 20, p. 259-265, 1999.

- MASUNARI, S. Ecologia das comunidades fitais. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul-Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, v. 1, p. 195-253, 1987.
- MESQUITA-VIEIRA, D. Biosorption of lead by the brown seaweed *Sargassum filipendula* - batch and continuous pilot studies. Electron. J. Biotechnol., v. 10, p. 368-375, 2006.
- MOUNTOUCHET, P. C. G. Sur la communauté des animaux vagiles associés à *Sargassum cymosum* C. Agardh, à Ubatuba, Etat São Paulo, Brésil. St. Neotr. Fauna Env., v. 14, p. 33-64, 1979.
- MUNDA, I.; KREMER, B. Chemical composition and physiological properties of fucoids under conditions of reduced salinity. Mar. Bio., v. 42, p. 9-15, 1977.
- MUNDA, I. Observations on variations in form and chemical composition of *Fucus ceranoids* L. Nova Hedwigia, v. 8, p. 403-414, 1964.
- NORTON, T.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. Algal biodiversity. J. Appl. Phycol., v. 35, p. 308-326, 1996.
- OKUNO, E.; NAKAJIMA, T.; YOSHIMURA, E. M.; HIODO, F.; FAUSTO, A. M. F.; PAES, W. S.; UMISED, N. K. & OTSUBO, E. S. Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Páscoa. RBE. Caderno de Engenharia Biomédica, v. 12, p. 143-153, 1996.
- OLIVEIRA FILHO, E. C.; PAULA, E. J. 1979. Potentiality for algin production in the São Paulo (Brazil) littoral region. In: IX th International Seaweed Symposium. 1979. JENSEN, A. e J. R. STEIN, (Eds.) Princeton, p. 479-486, 1979.
- PAULA, E. J.; V. R. ESTON. Are there another *Sargassum* species potentially as invasive as *S. muticum*. Bot. Mar., v. 30, p. 405-410, 1987.
- PAULA, E. J. O gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. Boletim de Botânica. Universidade de São Paulo, v. 10, p. 65-118, 1988.
- PAULA, E. J. Zonação nos costões rochosos: entre-marés. In: Anais do 1º Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul-Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, v.1, p. 266-288, 1989.
- PLATT, T.; GALLEGOS, C.; HARRISON, W. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J. Mar. Res., v. 38, p. 687-701, 1980.

- PENNIMAN, C.A.; MATHIESON, A.C.; PENNIMAN, C.E. Reproductive Phenology and Growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Bot. Mar.*, v. 29, p. 147–154, 1986.
- PESSOA, F. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes – A review. *Emir. J. Food Agric*, v. 24, p. 510-526, 2012.
- POLO, L.K.; FELIX, M.R.; KREUSH, M.; PEREIRA, D.; COSTA, G.; SIMIONI, C.; OURIQUES, L.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z.L.; SCHMIDT, E.C. Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *Photochem. Photobiol.* DOI: 10.1111/php.12224. (2013)
- POPPE, F.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Bot. Mar.*, v. 45, p. 253–61, 2002.
- POPPE, F.; SCHMIDT, R. A. M.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Research*, v. 51, p. 11-19, 2003.
- PUESCHEL, C. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, v. 15, p. 409-424, 1979.
- RAUTENBERGER, R.; BISCHOF K. Impact of temperature on UV-susceptibility of two *Ulva* (Chlorophyta) species from Antarctic and Subantarctic regions. *Polar Biol.*, v. 29, p. 988–996, 2006.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, v. 17, p. 208-212, 1963. 2006.
- ROLEDA, M., WIENCKE, C.; LÜDER, U. Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*. *J. Exp. Biol.*, v. 57, p. 3847-3856, 2006.
- SALGADO, L. The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption in vitro. *Braz. J. Oceanogr.*, v. 55, p. 145-154, 2007.
- SCHERNER, F.; VENTURA, R.; BARUFI, J.; HORTA, P. Salinity critical threshold values for photosynthesis of two cosmopolitan seaweed species: Providing baselines for potential shifts on seaweed assemblages. *Mar. Envir. Res.*, v. 79, p. 1-12, 2012.
- SCHMIDT, E.C; SCARIOT, L.A; ROVER, T; BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of

