

Lidiane Pires Gouvêa

Avaliação dos Efeitos de Temperatura e Nutrientes sobre a  
ecofisiologia de *Laurencia catarinensis* (Ceramiales, Rhodophyta)

Dissertação apresentada ao programa  
de Pós-Graduação em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas, Departamento  
de Botânica da Universidade Federal  
de Santa Catarina como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre  
em Biologia de Fungos, Algas e  
Plantas.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Paulo Antunes Horta Junior

Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Bonomi Barufi

Florianópolis  
2015

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

Gouvêa, Lidiane Pires

Avaliação dos Efeitos de Temperatura e Nutrientes sobre a ecofisiologia de *Laurencia catarinensis* (Ceramiales, Rhodophyta) / Lidiane Pires Gouvêa ; orientador, Paulo Antunes Horta Junior ; coorientador, José Bonomi Barufi. - Florianópolis, SC, 2015.

127 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. *Laurencia catarinensis*. 3. Aquecimento global. 4. Poluição. 5. Ecofisiologia. I. Horta Junior, Paulo Antunes. II. Barufi, José Bonomi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

*A minha família e ao Nuno,  
pelo apoio em todos os momentos*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todos esses anos de caminhada juntos e por me mostrarem que nada é impossível quando buscamos o conhecimento.

Agradeço ao Nuno, pelo amor, pela companhia e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

As minhas irmãs, por estarem sempre dispostas a ajudar em tudo que preciso.

Ao meu orientador Prof. Paulo Horta, o qual tenho grande admiração e privilégio de trabalhar, por ter depositado confiança em mim para que eu pudesse desenvolver o projeto, principalmente por me passar seus conhecimentos e fazer parte da minha evolução como profissional.

Agradeço ao meu co-orientador José Barufi, pela paciência e por estar sempre disponível para ajudar no trabalho.

Agradeço carinhosamente à amiga e colega Cintia Martins, pela ajuda e parceria em todas as etapas do trabalho, pelas conversas sem fim e risadas.

Agradeço ao colega Eduardo Bastos, por ter realizado as coletas do trabalho e pelas experiências compartilhadas que me ajudaram muito na execução do experimento.

A todos os companheiros do LAFIC, Cintia Lhullier, Manuela, Vanessa, Allan, Ellie, Thais, Debora, Letícia, João, Matheus e Gabrielle, pela parceria e por ajudarem de alguma forma na execução do trabalho.

Ao Professor Marcelo Maraschin, por disponibilizar o laboratório para a realização das análises, principalmente a Fernanda Ramlov, a Cláudia e a Regina Oliveira, por se disponibilizarem todas as vezes que precisei e pela ajuda em todas as análises.

Agradeço ao Simão por me ensinar todos os processos das análises de nutrientes da água.

A Camilla Reis, pela amizade e parceria nas tardes de estudo e análises infundáveis.

Aos Profs. João Silva, Pio Colepicolo e Leonardo Rorig, por gentilmente aceitarem fazer parte da banca.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

*"Aquele que quer aprender a voar um dia precisa primeiro aprender a ficar de pé, caminhar, correr, escalar e dançar; ninguém consegue voar só aprendendo vôo."*

*Friedrich Nietzsche*





## RESUMO

Dentre as algas vermelhas os representantes com metabolismo secundário mais rico estão delimitados pelo gênero *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae). Estes metabólitos apresentam importante papel ecológico e destacado potencial biotecnológico. Diversas espécies deste gênero possuem um metabolismo capaz de sintetizar substâncias de classes distintas, sendo os sesquiterpenos os mais abundantes e característicos do gênero. Estes papéis importantes nos ecossistemas marinhos são ameaçados, pelo aquecimento global e estressores locais uma vez que estas mudanças ambientais podem comprometer a aptidão fisiológica, empobrecendo o metabolismo secundário. Dessa forma, o presente trabalho teve com objetivo conhecer a fenologia reprodutiva de *Laurencia catarinensis* nos períodos de verão e inverno para então avaliar os impactos causados pelo aquecimento global e poluição antrópica sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos da alga.

Primeiramente, este trabalho avaliou a variação sazonal das concentrações dos pigmentos fotossintetizantes, Amido, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e no geral, pode-se observar que ocorreu aumento do conteúdo de clorofila *a*, Ficobiliproteínas e amido no período de inverno e aumento das concentrações para os compostos fenólicos e carotenoides no período de verão, para praticamente todos os estádios reprodutivos.

Dentro deste contexto, foi possível inferir, através do experimento realizado com a macroalga, que poderá ocorrer o aumento da sensibilidade de *L. catarinensis* a fatores como aquecimento global e poluição antrópica. Para a Taxa de crescimento relativo nas menores temperaturas com adição de nutrientes, o crescimento da macroalga foi maior variando entre (0,58 mg/gMF a 3,37 mg/gMF). Níveis altos de poluentes e o aumento da temperatura demonstraram toxicidade a macroalga podendo causar alterações bioquímicas e fisiológicas, diminuindo a produção de clorofila *a* nos tratamentos com concentrações altas de nutrientes (CAN) e temperatura de 28°C, em contrapartida o aumento das concentrações dos pigmentos acessórios

Ficocianina e Ficoeritrina para aumento da captação de luz ao aparato fotossintético. Dessa forma, a análise do perfil dos carotenoides determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) identificou a Luteína, Zeaxantina e  $\alpha$ -caroteno. A Luteína foi o composto majoritário em todos os tratamentos. Com relação ao perfil de compostos fenólicos (determinados por CLAE) foram detectados os seguintes compostos: epicatequina, galocatequina, epigallocatequina, ácido cafeico, 4,5 dicafeoilquinico, ácido Cumárico e dois compostos ainda não identificados (Composto X-Rt 4,3 min e Composto Y-Rt 9,2 min), sendo o composto majoritário a Epicatequina. O conteúdo de carotenoides e compostos fenólicos pode ser associado ao aumento de temperatura e fotoproteção e ao estresse causado pelo incremento de nutrientes, sendo que o mesmo pode ser verificado pelo teste de atividade antioxidante que foi observado em maior porcentagem no tratamento a 28°C. Com relação aos conteúdos de açúcares totais e amido, ocorreu diminuição do conteúdo destes compostos produzidos pelas algas na temperatura de 28°C e no tratamento CAN.

Para os dados da fluorescência da clorofila *a* analisados através do PAM, verificou-se decréscimo da irradiância de saturação ( $I_k$ ) da alga *L.catarinensis* na temperatura de 28°C, o mesmo também foi observado nos parâmetros  $\Delta F/F'_m$ , ETR e  $\alpha$  ETR. Para os dados de  $F_v/F_m$  tanto os tratamentos CBN quanto CAN decresceram seus valores em temperaturas de 28°C.

**PALAVRAS CHAVE:** *Laurencia catarinensis*, aquecimento global, estressores locais.

## ABSTRACT

Among the red algae, representatives with richest secondary metabolism are delimited by genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae). These metabolites have important ecological role and highlighted biotechnological potential. Several species of this genus have a metabolism able to synthesize different classes of substances, sesquiterpenes being the most abundant and characteristic of the genus. These important roles in marine ecosystems are threatened by global warming and local stressors because these environmental changes can impair the physiological fitness, impoverishing the secondary metabolism. Thus, this study was carried out to know the reproductive phenology of *L. catarinensis* in the summer and winter seasons and then evaluate the impacts of global warming and anthropogenic pollution on biochemical and physiological aspects of seaweed.

First, this study evaluated the seasonal variation of concentrations of photosynthetic pigments, Total sugars, starch, total phenolics, antioxidant activity and can be seen that there was an increase of chlorophyll content, Phycobiliproteins, total sugars and starch in the winter period prescribed and increasing concentrations for the phenolic compounds and carotenoids in the summer period, for practically all reproductive stages. Inside this context, it was possible to conclude, with this study, which could take the increased sensitivity of *L. catarinensis* to factors such as global warming and anthropogenic pollution. For the growth rate on the lower temperatures with the addition of nutrients, the growth of macroalgae was higher ranging from (0.58 mg / gDW to 3.37 mg / gDW). High levels of pollutants and increasing temperature to demonstrate toxicity seaweed causing biochemical and physiological changes, reducing the production of chlorophyll in treatments with high concentrations of nutrients (HNC) and of 28 °C, however increasing concentrations of pigments accessories Phycoerythrin and Phycocyanin and for increased light reception the photosynthetic apparatus. Thus, the profile analysis of carotenoids determined by high performance liquid chromatography

(HPLC) identified Lutein, Zeaxanthin and  $\alpha$ -carotene. Lutein was the major compound in all treatments. Regarding the profile of phenolic compounds (determined by HPLC) The following compounds were detected: epicatechin, galocatechin, epigallocatechin, caffeic acid, 4,5 dicaffeoylquinic, coumaric acid and two as yet unidentified compounds (Compound X-Rt 4.3 min, compound Y-Rt 9.2 min), being the major compound epicatechin. The content of phenolic compounds and carotenoids was associated with increases in temperature and photoprotection and stress caused by the increase of nutrients, where it can be verified by the test that the antioxidant activity was observed in a greater percentage in the treatment at 28°C. Relative to those of total sugars and starch content, a decrease in the temperature of 28°C and HNC, these compounds produced by algae. For the chlorophyll a fluorescence, there was a decrease in saturation irradiance ( $I_k$ ) of the algae *L.catarinensis* at 28°C, it was also observed in parameters  $\Delta F / F_m$  parameters ETR and  $\alpha$  ETR. For data  $F_v / F_m$  both treatments LNC and HNC decreased their values in temperatures of 28°C.

**KEY WORDS:** *Laurencia catarinensis*, global warming, local stressors.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Variação da biomassa (g) dos estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* coletadas no verão e no inverno na Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ . T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; NF: não-fértil.

.....48

FIGURA 2: Variação da biomassa (g) dos estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* coletadas no verão e no inverno Praia da Barra, Florianópolis, SC, no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ . T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; NF: não-fértil.....49

FIGURA 3: Concentração dos Clorofila *a* (mg/g-massa seca) determinada por espectrofotometria para o extrato de acetona 90% de tetrasporofitos, gametofitos femininos com cistocarpos e não-férteis de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a) e Praia da Barra (b) (Florianopolis, SC), no periodo de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .....50

FIGURA 4: Concentração dos pigmentos Ficoeritrina e Ficocianina determinada por espectrofotometria, dos tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a,b) e Praia da Barra (c,d) (Florianopolis, SC), no periodo de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .....51,52

FIGURA 5: Concentração dos carotenoides determinada por espectrofotometria para tetrasporofitos (T), gametofitos femininos

com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a) e Praia da Barra (b) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .....54

FIGURA 6: Concentração de compostos fenólicos(a,b) e Atividade antioxidante (b,c) determinada por espectrofotometria para os tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .....55,56

FIGURA 7: Concentração amido determinada por espectrofotometria para os tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (XV) (a) e Praia da Barra (PB) (b) e (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .....57

## CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Taxa de crescimento relativa (% d<sup>-1</sup>) da macroalga *Laurencia catarinensis* ao final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcados com letras diferentes entre comparações.....82

FIGURA 2. Conteúdo de Clorofila *a* (a), Ficocianina (b) e Ficoeritrina (c) dos talos da macroalga *Laurencia catarinensis* ao final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcados com letras diferentes entre comparações.....84,85

FIGURA 3: Valores das médias±desvio padrão dos Parâmetros fotossintéticos  $\Delta F/F'm$  (a) e ETR (b) de *Laurencia catarinensis* de amostras iniciais e finais ao experimento em temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C combinadas com concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN), n=3.....89

FIGURA 4: : Valores das médias±desvio padrão dos parâmetros fotossintéticos de *Laurencia catarinensis*: Fv/Fm (a), ETRmax (b),  $\alpha$  ETR (c) e Is (d) com amostras iniciais e finais ao experimento em temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C combinadas com concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN), n=3.....90,91

FIGURA 5: Concentração de Açúcares Totais (a) e amido (b) em mg/gMS da macroalga *L. catarinensis* no final do experimento, com temperaturas de 20 °C, 24 °C e 28 °C e concentrações baixas de nutrientes (oligo), intermediárias (meso) e altas (hiper). Os dados estão mostrados como médias ± desvio padrão (n = 3). As diferenças significativas de acordo com o teste Newman-Keuls estão marcadas

com letras diferentes entre os tratamentos.....96

FIGURA 6: Atividade antioxidante (DPPH) dos compostos fenólicos totais da macroalga *L. catarinensis* no final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcados com letras diferentes entre comparações.....101

FIGURA 7: Distribuição fatorial do componente principal (PCA) para os dados de ( $\alpha$  ETR, ETRmax, ETR, Fv/Fm, Fv/Fm', Ik), clorofila *a*, Ficobiliproteínas, carotenoides, compostos fenólicos, DPPH, Açúcares totais e amido e Taxa de crescimento. N=3.....103



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1: Dados ambientais fornecidos pela EPAGRI/CIRAM, coletados na estação meteorológica de Florianópolis localizada no município de São José, para os meses de Fevereiro e Agosto em que foram realizadas as coletas.....42

TABELA 2: Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3) da Irradiância, Temperatura, Salinidade, Turbidez, pH e O<sub>2</sub> dissolvido da água do mar obtidos durante o período de coleta de *Laurencia catarinensis* na Praia da Barra e Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, no período de Fev/2012 a Fevereiro/2014.....44

TABELA 3: Concentração dos nutrientes dissolvidos na água do mar obtidos durante o período de coleta de *Laurencia catarinensis* na Praia da Barra (PB) e Ilha do Xavier (XV), Florianópolis, SC, no período de Agosto/2012 a Fevereiro/2014.

Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).....45

TABELA 4: Resultados das análises de ANOVA fatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes Estádios reprodutivos e Estações do ano. Estes dados foram obtidos através das amostras coletadas na Ilha do Xavier da macroalga *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de F e p, em negrito e gl (graus de liberdade).....46

TABELA 5: Resultados das análise de ANOVA fatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes Estádios reprodutivos e Estações do ano. Estes dados foram através das amostras coletadas na Praia da Barra da macroalga *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os

dados de  $F$  e  $p$ , em negrito e gl (graus de liberdade).....47

## CAPÍTULO 2

TABELA 1: Resultados das análises bifatorias ANOVA para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos ao final do experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de  $F$  e  $p$ , em negrito e gl (graus de liberdade).....81

TABELA 2: Resultados das análises trifatorias ANOVA para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes tempo, nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de  $F$  e  $p$ , em negrito e gl (graus de liberdade).....87,88

TABELA 3: Resultados das análises bifatorial ANOVA dos Carotenoides, para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos estão apresentados com os dados de  $F$  e  $p$ , em negrito e gl (graus de liberdade).....93

TABELA 4: Concentração dos carotenoides (mg/g - massa seca) determinada por CLAE da macroalga *Laurencia catarinensis*. As Amostras foram submetidas as temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os valores apresentados correspondem a media de tres injecoes (10 µL ±desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls. ....94

TABELA 5: Resultados das análises bifatorial ANOVA dos compostos fenólicos, para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos estão apresentados com os dados de F e *p*, em negrito e gl (graus de liberdade).....99

TABELA 6: Concentração dos compostos fenólicos (mg/g - massa seca) determinada por CLAE para o extrato MeOH 80% da macroalga *L. catarinensis*. As condições experimentais foram 20°C, 24°C e 28°C, com as concentrações baixas de nutrientes (CBN), Intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os valores apresentados correspondem a média de três injeções (10µL)± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.....100

TABELA 7: Os autovalores e percentual da variância total dos dois primeiros eixos extraídos dos dados de PCA utilizando os parâmetros fotossintéticos ( $\alpha$  ETR, ETRmax, ETR, Fv/Fm,  $\Delta F / F'm$ , Is), pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos, DPPH, açúcar totais e amido.....102



## LISTA DE ABREVEATURAS

mg/gMS: miligrama/grama de massa Seca

CBN: Concentração baixa de nutrientes

CIN: Concentração intermediária de nutrientes

CAN: Concentração alta de nutrientes

Rt: Tempo de retenção

min: minutos

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

$\Delta F/F_m$ : Rendimento quântico efetivo

ETR: Taxa de transporte de elétrons

$F_v/F_m$ : Rendimento quântico máximo

$\alpha$  ETR: Eficiência fotossintética

$I_k$ : Irradiância de saturação

PB: Praia da Barra

XV: Ilha do Xavier



## SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	25
2. Objetivos.....	26
3. Material e Métodos.....	26
3.1 Locais de Estudo.....	26
3.2 Material Algal e Fenologia.....	27
3.3 Material Algal e Experimento.....	27
3.4 Métodos Analíticos.....	30
3.4.1 Análise dos nutrientes da água.....	30
3.4.2 Taxa de Crescimento relativa.....	30
3.4.3 Extração de Ficobiliproteínas.....	31
3.4.4 Extração de Clorofila <i>a</i> .....	31
3.4.5 Extração de Carotenoides.....	32
3.4.5.1 Determinação de Carotenoides por CLAE.....	32
3.4.6 Análise da fotossíntese a partir da fluorescência da Clorofila <i>a</i> .....	32
3.4.7 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	33
3.4.7.1 Determinação dos compostos fenólicos totais por CLAE.....	33
3.4.8 Inibição do radical DPPH.....	34
3.4.9 Extração de Açúcares solúveis totais.....	34
3.5 Extração de Amido.....	34
3.6 Medidas dos fatores abióticos.....	35
Análises Estatísticas.....	35
4. Discussão Geral e Conclusão.....	124
5. Referências.....	125

CAPÍTULO 1: Restrições fenotípicas e metabólicas de *Laurencia catarinensis* imposta por variações sazonais em costões rochosos subtropicais

1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos.....	39
3. Métodos Analíticos.....	39
4. Resultados.....	42
5. Discussão.....	58
6. Referências.....	62

CAPÍTULO 2: As ondas de aquecimento e poluição antrópica podem comprometer a ecofisiologia de produtores primários? Um estudo de caso com *Laurencia catarinensis* (Ceramiales, Rhodophyta)

1. Introdução.....	70
2. Material e Métodos.....	74
3. Métodos Analíticos.....	75
4. Resultados.....	79
5. Discussão.....	104
6. Referências.....	111



## 1 Introdução Geral

As alterações ambientais em decorrência das mudanças climáticas globais e dos impactos antrópicos, especialmente nas regiões costeiras, são algumas das maiores preocupações atuais em relação a crise que vive a biodiversidade mundial. As alterações no comportamento do clima são majoritariamente em decorrência da queima de combustíveis fósseis, que resultam no aumento do efeito estufa, colocando em risco a biodiversidade do planeta (Buckeridge et al, 2007). Declínios na biodiversidade também já foram observados mundialmente em decorrência dos impactos antrópicos (Liu et al., 2007; Connell et al. 2008), especialmente em ambientes marinhos, onde é possível que impactos locais (ex. liberação de nutrientes, decorrente da descarga de esgotos domésticos) se combinem com mudanças globais acelerando alterações ecológicas em áreas mais amplas da costa.

Neste contexto, o ambiente marinho costeiro tem sido fortemente afetado, pois cerca de 60% da população humana está concentrada cerca de 100 km distante do mar e margens costeiras produtivas dos oceanos, sendo que essa proporção deverá aumentar até 75% nas próximas décadas devido ao crescimento demográfico (Vitousek et al.1997).

Dentre os fatores relacionados às mudanças climáticas, podemos citar o aumento da temperatura da atmosfera e conseqüentemente da água do mar. A temperatura da superfície do mar (TSM) no Oceano Atlântico tem aumentado nas últimas décadas, sendo que no Atlântico Sul, esse aumento foi intensificado a partir da segunda metade do século XX, possivelmente devido às mudanças na camada de ozônio sobre o Polo Sul e também ao aumento dos gases efeito estufa (PBMC, 2012). Segundo dados do IPCC (Painel Intergovernamental de Mudanças climáticas), divulgados no quinto relatório (AR5), o oceano tem absorvido mais de 80% do calor acrescentado ao sistema climático, o que provocará um aumento de pelo menos 4°C na superfície do mar (IPCC, 2014). O aumento da temperatura dos oceanos e do nível do mar são indicadores consistentes de aquecimento do planeta.

Eventos climáticos extremos, como ondas de calor, são previstos a aumentar em frequência e magnitude como consequência do aquecimento global, mas seus efeitos ecológicos em ecossistemas marinhos ainda são mal compreendidos (Wernberg et al. 2012).

## 2 OBJETIVO GERAL

Conhecer a ecofisiologia dos diferentes estádios reprodutivos da macroalga *Laurencia catarinensis* encontrados nas estações de Verão e Inverno, bem como avaliar os impactos causados pela variação de alguns fatores associados ao aquecimento global e também estressores locais sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos da alga.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a variação fenológica da população ao longo de três anos;
- Avaliar a fisiologia da alga, através de pigmentos, metabólitos primários e metabólitos secundários dos estádios reprodutivos nas estações de verão e inverno;
- Realizar experimento com diferentes temperaturas e concentrações de nutrientes, para simular a variação de um fator associado ao aquecimento global e outro à poluição antrópica

## 3 Material e Métodos

### 3.1 Locais de Estudo

As coletas foram realizadas na Ilha do Xavier localizada a cerca de 4,5 km a leste da Ilha de Santa Catarina, em frente à Praia Mole e na Praia da Barra, de apenas 70m de extensão, localizada no canto Sul da Barra da Lagoa, Florianópolis, Brasil. De maneira geral, essas regiões apresentam características oceanográficas relativamente homogêneas, apesar de sua dinâmica de pequena e mesoescala ainda ser modestamente conhecida (Pereira et al. 2009). As águas costeiras e oceânicas da plataforma continental sul estão sob a ação dinâmica da convergência bilateral das correntes do Brasil (CB) e das Malvinas (CM), formando o limite oeste da Convergência Subtropical (CS). A CB transporta massas de água de origem tropical para o sul, até cerca de 36°S, onde converge com águas frias e menos salinas oriundas de sul transportadas pela CM (Rossi- Wongtschowski & Madureira, 2006).

Para o experimento, as amostras foram coletadas somente na Ilha do Xavier e para os estudos fenológicos, nos dois locais.

### 3.2 Material algal e Fenologia

As coletas foram realizadas em três áreas dos costões rochosos da Ilha do Xavier, com as respectivas localizações (27°36'33''S 48°23'09''W; 27°36'35''S 48°23'10''W e 27°36'38''S 48°23'15''W), e Praia da Barra (27°34'21.9''S 48°25'05.9''W; 27°34'24.1''S 48°25'16.7''W e 27°34'20.0''S 48°24'59.6''W) nos períodos de Fevereiro/2012, Agosto/2012, Fevereiro/2013, Agosto/2013 e Fevereiro/2014. As algas foram coletadas manualmente, com auxílio de quadrado 10x10 cm, para a delimitação da área e foram colocadas em sacos plásticos. Em laboratório, as algas foram triadas em lupa para separação dos estádios reprodutivos, pesadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer para posteriores extrações.

### 3.3 Material algal e Experimento

Amostras de *Laurencia catarinensis* foram coletados em março de 2014, na Ilha do Xavier (27°36'33''S 48°23'09''W, 27°36'35''S 48°23'10''W, 27°36'38''S 48°23'15''W). Originalmente, as amostras seriam coletadas na Ilha do Arvoredo, Praia da Barra e Ilha do Xavier, onde a alga havia sido encontrado previamente, mas foi verificado o desaparecimento das algas na Ilha do Arvoredo e declínio da população na Praia da Barra. Assim, para analisar as possíveis causas desses eventos, foi proposto o experimento para que se pudesse avaliar como a população de *Laurencia catarinensis* suportaria fisiologicamente o aumento da temperatura e da poluição na água do mar. Por isso, optou-se por realizar os experimentos com as algas da Ilha do Xavier, devido a proporção de algas desta espécie na localidade.

As medições das condições de campo da irradiância, temperatura da água do mar, salinidade, turbidez, pH e oxigênio dissolvido foram:  $691,7 \pm 0,04 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 20°C, 32, 0 NTU,  $8,1 \pm 0,02$ ,  $6,7 \pm 0,03\text{mg/L}$ , respectivamente.

As amostras foram coletadas do costão rochoso durante a maré baixa e transportados em caixas térmicas com água do mar para o laboratório, onde foram triados para remover epífitas e epifauna. Estes segmentos de talos foram cultivados sob as mesmas condições (20°C, com  $0,96 \mu\text{M de N-NH}_4^+$ ;  $0,46 \mu\text{M de P-PO}_4^{3-}$  e  $0,38 \mu\text{M de N-NO}_3$  - condição controle) durante 24 horas antes da sua utilização no experimento. Assim, os

tratamentos com nutrientes foram denominados CBN quando concentração baixa de nutrientes, CIN com concentrações intermediárias de nutrientes e CBN a níveis elevados em relação ao nível natural. As concentrações de nutrientes utilizadas no experimento foram determinadas de acordo com os cenários mais preocupantes de poluição antrópica, que pode ser evidenciado na China.

O experimento mesocosmo foi realizado sob luz natural durante 30 dias, em casa de vegetação (Figura 1 e 2). Três diferentes temperaturas de água (20°C, 24°C e 28°C) foram estabelecidas por chillers (GELAQUA) e três combinações de concentração de nutrientes (CBN: 0,96 µM de amônio, 0,46 µM de fosfato, 0,38 µM de nitrato; CIN: 40 µM de amônio, 2 µM de fosfato, 10 µM de nitrato; CAN: 80 µM de amônio, 5 µM de fosfato, 40 µM de nitrato, foram realizadas usando ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>). A adição destes nutrientes foi realizada diretamente nas caixas d'água com água do mar. Para isso, os valores de nutrientes que a água já continha, foram descontados para a obtenção dos valores desejados.

As amostras com 20°C e a concentração mais baixa de nutrientes foram consideradas como o controle, por ser a condição mais parecida a ocorrida em campo. O experimento consistiu em nove combinações de tratamentos com n = 4, no âmbito de um sistema de fluxo fechado e estável. Cada tratamento foi fornecido por um tanque com 300 litros de água do mar, com as temperaturas e concentração de nutrientes controladas. Cada tanque fornecia água para quatro frascos de plástico transparentes com capacidade de 2,5 litros, contendo 15g de *L. catarinensis* amarradas em uma lâmina de vidro.

As medidas de O<sub>2</sub> dissolvido, pH, salinidade, turbidez, temperatura e irradiância foram avaliadas diariamente por meio de equipamentos: WTW Oxímetro Oxi 315i, medidor de pH AT-315 Alfakit, Refratômetro SZJ- S10, Termômetro e Quantômetro LI-COR LI-1400, respectivamente.



Figura 1: Experimento realizado na casa de vegetação



Figura 2: Experimento com a macroalga *Laurencia catarinensis* em casa de vegetação.

### 3.4 Métodos analíticos

As análises de nutrientes da água, Biomassa, extrações e quantificações de Clorofila *a*, Ficobiliproteínas, Carotenoides, Atividade Antioxidantes, compostos fenólicos e Amido, foram realizadas para as amostras do estudo fenológico. Todas as concentrações foram determinadas por espectrofotometria.

Para o experimento realizado com a macrolaga, as concentrações de Clorofila *a*, Ficobiliproteínas, Açúcares Totais, Amido também foram quantificadas por espectrofotometria. No entanto, as análises de carotenoides e compostos fenólicos, foram realizadas a partir de cromatografia líquida de alta eficiência. Adicionalmente, também foram realizadas as análises de % da Taxa de crescimento relativo e análise da fotossíntese a partir da Fluorescência da clorofila *a*.

#### 3.4.1 Análises dos Nutrientes da água

Para as análises dos nutrientes na água, as amostras foram colocadas em garrafas de PVC. Em laboratório, as amostras de água foram filtradas com filtros GF/F Whatman com malha de 0,45  $\mu\text{m}$ . Os filtros utilizados para determinação do material particulado em suspensão foram preparados de acordo com Strickland & Parsons. (1972). Os nutrientes inorgânicos dissolvidos ( $\text{NO}_3^{-2}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) foram determinados pelo método colorimétrico, utilizando-se espectrofotômetro (Pró-análise, UV-1100), provido de cubetas com 5 cm de passo óptico. O Nitrato e o fosfato foram determinados segundo Grasshoff et al. (1983). Utilizou-se uma coluna para redução através de um sistema heterogêneo de grânulos de cádmio, para a determinação do nitrato. A concentração de N-amoniacal foi determinada seguindo os métodos descritos por Tréguer e Le Corre (1976). As análises dos nutrientes da água foram realizadas para todas as coletas da Fenologia. Para o experimento, as análises eram realizadas de 48 em 48 horas para monitoramento das concentrações dos nutrientes.

#### 3.4.2 Taxa de Crescimento relativa (TCR)

Os efeitos dos fatores temperatura e concentrações de nutrientes no crescimento dos talos de *L. catarinensis* foram avaliadas por meio de medidas de massa fresca no início do experimento, o qual foi estabelecido peso de 15g para todas as réplicas, e obtido os pesos no final do experimento. A taxa de crescimento foi calculada segundo a formula de Penniman et al. 1986.

$$TC = [(MF_f/MF_i)^{1/t} - 1].100$$

$Mf_f$ =Massa fresca final

$Mf_i$ =Massa fresca inicial

t= tempo

### 3.4.3 Extração de Ficobiliproteínas

A extração dos pigmentos foi realizada através da trituração de 0,3 g (massa fresca) de cada amostra em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 4 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 20 minutos (4000 rpm a 4 °C) e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro ( $\lambda = 498,5, 614$  e  $651$  nm). A determinação da concentração das ficobiliproteínas foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Kursar et al. (1983). Os resultados foram expressos em mg de pigmentos por g de massa seca.

$$FC = (151.1 * A_{614}) - (99.1 * A_{651})$$

$$FE = (155.8 * A_{498}) - (40 * A_{614}) - (10.5 * A_{651})$$

### 3.4.4 Extração de Clorofila *a*

A extração de clorofila *a* foi realizada através da trituração de 0,3 g (massa fresca) de cada amostra em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 4 mL de acetona 90%, de acordo com Ritchie (2008). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 4 °C) durante 15 minutos e o sobrenadante, contendo a clorofila *a*, foi transferido para tubos de eppendorfs vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro da marca BIOSPECTRO SP-220 ( $\lambda = 630, 647$  e  $664$  nm).

nm). A determinação da concentração de clorofila *a* foi realizada utilizando-se a fórmula descrita por Ritchie (2008). Os resultados foram expressos em mg de clorofila *a* por g de massa seca.

$$\text{Chl-}a = 11,406 * (\text{A}664 - \text{A}750)$$

### 3.4.5 Extração de Carotenóides

A extração dos carotenoides totais foi realizada com metanol (0,5 g de massa seca,  $n = 3$ ). O extrato recuperado foi submetido à espectrofotometria UV-Vis para determinação do teor de carotenóides totais ( $\lambda = 480$  nm). Os carotenoides totais foram determinados através da fórmula de  $\alpha$ -caroteno ( $0.01-12 \mu\text{g mL}^{-1}; y = 1019x; r^2 = 0.998$ ). Esta análise foi realizada somente para os dados de fenologia.

#### 3.4.5.1 Determinação de Carotenóides por CLAE

As amostras do experimento foram submetidas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Dessa forma, os carotenóides foram extraídos a partir de amostras (0,5 g de massa seca,  $n = 3$ ) com metanol. Os extratos foram centrifugados (10 min., 4000 rpm). Uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) foi injetada na cromatografia líquida (LC-10A da Shimadzu) equipado com uma coluna de fase inversa C18 (Vydac 218TP54; 250 mm x 4.6 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ ), protegida por uma coluna de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$  (Vydac 218GK54) e detector and a UV-vis (450 nm). As eluições foram realizadas com MeOH: CH<sub>3</sub>CN (90: 10, v/v) com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação dos carotenóides ( $\alpha$ -caroteno e luteína) foram realizados utilizando o tempo de retenção e co-cromatografia dos compostos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), bem como, por analogia com outros relatórios de análise de carotenóides por RP-CLAE -UV-visível em condições semelhantes (Scott e Eldridge 2005; Hulshof et al 2007). A quantificação de Carotenoides foi baseada nas curvas padrões: luteína (0.5 - 45  $\mu\text{g mL}^{-1}; y = 7044x; r^2 = 0.999$ ) e  $\alpha$ -caroteno (0,01-12  $\mu\text{g mL}^{-1}; y = 1019x; r^2 = 0,998$ ).

#### 3.4.6 Análise da Fotossíntese a partir da fluorescência da clorofila *a*

As análises da Fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas somente para o experimento. O desempenho fotossintético foi estimado in vivo



pela fluorescência da clorofila *a* (chl *a*) do PSII usando um fluorômetro portátil (Junior-PAM, Walz, Alemanha), em cada lâmina contendo alga ( $n = 3$  repetições para cada tratamento). As definições ideais para a espécie estudada foram previamente avaliadas em condições *in situ* e uma vez definido foram mantidas constantes (ganho = 1 e intensidade da luz de medida = 8). A duração do impulso de saturante foi de 0,8 seg. Para cada amostra foram medidos rendimento quântico efetivo do fotossistema II,  $\Delta F / F'_m$ , onde  $\Delta F = F'_m - F_t$ ;  $F'_m$  é a fluorescência máxima de uma amostra iluminada;  $F_t$  é o transitório da fluorescência (Schreiber et al., 1994); ETR (taxa de transporte de elétrons) absoluta porque foi medida a absorvância de cada amostra. Portanto,  $ETR = \Delta F / F'_m \times 0,5 \times \text{abs} \times \text{PAR}$ , onde PAR é a radiação fotossinteticamente ativa, como  $\mu\text{mol s}^{-1}$ , abs é a absorvância da amostra (a abs das amostras de *L. catarinensis* foram em média 0,915). Para medições de rendimento quântico máximo, as algas foram mantidas no escuro por 15 minutos. As curvas de fotossíntese- irradiância foram geradas com base na proporção de ETR e parâmetros foram calculados por Webb et al. (1984) e Platt et al. (1980), dessa forma, o rendimento máximo quantum ( $F_v/F_m$ ), a taxa máxima de transporte de elétrons (ETR<sub>max</sub>), eficiência fotossintética ( $\alpha$  ETR) e irradiação de saturação ( $I_k$ ) foram obtidos.

### 3.4.7 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Arnaldos et al. (2001) com modificações baseadas em Schiavon (2012). Utilizou-se 0,5 g de biomassa seca e 5 mL de metanol 80%, agitou-se no vórtex e incubou-se por 1h ao abrigo de luz. Logo, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm e temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e então utilizou-se 150  $\mu\text{L}$  reativo de Folin- Ciocalteu e 1,650  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 2% (p/v). Para as leituras em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SO-220) utilizou-se o comprimento de onda de 750 nm. A quantificação dos compostos fenolicos totais foi realizada a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 800  $\text{dg.mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,254x$ ). Esta análise foi realizada somente para os dados de fenologia.

#### 3.4.7.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos por CLAE

Os compostos fenólicos foram extraídos a partir de amostras (0,5 g de massa seca,  $n = 3$ ) utilizando metanol 80%. As soluções foram

centrifugadas (10 min, 4000 rpm). O extrato (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) foram injetados no cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A) equipado com uma coluna C18 de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$  (Shim-pack C18; de 250 mm  $\times$  4,6 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$ ) e um detector de UV-vis (280nm). A eluição foi realizada com água: ácido acético: n-butanol (350: 1: 10, v / v / v), a um fluxol de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. A Identificação polifenólicos foi realizada utilizando os tempos de retenção e de co-cromatografia de compostos padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação dos compostos fenólicos baseou-se na curvas padrão de ácido gálico ((2.5–200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 795.09x$ ;  $r^2 = 0.999$ ). Esta análise foi realizada somente para o experimento.

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

A metodologia utilizada foi descrita Tait et al. (1996). Para a avaliação quantitativa, 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato, obtido pela extração com methanol 80% (0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi acrescido de 2,9 mL da solução de DPPH (200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, USA) e deixado 1 h no escuro a 25 $^{\circ}\text{C}$ . Para as leituras em espectrofotômetro utilizou-se o comprimento de onda de 517 nm ( espectrofotometro BIOSPECTRO SP-220). A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição: } \left[ \frac{\text{Abs controle (DPPH)} - \text{Abs final da amostra}}{\text{Abs controle (DPPH)}} \right] \times 100$$

#### 3.4.9 Extração de açúcares solúveis totais

A extração de açúcares solúveis totais foi feita de acordo com a metodologia proposta por Shannon (1968). As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido (0,05 g – massa fresca) com a posterior adição de 2 mL da solução MCW (metanol:clorofórmio:água) (12:5:3, v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ ) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (5 minutos, 4000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ ). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e o extrato foi novamente centrifugado. A fase superior dos extratos foram coletadas e utilizada para análise dos açúcares. A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit & Burris (1964). Aliquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL

do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotometro. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  -  $r^2= 0,99$ ;  $y = 0,008x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca. Esta análise foi realizada somente para o experimento.

### 3.5 Extração de amido

A metodologia descrita por McCready et al. (1950) foi utilizada para determinar o teor de amido. Ao resíduo da centrifugação do extrato, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 4°C) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 minutos, 4000 rpm a 4°C). Os sobrenadantes foram reunidos. A dosagem do amido foi realizada de acordo com o método de Umbreit & Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotometro. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 7,5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  -  $r^2= 0,99$ ;  $y = 0,341x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

### 3.6 Medidas dos fatores abióticos: Oxigênio dissolvido, pH , Salinidade, Irradiância, Temperatura e Turbidez

Para a avaliação do O<sub>2</sub> dissolvido foi utilizado o equipamento (Oxímetro WTW Oxi 315i), para o pH (pHmetro AT-315 Alfakit), salinidade foi medida com refratometro SZJ- S10, Irradiância com o Quantômetro LI-COR LI-1400, para a Temperatura foi usado um Termômetro de mercúrio 0,5°C de precisão e a Turbidez foi medida através do Turbidímetro Plus II- Alfakit.

### 3.7 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls'. Todas as análises estatísticas foram realizadas

utilizando o pacote de software Statistica, considerando  $p \leq 0.05$ . Para diferenças significativas, post hoc foi realizada utilizando Teste de múltiplas comparações Newman-Keuls. A homogeneidade da variância foi testada *a priori*, pelo teste de Cochran. Essas análises foram realizadas para o Experimento e Fenologia.

O grupo de dados multivariados foi analisado em MVSP 3.2 software (multivariada Statistical Package for Windows) (Kovach 2005), pela técnica estatística de Análise de Componentes Principais (PCA- Análise de Componentes Principais). Esta análise foi realizada somente para o Experimento.

## CAPÍTULO 1

### Restrições fenotípicas e metabólicas de *Laurencia catarinensis* imposta por variações sazonais em costões rochosos subtropicais

#### 1 Introdução

A preocupação com os impactos da mudança do clima (IPCC 2013) tem motivado esforços para avaliar as mudanças sazonais de padrões fenológicos e metabólicos das populações-chave, que caracterizam diferentes aspectos de sua biologia, avaliando eventual relação entre estes aspectos e fatores ambientais, como temperatura (Araujo et al. 2007; Bravin & Valentin, 2002). Essas mudanças fenológicas têm sido relacionadas a respostas biológicas ao aquecimento do clima dos últimos 150 anos clima (Beebe, 1995; Parmesan & Yohe, 2003).

Nos ecossistemas terrestres, para muitas espécies, o clima influencia nas principais fases do seu ciclo de vida anual, como a migração, florescimento e acasalamento. Como o clima esquentou nas últimas décadas, o calendário destes eventos foi alterado em algumas partes do país. Assim, em ecossistemas marinhos, os impactos da mudança climática causa diminuição da produtividade do oceano, alteração na dinâmica da cadeia alimentar, redução da abundância de espécies de formação de habitats, deslocando a distribuição das espécies (Gulberg & Bruno, 2010; Harley et al. 2006).

Em ecossistemas costeiros estes esforços estão concentrados em representantes de áreas temperadas, principalmente na biodiversidade marinha da flora do Sul da Austrália por ter 30-40% das espécies do mundo de macroalgas e até 50% de suas espécies são estimadas endêmica (Wernberg et al. 2011; Kopsell et al. 2006). Assim, essas informações são importantes para o monitoramento e gestão ambiental no contexto das mudanças globais (Espinoza-Avalos 2005), em ambientes tropicais ou transitórias, são necessários esforços adicionais. Nas áreas de transição biogeográfica, como províncias subtropicais representados no Atlântico ocidental por Sul do litoral brasileiro, as mudanças sazonais na temperatura e irradiância são bem conhecidos. No entanto, estes padrões estão mudando nas últimas décadas, devido as mudanças climáticas. Um estudo recente de temperaturas máximas e mínimas no sul do Brasil durante o período 1960-2002 apontou para um aquecimento sistemático do Sul, as mudanças de sensoriamento de temperatura máxima e mínima nos níveis anuais e sazonais (Marengo, 2010). A temperatura da superfície do mar no Oceano Atlântico, tem aumentado nas últimas décadas e no Atlântico Sul, este aumento foi intensificado a partir da segunda metade do século XX, possivelmente devido a alterações na camada de ozônio sobre o Pólo Sul e do aumento dos gases de efeito estufa (PBMC, 2012). Essas mudanças podem afetar os padrões fenológicos das algas entremarés. O crescimento e a reprodução destes organismos são resultado de ajustamentos metabólicas dos sistemas biológicos. Esses ajustes podem resultar em alterações fenotípicas ou mesmo na seleção de genótipos com particularidades bioquímicas (Forrest & Miller-Rushing, 2010; Wilczek et al. 2010.) Assim, os fatores que determinam a distribuição qualitativa desses produtores primários variam, apesar de ser muitas vezes relacionados à dessecação, irradiância, hidrodinâmica, fotoperíodo e também a disponibilidade de nutrientes (Lobban & Harrison, 1997). Entre os fatores que determinam essas alterações na expressão genética, a temperatura produz grandes mudanças de comportamento, distribuição ou variações fenotípicas sazonais de organismos marinhos (Tittensor et al. 2010; Eggert, 2012).

Tradicionalmente sob condições estressantes, com limitação de recursos para a fotossíntese, como menor luminosidade e fotoperíodo, poderia ocorrer a inibição do desenvolvimento, especialmente em algas de ambientes tropicais. Reis & Valentin (2000) no estudo realizado com a alga vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux encontraram mais talos vegetativos do que reprodutivos no verão, o que foi atribuído por fatores abióticos, como temperatura e mais horas de luz solar.

Plantas Cistocárpicas representam uma baixa proporção de biomassa enquanto plantas masculinas não foram encontrados. Assim, a raridade de gametófitos provavelmente, pode ter ocorrido pela substituição de reprodução sexual por reprodução assexuada ou reprodução vegetativa via apomixia. Quando estas temperaturas limitam o crescimento e/ou reprodução é observada a redução do tamanho ou da frequência de estruturas reprodutivas (Dring, 1988; Molenaar, 1996), o mesmo verificado por Paula & Oliveira Filho (1980) que descreveram aspectos fenológicos de duas populações *Sargassum cymosum* C. Agardh que apresentaram valores mais elevados na altura do talo e biomassa no final da primavera e os valores mais baixos no verão ou início do outono. Além disso, as alterações fenotípicas interferem na síntese de diferentes categorias de substâncias químicas que causam alterações no metaboloma de organismos sésseis especialmente em algas (Van Alstyne et al. 2001). Dessa forma, as algas podem responder à mudança na concentração e proporção de pigmentos fotossintéticos/pigmentos fotoprotetores, fotoinibição dinâmica (Abdala-Diaz et al. 2006), a atividade eficiente de sistemas antioxidantes (Bischof & Rautenberger 2012), a atividade celular de carboxilação (Davison, 1991) e a variação da composição lipídica e fluidez das membranas (Steinhoff et al. 2012). Em certas estações extremas de temperatura, por exemplo, exigem elaborados mecanismos antioxidantes. Estes mecanismos são defesas essenciais para a manutenção dessas populações em períodos adversos (Bischof & Rautenberger 2012; Bouzon et al. 2012). As demandas de energia decorrente do estresse oxidativo, resultando em um déficit exigindo limitação fenotípica podem reduzir a fertilidade dos gametófitos e tetrasporófitos, como observado em espécies de *Gracilaria* (McLachlan & Edelstein, 1977; Rabanal et al. 1997, Marinho-Soriano et al. 1998). Ramlov (2010) observou em seu estudo que o teor de carotenóides em *Gracilaria dominguisis*, apresentaram variações sazonais e anuais, o que demonstra que a mudança na concentração destes compostos pode representar uma estratégia de estágios reprodutivos às variações dos fatores ambientais observadas entre os anos de amostragem. Estudos com *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq (como *Gigartina acicularis*) têm respostas quantitativas para dia de fotoperíodo longo atuando apenas na redução do tempo necessário para a diferenciação de tetrasporangios (Guiry, 1984). Portanto, a caracterização de populações naturais é extremamente importante para que se possa inferir estimativas da população frente a respostas a fatores de estresse, tais como aumento de temperatura em ecossistemas marinhos. Além disso, estudos de aspectos fenológicos são

fundamentais para viabilidade do aproveitamento econômico da espécie. Assim, o presente estudo buscou avaliar, através do estudo fenológico reprodutivo, a influência das estações de verão e inverno sobre a fisiologia da alga *Laurencia catarinensis* através das análises de biomassa, clorofila *a*, Ficobiliproteínas, carotenóides, compostos fenólicos, atividade antioxidante e amido.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Coleta do Material**

As coletas foram realizadas em três áreas dos costões rochosos da Ilha do Xavier e da Praia da Barra, as duas localizadas em Florianópolis, SC. Nos períodos de Fevereiro/ 2012, Agosto/2012, Fevereiro/2013, Agosto/2013, Fevereiro/2014. As algas foram coletadas manualmente, com auxílio de quadrado de PVC com 10x10 cm, para a delimitação da área com o número amostral de 15 quadrados, sendo 5 quadrados para cada área. Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos para posterior triagem em laboratório.

#### **2.1.2 Processamento do material em Laboratório**

As algas foram triadas em Lupa para a separação dos estádios reprodutivos, pesadas e armazenadas em papel alumínio para posterior extração de pigmentos e metabólitos primários e secundários.

## **3 Métodos Analíticos**

### **3.1 Análise dos Nutrientes da água**

As amostras de água coletadas em campo, foram filtradas com filtros GF/F Whatman com malha de 0,45  $\mu\text{m}$ . Os filtros utilizados para determinação do material particulado em suspensão foram preparados de acordo com Strickland & Parsons. (1972). Os nutrientes inorgânicos dissolvidos ( $\text{NO}_3^{-2}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ) foram determinados pelo método colorimétrico, utilizando-se espectrofotômetro (Pró-análise, UV-1100), provido de cubetas com 5 cm de passo óptico. O Nitrato e o fosfato serão determinados segundo Grasshoff *et al.* (1983). Para o processo de redução do nitrato, foi utilizada uma coluna através de um sistema heterogêneo de grânulos de cádmio. A concentração de N-amoniacoal foi

determinada seguindo os métodos descritos por Tréguer e Le Corre (1976).

### 3.1.2 Pigmentos fotossintetizantes

Para as extrações dos pigmentos foram utilizadas 0,3 g de massa fresca, (n=3) . As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e extraídas com 50 mM de tampão fosfato (pH 5,5). O homogenato foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min a 4°C para a extração das ficobiliproteínas presentes no sobrenadante. A extração de clorofila *a* foi realizada com acetona 90% e centrifugada (centrífuga EPPENDORF 5810R) a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os carotenoides foram extraídos com 0,5 g de massa seca e metanol PA (n=3). Os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria (espectrofotometro BIOSPECTRO SP-220). As concentrações de ficobiliproteínas foram calculadas de acordo com Kursar et al. (1983), Ritchie (2006,2008) para clorofila *a* e os carotenoides totais foram determinados através da fórmula de  $\alpha$ -caroteno ( $0.01-12 \mu\text{g mL}^{-1}; y = 1019x; r^2 = 0.998$ ).

### 3.1.3 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Arnaldos et al. (2001) com modificações baseadas em Schiavon (2012). Utilizou-se 0,5 g de biomassa seca e 5 mL de metanol 80%, agitou-se no vórtex e incubou-se por 1h ao abrigo de luz. Logo, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm e temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e então utilizou-se 150  $\mu\text{L}$  reativo de Folin-Ciocalteu e 1,650  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 2% (p/v). Para as leituras em espectrofotômetro utilizou-se o comprimento de onda de 750 nm . A quantificação dos compostos fenolicos totais foi realizada através da curva padrão de acido galico ( $50 \text{ a } 800 \text{ dg.mL}^{-1} - r^2 = 0,99; y = 1,254x$ ).