- Kappaphycus alvarezii Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, v. 40, p. 860-869, 2009.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recordings of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometry. *Photosyn. Res.*, v. 10, p. 51- 62, 1986.
- SCHREIBER, U.; NEUBAUER, C. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res.*, v. 25, p. 279-293, 1990.
- SILVA, E.A. Biosorption of binary mixtures of Cr (III) and Cu (II) ions by *Sargassum* sp. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 20, p. 213-227, 2003.
- SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, MP. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, v. 76, p. 53-60, 2004.
- SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research.*, v. 26, p. 31-43, 1969.
- SUGANTHY, N.; ARIF, N.S.; KARUTHA, P.S.; PANDIMA, DK. Antioxidant and metal chelating potential of the solvent fractions of *Gelidiella acerosa*, the red algae inhabiting South Indian coastal area. *Biomed. Pharmacother.*, pp 1-6, 2010. Doi : 10.1016/j.biopha.2010.09.022
- STEEN, H. 2004. Effects of reduced salinity on reproduction and germling development in *Sargassum muticum* (Phaeophyceae, Fucales). *Eur. J. Phycol.*, v. 39, p. 293-299.
- SZÉCHY, M. T.; PAULA, E. J. Tipos Morfológicos em populações de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Leandra*, v. 12, p 1- 10, 1999.
- SZÉCHY, M. T.; PAULA, E. J. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Bot.*, v. 23, p. 121- 132, 2000.
- SZÉCHY, M. T.; M, GALLIEZ.; M, MARCONI. Quantitative variables applied to phenological studies of *Sargassum vulgare* C. Agardh (Phaeophyta-Fucales) from Ilha Grande Bay, State of Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Bot.*, v. 29, p. 27-37, 2006.

- SZÉCHY, M. T.; VELOSO, V. G.; PAULA, E. J. Brachyura (Decapoda, Crustácea) of phytobenthic communities of the sublittoral region of rocky shores of Rio de Janeiro. *Trop. Eco.*, v. 42, p. 231- 242, 2001.
- TALARICO, L.; MARANZANA, G. Light and adaptative responses in red macroalgae: an overview. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.*, v. 56, p. 1-11, 2000.
- TALARICO, L. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci. Ma.r.*, v. 60, p. 205–22, 1996.
- TEVINI, M.; TERAMURA, A. H. UV-B. Effects on terrestrial plants. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.*, 50: 479-487. 1989.
- VASS, I. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: PESSARAKLI M (Org.). *Handbook of photosynthesis*. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 931-949.
- WATERMAN, P.; MOLE, S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, 1994.
- WIENCKE, C.; GÓMEZ, I.; PAKKER, H.; FLORES-MOYA, A.; ALTAMIRANO, M.; HANELT, D.; BISCHOF, K.; FIGUEROA, F. L. Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA on brown algal zoospores: Implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Prog Ser.*, v.197, p. 17-229, 2000.
- WILKINSON, M.; WOOD, P.; WELLS, E.; SCANLAN, C. Using attached macroalgae to assess ecological status of British estuaries for the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 55, p. 136-150, 2007.
- WILKINSON, M. Survival strategies of attached algae in estuaries. In: Jones, N.V., Wolff, W.J. (Eds.). *Feeding and Survival Strategies of Estuarine Organisms*. Plenum Publishing Company, New York, p. 29-38, 1981.
- WILCOX, L.; GRAHAM, J.; GRAHAM, L. *Algae*. 2. ed. Benjaming Cumming, 2009. 616 p.
- WOOD, W. F. Effect of solar ultraviolet radiation on the kelp *Ecklonia radiata*. *Mar. Biol.*, v. 96, p. 143-150, 1987.
- WORREST, R. C. Review of Literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. In: CALKINS, J. (Org.). *The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems*. New York: Plenum Press, p. 429-457, 1982.
- XIA LI, JI QIANG ZHAO, XUE XI TANG. Effect of UV-B Radiation on GSH and GSH-Related Enzymes of Brown Alga *Sargassum thunbergii* (Mert.) O.Kuntze. *Adv. Mater. Res.*, v. 518, p. 5442-5445, 2012.

YABUR R, BASHAN Y, HERNÁNDEZ-CARMONA G. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.*, v. 19, p. 43-53, 2006.

YANG, J.; VOLESKY, B. Biosorption and elution of uranium with seaweed biomass. In: *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century: International Biohydrometallurgy Symposium Proceedings*. (20th – 23rd June, 1999, San Lorenzo De El Escorial, Madrid, Spain). BALLESTER, Antonio and AMILS, Ricardo eds., 483, 1999.

ZAHRA, R.; MEHRNAZ, M.; FARZANEH, V.; KOHZAD, S. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanu*. *Afr. J. Biotechnol.*, v.6, p. 2740-2745, 2007.

ZAREMBA, T. G.; LEBON, T.R.; MILLAR, D.B.; SMEJKAL, R.M & HAWLEY, R.J. Effects of ultraviolet light on the in vivo assembly of microtubules. *J. Biochem.*, v. 23, p. 1073-1080, 1984.

ZEPP, D. J.; ERICKSON, DJ.; PAUL, ND.; SULZBERGER, B. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling, *Photochem. Photobiol.*, v. 6, p 286-300, 2007.