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

A metodologia utilizada foi descrita Tait et al. (1996). Para a avaliação quantitativa, 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato obtido pela extração com metanol 80% ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi acrescido de 2,9 mL da solução de DPPH ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, USA) e deixado 1 h no escuro a 25°C. Para as leituras em espectrofotômetro utilizou-se o comprimento de onda de



517 nm ( espectrofotometro BIOSPECTRO SP-220). A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

% de inibição:  $[(\text{Abs controle (DPPH)} - \text{Abs final da amostra}) / \text{Abs controle (DPPH)}] \times 100$

### 3.1.5 Extração e dosagem de amido

A metodologia descrita por McCready et al. (1950) foi utilizada para determinar o teor de amido. Foi utilizada 0,050 g de biomassa seca para a extração. Ao resíduo da centrifugação do extrato, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 4°C) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 minutos, 4000 rpm a 4°C). Os sobrenadantes foram reunidos. A dosagem do amido foi realizada de acordo com o método de Umbreit & Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotometro. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 7,5 µg. mL<sup>-1</sup>- r<sup>2</sup>= 0,99; y = 0,341x). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

### 3.2 Medidas de Oxigênio dissolvido, pH, Salinidade, Turbidez e Irradiância

Para a avaliação do O<sub>2</sub> dissolvido, pH, Salinidade, Turbidez, Irradiância e temperatura foram utilizados os seguintes equipamentos: Oxímetro WTW Oxi 315i, pHmetro AT-315 Alfakit , Refratômetro SZJ- S10, Turbidímetro Plus II- Alfakit, Radiômetro LI-COR LI-1400 e Termômetro. Todos os parâmetros abióticos foram medidos em campo.

### 3.3 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls'. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica, considerando  $p \leq 0.05$ . Para diferenças significativas, post hoc foi realizada utilizando Teste de múltiplas comparações Newman-Keuls. A homogeneidade da variância foi testada *a priori*, pelo teste de Cochran.

## 4 Resultados

### 4.1 Avaliação dos Parâmetros Ambientais

Com relação aos dados ambientais cedidos pela EPAGRI/CIRAM, pode-se observar que os maiores índices de Precipitação Pluviométrica Total Mensal (PPTM) registrados durante o período de amostragem foi no ano de verão e inverno de 2013, com 223 mm e 138 mm, respectivamente e os menores índices foram observados no verão e inverno de 2012 com 106 mm e 57.7 mm, respectivamente. A Média mensal da temperatura mínima (MMTMI) foi maior no verão de 2014 (23°C), juntamente com verão de 2012 (22.8°C). A Média mensal da temperatura máxima (MMTMA) foram registradas no verão de 2014 (30.4°C), seguida pelo verão de 2012 (29.4°C) e no inverno de 2012 (22.1°C). A Média Mensal da velocidade dos ventos (MMVV) foi maior no verão de 2013 (2.28 ms) e inverno de 2012 (2.96 ms). Com relação ao Total mensal dos Números de dias de Chuva (NDC), o maior número ocorreu no verão de 2013 (18 dias), juntamente com o inverno de 2013 (11 dias) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados ambientais fornecidos pela EPAGRI/CIRAM, coletados na estação meteorológica de Florianópolis localizada no município de São José, para os meses de Fevereiro e Agosto em que foram realizadas as coletas.

\*dados não fornecidos pela EPAGRI/CIRAM

Estações do Ano	PPTM (mm)	MMTMI (°C)	MMTMA (°C)	MMVV (ms)	NDC (Dias)
Verão/12	106	22.8	29.4	2.1	12
Inverno/12	57.7	16	22.1	2.96	8
Verão/13	223	22.1	28.7	2.28	16
Inverno/13	138	12.3	19.6	2.68	11
Verão/14	155	23	30.4	*	10

Os parâmetros físico-químicos da água do mar foram analisados no dia da coleta, incluindo as análises de irradiância, temperatura, salinidade, turbidez, pH, O<sub>2</sub> dissolvido e os nutrientes dissolvidos na água do mar (ortofosfato, nitrato, nitrito e N-amoniaco). A irradiância foi maior nas coletas de verão, da mesma forma que a temperatura. A salinidade se manteve entre 31 e 32 durante todas as coletas.

Com relação ao pH e O<sub>2</sub> dissolvido, os menores valores foram observados nas coletas de verão e os maiores valores nas coletas de inverno (tabela 2). As concentrações de ortofosfato, nitrato, nitrito e N-amoniaco da água do mar de cada coleta realizada constam na tabela 3.

**Tabela 2:** Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3) da Irradiância, Temperatura, Salinidade, Turbidez, pH e O<sub>2</sub> dissolvido da água do mar obtidos durante o período de coleta de *Laurencia catarinensis* na Praia da Barra e Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, no período de Fev/2012 a Fevereiro/2014.

Estação do ano	Ano	Local	Irradiância	Temperatura (°C)	Salinidade (UPS)	Turbidez (NTU)	pH	Oxigênio (mg/L)
Inverno	2012	PB	301,5 $\pm$ 0,00	17 $\pm$ 0,00	31 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,2 $\pm$ 0,02	7,4 $\pm$ 0,01
verão	2012	PB	659,2 $\pm$ 0,03	21,1 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,1 $\pm$ 0,01	6,6 $\pm$ 0,02
Inverno	2013	PB	344,1 $\pm$ 0,01	18,3 $\pm$ 0,1	31 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,2 $\pm$ 0,02	7,3 $\pm$ 0,01
verão	2013	PB	789,2 $\pm$ 0,03	22,4 $\pm$ 0,3	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	7,8 $\pm$ 0,01	6,8 $\pm$ 0,04
verão	2014	PB	600,7 $\pm$ 0,04	22 $\pm$ 0,00	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	7,1 $\pm$ 0,03
Inverno	2012	XV	391,2 $\pm$ 0,02	18,0 $\pm$ 0,2	31 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,3 $\pm$ 0,02	7,9 $\pm$ 0,03
verão	2012	XV	720,8 $\pm$ 0,02	21,5 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	7,8 $\pm$ 0,01	6,2 $\pm$ 0,01
Inverno	2013	XV	378,1 $\pm$ 0,03	18,8 $\pm$ 0,2	31 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,2 $\pm$ 0,03	7,4 $\pm$ 0,03
verão	2013	XV	701,2 $\pm$ 0,01	21,0 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	6,4 $\pm$ 0,04
verão	2014	XV	805,7 $\pm$ 0,04	20 $\pm$ 0,00	32 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	6,7 $\pm$ 0,03

**Tabela 3:** Concentração dos nutrientes dissolvidos na água do mar obtidos durante o período de coleta de *Laurencia catarinensis* na Praia da Barra (PB) e Ilha do Xavier (XV), Florianópolis, SC, no período de Agosto/2012 a Fevereiro/2014. Os valores correspondem a media  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Coletas	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	N-NO <sub>3</sub> (μM)	N-NO <sub>2</sub> (μM)	P- PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (μM)
PB/I/12	2,17±0,10	0,14±0,10	0,39±0,10	0,40±0,10
PB/V/12	10,68±0,01	0,11±0,20	0,20±0,10	0,17±0,10
PB/I/13	2,25±0,01	0,12±0,01	0,42±0,10	0,42±0,10
PB/V/13	50,72±0,02	0,10±0,10	0,22±0,20	0,32±0,10
PB/V/14	13,52±0,20	0,18±0,10	0,30±0,40	0,50±0,10
XV/I/12	2,23±0,30	0,14±0,00	0,18±0,10	0,44±0,10
XV/V/12	0,90±0,01	0,13±0,00	0,22 ±0,10	0,11±0,10
XV/I/13	2,30±0,02	0,15±0,30	0,17±0,30	0,43±0,10
XV/V/13	0,86±0,02	0,14±0,10	0,22±0,03	0,13±0,10
XV/V/14	4,78±0,01	0,10±0,03	0,33±0,10	0,09±0,10

**Tabela 4:** Resultados da análise de ANOVA fatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes Estádios reprodutivos e Estações do ano. Estes dados foram obtidos através das amostras coletadas na Ilha do Xavier da macroalga *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de F e p, em negrito e gl (graus de liberdade).

Fonte de variação Variável	Estações do Ano			Estádios Reprodutivos			EAxER		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
Biomassa	<b>393,4</b> 3	<b>4,06</b>	<b>0,00</b>	<b>1397,</b> 3	<b>14,43</b>	<b>0,00</b>	<b>509,2</b> 8	<b>5,26</b>	<b>0,00</b>
Clorofila <i>a</i>	<b>0,14</b>	<b>315,4</b> 7	<b>0,00</b>	<b>0,75</b>	<b>68,13</b>	<b>0,00</b>	<b>0,36</b>	<b>33,17</b>	<b>0,00</b>
Ficocianina	<b>0,11</b>	<b>10,07</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>28,30</b>	<b>0,00</b>	<b>1,08</b>	<b>3,89</b>	<b>0,00</b>
Ficoeritrina	<b>0,45</b>	<b>6,23</b>	<b>0,00</b>	<b>4,37</b>	<b>59,46</b>	<b>0,00</b>	<b>2,10</b>	<b>28,62</b>	<b>0,00</b>
Carotenoides	<b>0,09</b>	<b>4391,</b> 8	<b>0,00</b>	<b>0,26</b>	<b>12695</b> ,50	<b>0,00</b>	<b>0,17</b>	<b>8632,</b> 1	<b>0,00</b>
Compostos fenólicos	<b>0,01</b>	<b>265,9</b> 6	<b>0,00</b>	<b>0,30</b>	<b>4764,</b> 72	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>394,2</b> 8	<b>0,00</b>
DPPH	<b>46,43</b>	<b>381,8</b> 1	<b>0,00</b>	<b>399,8</b> 9	<b>3288,</b> 43	<b>0,00</b>	<b>48,52</b>	<b>399,0</b> 0	<b>0,00</b>
Amido	<b>0,08</b>	<b>327,1</b>	<b>0,00</b>	<b>1,17</b>	<b>4460,</b> 9	<b>0,00</b>	<b>2,46</b>	<b>9401,</b> 7	<b>0,00</b>

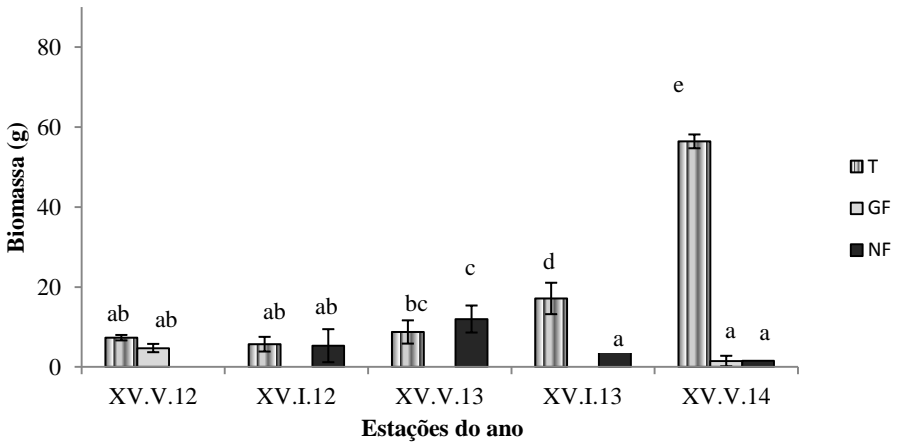
## 2 Variação Fenológica da População

Todos os dados analisados de Biomassa, Clorofila *a*, Ficobiliproteínas, Compostos carotenoidicos, Fenólicos, Atividade antioxidante e Amido , para os dois locais variaram significativamente, conforme descritos nas tabela 4 e 5.

Nas coletas realizadas na Ilha do Xavier, ocorreu aumento da biomassa dos tetrasporófitos no inverno/2013, com 17,11 g quando comparado ao verão com 8,73 g, já os talos não-férteis apresentaram diminuição da biomassa do verão para o inverno/2013, A maior quantidade de biomassa encontrada para os tetrasporófitos foi no verão/14, com 56,40g (figura 1). Nas coletas realizadas na Praia da Barra, a biomassa individual dos estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* apresentaram diminuição da biomassa dos tetrasporófitos quando comparados verão/12 com inverno/13 e inverno/12 com verão/13, Em contrapartida, verificou-se aumento da biomassa dos tetrasporófitos quando comparados inverno/13 com verão/14 (figura 2).

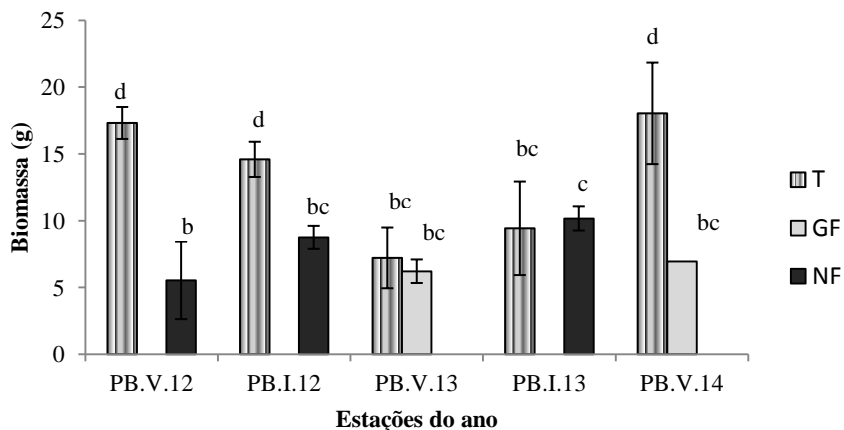
**Tabela 5:** Resultados da análise de ANOVA fatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes Estádios reprodutivos e Estações do ano. Estes dados foram através das amostras coletadas na Praia da Barra da macroalga *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de F e p, em negrito e gl (graus de liberdade).

Fonte de variação	Estações do Ano			Estádios Reprodutivos			EAxER		
	gl 2								
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
<b>Variável</b>									
Biomassa	<b>20,94</b>	<b>6,56</b>	<b>0,00</b>	<b>456,46</b>	<b>143,09</b>	<b>0,00</b>	<b>82,57</b>	<b>25,88</b>	<b>0,00</b>
Clorofila <i>a</i>	<b>0,03</b>	<b>43,69</b>	<b>0,00</b>	<b>1,64</b>	<b>266,80</b>	<b>0,00</b>	<b>0,51</b>	<b>83,45</b>	<b>0,00</b>
Ficocianina	<b>0,15</b>	<b>25,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>28,30</b>	<b>0,00</b>	<b>1,08</b>	<b>3,89</b>	<b>0,00</b>
Ficoeritrina	<b>0,94</b>	<b>47,45</b>	<b>0,00</b>	<b>5,80</b>	<b>291,27</b>	<b>0,00</b>	<b>1,49</b>	<b>74,96</b>	<b>0,00</b>
Carotenoides	<b>0,12</b>	<b>8694,90</b>	<b>0,00</b>	<b>1,14</b>	<b>78312,40</b>	<b>0,00</b>	<b>0,17</b>	<b>7788,55</b>	<b>0,00</b>
Compostos fenólicos	<b>0,03</b>	<b>1313,18</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>26858,13</b>	<b>0,00</b>	<b>0,007</b>	<b>2507,59</b>	<b>0,00</b>
DPPH	<b>70,51</b>	<b>1109,10</b>	<b>0,00</b>	<b>388,37</b>	<b>6108,35</b>	<b>0,00</b>	<b>69,05</b>	<b>1086,04</b>	<b>0,00</b>
Amido	<b>0,49</b>	<b>339,75</b>	<b>0,00</b>	<b>5,50</b>	<b>3769,51</b>	<b>0,00</b>	<b>2,12</b>	<b>1455,66</b>	<b>0,00</b>



**Figura 1:** Variação da biomassa (g) dos estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* coletadas no verão e no inverno na Ilha do Xavier, Florianópolis, SC, no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média  $\pm$  desvio padrão. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; NF: não-fértil.



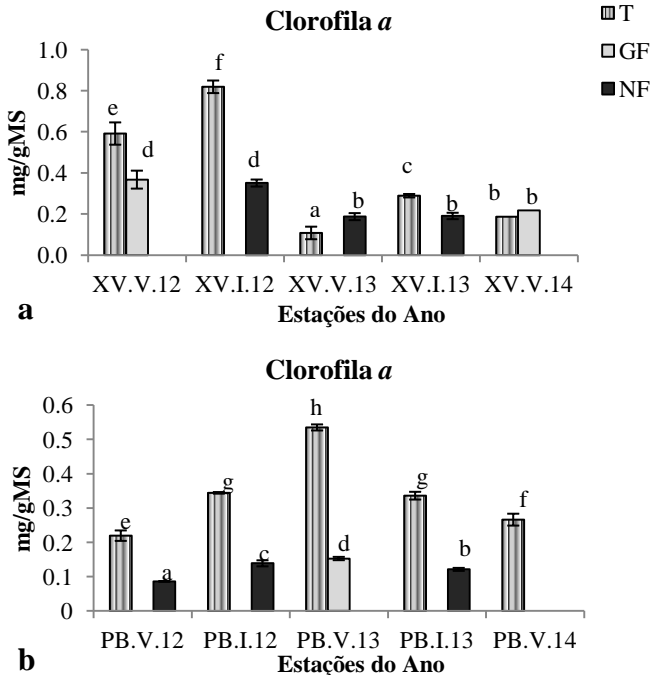


**Figura 2:** Variação da biomassa (g) dos estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* coletadas no verão e no inverno Praia da Barra, Florianópolis, SC, no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a media $\pm$  desvio padrão. T: tetrasporófito; GF: gametófito feminino com cistocarpos; NF: não-fértil.

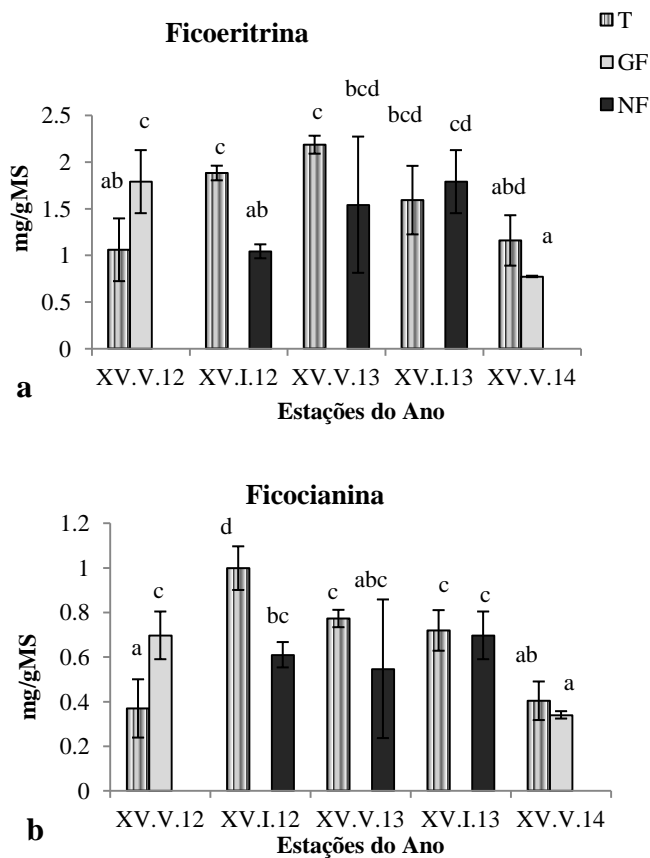
#### 4.3 Pigmentos fotossintetizantes

Na Ilha do Xavier, a concentração de clorofila *a* (figura 3) nos tetrasporofitos aumentou do verão para o inverno, em todas as coletas. Nos indivíduos não férteis, ocorreu diminuição da concentração, quando comparadas as estações de inverno/12 com verão/13, com valores correspondentes a 0,35 mg/gMS e 0,18 mg/gMS, respectivamente. Gametófitos femininos apresentaram maior concentração no verão/12 (0,36 mg/gMS) do que verão/14 com 0,21 mg/gMS. Na Praia da Barra (Figura 4), verificou-se que nos tetrasporofitos ocorreu aumento da concentração de clorofila *a* do verão para o inverno, nas coletas do ano de 2012, com valores de 0,2136 mg/gMS e 0,3436 mg/gMS, já no verão e inverno de 2013, verificou-se o contrário com valores de 0,53 mg/gMS e 0,33 mg/gMS. Quando comparados inverno/13 com verão/14 observou-se decréscimo da concentração, o mesmo observado no ano de 2012, Nos indivíduos não férteis, ocorreu o mesmo padrão visto para os

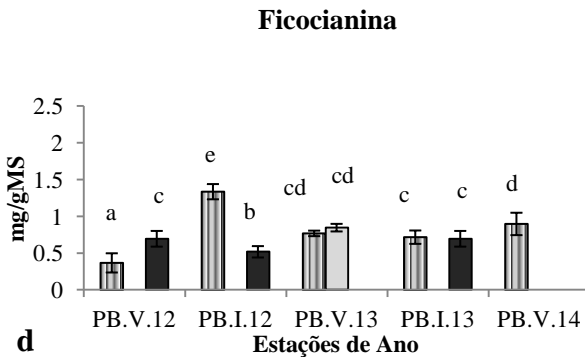
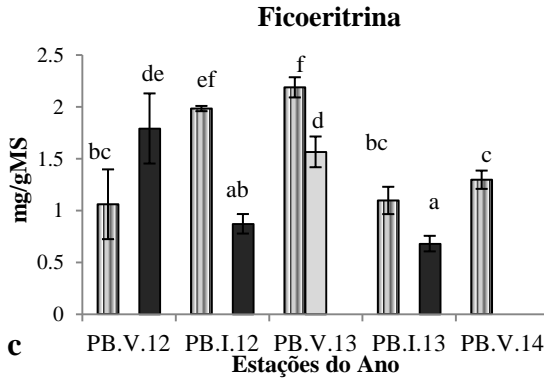
tetrasporófitos nas coletas de 2012. Gametófitos femininos apresentaram concentração de 0,15 mg/gMS e foram encontrados somente nas coletas de verão/13, Com relação as ficobiliproteínas, na Ilha do Xavier, foi encontrado tanto para as ficoeritrinas (Figura 4 a,c) quanto para as ficocianinas (Figura 4 b,d), o aumento das concentrações quando comparadas verão com o inverno de 2012, em tetrasporófitos, Nos indivíduos não-férteis observou-se aumento da concentração de ficoeritrina do inverno/12 para inverno/13, Os Gametófitos femininos apresentaram acréscimo na concentração de ficoeritrina e ficocianina do verão/12 para o verão/14, Na Praia da Barra, o mesmo ocorreu para os tetrasporófitos nas coletas de 2012, Nas coletas de 2013, ocorreu diminuição da concentração de ficoeritrina, no inverno. Nos indivíduos não-férteis ocorreu diminuição da concentração de ficocianina e ficoeritrina, quando comparados verão e inverno/12, Os gametófitos femininos apresentaram maior concentração de ficoeritrina do que ficocianina.



**Figura 3:** Concentração dos Clorofila *a* (mg/g-massa seca) de tetrasporófitos (T), gametófitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a) e Praia da Barra (b) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média± desvio padrão.



**Figura 4:** Concentração dos pigmentos Ficoeritrina e Ficocianina determinada por espectrofotometria, dos tetrasporófitos (T), gametófitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a,b) e Praia da Barra (c,d) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média  $\pm$  desvio padrão.



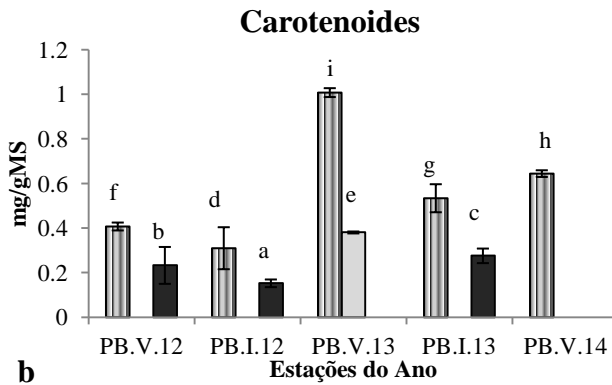
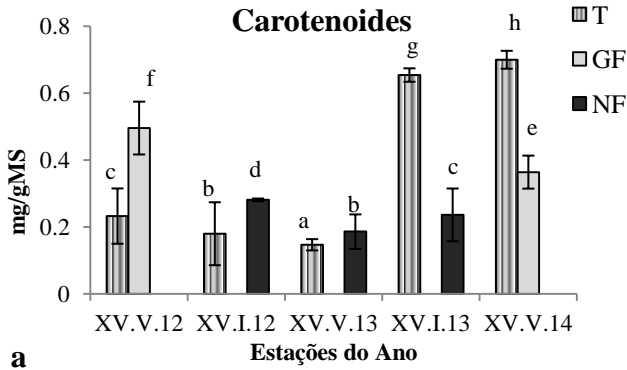
**Figura 4:** Concentração dos pigmentos Ficoeritrina e Ficocianina determinada por espectrofotometria, dos tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a,b) e Praia da Barra (c,d) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm$  desvio padrão.

Com relação ao conteúdo de carotenoides, verificou-se que no primeiro ano de coleta, ocorreu diminuição da concentração do verão para o inverno, nos dois locais (figura 5) sendo observado o mesmo para os indivíduos não-férteis, na Praia da Barra.

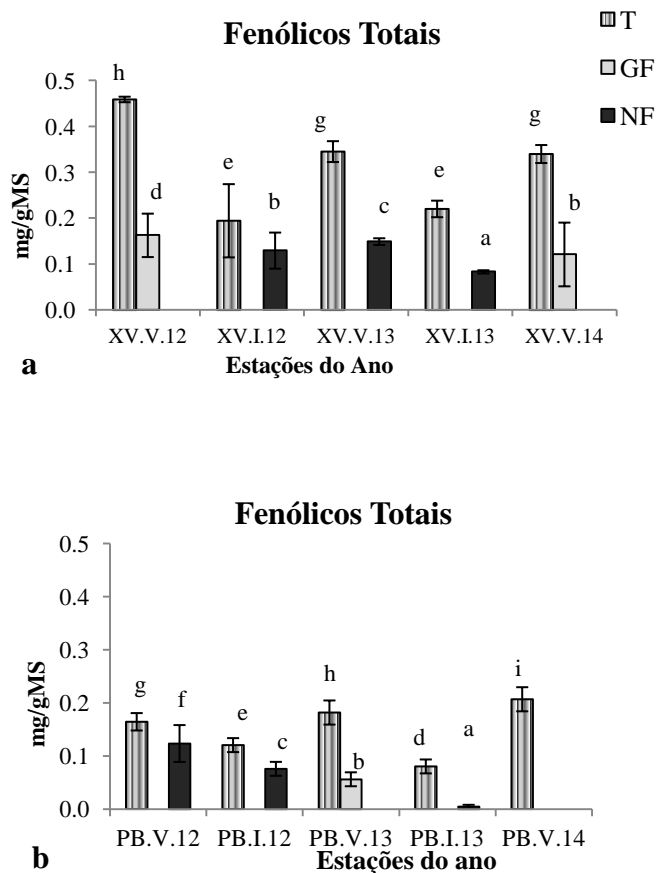
Os gametófitos femininos apresentaram maior concentração no verão/12 quando comparado com o verão/14 (0,49 mg/gMS e 0,36 mg/gMS, respectivamente).

No segundo ano de coleta, pode-se observar que na Ilha do Xavier ocorreu aumento da concentração de carotenoides em tetrasporófitos no inverno, o que se repetiu para os indivíduos não-férteis. Porém quando comparados inverno/13 e verão/14, ocorreu aumento da concentração do pigmento. Nas coletas realizadas na Praia da barra, observou-se o inverso, pois ocorreu diminuição da concentração do pigmento do verão para o inverno, para os tetrasporófitos e não-férteis. Da mesma forma, quando comparada inverno/13 com verão/14.

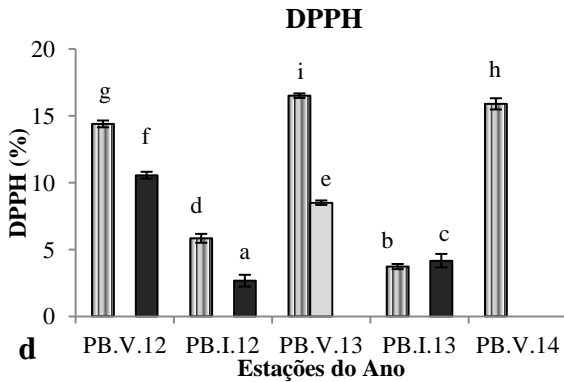
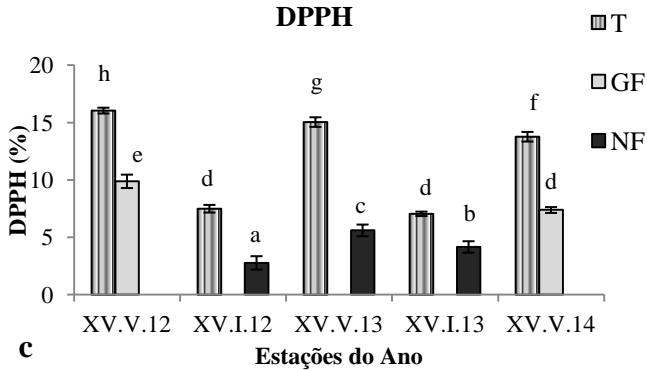
Com relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, verificou-se a diminuição das concentrações e % de atividade antioxidante dos tetrasporófitos do verão para o inverno, nos três anos e nos dois locais de coleta (figura 6). Na Ilha do Xavier, para os gametófitos femininos observou-se maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante no verão/12 quando comparado ao verão/14. Para os indivíduos não-férteis observou-se o mesmo padrão dos tetrasporófitos.



**Figura 5:** Concentração dos carotenoides determinada por espectrofotometria para tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (a) e Praia da Barra (b) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 6:** Concentração de compostos fenólicos (a,b) e Atividade antioxidante (b,c) determinada por espectrofotometria para os tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média  $\pm$  desvio padrão.

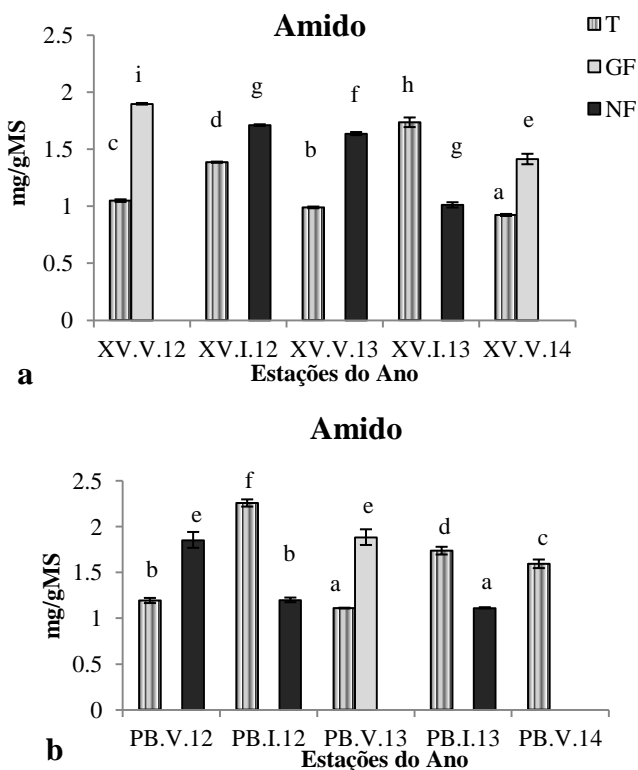


**Figura 6:** Concentração de compostos fenólicos (a,b) e Atividade antioxidante (b,c) determinada por espectrofotometria para os tetrasporofitos (T), gametofitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a média  $\pm$  desvio padrão.

Para o conteúdo de amido, verificou-se que nos tetrasporófitos ocorreu aumento da concentração nos dois locais de coleta, do verão para o inverno, em todos os anos (figura 7), Nas coletas realizadas na Ilha do



Xavier, observou-se diminuição da concentração dos gametófitos femininos do verão/12 para o verão/14, com valores de 1,8 mg/gMS para 1,3 mg/gMS, Para os indivíduos não-férteis o inverso que foi verificado para as concentrações, com diminuição do verão para o inverno, nos dois locais.



**Figura 7:** Concentração amido determinada por espectrofotometria para os tetrasporófitos (T), gametófitos femininos com cistocarpos (GF) e não-férteis (NF) de *Laurencia catarinensis*. As amostras foram coletadas no verão e inverno na Ilha do Xavier (XV) (a) e Praia da Barra (PB) (b) (Florianópolis, SC), no período de Fevereiro/2012 a Fevereiro/2014. Cada valor corresponde a  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .

Para a concentração de amido, ocorreu aumento nas estações de inverno para os dois locais para os tetrasporófitos, porém para os talos não-férteis pode-se observar o inverso. Nos gametófitos femininos, observa-se que no verão/14 ocorreu diminuição do conteúdo, se comparado com verão/12.

#### 4.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade e homogeneidade de variância (Teste de Cochran).

Para verificar a variação da Biomassa, Clorofila *a*, ficobiliproteínas, compostos carotenoidicos, fenólicos, Atividade antioxidante e Amido, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) fatorial, seguido do teste de comparação múltipla de Student- Newman-Keuls. As análises foram feitas considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), As análises de variância foram realizadas no programa STATISTICA 7,0 (StatSoft, Inc.).

### 5 Discussão

Durante o período de coletas (3 anos) observou-se a predominância de tetrasporófitos em relação aos gametófitos e não-férteis, sendo que em nenhum local de coleta foram encontrados gametófitos masculinos. Esta predominância foi ainda maior no verão/14 tanto para a Ilha do Xavier quanto para a Praia da Barra. Este fato pode estar relacionado ao dobro de material genético que indivíduos diploides possuem o que confere vantagens adaptativas a estes em relação aos espécimes haploides (fase gametofítica) (Destombe et al. 1989). Desta forma, os indivíduos haploides desenvolveriam estratégias para sobreviver às condições adversas, por estarem mais suscetíveis. Ainda que estudos em laboratório tenham verificado que a taxa de liberação de carposporos e tetrasporos seja semelhante (Ferreira, 2008), os resultados obtidos no presente estudo indicam que a sobrevivência dos gametófitos dependem da interação entre vários fatores, um destes fatores pode ser a temperatura, que diminui nos meses de inverno. Estudos realizados com espécies de *Gracilaria* evidenciaram que a temperatura pode influenciar a sobrevivência de esporos e que ocorre diferenças nos limites de tolerância para tetrasporos e carposporos (Yokoya & Oliveira, 1992). A relevância da propagação vegetativa também já foi observado por outros

autores para diversificada macroalgas entremarés (Lobban & Harrison, 1994). Em *Laurencia crustiformans* McDermid que é uma espécie de sub e entremarés, plantas sexuais são pouco frequentes (McDermid, 1989), apenas algumas plantas femininas têm sido observadas.

Estas diferenças podem ser atribuídas aos fatores ambientais (salinidade, temperatura, irradiação, herbívora) e/ou surgem como resultado de diferentes pressões de seleção podendo ser transformadas em vantagens adaptativas específicas para cada fase (Hannach & Santelices, 1985). Neste contexto, a ocorrência de talos não-férteis de *L. catarinensis* foi baixa quando comparada aos férteis, sendo que do total de amostras coletadas, foram encontrados na Ilha do Xavier e Praia da Barra, 32,6% e 21,18%, respectivamente, corroborando com estudos realizados com *Gracilaria spp*, observado por Plastino (1985) e Costa & Plastino (2001), que identificaram baixa frequência para indivíduos não-férteis.

Pigmentos fotossintetizantes como a clorofila *a* e pigmentos acessórios, podem apresentar alterações nas suas concentrações de acordo com as variações ambientais. Algumas espécies podem apresentar variações significativas do conteúdo pigmentar em resposta às diferentes condições de luz disponíveis no ambiente, como o evidenciado no presente estudo. Essas adaptações do aparato fotossintetizante das algas estão relacionadas principalmente às variações na quantidade e qualidade da luz recebidas, possibilitando maior aproveitamento da luz pela alga (Beer & Levy, 1983; Honsell et al. 1984; Carnicas et al. 1999), o que pode ser observado no presente trabalho quando comparadas coletas de inverno e verão, na Ilha do Xavier observou-se maior concentração de clorofila *a* nos tetrasporófitos no inverno/12, quando comparadas as coletas de verão, isso pode ter ocorrido devido as baixas condições de luz disponíveis no ambiente, aumentando a concentração dos pigmentos para otimizar e maximizar a colheita de luz e a fotossíntese (Pereira, 2009 ). O gametófito feminino foi encontrado no verão de 2012 e 2014, com maior concentração no primeiro ano da coleta, que pode ser atribuído a menor irradiância que pode ser constatada pela medição em campo.

As algas desenvolvem diversos mecanismos para captar a luz solar e assim conseguem regular o seu teor de pigmentos, em resposta a quantidade e qualidade da luz, nutrientes e variação de temperatura, assegurando a sua sobrevivência (Lopez-Figueroa & Niell, 1990). Neste contexto, com relação às ficobiliproteínas, que são pigmentos acessórios, observou-se o aumento da concentração de ficocianina e ficoeritrina no inverno de 2012, nos tetrasporófitos, corroborando com o que foi verificado em outros estudos, que registraram aumento nas

proteínas totais solúveis e ficobiliproteínas no período de inverno e queda no verão (Campbell et al. 1999; Aguilera et al. 2002; Orduna-Rojas et al. 2002), sendo o mesmo padrão observado na Praia da Barra, tanto para os tetrasporófitos quanto para os talos não-férteis, exceto no verão/13 que ocorreu aumento da concentração de clorofila *a* no verão, nos talos tetrasporófitos. Evidenciou-se o mesmo padrão no verão/12, com o aumento do conteúdo pigmentar de ficocianina e ficoeritrina, já no verão/13 ocorreu aumento da concentração de ficoeritrina, pelo fato dos dados de Precipitação pluviométrica total mensal (mm) terem sido maiores no verão/13 do que no inverno/13, pode ter acarretado no aumento da turbidez da água e conseqüentemente no aumento da concentração de nitrogênio e da concentração de ficoeritrina, visto que, formam uma das principais reservas intracelulares de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras macromoléculas consumidas quando a alga encontra-se sob limitação de nitrogênio (Bird et al. 1982; Lapointe & Duke, 1984; Lobban & Harrison, 1997). Nos meses de verão, além do aumento na radiação, ocorre o aumento da temperatura, dessa forma, em condições de emersão a alga sofre desidratações muito mais severas do que em qualquer outra época do ano. Nessas condições estressantes o fotossistema II sofre fotoinibição, o que gera a formação radicais livres (Smirnov, 1993). Os carotenoides podem reagir com esses radicais e proteger o cloroplasto contra lipoperoxidação e bloquear a reação em cadeia dos radicais (Collen & Davison, 1999). O Acúmulo de carotenóides em espécies de algas é acrescido com a temperatura devido ao aumento oxidativo e efeitos de fotodano. Dessa forma, a tolerância de *L. catarinensis* a essas condições de estresse pode ser atribuída aos pigmentos carotenoides, que atuam na defesa antioxidante e reagem com espécies reativas de oxigênio, promovendo a manutenção da alga em períodos de estresse, pois no presente estudo, foi encontrado maior conteúdo de carotenoides nos talos tetrasporófitos no verão/14 na Ilha de Xavier, porém foi verificado aumento da concentração no inverno de 2013 para os tetrasporófitos e talos não-férteis, o que pode ter ocorrido devido a baixa concentração de clorofila *a*, com o intuito de maximizar a coleta de luz, uma vez que a transferência de energia das clorofilas para alguns carotenóides do ciclo da xantofila que leva à dissipação de energia na forma de calor, protegendo o aparato fotossintético contra fotodanos, agindo como antioxidantes (Pereira, 2009; Araújo & Dominici, 2009; Marquardt & Hanelt, 2004), sugerindo também que a fotodegradação é maior que a formação de carotenoides nos meses onde a irradiância e a temperatura são mais elevadas (Rodríguez-Amaya et al. 2008). Como descrito acima, os altos níveis de irradiância favorecem a

fotodegradação dos carotenoides, e, por este motivo, os estádios reprodutivos de *L. catarinensis* poderiam aumentar a síntese dos compostos fenólicos, evitando assim danos fotooxidativos. Como no verão/14 foram observadas as maiores temperaturas (mínima = 23°C; máxima = 30,4°C), o aumento nas concentrações de compostos fenólicos pode ser considerado um mecanismo de proteção contra a elevação da temperatura (Rodríguez-Amaya et al. 2008), como visto na Praia da Barra, pelo aumento de carotenoides no período do verão, nos três anos de coleta,

Algas vermelhas, são consideradas fontes de antioxidantes, tais como polifenóis, florotaninos, e fucoxantina, Estudos relataram que os extratos isolados de diversas algas vermelhas contêm compostos fenólicos e possuem atividades antioxidantes (Ganesan et al. 2008; Huang & Thi, 2014; Farvin & Jacobsen, 2013). Os compostos fenólicos, assim como os carotenoides, tem elevada capacidade de combater os radicais livres, corroborando o que foi evidenciado no presente estudo, pois conteúdos de fenólicos e atividade antioxidante também seguiram o mesmo padrão, aumentando suas concentrações nas estações de verão e diminuindo no inverno, nos tetrasporófitos, o mesmo ocorreu para os talos não-férteis. Na Praia da Barra, com relação aos tetrasporófitos e talos não-férteis, observou-se o mesmo que na Ilha do Xavier para os conteúdos de fenólicos e atividade antioxidante.

A temperatura também é relacionada as modificações no teor de amido em células algais, pois as algas Rhodophyceae metabolizam amido, como amido das florídeas. Estes são produzidos por metabólitos fosforilados nas reações escuras do ciclo da fotossíntese utilizando ligações de fosfato ricos em energia (ou seja, ATP) formados nas reações de luz. No entanto, devido as enzimas envolvidas neste processo, altas temperaturas poderiam degradá-las e conseqüentemente ao amido produzido (Nakamura & Myiachi, 1982), o que pode-se evidenciar no presente estudo, pois para duas localidades, ocorreu diminuição do conteúdo de amido nos tetrasporófitos no verão, onde ocorrem maiores temperaturas. Neste contexto, é possível verificar que os diferentes estádios reprodutivos de *Laurencia catarinensis* poderiam sofrer alterações quanto sua fisiologia em diferentes épocas do ano (verão e inverno). No entanto, estudos fenológicos são importantes para uma melhor compreensão do funcionamento do metabolismo da alga frente a alterações dos fatores abióticos para que se possa inferir conseqüências de mudanças climáticas nos organismos marinhos.

## 5 Referencias

- Abdala Diaz. R. T.; CabelloPasini. A.; Perez Rodriguez. E.; Conde Alvarez. R. M.; Figueroa. F. L. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology*. 148: 455-465.
- Aguilera. J.; Bischof. K.; Karsten. U.; Hanelt. D.; Wiencke. C. 200.. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology*. 140(6). 1087-1095.
- Araújo. S. D. C.; Deminicis. B. B. 2009. Photoinhibition of the photosynthesis. *Revista Brasileira de Biociências*. 7(4). 463-472.
- Arnaldos. T.L.R.; Munoz. M.A. ; Calderon. A.A. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*. cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*. 113: 315-322.
- Beebee. T.J.C. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature*. pp. 219–220.
- Beer. S.; Levy. I. 1983. Effects of photon fluence rate and light spectrum composition on growth, photosynthesis and pigment relations in *Gracilaria sp.* *Journal of phycology*. 19(4). 516-522.
- Bird. K T.; Habig. C.; DeBusk. T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (rhodophyta) 1. *Journal of Phycology*. 18(3). 344-348.
- Bischof. K.; Rautenberger. R. 2012. Seaweed responses to environmental stress: Reactive oxygen and antioxidative strategies. *Em: Wiencke C.. Bischof K. eds. Seaweed Biology Novel Insights into Ecophysiology. Ecology and Utilization Springer-Verlag Berlin*. 3: 109-132.
- Borowitzka. M. A. 1972. Intertidal algal species diversity and the effect of pollution. *Aust. J. mar. Freshwat. Res*. 23: 73–84.
- Bouzon. Z. L.; Ferreira. E. C.; Santos. R.; Scherner. F.; Horta. P.A.; Maraschin. M.; Schimidt. E.C. Influences of cadmium On fine structure

And metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. *Protoplasma* .2012.

Boyce. D. G.; Lewis. M. R.; Worm. B. 2010. Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*. 466(7306). 591-596.

Breeman. A. M. 1988. Relative importance of temperature and other factors in determining geographic boundaries of seaweeds: experimental and phenological evidence. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 42(2). 199-241.

Campbell. D.; Hurry. V.; Clarke. A. K.; Gustafsson. P.; Öquist. G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3). 667-683.

Carnicas. E.; Jiménez. C.; Niell. F. X. 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 50(2). 149-158.

Collén. J.. & Davison. I. R. (1999). Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant. Cell & Environment*. 22(9). 1143-1151.

Costa. V.L.; Plastino. E.M. 2001. Historico de vida de especimens selvagens e variantes cromaticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales. Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botanica* 24: 491-500.

Davison. I. R. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis. temperature. *J. Phycol.* 27:2-8.

Destombe. C.; Godim. J.; Remy. J.M. 1989. Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales. Rhodophyta). *Thirteenth International Seaweed Symposium* 204/205: 219 – 223.

Dring. M. J. 1988. Photocontrol of development in algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39(1). 157-174.

Eggert. A. 2012. Seaweed responses to temperature. In Wiencke.C. & Bischof. K. [Eds.] Seaweed Biology. Springer-Verlag. Berlin. Germany. pp. 47–66.

Espinoza-Avalos. J. 2005. Fenología de macroalgas marinas. Hidrobiológica 15 (1): 109-122.

Ferreira. L.B. 2008. Diversidade intraespecifica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales. Rhodophyta): estudos fisiologicos na interpretacao do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo. 200p.

Forrest. J.; Miller-Rushing. A. J. 2010. Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 365(1555). 3101-3112.

Forrest. J.; Miller-Rushing. A. J. 2010. Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 365(1555). 3101-3112.

Ganesan. P., Kumar. C. S.; Bhaskar. N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology. 99(8). 2717-2723.

Garcia-Plazaola. J.I.; Hernandez. A.; Olano. J.M.; Becerril. J.M. 2003. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. Functional Plant Biology 30: 319–24.

Guimarães. M.; Plastino. E. M.; Oliveira. E. C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales. Rhodophyta) from Brazil. Botanica Marina. 42(5). 481-486.

Guiry. M. D. 1984. Photoperiodic and temperature responses in the growth and tetrasporogenesis of *Gigartina acicularis* (Rhodophyta) from Ireland. Helgoländer Meeresuntersuchungen. 38(3-4). 335-347.

Hannach. G.; Santelices. B. 1985. Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of Iridaea (Rhodophyta: Gigartinales). Marine ecology. Progress series. 22(3). 291-303.



- Harley, C. D.; Randall Hughes, A.; Hultgren, K. M.; Miner, B. G.; Sorte, C. J.; Thornber, C. S.; Williams, S. L. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters*. 9(2). 228-241.
- Hoegh-Guldberg, O.; Bruno, J. F. 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*. 328(5985). 1523-1528.
- Honsell, E.; Kosovel, V.; Talarico, L. 1984. Phycobiliprotein distribution in Rhodophyta: studies and interpretations on the basis of their absorption spectra. *Botanica marina*. 27(1). 1-16.
- Hwang, E. S.; Thi, N. 2014. Effects of Extraction and Processing Methods on Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive nutrition and food science*. 19(1). 40.
- Kursar, T.A.; Van der Meer, J.; Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.
- Lapointe, B. E.; Duke, C. S. 1984. Biochemical strategies for growth of *gracilaria tikvahiae* (rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *Journal of Phycology*. 20(4). 488-495.
- Little M.M.; Murray, S.N. 1975. Impact of sewage on the distribution, abundance and community structure of rocky intertidal macro-organisms. *Mar Biol* 30: 277–291.
- Lobban C.; Harrison, P. 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 366 pp.
- Lobban, C.S.; Harrison, P.J. 1997. Seaweed ecology and physiology. ix. Cambridge University press. 366p.*
- López-Figueroa, F. & Niell, F. X. (1990). Effects of light quality on chlorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. *Marine Biology*. 104(2). 321-327.
- Marengo, J. A.; Ambrizzi, T.; Da Rocha, R. P.; Alves, L. M.; Cuadra, S. V.; Valverde, M. C.; Ferraz, S. E. 2010. Future change of climate in South America in the late twenty-first century: intercomparison of scenarios from three regional climate models. *Climate Dynamics*. 35(6). 1073-1097.

Marinho-soriano. E.; Laugier. T.; De-Casabianca. M.-L. 1998. Reproductive strategy of two *Gracilaria* species. *G. bursa-pastoris* and *G. gracilis*. in a Mediterranean Lagoon (Thau. France). *Botanica Marina* 41:559-564.

Marquardt. J.; Hanelt. D. 2004. Carotenoid composition of *Delesseria lancifolia* and other marine red algae from polar and temperate habitats. *European journal of phycology*. 39(3). 285-292.

McCready R.M.. Guggolz J.. Silveira V.. Owens H.S.1950. Determination of starch and amylose in vegetables: Application to peas. *Anal. Chem.* 22. 1156–1158.

McDermid. K. J. 1989. *Laurencia crustiformans* sp. nov.(Ceramiales. Rhodophyta) from the Hawaiian Islands. *Phycologia*. 28(3). 352-359.

McLachlan. J.; Edelstein. T. 1977. Life-history and culture of *Gracilaria foliifera* (Rhodophyta) from south Devon. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 57(03). 577-586.

Molenaar. F. J.; Breeman. A. M.; Venekamp. L. A. 1996. Ecotypic variation in *Cystoclonium purpureum* (rhodophyta) synchronizes life history events in different regions<sup>1</sup>. *Journal of phycology*. 32(4). 516-525.

Nakamura. Y.; Miyachi. S. 1982. Effect of temperature on starch degradation in *Chlorella vulgaris* 11h cells. *Plant and Cell Physiology*. 23(2). 333-341.

Oliveira Filho. E. C.; de Paula. E. J. 1980. Aspectos fenológicos de duas populações de *Sargassum cymosum* (Phaeophyta-Fucales) do litoral de São Paulo. Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*. 8(1).

Oliveira. E.C.; Horta. P.A.; Amancio. E.; Anna. C.L.S.. 2001. Algas e angiospermas marinhas bêmicas do litoral brasileiro. In: Ministério do Meio Ambiente. *Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil*. RJ.

Orduña-Rojas. J.; Robledo. D.; Dawes. C. J. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta.

Gracilariales) from Yucatan. Mexico. I. Seasonal physiological and biochemical responses. *Botanica marina*. 45(5). 453-458.

Pakker. H.; Breeman. A. M.; Van Reine. W. F.; Van Oppen. M. J. H.; Van Den Hoek. C. 1996. Temperature responses of tropical to warm-temperate Atlantic seaweeds. I. Absence of ecotypic differentiation in ampho-Atlantic tropical-Canary Islands species. *European Journal of Phycology*. 31(2). 123-132.

Parmesan. C.. & Yohe. G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*. 421(6918). 37-42.

Penniman. C.A.; Mathieson. A.C.; Penniman. C.E. 1986. Reproductive Phenology and Growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales. Rhodophyta) in the Great Bay Estuary. New Hampshire. *Botanica Marina*. 29: 147-154.

Pereira. D.C. 2009. Variação no conteúdo proteico e pigmentar em variantes cromáticas de *Gracilaria domingensis* nas populações naturais de Rio do Fogo-RN. Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade do rio Grande do Norte. Natal. 91p.

Plastino. E. M. 1988. Deviations in the life-history of *Gracilaria* sp.(Rhodophyta. Gigartinales). from Coquimbo. Chile. under different culture conditions. *Hydrobiologia*. 164(1). 67-74.

Rabanal. S.F.; Azanza. R.; Hurtado-Ponce. A. 1997. Laboratory manipulation of *Gracilariopsis bailinae* Zhang et Xia (Gracilariales. Rhodophyta). *Bot. Mar.* 40: 547-556

Ramlov. F. 2010. Variação sazonal dos carotenóides e compostos fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales. Rhodophyta). Tese de Doutorado.

Ritchie. R.J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a. b. c ed and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone. methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*. 46. 115-126.

Rodriguez-Amaya. D. B.; Kimura. M.; Godoy. H. T.; Amaya-Farfan. J. 2008. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21(6). 445-463.

Sabeena Farvin. K. H.; Jacobsen. C. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food chemistry*. 138(2). 1670-1681.

Schiavon. M.; Moro. I.; Pilon-Smits. E. A.; Matozzo. V.; Malagoli. M.; Dalla Vecchia. F. 2012. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic toxicology*. 122. 222-231.

Schreiber.U.; Bilger .W.; Neubauer.C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis.In: Schulze. E.D.,Caldwell.M.M.(Eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis.Ecological Studies.vol.100*. Springer.Berlin. pp. 49±70.

Schreiber.U.; Bilger .W.; Neubauer.C.; 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis.In: Schulze. E.D.,Caldwell.M.M.(Eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis.Ecological Studies.vol.100*. Springer.Berlin. pp. 49±70.

Shannon. J. C. 1968. Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays*. kernels following  $^{14}\text{CO}_2$  treatment of intact plants. *Plant physiology*. 43(8). 1215-1220.

Smirnoff. N. 1993. Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. 27-58.

Steinhoff. F.S.; Graeve. M.; Bischof. K.; Wiencke. C. 2012. Phlorotannin production and lipid oxidation as a potential protective function against high photosynthetically active and UV radiation in gametophytes of *Alaria esculenta* (Alariales. Phaeophyceae). *Photochemistry and Photobiology* 88. 46-57.

- Strickland. J.D.H.; Parsons. T.R.; 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of Fishery Research. Bd.. Canada. 310p.
- Tait. A.; Ganzerli. S.; Di Bella. M. 1996. Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl) phenols Tetrahedron. 52:1287-12596.
- Tittensor. D. P.; Mora. C.; Jetz. W.; Lotze. H. K.; Ricard. D.; Berghe. E. V.; Worm. B. 2010. Global patterns and predictors of marine biodiversity across taxa. Nature. 466(7310). 1098-1101.
- Tréguer. P.. & Le Corre. P. 1975. Manuel D'analyse des Sels Nutritifs Dans l'eau de Mer (Utilisation de L'autoanalyseur II Technicon) Université de Bretagne Occidentale.
- Umbreit. W.W.; Burris. R.H.; Stauffer. J.E. 1957. Manometric Techniques. New York. Burgess. Publishing.. 338.
- Van Alstyne. K. L.; Wolfe. G. V.; Freidenburg. T. L.; Neill. A.; Hicken. C. 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Marine Ecology Progress Series*. 213. 53-65.
- Van den Hoek. C.; Breeman. A. M.; Stam. W. T. 1990. The geographic distribution of seaweed species in relation to temperature: present and past. In Expected effects of climatic change on marine coastal ecosystems (pp. 55-67). Springer Netherlands.
- Wilczek. A. M.; Burghardt. L. T.; Cobb. A. R.; Cooper. M. D.; Welch. S. M.; Schmitt. J. 2010. Genetic and physiological bases for phenological responses to current and predicted climates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365(1555). 3129-3147.
- Yokoya. N. S.; Oliveira. E. C. 1992. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. *Journal of Applied Phycology* 4: 339-345.

## CAPÍTULO 2

As ondas de aquecimento e poluição antrópica podem comprometer a ecofisiologia de produtores primários? Um estudo de caso com *Laurencia catarinensis* (Ceramiales, Rhodophyta)

### 1 Introdução

A temperatura é um dos principais determinantes de aspectos macroecológicos e evolutivos das macrófitas marinhas (Wernberg et al. 2011). No início de 2011, os ecossistemas marinhos ao longo da costa oeste da Austrália, experimentaram uma onda de aquecimento sem precedentes no registro histórico. Anomalias de 2-4° C foram observadas na água superfície do oceano, e persistiram por mais de 10 semanas ao longo de mais de 2.000 km de litoral. Este evento extremo alterou a fisionomia dos ambientes costeiros da região, ocorrendo uma redução na abundância de algas formadoras de habitat, empobrecimento na estrutura da comunidade e tropicalização das comunidades de peixes (Wernberg et al. 2012). Na Europa (particularmente na França) Sparnocchia et al. (2006) evidenciaram o desenvolvimento de uma anomalia na temperatura do mar em 2003 no mar da Ligúria, que começou no final de maio e persistiu no mês de Agosto, com aumento de 2-3°C maior do que em verões anteriores. Conforme, também foi observado por Olita et al. (2007) no ano de 2003, pois este evento de aquecimento da temperatura da superfície do mar chegou a 29,5 ° C, 2,5 ° C mais altas do que os verões anteriores, no Tirreno. Estas ondas de calor, provavelmente estão ligadas as mortalidades evidenciadas nos locais de comunidades de recifes rochosos que ocorreram na época (Garrabou et al. 2009). Estes fenômenos globais de aquecimento, que vêm sendo observados com maior frequência, como no último verão no sul do Brasil, podem interagir com estressores locais, como a poluição por nutrientes inorgânicos derivados da urbanização e produção agrícola na zona

costeira (Conley et al. 2009; Martins et al. 2014; Scherner et al. 2013). Este aporte de nutrientes em habitats marinhos tem aumentado nas últimas décadas. A quantidade de nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN) na água do mar, por exemplo, mais do que duplicou, levando à eutrofização e deterioração da qualidade da água em ambientes costeiros ao redor do mundo (Teichberg et al. 2010, Piazzzi et al. 2011, Karez et al. 2004, Scherner et al. 2012; Pagliosa & Barbosa 2006 ). Um dos fatores limitantes para a produtividade de macroalgas marinhas é de fato a concentração de DIN e fósforo (P) (Hanelt & Figueroa, 2012; Zou & Gao, 2014). Estes nutrientes são necessários para a síntese de proteínas e para a síntese de DNA, RNA e transferência de energia, respectivamente, possibilitando a manutenção do crescimento de plantas aquáticas. Por outro lado, estas substâncias quando em concentrações elevadas representam estressores, isolados ou combinados, que provocam importantes mudanças na estrutura das comunidades entremarés, diminuindo a riqueza e a diversidade de espécies em ecossistemas marinhos tropicais e subtropicais (Martins et al. 2012; Scherner et al. 2013; Halpern et al. 2008).

A toxicidade destas substâncias altera as respostas fisiológicas destes produtores primários marinhos modificando potencialmente o metabolismo primário e secundário. Entre os constituintes do metabolismo primário, destacam-se pigmentos como clorofilas, que desempenham papel chave na fotossíntese, auxiliando a absorção de luz e a transferência de energia para os centros de reação. A clorofila *a* é considerada uma reserva de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo que diversos estudos reportam redução na concentração deste pigmento em algas submetidas à baixa disponibilidade de nitrogênio (García-Sánchez et al. 1993; Parjikolaei et al. 2013). As ficobiliproteínas, especialmente a ficoeritrina, formam uma das principais reservas intracelulares de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras macromoléculas consumidas quando a alga encontra-se sob limitação de nitrogênio (Bird et al. 1982; Lapointe & Duke, 1984; Lobban & Harrison, 1997). Outras proteínas solúveis, incluindo enzimas envolvidas na fotossíntese, podem ser consumidas pelas algas sob limitação de nitrogênio (Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez et al. 1993), ocasionando a diminuição dos pigmentos fotossintetizantes nitrogenados, redução das taxas fotossintetizantes e, conseqüentemente, no decréscimo das taxas de crescimento (Bird et al. 1982; Lapointe & Duke, 1984). Estudos realizados, também verificaram que o conteúdo de carbono, juntamente com o crescimento, pode diminuir, decorrente de altas concentrações de nutrientes (García-Sánchez et al. 1993; Hessen &

Anderson, 2008; Sterner & Elser, 2002),. Segundo Huo et al. (2011), o crescimento de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenf. foi inibido pelas altas concentrações de amônio, nitrato, nitrito e fosfato, mostrando a sensibilidade da espécie a altas concentrações de nutrientes.

Por outro lado, em algas sob limitação de nitrogênio, ocorre aumento nas concentrações de carbono e na razão entre carbono e nitrogênio tecidual decorrente da utilização de reservas celulares de aminoácidos livres, pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis (Lapointe & Duke, 1984), que pode ser atribuído ao acúmulo de amido das florídeas e floridosídeo. Li et al. (2001) observaram que em culturas de *Porphyridium* sp. submetidas à escassez de nitrato ocorre um aumento de até 1500% no conteúdo de polissacarídeos solúveis, corroborando que em Rhodophyta estes compostos atuam como reserva dinâmica de carbono (Yu et al. 2002; Collén et al. 2004).

Dessa forma, partindo do pressuposto que respostas ecofisiológicas, como as anteriormente descritas, são influenciadas por variações na temperatura da água, suas interações com a disponibilidade de nutrientes podem levar a sinergismos que venham a comprometer sobremaneira a produção primária em ambientes costeiros. Quando a temperatura se eleva acima do ótimo da espécie, a fotossíntese decresce. Quando estes valores elevados perduram por longos períodos os danos nos fotossistemas tornam-se irreversíveis (Hanelt & Figueroa, 2012). Além disso, altas temperaturas podem levar ao aumento da respiração mitocondrial e da fotorrespiração, o que acarreta na diminuição de fixação do CO<sub>2</sub> e conseqüentemente, do crescimento.

Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão associados à estratégias de proteção contra estressores ambientais como o excesso de irradiância, temperatura, herbívoros, entre outros. Dentre as vias relacionadas ao metabolismo secundário destacam-se substâncias denominadas carotenoides e fenólicos, protegendo os organismos contra excesso de irradiância, temperaturas extremas e herbivoria (Demmig-Adams et al. 1996; Souza et al. 2011). Todo o metabolismo primário e secundário refletem estas variações no meio externo. Assim, estes fatores podem determinar a presença ou ausência de certos carotenoides, por exemplo. Estas variações bioquímicas alteram a capacidade destes produtores primários de reagir às diferentes disponibilidades de irradiância, alternado a capacidade de aclimação ou as suas respostas de fotoproteção (Marquardt & Hanelt, 2004). Estes carotenoides promovem a necessária dissipação de energia na forma de calor,



protegendo o aparato fotossintético contra fotodanos, atuando como antioxidantes (Pereira, 2009; Araújo & Dominicis, 2009; Marquardt & Hanelt, 2004). Essa função decorre da habilidade destas substâncias em prevenir a formação de radicais espécies reativas de oxigênio, que são formados a partir da transferência de energia da clorofila em estado triplete para o basal, tornando assim os produtos termodinamicamente estáveis (Barufi, 2010). Algas vermelhas, são consideradas fontes destes antioxidantes, destacando-se polifenóis, florotaninos e fucoxantina (Ganesan et al. 2008; Huang & Thi, 2014; Farvin & Jacobsen, 2013).

Dentre as algas vermelhas os representantes com metabolismo secundário mais rico estão delimitados pelo gênero *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae). Estes metabólitos apresentam importante papel ecológico (Lhullier et al. 2010; Santos et al. 2012) e destacado potencial biotecnológico. Tendo em vista a importante presença dos metabólitos na referida alga, diversos trabalhos foram realizados com extratos de *Laurencia*, os quais apresentaram significativa atividade antioxidante e citotóxicas de metabólitos isolados (Pereira & Teixeira, 1999; Machado et al. 2010; Anggadiredja et al. 1997; Rocha et al. 2007). Além disso, alguns metabólitos halogenados demonstraram que estes compostos apresentam potencial para atuar como substâncias químicas de defesa contra bactérias patogênicas (Vairappan, 2004; Machado et al. 2010). Exemplos da magnitude das propriedades destes metabólitos puderam ser verificados no trabalho de Stein et al. (2011) que constatou que extratos apolares de espécies de *Laurencia* (*Laurencia aldingensis*, *Laurencia catarinensis*, *Laurencia dendroidea*, *Laurencia intricata* e *Laurencia translucida*) possuem propriedades antifúngicas, incentivando a investigação para novas drogas no tratamento de doenças infecciosas. Outros estudos, também mostraram que o composto elatol, presentes no gênero *Laurencia*, apresentam atividade antiincrustantes (Deepa et al. 2014; Da Gama et al. 2014; Da Gama et al. 2008; Da Gama et al. 2002). Também foi relatado na literatura que as algas deste gênero apresentam defesas químicas contra peixes recifais, ouriços-do-mar e gastrópodos. Tal aspecto não é surpreendente, uma vez que diversas espécies deste gênero possuem um metabolismo capaz de sintetizar substâncias de classes distintas, sendo os sesquiterpenos os mais abundantes e característicos do gênero (Lhullier, et al. 2009; Fujii et al. 2011). Estes papéis importantes nos ecossistemas marinhos são ameaçados, pelo aquecimento global e estressores locais (Horta et al. 2012), uma vez que estas mudanças

ambientais podem comprometer a aptidão fisiológica, empobrecendo o metabolismo secundário.

Sendo assim, neste estudo avaliamos os efeitos isolados e combinados, do incremento de nutrientes e temperatura, na taxa de crescimento, açúcares totais, amido, pigmentos fotossintetizantes, performance fotossintética, compostos fenólicos e atividade antioxidante na ecofisiologia de *Laurencia catarinensis*, com o objetivo de fornecer informações complementares sobre os mecanismos fisiológicos que ocorrem sob condições de estresse e conseqüentemente gerando a diminuição da população de produtores primários. Desta forma, poder-se-á acrescentar conhecimento à bem documentada perda de biodiversidade em conseqüência da urbanização.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material algal e Experimento

*Laurencia catarinensis* apresentou uma mudança drástica na sua abundância nos últimos anos no sul do Brasil. Esforços de amostragem (CAP 1) revelam o desaparecimento da Ilha do Arvoredo e redução da biomassa na população da Praia da Barra. Assim, para avaliar as possíveis causas desses eventos, foi proposto o experimento para que se pudesse avaliar como a população de *Laurencia catarinensis* suportaria fisiologicamente o aumento da temperatura e da poluição na água do mar.

Amostras de *Laurencia catarinensis* foram coletados em março de 2014, na Ilha do Xavier (27°36'33 "S 48°23'09"W, 27°36'35"S 48°23'10"W, 27°36'38 "S 48°23'15"W), localizado a cerca de 4,5 km de distância da ilha de Florianópolis, Brasil.

As medições das condições de campo da irradiância, temperatura da água do mar, salinidade, turbidez, pH e oxigênio dissolvido foram:  $691,7 \pm 0,04 \mu\text{mols f\acute{o}tons por mm}^2$ ,  $20^\circ\text{C} \pm 32 \pm 0$  NTU,  $8,1 \pm 0,02$ ,  $6,7 \pm 0,03 \text{mg/L}$ , respectivamente.

As amostras foram coletadas do costão rochoso durante a maré baixa e transportados em caixas térmicas com água do mar para o laboratório, onde foram triados para remover epífitas e epifauna. Estes segmentos de talos foram cultivadas sob as mesmas condições ( $20^\circ\text{C}$ , com  $0,96 \mu\text{M}$  de  $\text{N-NH}_4$ ,  $0,46 \mu\text{M}$  de  $\text{PO}_4$  e  $0,38 \mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3$  - condição de bixa concentração de nutrientes) durante 24 horas antes da sua utilização no experimento. Assim, os tratamentos com nutrientes foram denominados

CBN (concentração baixa de nutrientes), CIN (concentrações intermediárias de nutrientes) e CAN (concentrações altas de nutrientes). O experimento mesocosmo foi realizado sob luz natural durante 30 dias. Três diferentes temperaturas de água (20°C, 24°C e 28°C) foram estabelecidas por chillers (GELAQUA) e três combinações de concentração de nutrientes (CBN: 0,96 µM de amonio, 0,46 µM de fosfato, 0,38 µM de nitrato; CIN: 40 µM de amonio, 2 µM de fosfato, nitrato de 10 µM; CAN: 80 µM de amonio, fosfato de 5 µM, 40 µM de nitrato) foram realizadas usando ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>). As amostras com 20°C e a concentração mais baixa de nutrientes foi consideradas como o controle. O experimento consistiu em nove combinações de tratamentos com n = 4, no âmbito de um sistema de fluxo fechado e estável. Cada tratamento foi fornecido por um tanque com 300 litros de água do mar, com as temperaturas e concentração de nutrientes controladas. Cada tanque fornecia água para quatro frascos de plástico transparente com capacidade de 2,5 litros, contendo 15g de *L. catarinensis* amarradas em uma lâmina de vidro.

As medidas de O<sub>2</sub> dissolvido, pH, salinidade, turbidez, temperatura e irradiância foram avaliadas diariamente através WTW Oxímetro Oxi 315i, medidor de pH AT-315 Alfakit, Refratômetro SZJ- S10, Termômetro e Quantômetro LI-COR LI-1400, respectivamente.

## 2.2 Taxa de Crescimento relativa (TCR)

Os efeitos dos fatores temperatura e concentrações de nutrientes no crescimento dos talos de *L. catarinensis* foram avaliadas através de medidas de massa fresca no início do experimento, o qual foi estabelecido peso de 15g para todas as réplicas e obtido os pesos no final do experimento. A taxa de crescimento foi calculada segundo a fórmula de Penniman et al. 1986.

## 2.3 Métodos Analíticos

### 2.3.1 Análises dos Nutrientes da água

Para as análises dos nutrientes na água, as amostras foram colocadas em garrafas de PVC. Em laboratório, as amostras de água foram filtradas com filtros GF/F Whatman com malha de 0,45 µm. Os filtros utilizados para determinação do material particulado em suspensão foram preparados de acordo com Strickland & Parsons. (1972). Os nutrientes

inorgânicos dissolvidos ( $\text{NO}_3^{-2}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) foram determinados pelo método colorimétrico, utilizando-se espectrofotômetro (Pró-análise, UV-1100), provido de cubetas com 5 cm de passo óptico. O Nitrato e o fosfato serão determinados segundo Grasshoff *et al.* (1983). Utilizou-se uma coluna para redução através de um sistema heterogêneo de grânulos de cádmio, para a determinação do nitrato. A concentração de N-amoniacal foi determinada seguindo os métodos descritos por Tréguer e Le Corre (1976).

### 2.3.2 Pigmentos fotossintetizantes

Para extração de amostras dos pigmentos (0,3 g de massa fresca,  $n = 3$ ) foram moídos com nitrogênio líquido até formar pó e extraído com tampão fosfato 50 mM (pH 5,5). Os homogenatos foram centrifugados (Centrífuga EPPENDORF 5810R) a 4000 rpm durante 20 min a 4 ° C para a separação de ficobiliproteínas presentes nos sobrenadantes. Clorofila *a* foi extraída depois da dissolução do pellet em de acetona 90% e centrifugado (Eppendorf 5810R) a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C. Os pigmentos foram quantificados por espectrofotometria (SP-BIOSPECTRO 220) e as concentrações foram calculadas de acordo com Kursar *et al.* (1983) para ficobiliproteínas e Ritchie (2008) para a clorofila *a*.

#### 2.3.2.1 Extração de Carotenóides por CLAE

Os carotenóides foram extraídos a partir de amostras (0,5 g de massa seca,  $n = 3$ ) com metanol. Os extratos foram centrifugados (10 min., 4000 rpm). Uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) foi injetada na cromatografia líquida (LC-10A da Shimadzu) equipado com uma coluna de fase inversa C18 (Vydac 218TP54; 250 mm x 4.6 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$ , 30 °C), protegida por uma coluna de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$  (Vydac 218GK54) e detector and a UV-vis (450 nm). As eluições foram realizadas com  $\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}$  (90: 10, v/v) com fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A identificação dos carotenóides ( $\alpha$ -caroteno e luteína) foram realizados utilizando o tempo de retenção e co-cromatografia dos compostos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), bem como, por analogia com outros relatórios de análise de carotenóides por RP-CLAE -UV-visível em condições semelhantes (Scott e Eldridge 2005; Hulshof *et al* 2007). A quantificação de Carotenoides foi baseada nas curvas padrões: luteína

(0.5 - 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 7044x$ ;  $r^2 = 0.999$ ) e  $\alpha$ -caroteno (0.01-12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 1019x$ ;  $r^2 = 0.998$ ).

### 2.3.3 Performance Fotossintética

O desempenho fotossintético foi estimada in vivo pela fluorescência da clorofila a (chl a) do PSII usando um fluorômetro portátil (Junior-PAM, Walz, Alemanha), em cada lâmina contendo alga ( $n = 3$  repetições para cada tratamento). As definições ideais para a espécie estudada foram previamente avaliadas em condições in situ e uma vez definido foram mantidas constantes (ganho = 1 e intensidade da medida = 8). A duração do impulso de saturante foi de 0,8 seg. Para cada amostra foram medidos rendimento quântico efetivo do fotossistema II,  $F / F_m'$ , onde  $F = F_m' - F_t$ ;  $F_m'$  é a fluorescência máxima de uma amostra iluminado;  $F_t$  é o transitório da fluorescência (Schreiber et al., 1994); ETR (taxa de transporte de elétrons) absoluta porque foi medir a absorvância de cada amostra. Portanto,  $\text{ETR} = F/F_m' \times 0,5 \times \text{abs} \times \text{PAR}$ , onde PAR é a radiação fotossinteticamente ativa, como fótons  $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , abs é a absorvância que foi medida para cada amostra. Para medições de rendimento quântico máximo, as algas foram mantidas no escuro por 15 minutos. As curvas de fotossíntese- irradiância foram geradas com base na proporção de ETR e parâmetros foram calculados por Webb et al. (1984) e Platt et al. (1980). Valores de rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ), a taxa máxima de transporte de elétrons ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ ), eficiência fotossintética ( $\alpha$  ETR) e irradiação de saturação ( $I_s$ ) foram obtidos.

### 2.3.4 Compostos Fenólicos determinados por CLAE

Os compostos fenólicos foram extraídos a partir de amostras (0,5 g de massa seca,  $n = 3$ ) utilizando metanol 80%. As soluções foram centrifugadas (10 min, 4000 rpm). O extrato (10  $\mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) foram injetados no cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A) equipado com uma coluna C18 de fase reversa de 5  $\mu\text{m}$  (Shim-pack C18; de 250 mm  $\times$  4,6 mm  $\varnothing$ , 5  $\mu\text{m}$ , 30  $^\circ\text{C}$ ) e um detector de UV-vis (280nm). A eluição foi realizada com água: ácido acético: n-butanol (350: 1: 10, v / v / v), a um fluxol de 0,8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A Identificação polifenólicos foi realizada utilizando os tempos de retenção e de co-cromatografia de compostos padrão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação dos

compostos fenólicos baseou-se na curvas padrão de ácido gálico (2.5–200 µg mL<sup>-1</sup>;  $y = 795.09x$ ;  $r^2 = 0.999$ ).

### 2.3.5 Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade de eliminação radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi determinada de acordo com Tait et al. (1996). Para a avaliação quantitativa, 100 µL de cada extracto foi misturado (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) com 2,9 mL de solução de DPPH (200 µg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, EUA), preparada diariamente. Após 1 h no escuro a 25 ° C, a absorbância foi medida a 517 nm utilizando espectrofotómetro (BIOSPECTRO SP-220). A atividade anti-radical (AA) foi determinada utilizando a seguinte fórmula: % de AA = (Abs-Abs amostra de controle) / Abs × 100%. O controle positivo de quercetina foi também medida nas mesmas concentrações. Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicata e os resultados são expressos como percentagem.

### 2.3.6 Açúcares Totais e Amido

A extração de açúcares solúveis totais foi realizado de acordo com Shannon (1968). As amostras (0,05 g de massa seca, n = 3) foram extraídos com 2 ml de metanol: clorofórmio: água (MCW) (12: 5: 3) e centrifugado ( Centrífuga EPPENDORF 5810R) a 3000 rpm durante 5 minutos a 25 ° C. O sobrenadante foi recuperado e o pelet foi re-extraído com 2 ml de MCW. Uma parte de clorofórmio e 1,5 parte de água foram adicionados para cada quatro partes de sobrenadante, seguido de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, a partir dos quais foram obtidas duas fases. A fase aquosa superior foi colhida e dosagem utilizando antrona 0,2%, de acordo com Umbreit & Burris (1957). A extração de amido foi realizado de acordo com McCready et al. (1950). Os grânulos usados na extração de açúcares solúveis totais foram triturados com ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) a 30% (v / v) e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, a 25 ° C. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi novamente extraída como especificado acima. O extrato também foi centrifugado e os sobrenadantes de ambas as extrações foram combinadas e analisadas de acordo com Umbreit e Burris (1964), utilizando o reagente de antrona de 0,2% (w/v). A

concentração de açúcar e amido foram calculados usando a D-glucose como padrão.

## 2.4 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls. Para determinar as variações na taxa de crescimento, clorofila *a*, ficobiliproteínas, amido, açúcares totais, compostos fenólicos e carotenóides em diferentes temperaturas e concentrações de nutrientes foi utilizada a ANOVA bi-fatorial. Para as análises realizadas com os parâmetros obtidos com a fluorescência da clorofila foi utilizada ANOVA tri-fatorial, porque as medidas foram realizadas ao longo da experimentação. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica, considerando  $p \leq 0.05$ . Para diferenças significativas, *post hoc* foi realizada utilizando Teste de múltiplas comparações Newman-Keuls. A homogeneidade da variância foi testada *a priori*, pelo teste de Cochran.

O grupo de dados multivariados foi analisado em MVSP 3.2 software (multivariada Statistical Package for Windows) (Kovach 2005), pela técnica estatística de Análise de Componentes Principais (PCA- Análise de Componentes Principais). Quinze variáveis foram selecionadas para esta análise: clorofila *a*, ficoeritrina, Ficocianina, Amido, Açúcares totais, carotenóides totais, compostos fenólicos totais, DPPH, Fv/Fm, ETR max,  $\alpha$  ETR, Is, ETR,  $\Delta F/F'm$ . Como essas variáveis têm diferentes escalas de medição, os dados foram submetidos à transformação log 10. Matrizes de Covariância e Biplots com distância euclidiana foram utilizadas. Os autovetores produzidos a partir da biplot euclidiano foram usados para identificar as faixas individuais que contribuíram para a formação de grupos. A soma dos valores absolutos do eixo x e coordenada y para cada autovetor foram utilizada para classificar as bandas como determinantes forte ou fraco, considera se que quanto maior o autovetor maior o efeito. Para maior clareza somente os valores dos dois primeiros eixos da análise foram apresentados.

## 3 Resultados

### 3.1 Taxa de Crescimento Relativa

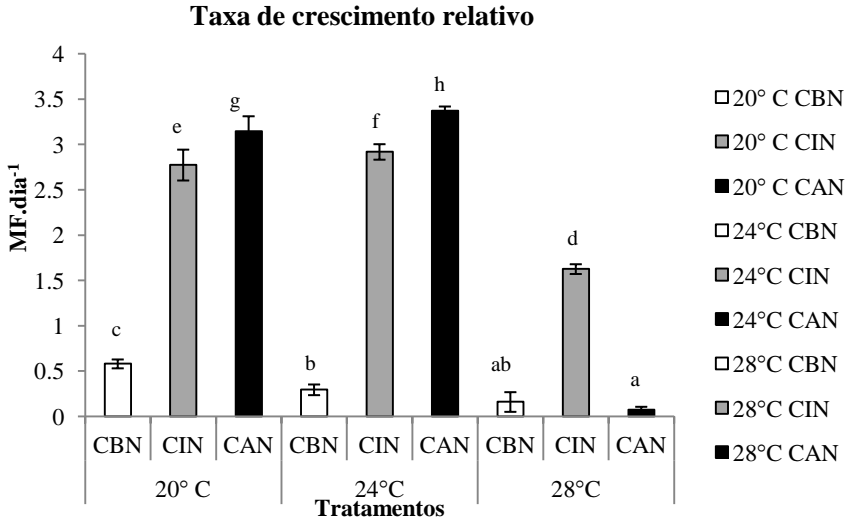
Após 30 dias de experimento, os efeitos da temperatura e nutrientes, apresentaram diferenças significativas na taxa de crescimento relativa

(TCR) de *L. catarinenses* ( $p \leq 0.05$ , Tabela 1). As menores TCRs foram observadas nos tratamentos com concentração baixa de nutrientes (CBN). As algas expostas a 28°C apresentaram TCRs inferiores às observadas nos tratamentos mais frios, sendo notórias as diferenças observadas nos tratamentos com altas concentrações de nutrientes (CAN) (Figura 1). Nestas condições a temperatura extrema inverte uma tendência de elevação de seus valores quando considerados os tratamentos 20 e 24°C.



**Tabela 1:** Resultados das análises bifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos ao final do experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de F e *p*, em negrito e gl (graus de liberdade).

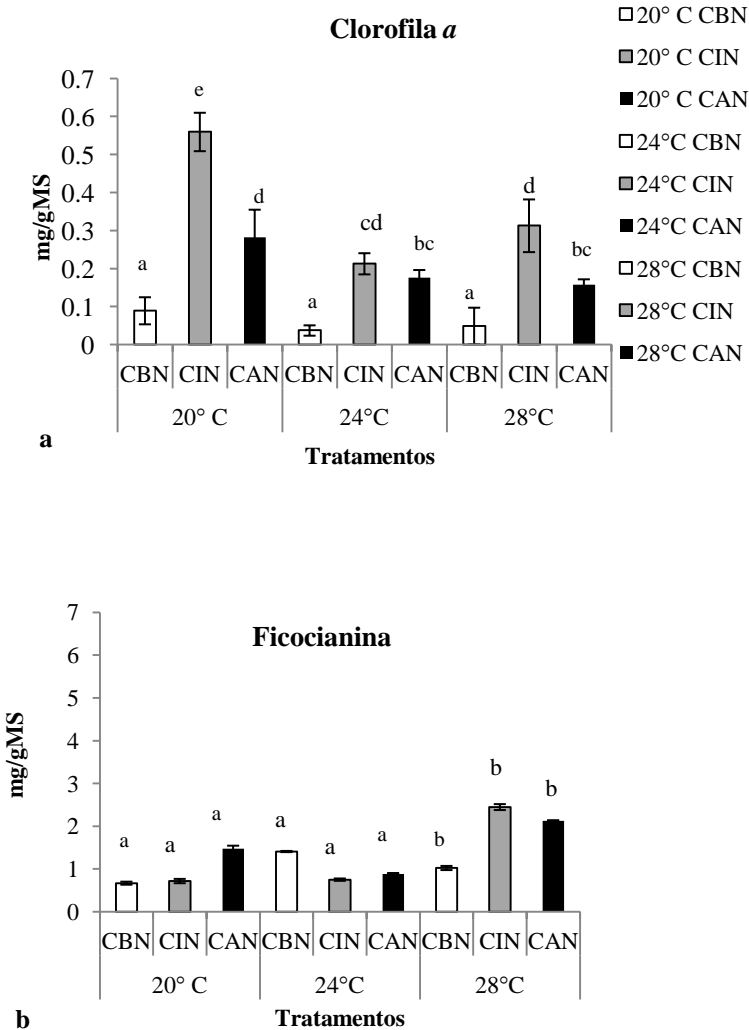
Fonte de Variação Variável	gl 2 MS	Nutrientes			Temperatura			N×T		
		F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	
TCR%	<b>15,34</b>	<b>1746</b>	<b>0,00</b>	<b>9,31</b>	<b>1059,80</b>	<b>0,00</b>	<b>3,10</b>	<b>353,35</b>	<b>0,00</b>	
Clorofila <i>a</i>	<b>0,20</b>	<b>81,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>28,30</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>7,66</b>	<b>0,00</b>	
Ficocianina	0,48	1,74	0,20	<b>2,34</b>	<b>8,43</b>	<b>0,00</b>	<b>1,08</b>	<b>3,89</b>	<b>0,01</b>	
Ficoeritrina	<b>4,65</b>	<b>4,16</b>	<b>0,03</b>	<b>9,78</b>	<b>8,75</b>	<b>0,00</b>	<b>4,37</b>	<b>3,91</b>	<b>0,01</b>	
Açucars	<b>6,61</b>	<b>1139,86</b>	<b>0,00</b>	<b>43,73</b>	<b>7533,82</b>	<b>0,00</b>	<b>12,32</b>	<b>2123,19</b>	<b>0,00</b>	
Totais										
Amido	<b>0,50</b>	<b>5229,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,28</b>	<b>2930,45</b>	<b>0,00</b>	<b>0,56</b>	<b>5792,99</b>	<b>0,00</b>	



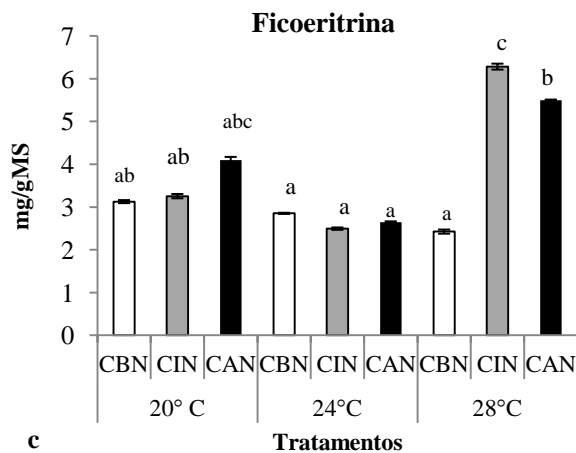
**Figura 1.** Taxa de crescimento relativa (% d<sup>-1</sup>) da macroalga *Laurencia catarinensis* ao final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcadas com letras diferentes entre comparações.

### 3.2 Pigmentos Fotossintetizantes

A interação entre temperatura e nutrientes produziu variação significativa (tabela 1) em clorofila *a* (figura 2 a), ficocianina (figura 2 b) e ficoeritrina (figura 2 c). Em todas as temperaturas combinadas com as condições intermediárias e altas de nutrientes, verificou-se aumento da concentração de clorofila *a*. Porém, quando comparamos os tratamentos CBN, CIN e CAN em temperaturas mais quentes, percebe-se uma tendência da alga diminuir o conteúdo do pigmento fotossintetizante. A concentração de Ficocianina apresentou influência somente da temperatura, apresentando maior conteúdo na temperatura de 28°C. Já, a Ficoeritrina apresentou maior concentração na condição CIN e temperatura de 28°C, ocorrendo o decréscimo em temperaturas mais frias.



**Figura 2.** Conteúdo de Clorofila a (a), Ficocianina (b) e Ficoeritrina (c) dos talos da macroalga *Laurencia catarinensis* ao final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcadas com letras diferentes entre comparações.



**Figura 2.** Conteúdo de Clorofila *a* (a), Ficocianina (b) e Ficoeritrina (c) dos talos da macroalga *Laurencia catarinensis* ao final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcados com letras diferentes entre comparações.

### 3.2.1 Análise dos Parâmetros da Fluorescência da Clorofila *a*

A interação entre temperatura e nutrientes produziu diferenças significativas nos parâmetros fotossintético ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 2).

Quando analisados os parâmetros  $\Delta F/F'm$  (Figura 3a) e ETR (Figura 3c) verificou-se que a alga obteve melhor desempenho fotossintético em temperatura de 20°C, diminuindo-o com o aumento da temperatura. Em condições de 20°C ocorreu aumento dos valores com o incremento de nutrientes, sendo observado o contrário na temperatura de 24°C. Nas condições de concentrações baixas e altas de nutrientes foi observado a diminuição dos valores dos parâmetros na temperaturas mais quente.

Através dos parâmetros obtidos pela curva de luz  $F_v/F_m$ ,  $ETR_{max}$ ,  $\alpha$  ETR e  $I_s$  ( Figura 3 a, b, c e d) pode-se verificar que na temperatura de 20°C ocorreu aumento dos valores com o incremento de nutrientes, porém foi observado o efeito antagônico nos dados de irradiância de saturação ( $I_s$ ). Na temperatura a 28°C observou-se o efeito negativo ao incremento de nutrientes, ocorrendo queda dos valores dos parâmetros fotossintéticos. Quando analisado o tratamento CBN e CAN pode-se perceber que o aumento da temperatura foi prejudicial ao metabolismo da macroalga. Sendo que para as concentrações intermediárias (CIN) pode-se observar o inverso para os dados de  $F_v/F_m$  e  $\alpha$  ETR.

**Tabela 2:** Resultados das análises trifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes tempo, nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos são apresentados com os dados de F e *p*, em negrito e gl (graus de liberdade).

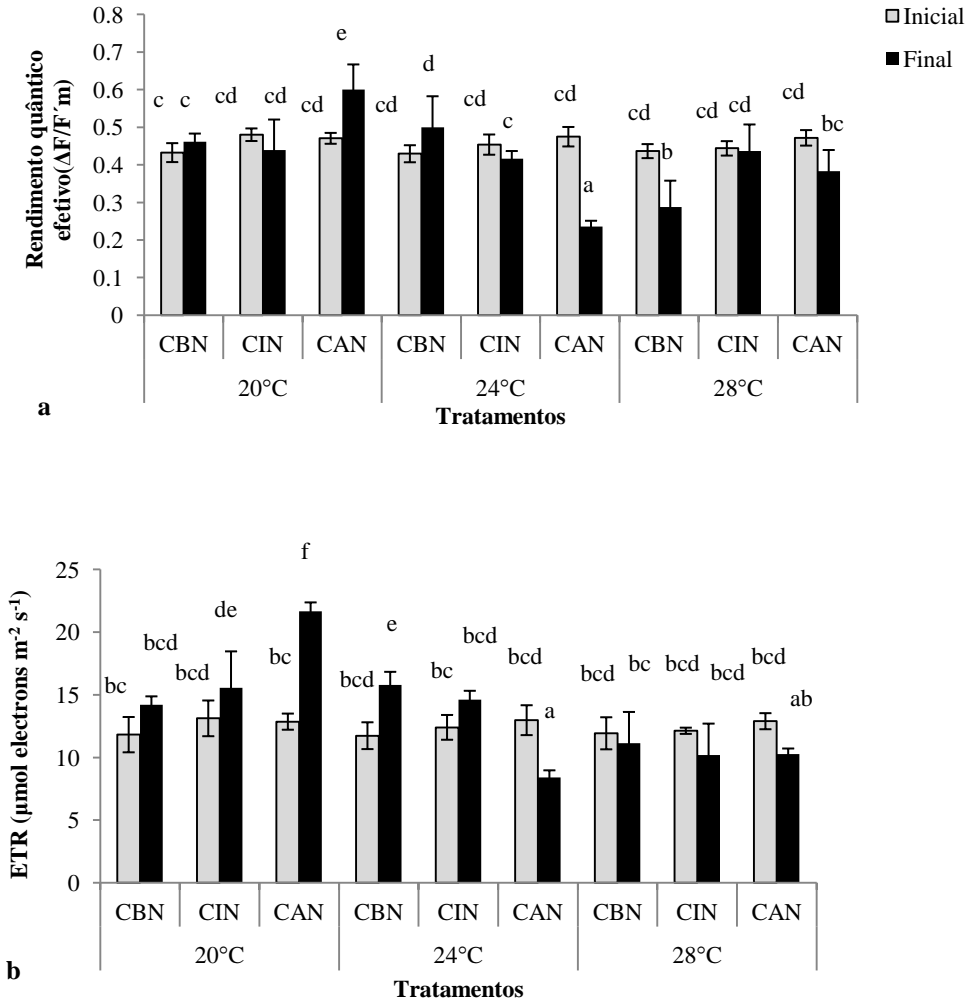
(continua)

Variáveis	Tempo			Nutrientes			Temperatura			ToxN		
	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>
$\Delta F/F'm$	0,005	3,96	0,05	0,00	0,64	0,50	<b>0,02</b>	<b>15,34</b>	<b>0,00</b>	0,00	0,57	0,56
ETR	<b>38,30</b>	<b>58,24</b>	<b>0,00</b>	<b>4,40</b>	<b>6,78</b>	<b>0,00</b>	<b>12,59</b>	<b>19,15</b>	<b>0,00</b>	0,75	1,15	0,33
Fv/Fm	<b>0,26</b>	<b>254</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>17,1</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>15,21</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>17,15</b>	<b>0,00</b>
ETRmax	<b>3408,76</b>	<b>679,14</b>	<b>0,00</b>	4,53	0,90	0,40	<b>291,06</b>	<b>57,98</b>	<b>0,00</b>	<b>100,11</b>	<b>19,94</b>	<b>0,00</b>
$\alpha ETR$	<b>0,00</b>	<b>28,86</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>13,37</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>10,23</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3,71</b>	<b>0,00</b>
Is	<b>111096</b>	<b>144,18</b>	<b>0,00</b>	<b>294081</b>	<b>38,16</b>	<b>0,00</b>	<b>1041178</b>	<b>135,13</b>	<b>0,00</b>	<b>255899</b>	<b>33,21</b>	<b>0,00</b>

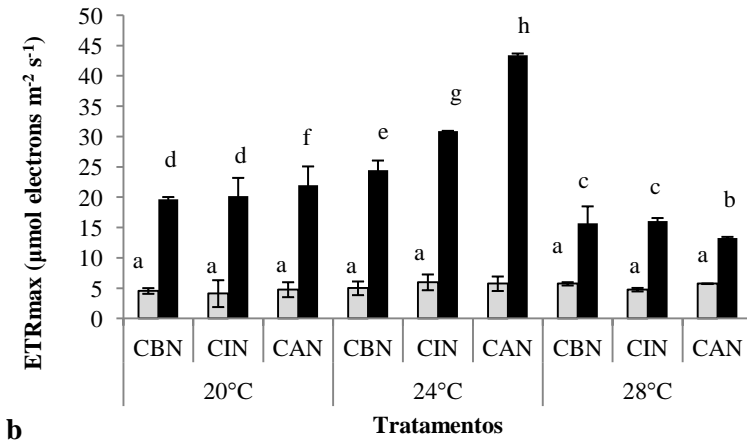
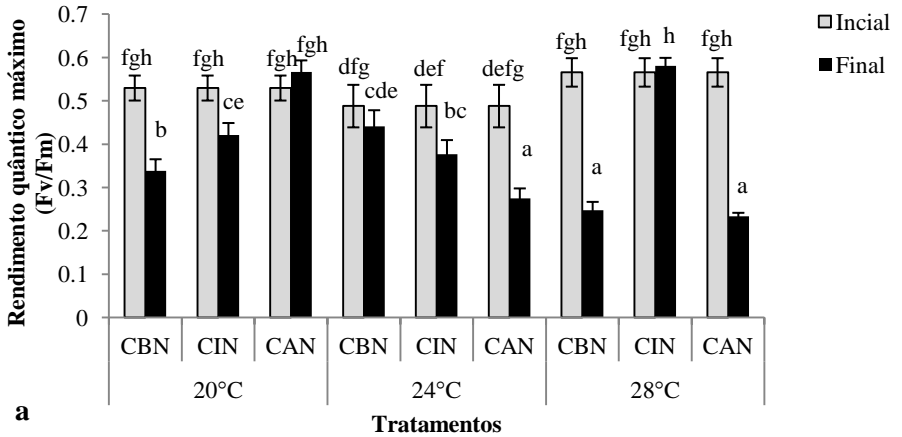
(continuação)

Fonte de variação	ToxTemp			NxTemp			NxToxTemp		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
$\Delta F/F'm$	0,021	20,14	0,00	0,027	14,70	0,00	0,025	20,36	0,00
ETR	28,89	43,94	0,00	32,33	49,16	0,00	28,70	43,64	0,00
Fv/Fm	0,028	17,26	0,00	0,035	33,09	0,00	0,035	33,09	0,00
ETRmax	224,14	44,65	0,00	57,67	11,49	0,00	136,70	27,23	0,00
$\alpha$ ETR	0,00	28,01	0,00	0,00	7,78	0,00	0,00	6,97	0,00
Is	935862	121,46	0,00	132109	17,14	0,00	404496	52,49	0,00

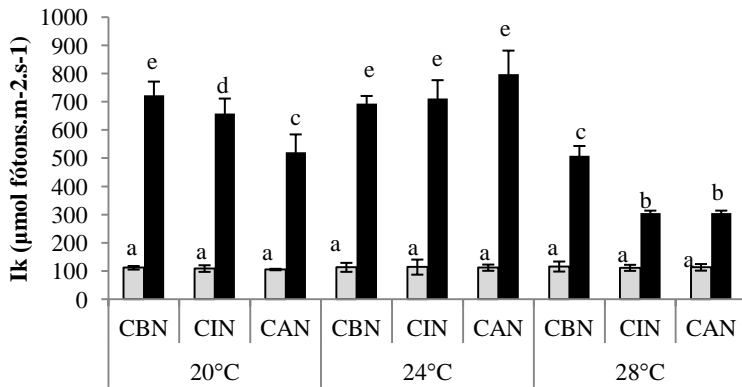
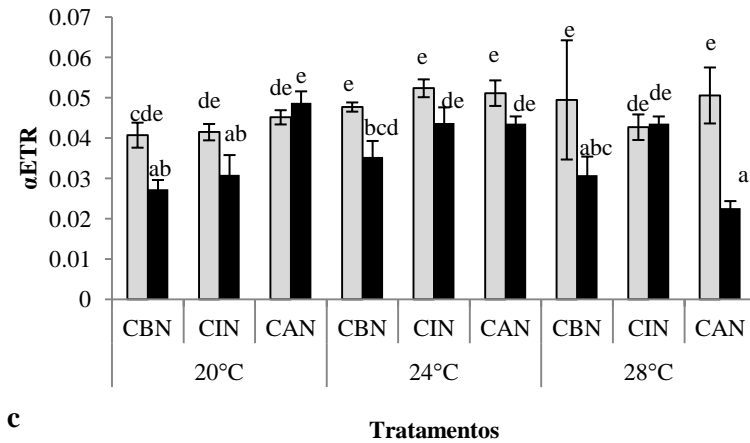




**Figura 3:** Valores das médias±desvio padrão dos Parâmetros fotossintéticos  $\Delta F/F'm$  (a) e ETR (b) de *Laurencia catarinensis* de amostras iniciais e finais ao experimento em temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C combinadas com concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN), n=3.



**Figura 4:** Valores das médias±desvio padrão dos parâmetros fotossintéticos de *Laurencia catarinensis*: Fv/Fm (a), ETRmax (b),  $\alpha$  ETR (c) e Is (d) com amostras iniciais e finais ao experimento em temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C combinadas com concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN), n=3.

**d**

**Figura 4:** Valores das médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros fotossintéticos de *Laurencia catarinensis*: Fv/Fm (a), ETRmax (b),  $\alpha$  ETR (c) e  $I_s$  (d) com amostras iniciais e finais ao experimento em temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C combinadas com concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN), n=3.

### 3.2.2 Extração de carotenoides por CLAE

A interação entre temperatura e nutrientes produziu diferenças significativas nos carotenoides ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 3).

Os carotenoides totais (Tabela 4) apresentaram-se em maior concentração nos tratamentos CIN nas temperaturas 20°C e 24°C, enquanto na temperatura mais alta observou-se maior concentração destes compostos em ambos os tratamentos CIN e CAN. Os carotenoides presentes nas amostras foram Luteína, Zeaxantina Livre e esterificada e  $\alpha$ -Caroteno.

Para o composto Luteína obteve-se o mesmo padrão do que em carotenoides totais. Em Zeaxantina livre observou-se que tanto para as temperaturas de 20°C e 24°C, o tratamento CIN obteve maior concentração do composto, porém a 28°C o tratamento com maior concentração de nutrientes obteve menor conteúdo do composto. O tratamento CIN, diminuiu a 28°C e CAN aumentou a produção de Zeaxantina livre.

Em Zeaxantina esterificada observou-se que nas temperaturas de 24°C e 28°C, ocorreu aumento do conteúdo com o incremento de nutrientes. Para o tratamento CIN observou-se a diminuição da concentração com o aumento da temperatura e em CAN o inverso foi constatado. Por fim, em  $\alpha$ -Caroteno observou-se que ele esteve presente somente no tratamento CIN, em temperaturas de 20°C e 24°C. Porém na temperatura mais alta, observou-se o aumento da concentração com o incremento de nutrientes. Quando comparados os tratamentos com as temperaturas, constatou-se que em CBN e CAN O composto esteve presente somente a 28°C, enquanto em CIN o maior conteúdo ocorreu a 20°C.

**Tabela 3:** Resultados das análises bifatorial ANOVA dos Carotenoides, para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos estão apresentados com os dados de F e *p*, em negrito e gl (graus de liberdade).

Fonte de Variação gl=2 Variável	Nutrientes			Temperatura			NxT		
	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>
Luteína	<b>12679,32</b>	<b>128,62</b>	<b>0,00</b>	<b>2097,29</b>	<b>21,27</b>	<b>0,00</b>	<b>3239,50</b>	<b>32,86</b>	<b>0,00</b>
Zeaxantina Livre	<b>344,12</b>	<b>951,18</b>	<b>0,00</b>	<b>89,08</b>	<b>246,23</b>	<b>0,00</b>	<b>131,06</b>	<b>362,27</b>	<b>0,00</b>
Zeaxantina esterificada	<b>6086,35</b>	<b>2355,82</b>	<b>0,00</b>	<b>4012,67</b>	<b>1553,16</b>	<b>0,00</b>	<b>3728,50</b>	<b>1443,17</b>	<b>0,00</b>
$\alpha$ -Caroteno	<b>126,24</b>	<b>53,15</b>	<b>0,00</b>	<b>22,66</b>	<b>9,54</b>	<b>0,00</b>	<b>43,49</b>	<b>18,31</b>	<b>0,00</b>
Carotenoides totais	<b>50008,8</b>	<b>5,4</b>	<b>0,00</b>	<b>15875,4</b>	<b>1,71</b>	<b>0,00</b>	<b>19022,6</b>	<b>2,05</b>	<b>0,00</b>

**Tabela 4:** Concentração dos carotenoides (mg/g - massa seca) determinada por CLAE da macroalga *Laurencia catarinensis*. As Amostras foram submetidas as temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os valores apresentados correspondem a media de tres injecoes (10 µL ±desvio padrão). As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Pico, composto	Rt (mi n)	mg/gMS								
		20°C			24°C			28°C		
		CBN	CIN	CAN	CBN	CIN	CAN	CBN	CIN	CAN
Luteína	3,6- 3,8	6,26±0,33 a	65,58±1,2 2 <sup>c</sup>	1,85±0,7 0 <sup>a</sup>	3,70±1,53 a	132,09±28, 02 <sup>d</sup>	20,92±6,1 6 <sup>ab</sup>	9,02±2,12 <sup>a</sup>	35,59±6,3 4 <sup>b</sup>	38,56±3,9 b
Zeaxantin a livre	4,1	2,34±0,06 ab	13,33±0,2 3 <sup>f</sup>	nd	1,29±0,06 ab	27,74±0,01 <sup>g</sup>	5,97±1,72 d	3,11±0,69 bc	4,25±1,55 cd	8,37±1,14 e
Zeaxantin a esterificad a	4,4	1,85±0,37 a	Traços*	0,37±0,1 7 <sup>a</sup>	1,88±0,12 a	133,57±0,0 1 <sup>d</sup>	8,59±2,55 b	4,01±1,10 <sup>a</sup>	18,16±2,8 7 <sup>c</sup>	15,08±2,6 8 <sup>c</sup>
α-caroteno	9,7	nd	10,79±0,7 3 <sup>c</sup>	Traços*	nd	6,67±1,83 <sup>b</sup>	Traços*	1,85±0,91 <sup>a</sup>	7,04±2,50 b	11,01±2,7 8 <sup>c</sup>
Carotenói des		10,45±0,7 6 <sup>c</sup>	89,68±2,1 8 <sup>h</sup>	2,22±0,8 7 <sup>a</sup>	6,87±1,71 b	300,07±29, 85 <sup>i</sup>	35,48±10, 43 <sup>e</sup>	17,99±4,8 2 <sup>d</sup>	65,04±13, 22 <sup>f</sup>	73,02±10, 5 <sup>g</sup>
Totais**										

nd: não detectado

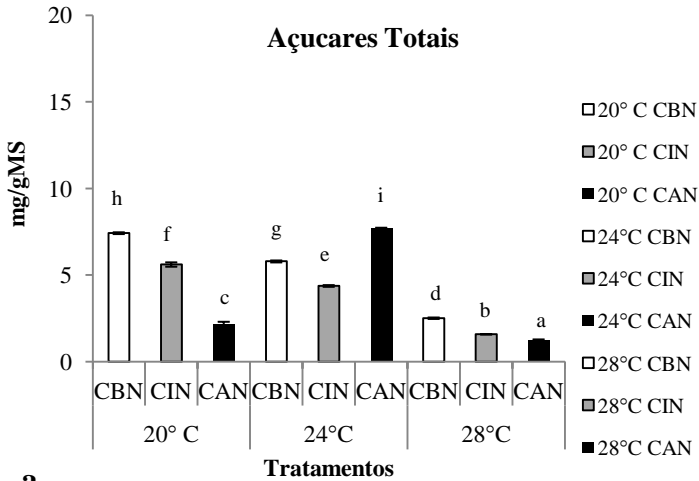
Traços\*: concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração

Carotenóides totais\*\*: Soma dos carotenoides identificados por CLAE

### 3.3 Açúcares Totais e Amido

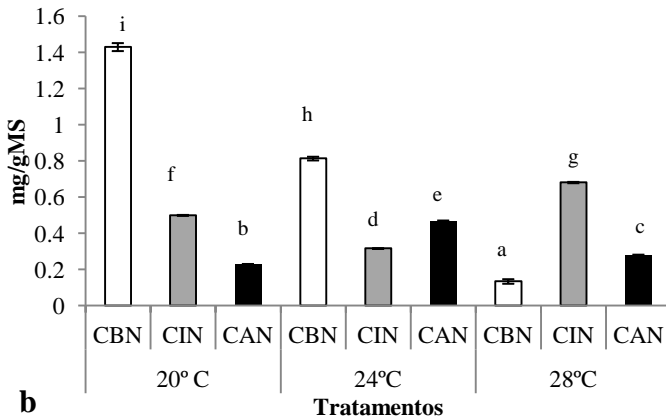
Os conteúdos de açúcares totais (figura 5 a) de *Laurencia catarinensis*, apresentaram diminuição nas temperaturas 20°C e 28°C, com o incremento de nutrientes, no entanto, na temperatura intermediária (24°C), verifica-se a mesma tendência para os tratamentos CBN e CIN, mas o inverso é verificado no tratamento CAN. Dessa forma, o mesmo é verificado quando são comparados os tratamentos CBN, CIN e CAN com aumento de temperatura. Mostrando influência do aumento de nutrientes e da temperatura na síntese de compostos importantes do metabolismo primário da alga.

A substância de reserva, amido (figura 5 b) teve a maior concentração no tratamento controle CBN/20°C, ocorrendo diminuição quando incrementados os nutrientes, assim como na temperatura de 24°C. Porém, na temperatura de 28°C, percebe-se a influencia do nutriente na produção do amido, pois em temperaturas mais quentes, é preciso que se tenha concentrações intermediárias de nutrientes, já que nos tratamentos CBN e CAN, ocorre diminuição da substância de reserva da alga. Nos tratamentos CBN, em temperaturas mais quentes, ocorre uma tendência de diminuição do amido, porém para o CIN possibilita a produção, na temperatura de 28°C. Para o tratamento CAN, a temperatura de 24°C benéfica para a produção dos compostos, tendo ocorrido o inverso em 28°C.



a

**Amido**



b

**Figura 5.** Concentração de Açúcares Totais (a) e amido (b) em mg/gMS da macroalga *L. catarinensis* no final do experimento, com temperaturas de 20 °C, 24 °C e 28 °C e concentrações baixas de nutrientes (oligo), intermediárias (meso) e altas (hiper). Os dados estão mostrados como médias  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As diferenças significativas de acordo com o teste Newman-Keuls estão marcadas com letras diferentes entre os tratamentos.



### 3.4 Compostos fenólicos determinados por CLAE e Atividade antioxidante

A interação entre temperatura e nutrientes produziu diferenças significativas nos Compostos fenólicos ( $p \leq 0.05$ ) (Tabela 5).

Os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais (tabela 6) foram verificados nos tratamentos com concentrações (CIN e CAN), na temperatura de 28°C e no tratamento CAN na temperatura de 24°C como consta na tabela 3. Com relação as Catequinas pode-se observar que o composto Epicatequina foi encontrado em maior concentração em todos os tratamentos variando entre 2,14mg/gMS e 6,84 mg/gMS. Galocatequina apresentou maior concentração em CAN a temperatura de 28°C com 1,08 mg/gMS. A Epigalocatequina apresentou as menores concentrações a 20°C e maiores em 24°C e 28°C.

O Acido Cafeico na temperatura mais fria apresentou diminuição da concentração com o incremento de nutrientes, ocorrendo o inverso a temperatura de 24°C.

O tratamento CBN, apresentou diminuição do composto com o aumento da temperatura, assim como em CAN. Porém em CIN verificou-se o aumento da concentração a 28°C. O composto 4,5 dicafeoilquínico fez-se presente em quantidades consideráveis somente nos tratamentos CIN e CAN a 28°C. Da mesma forma ocorreu nas concentrações de Acido cumárico, porém foi observado também em CBN/20°C e CBN-CAN/ 24°C.

Foram observados também dois compostos não identificados, denominados de Composto X e Composto Y.

O composto X apresentou aumento de sua concentração com o incremento de nutrientes, na temperatura de 28°C. Já o composto Y, ocorreu somente nos tratamentos CBN em todas as temperaturas testadas, com o maior valor em 24°C.

Para o teste de DPPH (Figura 6) também foi observado o mesmo padrão, pois ocorreu maior atividade antioxidante nas temperaturas mais quentes, sendo o valor mais alto encontrado no tratamento CAN/28°C com 28,7%.

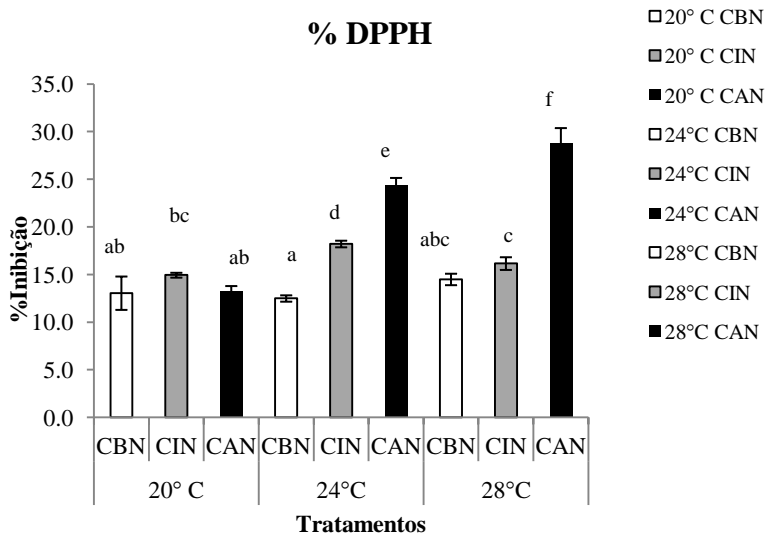
**Tabela 5:** Resultados das análises bifatorial ANOVA dos compostos fenólicos, para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis independentes nutrientes e temperatura. Estes dados foram obtidos durante o experimento realizado com *L.catarinensis*. Os efeitos significativos estão apresentados com os dados de F e *p*, em negrito e gl (graus de liberdade).

Fonte de variação gl=2 Variável	Nutrientes			Temperatura			NxT		
	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>	MS	F	<i>p</i>
Composto X	<b>4,85</b>	<b>38,53</b>	<b>0,00</b>	<b>8,06</b>	<b>63,99</b>	<b>0,00</b>	<b>4,89</b>	<b>38,82</b>	<b>0,00</b>
Epicatequina	<b>27,56</b>	<b>23,65</b>	<b>0,00</b>	<b>5,96</b>	<b>5,11</b>	<b>0,00</b>	<b>9,22</b>	<b>7,92</b>	<b>0,00</b>
Galocatequina	<b>0,46</b>	<b>17,05</b>	<b>0,00</b>	<b>0,38</b>	<b>14,07</b>	<b>0,00</b>	<b>0,31</b>	<b>11,67</b>	<b>0,00</b>
Epigalocatequina	<b>0,18</b>	<b>32,44</b>	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>	<b>19,32</b>	<b>0,00</b>	<b>0,12</b>	<b>22,52</b>	<b>0,00</b>
Composto Y	<b>1,77</b>	<b>254,73</b>	<b>0,00</b>	<b>0,15</b>	<b>22,02</b>	<b>0,00</b>	<b>0,27</b>	<b>39,80</b>	<b>0,00</b>
Acido Caféico	<b>0,21</b>	<b>25,06</b>	<b>0,00</b>	<b>0,28</b>	<b>32,75</b>	<b>0,00</b>	<b>0,42</b>	<b>49,19</b>	<b>0,00</b>
4,5dicafeoilquínico	<b>0,07</b>	<b>8,19</b>	<b>0,00</b>	<b>0,31</b>	<b>32,66</b>	<b>0,00</b>	<b>0,17</b>	<b>17,69</b>	<b>0,00</b>
Acido Cumárico	<b>0,49</b>	<b>32,55</b>	<b>0,00</b>	<b>1,97</b>	<b>128,61</b>	<b>0,00</b>	<b>1,31</b>	<b>85,60</b>	<b>0,00</b>
Fenólicos totais	<b>66,21</b>	<b>1829,79</b>	<b>0,00</b>	<b>48,33</b>	<b>1335,60</b>	<b>0,00</b>	<b>58,76</b>	<b>1623,84</b>	<b>0,00</b>

**Tabela 6:** Concentração dos compostos fenólicos da macroalga *L. catarinensis*. As condições experimentais foram 20°C, 24°C e 28°C, com as concentrações baixas de nutrientes (CBN), Intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os valores apresentados correspondem a media de três injeções (10µL)± desvio padrão. As letras (na mesma linha) indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Pico, composto	Rt (min)	mg/gMS								
		20°C			24°C			28°C		
		CBN	CIN	CAN	CBN	CIN	CAN	CBN	CIN	CAN
Composto X	4,3	1,14±0, 32 <sup>ab</sup>	nd	0,60±0, 15 <sup>ac</sup>	1,41±0,06 ab	0,91±0, 49 <sup>a</sup>	1,49±0, 10 <sup>ab</sup>	0,64±0, 10 <sup>ac</sup>	1,93±0, 61 <sup>b</sup>	4,79±0, 64 <sup>d</sup>
Epicatequina	4,6- 4,7	2,70±1, 14 <sup>a</sup>	6,22±0, 90 <sup>b</sup>	3,58±1, 34 <sup>a</sup>	2,15±0,54 a	2,33±1, 5 <sup>a</sup>	6,36±0, 36 <sup>b</sup>	2,14±0, 33 <sup>a</sup>	6,80±1, 19 <sup>b</sup>	6,84±1, 68 <sup>b</sup>
Galocatequina	6,2	nd	traços	traços	0,50±0,09 b	nd	0,56±0, 34 <sup>b</sup>	nd	0,40±0, 23 <sup>ab</sup>	1,08±0, 31 <sup>c</sup>
Epigalocatequi na	8,7	traços	0,26±0, 05 <sup>a</sup>	0,20±0, 02 <sup>a</sup>	0,39±0,04 a	nd	0,57±0, 09 <sup>b</sup>	traços	0,61±0, 10 <sup>b</sup>	0,70±0, 15 <sup>b</sup>
Composto Y	9,2	0,77±0, 16 <sup>d</sup>	nd	nd	1,35±0,11 e	nd	traços	0,45±0, 05 <sup>c</sup>	traços	traços
Acido Cafeico	14,2	0,96±0, 04 <sup>b</sup>	0,99±0, 14 <sup>b</sup>	0,48±0, 12 <sup>ac</sup>	0,32±0,09 a	0,34±0, 04 <sup>a</sup>	0,97±0, 06 <sup>b</sup>	nd	0,61±0, 05 <sup>cd</sup>	0,76±0, 11 <sup>d</sup>
4,5dicafeoilquí nico	16,3- 17	traços	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,32±0, 05 <sup>a</sup>	0,55±0, 03 <sup>b</sup>
Acido Cumárico	23,4- 25,6	0,34±0, 12 <sup>bc</sup>	nd	nd	0,55±0,16 c	nd	0,27±0, 01 <sup>ab</sup>	nd	1,06±0, 18 <sup>d</sup>	1,92±1, 24 <sup>e</sup>
Fenólicos totais		5,91 <sup>d</sup>	7,47 <sup>f</sup>	4,86 <sup>c</sup>	6,67 <sup>e</sup>	3,58 <sup>b</sup>	10,22 <sup>g</sup>	3,23 <sup>a</sup>	11,73 <sup>h</sup>	16,64 <sup>i</sup>

nd: não detectado; Traços\*: concentração abaixo do limite de detecção da curva de calibração; Fenólicos totais\*\*\*: Soma dos fenólicos identificados por CLAE



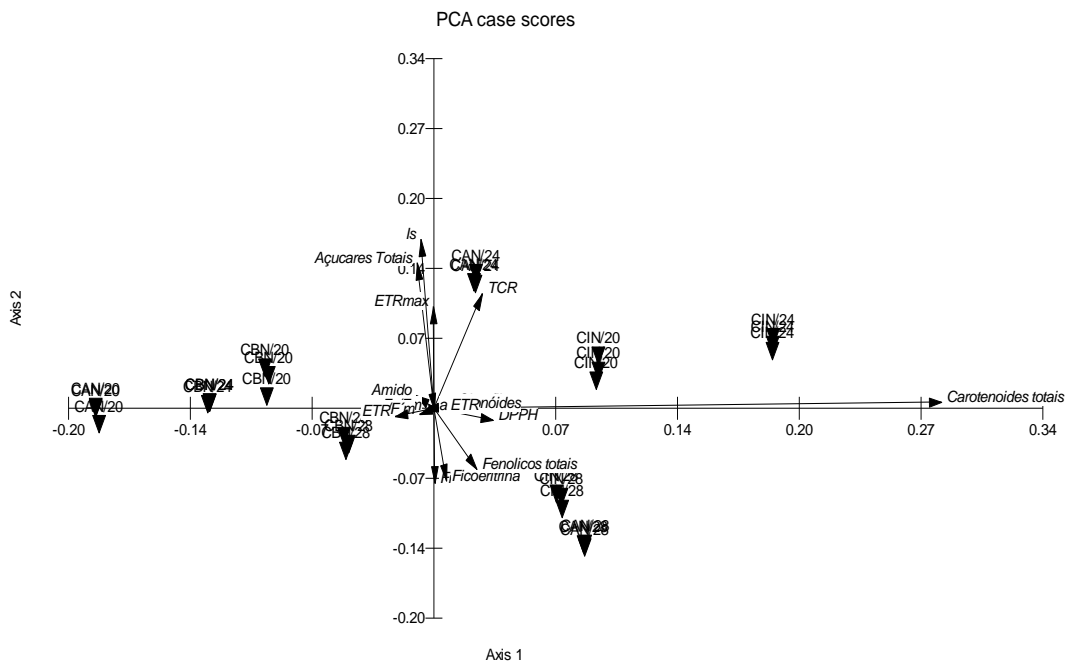
**Figura 6.** Atividade antioxidante (DPPH) dos compostos fenólicos totais da macroalga *L. catarinensis* no final do experimento, com temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C e concentrações baixas de nutrientes (CBN), intermediárias (CIN) e altas (CAN). Os dados estão apresentados como média (n= 3). As diferenças significativas de acordo com o teste de Newman-Keuls estão marcadas com letras diferentes entre comparações.

### 3.5 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de ordenação mostrou que o primeiro componente (eixo I) apresenta amplitude de valores para com contribuição de 55,06% da variância do conjunto de dados relacionada com o TCR%, agrupou o tratamento CIN/20°C-24°C e CAN/24°C. O segundo componente apresenta o de maior contribuição a explicação da variância total dos dados com 77,71% (Eixo II) que é representado correlacionado com as variáveis açúcares totais, ETRmax e Amido alocando as condições CBN-CAN/20°C e CBN/ 24°C para o eixo II. Os fatores Fenólicos totais, DPPH e Ficoeritrina alocaram os tratamentos CIN-CAN/28°C, mostrando uma correlação negativa com relação ao eixo II (Figura 7, Tabela 7)

**Tabela 7:** Os autovalores e percentual da variância total dos dois primeiros eixos extraídos dos dados de PCA utilizando os parâmetros fotossintéticos ( $\alpha$  ETR, ETRmax, ETR, Fv/Fm,  $\Delta F / F'm$ , Is), pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos, DPPH, açúcar totais e amido.

	Axis 1	Axis 2
Eigenvalues	0,35	0,14
Percentage	55,06	22,65
Cum. Percentage	55,06	77,71



**Figura 7:** Distribuição fatorial do componente principal (PCA) para os dados de ( $\alpha$  ETR, ETRmax, ETR, Fv/Fm,  $\Delta F/F'm$ , I $\kappa$ ), clorofila *a*, Ficobiliproteínas, carotenoides, compostos fenólicos, DPPH, Açucares totais, amido e Taxa de crescimento.

## 4 Discussão

Variações na temperatura alteram diferentes aspectos da biologia de organismos marinhos, sendo fator determinante de sua ecologia e biogeografia (Eggert, 2012). Estas respostas ecológicas ou mesmo evolutivas, são reflexo das limitações fisiológicas que temperaturas extremas impõem à homeostase de populações ou mesmo de comunidades. Nossos resultados reforçam esta perspectiva considerando que todos os descritores apresentaram variações expressivas quando considerada as temperaturas máximas avaliadas. Quando consideramos cenários que integram variações na disponibilidade de nutrientes e as variações na temperatura, as hipóteses correntemente defendidas apontam para uma elevação na biomassa de produtores primários em oceanos mais quentes e mais ricos em nutrientes (Teichberg et al. 2008). Em geral, a taxa de crescimento das algas é proporcional à velocidade de absorção do nutriente, habilidade limitada por extremos de temperatura (Juneja et al. 2013), o que pode ser observado no presente estudo, pois na temperatura de 28°C com o tratamento CAN, a alga obteve menor taxa de crescimento (0,074 mg/gMF) correlacionando-se negativamente com o tratamento. Nas menores temperaturas com adição de nutrientes, o crescimento foi maior variando entre (0,58 mg/gMF a 3,37 mg/gMF), corroborando com a hipótese de que a disponibilidade de nutrientes representa o fator ambiental que muitas vezes é responsável pelo aumento da biomassa de muitas espécies de produtores primários costeiros (Reis & Yoneshigue-Valentin, 1998), o mesmo comprovado por Nishihara et al. (2004) em experimentos realizados com a macroalga *Laurencia papillosa*, mostrando que tanto a temperatura da água do mar quanto a disponibilidade de nutrientes foram determinantes importantes que influenciaram o crescimento sazonal da alga, da mesma forma, Yokoya et al. (2007) em um estudo realizado com a alga *Hypnea musciformis*, verificou a maior taxa de crescimento em temperaturas de 20°C-25°C.

No entanto, adição de compostos nitrogenados na água do mar pode estimular a taxa de crescimento, fotossíntese, a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, como a nitrato redutase e de enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono como a RuBisCO



(Wheeler & Weidner, 1983; Rosemberg & Ramus, 1982). Dessa forma, diferentes respostas das macroalgas marinhas tem sido descritas para sua adaptação a radiação solar e mudanças de temperatura, como alterações no conteúdo dos pigmentos e taxas de pigmentos fotossintéticos/pigmentos de fotoproteção (Staehr & Wernberg 2009), compostos fenólicos e eficiência da atividade de sistemas antioxidantes (Bischof & Rautenberger, 2012).

A temperatura também é relacionada as modificações no teor de amido em células algais. As Rhodophyceae metabolizam amido, como amido das florídeas. Amidos são produzidos por metabólitos fosforilados nas reações escuras do ciclo da fotossíntese utilizando ligações de fosfato ricos em energia (ou seja, ATP) formados nas reações de luz. As enzimas que têm sido sugeridas para desempenhar um papel crítico na temperatura de degradação dependente de amido são  $\alpha$ -amilase e glucano- $\alpha$  fosforilase constatou-se que o aumento da temperatura leva à degradação do amido produzido (Nakamura & Myiachi, 1985), o que pode-se observar no presente estudo, pois na temperatura de 28°C e CAN, ocorreu diminuição na quantidade de amido e açúcares totais produzido pelas algas, comprovando-se na análise de correlação com os tratamentos CBN-CAN/20°C e CBN-24°C, corroborando com o estudo realizado por Rotem et al. (1986) quem também evidenciou aumento da quantidade de amido na macroalga *Gracilaria sp.*, quando cultivadas em água do mar sem adição de nutrientes.

Algumas espécies de algas podem estocar o nitrogênio na forma de aminoácidos, proteínas e pigmentos (Bird et al. 1982, Rosemberg & Ramus 1982). Neste estudo foi possível observar que sem a adição de nutrientes, a alga produziu pouca quantidade de clorofila *a* (entre 0,037mg/gMS e 0,09 mg/gMS), já em concentrações intermediárias ocorreu aumento (entre 0,213mg/gMS e 0,560mg/gMS), valores menores aos encontrados em algas do mesmo gênero *Laurencia pacifica* e *L. nidifica*, que apresentaram maiores valores para clorofila *a*, em temperatura de 21°C, sendo 2,5 mg/gMS e 1,2 mg/gMS, respectivamente (Padilla-Gamino & Carpenter, 2007), logo em condições de altas concentrações de nutrientes, houve decréscimo do conteúdo de clorofila *a* (0,157mg/gMS a 0,282mg/gMS). Dessa forma, uma hipótese a este fato pode ser em decorrência da degradação da clorofila *a*, pois observou-se coloração amarronzada das algas nos dois tratamentos. Segundo Steet & Tong (1996) a degradação da Clorofila *a* pode ser observada pela perda de cor ou pela formação da cor marrom oliva, que são características da feofitina. Este fenômeno está

relacionado com uma alteração comum de clorofila (feofitinação), onde o centro de magnésio é substituído por hidrogênio, alterando o espectro de absorção da clorofila *a* (Martins & Silva, 2000; Streit et al. 2005), o que pode ser comprovado neste trabalho, pois na temperatura de 20°C e condições CAN, ocorreu maior concentração de Clorofila *a*, não sendo evidenciada a degradação.

A adaptação do aparato fotossintético das algas às variações de luz, nutrientes, ou a temperatura no ambiente pode envolver alterações tanto nas concentrações quanto nas proporções de pigmentos no talo da macroalga (Rosemberg & Ramus, 1982), isso pode ser comprovado neste estudo, pois as ficocianinas por não serem consideradas as principais reservas de nitrogênio como as ficoeritrinas, uma vez que este composto é degradado na ausência do nutriente (Bird et al. 1982), sofreu somente a influência da temperatura nos tratamentos, sendo que foi produzida em maior quantidade na temperatura de 28°C, como pode ser visto na correlação positiva, fato que pode ter sido estimulado pela baixa concentração de clorofila *a*. Assim, as ficoeritrinas, foram influenciadas pelos nutrientes e temperatura, apresentando aumento na sua concentração em temperatura de 28°C em condições CIN e CAN. De fato, a interação sinérgica entre elevadas concentrações de nutrientes em conjunto com temperaturas extremas promoveram modificações na concentração pigmentar de *L. catarinensis*. Neste contexto, assim como as ficobiliproteínas, os carotenoides absorvem a energia da luz para utilização no processo de fotossíntese protegendo a clorofila do fotodano (Armstrong et al. 1996). Acúmulo de carotenóides em espécies de algas pode ser acrescido com a temperatura devido ao aumento oxidativo. Segundo a literatura, as algas vermelhas apresentam um padrão na composição de carotenoides, sendo este padrão composto por  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno e uma xantofila majoritária, luteína, zeaxantina ou anteraxantina (Marquardt & Hanelt, 2004, Schubert et al. 2006, Esteban et al. 2009). Em algumas espécies de algas, a luteína é o carotenóide principal, como evidenciado para *L. catarinensis* porém em outras espécies pode ser substituído por zeaxantina ou anteraxantina. Estudos com o mesmo gênero já foram realizados por Schubert et al (2006) que verificou em *Laurencia gardneri* a presença de 18,9% de Luteína e 43,7 % de Zeaxantina, do total de carotenoides já em *L. pacifica* apresentou 3,5% e 57%, de luteína e zeaxantina, respectivamente, corroborando com os valores obtidos no presente trabalho para as concentrações de zeaxantina observada no tratamento controle CBN/20°C. Os resultados

obtidos para *Laurencia catarinensis* apontam para a influência dos fatores ambientais na síntese de carotenóides.

Aumento na formação de carotenóide com o aumento da temperatura é geralmente atribuído a resposta celular ao aumento da formação de radicais livres de oxigênio ativo ou o aumento da atividade da enzima biossintética (Juneja et al. 2013). A disponibilidade de Nitrogênio não deve afetar diretamente as concentrações de carotenóides, pelo fato deste elemento não fazer parte da sua composição química. No entanto, decréscimos de N, seguido de uma diminuição da clorofila poderia causar menor capacidade para absorver a luz para a fotossíntese. Consequentemente, mais foto-dano poderia estimular um aumento em carotenóides como antioxidantes (Kopsell et al. 2007; Parjikolaei et al. 2013), o que pode ser representado no estudo, pois nas condições CBN, as algas produziram menor quantidade de clorofila *a*, em contrapartida ocorreu incremento no conteúdo de carotenóides.

Dessa forma como os carotenóides, os compostos fenólicos estão envolvidos na prevenção de inúmeras patologias, devido a sua capacidade antioxidante (Farvin & Jacobsen, 2013). Assim como para os carotenóides, pouco se conhece sobre a dinâmica no acúmulo de compostos fenólicos em macroalgas, principalmente no que diz respeito as algas vermelhas. Esses compostos interrompem a cadeia de reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis para as células (Angelo & Jorge, 2007). Os antioxidantes fenólicos tem interação principalmente com os radicais peróxila, e possuem capacidade de quelar metais de transição. A atividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura, do grau de metoxilação e do número de hidroxilas presentes na molécula (Barreiros et al. 2006). O estudo aqui apresentado referente ao acúmulo de compostos fenólicos totais para *Laurencia catarinensis*, foi semelhante aos descritos na literatura, para macroalgas marinhas (Abdala-Diaz et al. 2006; Plouguerné et al. 2006), sendo que as maiores concentrações destes compostos, foram observadas na temperatura mais elevada (nos tratamentos CIN e CAN). No entanto, para as condições CBN e temperatura de 28°C, ocorreu o decréscimo destes compostos, o que pode ser atribuído a diferença de irradiação natural do ambiente. As catequinas pertencem a um pequeno grupo de compostos fenólicos, eles incluem catequina (3-hidroxi-flavan) e o seu epímero, e também podem ocorrer como galatos com ácido gálico. Estudo realizado com a alga vermelha *Porphyra yezoensis* verificou o conteúdo de catequina e

epigalocatequina em concentrações de  $36 \pm 4$  e  $32 \pm 4$  mg/gMS, respectivamente, já em *Chondrus verrucosus* não foi detectado o conteúdo de catequinas. Epigalocatequina galato, epigalocatequina, epicatequina galato e epicatequina foram os mais importantes componentes em termos de capacidade antioxidante entre todos as catequinas (Yoshie et al. 2000), o que pode ser verificado no presente estudo, onde a epicatequina foi encontrada em maiores concentrações dentre os tratamentos.

A atividade de eliminação de radicais, realizada por DPPH, constatou neste estudo o mesmo padrão para compostos fenólicos, onde os tratamentos com temperaturas  $24^{\circ}\text{C}$  e  $28^{\circ}\text{C}$ , juntamente com altas concentrações de nutrientes apresentaram maiores atividades antioxidantes (24,38% e 28,72% em concentração de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato, respectivamente). Estudos com várias espécies da ordem *Ceramiales*, mostraram relativamente um alto valor para DPPH, para *Heterosiphonia gibbesii* ( $8,15\% \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Acanthophora spicifera* ( $12,50\% \pm 0,24 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), *Bryothamnion triquetrum* ( $12,89\% \pm 0,51 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e *Ceramium nitens* ( $13,89\% \pm 0,07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Outros estudos têm demonstrado atividade antioxidante em *Polysiphonia urceolata* e *P. morrowii* (Fujimoto, 1990), *Bryothamnion Triquetrum* (Fallarero et al. 2003), e *Rhodomela confervoides* (Huang & Wang, 2004).

Estresses ambientais não só produzem danos no aparato fotossintético diretamente, mas também afetam a atividade das enzimas envolvidas nas reações de escuro e no transporte fotossintético de elétrons (Lin et al. 2009, Yang et al.2012). A temperatura é um fator de extrema importância no controle da taxa de fotossíntese em todas as plantas e algas (Davison et al. 1991), o crescimento, a fotossíntese e a reprodução de macroalgas entremarés são frequentemente limitadas por elevadas temperaturas do ar e da água (Clark et al. 2013).

Os pigmentos fotossintéticos que facilitam a captura de luz na fotossistema II estão também relacionados com a eficiência da fotossíntese. As algas têm desenvolvido diversos mecanismos para captar a luz solar e assim conseguem regular o seu teor de pigmentos, em resposta a quantidade e qualidade da luz, nutrientes e variação de temperatura, assegurando a sua sobrevivência (Lopez-Figueroa & Niell, 1990). Sendo assim, no geral, para todos os parâmetros da fluorescência da Clorofila *a*, verificou-se que as temperaturas quentes e condições CAN causaram danos ao Fotossistema II da macroalga *Laurencia catarinensis*, o que pode ser visualizado juntamente com a concentração

de açúcares totais, amido e Clorofila *a*, ocorrendo decréscimo na concentração destas substâncias na citada macroalga. Segundo Steller et al. (2007), estas respostas seriam consequência de regulação negativa de processos metabólicos que são regulados por enzimas, que por sua vez são altamente sensíveis à altas temperaturas (30°C). Necchi (2004) ao estudar as características fotossintéticas em resposta a irradiância de 33 espécies de macroalgas por meio das técnicas de fluorescência da clorofila e oxigênio dissolvido, verificou que as Curvas de fotossíntese-irradiância baseadas nas duas técnicas indicaram adaptações à baixa irradiância para Bacillariophyta e Rhodophyta, demonstrando que estas algas são tipicamente adaptadas a sombra, o que também foi verificado no presente estudo, devido ao decréscimo da irradiância de saturação ( $I_s$ ) da alga *L.catarinensis* na temperatura de 28°C. As estratégias de proteção a fotodanos de plantas crescendo sob luz excessiva podem envolver indução de mecanismos fotoprotetores e síntese de pigmentos, em contraste, a fotoinibição crônica resulta na perda de atividade dos centros de reação do FSII (Schreiber et al. 1994).

O parâmetro  $\Delta F/F'm$  representa a eficiência de captura da excitação pelos centros de reação abertos do PSII (Schreiber et al. 1994) e está relacionada à dissipação da energia termal no sistema antena (Demmig-Adams et al. 1990). A diminuição de  $\Delta F/F'm$  e ETR, como foi observado no presente estudo em condições de incremento de nutrientes e altas temperaturas, mostra o processo regulatório da atividade do PSII por meio da redução da absorção de energia no sistema antena e decréscimo dos processos fotoquímicos da fotossíntese e consequentemente na diminuição na eficiência do PSII ( $\alpha$  ETR) podem ser gerados pela acumulação de aceptores reduzidos, como, também, pelo aumento da dissipação térmica do excesso de energia excitada, antes de alcançar os centros de reação do PSII (Demmig-Adams et al. 1995). Devido ao fato dos processos fotoquímicos e não-fotoquímicos competirem pela energia excitada, o aumento em um dos processos causa a redução em outro (Krause & Weis, 1991). As estratégias de proteção a fotodanos de plantas crescendo sob luz excessiva podem envolver indução de mecanismos fotoprotetores e síntese de pigmentos, em contraste, a fotoinibição crônica resulta na perda de atividade dos centros de reação do FSII. Curvas de indução escuro/luz permitem avaliar informações importantes sobre a performance fotossintética de uma planta adaptada ao escuro, pois é possível inativar parcialmente as enzimas do ciclo de Calvin e depois ativa-las através do pulso de saturação durante os primeiros minutos de iluminação (Schreiber et al.

1994). Estudo realizado por Fujimoto et al. (2014) verificou em experimentos realizados com a macroalga *Gelidiella acerosa*, que o Fv/Fm apresentou-se dependente da temperatura, ocorrendo aumento gradual até 27°C e decréscimo a temperatura de 30°C, semelhante ao que pode ser observado no presente estudo, onde tanto os tratamentos CBN quanto CAN decresceram seus valores em temperaturas de 28°C. Estudos anteriores também indicaram que o rendimento quântico máximo era dependente da temperatura conforme relatado para *Pyropia tenera* (Kjellman) (Watanabe et al. 2014) e *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft et Wynne (Vo et al. 2014).

Macroalgas entremarés por vivem na interface dos habitats marinhos e terrestres e por serem submetidas a desafios ambientais colocados por ambos os regimes climáticos aquáticos e atmosféricos (Helmuth et al. 2006), experimentam grandes mudanças temporais na temperatura, radiação solar e disponibilidade de nutrientes e são confrontados com a dessecação freqüente e stresses osmóticos (Li & Brawley, 2004). Em virtude de seu habitat, estas algas são expostas a pressões climáticas e antrópicas, e estão sendo cada vez mais utilizadas como um sistema de alerta para impactos das mudanças climáticas (Harley et al. 2006, Lima et al. 2007). Com a expectativa de vida relativamente curta, as algas podem responder mais rapidamente às mudanças climáticas do que as plantas terrestres (Southward et al. 2004). Dentro deste contexto, é possível inferir, com o presente estudo e outros já realizados, que pode ocorrer o aumento da sensibilidade de macrofitas aquáticas, principalmente de *Laurencia catarinensis* a vários fatores ambientais em águas eutrofizadas (Ralph 1999). Além disso, determinados níveis de poluentes podem causar alterações bioquímicas nestas algas, aumentando a síntese da energia para demanda de reparos nos constituintes celulares ocorrendo um decréscimo de energia disponível para a macroalga crescer e manter seu ciclo reprodutivo.

## 5 Referências

Abdala Diaz, R. T.; Cabello Pasini, A.; Perez-Rodriguez, E.; Conde Alvarez, R. M.; Figueroa, F. L. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology*, 148: 455-465.

Angelo, P.M.; Jorge, N. 2007. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, 66, 1:1-9.

Anggadiredja, J.; Andyani, R. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu islands. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 477-479.

Araujo, S.A.C.; Deminicus, B.B. 2009. Fotoinibicao da fotossintese. *Revista Brasileira de Biociencias* 7: 463-472.

Armstrong W.; Armstrong J.; Beckett, P.M. 1996. Pressurised aeration in wetland macrophytes: some theoretical aspects of humidity- induced convection and thermal transpiration. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 31 : 25–36.

Arnaldos, T.L.; R. Munoz, M.A. ; Calderon, A.A. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*, 113: 315-322.

Barreiros, L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1.

Barufi, J.B. 2010. Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular. Instituto de Biociencias USP. Tese de Doutorado

Bird, K.T.; Habig, C.; Debusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18: 344-348.

Bischof, K.; Rautenberger, R. 2012. Seaweed responses to environmental stress: Reactive oxygen and antioxidative strategies. Em: Wiencke C., Bischof K. eds. *Seaweed Biology Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization* Springer-Verlag Berlin. 3: 109-132.

Clark, J. S.; Poore, A. G., Ralph, P. J.; Doblin, M. A. (2013). Potential for adaptation in response to thermal stress in an intertidal macroalga. *Journal of Phycology*, 49(4), 630-639.

Collén, P.N.; Camitz, A.; Hancock, R.D.; Viola, R.; Pedersén, M. 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 40:305-314.

Conley, D. J.; Paerl, H. W.; Howarth, R. W.; Boesch, D. F.; Seitzinger, S. P., Havens, K. E.; Likens, G. E. 2009. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014-1015.

Cox, S.; Abu-Ghannam, N.; & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds.

Da Gama, B. A. P.; Carvalho, A. G. V.; Weidner, K.; Soares, A. R.; Coutinho, R.; Fleury, B. G.; Teixeira, V. L.; Pereira, R. C. 2008. Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Botanica Marina*, 51: 191201.

Da Gama, B. A. P.; Pereira, R. C.; Carvalho A. G. V.; Coutinho, R.; YoneshigueValentin, Y. 2002. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling* 18:1320.

Da Gama, B.A.P.; Erwan Plouguerné,E.; Pereira, R.C. 2014. The Antifouling Defence Mechanisms of Marine Macroalgae. *Advances in Botanical Research* ,V.71, 413–440.

Davison, I. R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of Phycology*, 27(1), 2-8.



Deepa, S., Srikumar, M., & Padmakumar, K. P. 2014. Antifouling potential of selected macroalgae from the gulf of Mannar, India. *International Journal of Bioassays*, 3(11), 3479-3487.

Demmig-Adams, B.; Adams, W.W.; Logan, B.A.; Verhoeven, A.S. 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Aust J Plant Physiol*. 22:249–260.

Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1-24.

Demmig-Adams, B.; Adams III, W. W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in plant science*, 1(1), 21-26.

Éder C, S.; Roberta de P, M.; Alexandra, L.; Marcelo, M.; Paulo A, H.; Zenilda L, B. 2012. Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *American Journal of Plant Sciences*, 2012.

Eggert, A. 2012. Seaweed responses to temperature. In Wiencke, C. & Bischof, K. [Eds.] *Seaweed Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 47–66.

Fallarero, A.; Iokkanen, J.J.; Männistö, P.T.; Castañeda, O.; Vidal, A. (2003). Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*, v.10, n.1 p. 39-47.

Fujii, M. T., Cassano, V., Stein, É. M., & Carvalho, L. R. (2011). Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(2), 268-282.

Fujimoto, K. 1990. Antioxidant activity of algal extracts. In: Akatsukal (ed) Introduction to applied phycology. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 199–208

Ganesan, P.; Kumar, C.S.; Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99: 2717–2723.

García-Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. ; Niell, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant.* 88: 631-637.

Garrabou, J.; Coma, R.; Bensoussan, N.; Bally, M.; Chevaldonné, P.; Cigliano, M.; Cerrano, C. 2009. Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global change biology*, 15(5), 1090-1103.

Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K. 1983. Methods of seawater analyses. Verlag Chemie. *Weinheim, Germany*, 511, 342-355.

Halpern, B.S.; Walbridge, S.; Selkoe, K.A.; Kappel, C.V.; Micheli, F.; D'Agrosa, C.; Bruno, J.F.; Casey, K.S.; Ebert, C.; Fox, H.E.; Fujita, R.; Heinemann, D.; Lenihan, H.S.; Madin, E.M.P.; Perry, M.T.; Selig, E.R.; Spalding, M.; Steneck, R.; Watson, R. 2008. A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319:948–952.

Hanelt D., Figueroa F.L. 2012. Physiological and photomorphogenic effects of light on marine macrophytes In: *Seaweed Biology, Ecological Studies Series* 219. C. Wiencke K. Bischof (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, 3-23.

Hanelt, D.; López-Figueroa, F. 2012. Physiological and Photomorphogenic Effects of Light on Marine Macrophytes. *Em: Seaweed Biology*. Wiencke C.; Bischof, K. eds. *Ecological Studies* 219, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Cap 1: 3-23.

Harley, C. D.; Randall Hughes, A.; Hultgren, K. M.; Miner, B. G., Sorte, C. J.; Thornber, C. S.; Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters*, 9(2), 228-241.

Helmuth, B.; Mieszkowska, N.; Moore, P.; Hawkins, S. J. 2006. Living on the edge of two changing worlds: forecasting the responses of rocky

intertidal ecosystems to climate change. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 37, 373–404.

Hessen, O.D; Anderson R.T. 2008. Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: Physiological, ecological, and evolutionary implications. *Limnol.Oceanogr.* (53)4, 1685-1696.

Huang, H. L., & Wang, B. G. (2004). Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 4993-4997.

Huo, Y.X.; Cho, K.M.; Rivera, J.G.; Monte, E.; Shen, C.R.; Yan, Y.; Liao, J.C. 2011. Conversion of proteins into biofuels by engineering nitrogen flux. *Nat Biotechnol* 29(4):346-51

Hwang, E. S.; Thi, N. 2014. Effects of Extraction and Processing Methods on Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive nutrition and food science*, 19(1), 40.

Juneja, A., Ceballos, R., Murthy, G., Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 2013, 6, 4607–4638.

Karez, R.; Engelbert, S.; Kraufvelin, P.; Pedersen, M. F.; Sommer, U. 2004. Biomass response and changes in composition of ephemeral macroalgal assemblages along an experimental gradient of nutrient enrichment. *Aquatic Botany*, 78(2), 103-117.

Kopsell D.A.; Kopsell D.E.; Curran-Celentano J. 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form, *J. Sci. Food Agric.*, 87, 900-907.

Krause G.H.; Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol* 42: 313–349

Kursar, T.A.; Van der Meer, J.; Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.

Lapointe, B.E.; Duke, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J.*

Lhullier, C.; Falkenberg, M.; Ioannou, E.; Quesada, A.; Papazafiri, P.; Horta, P. A.; Roussis, V. 2009. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *Journal of natural products*, 73(1), 27-32.

Li, S. Y.; Lellouche, J. P.; Shabtai, Y.; Arad, S. 2001. Fixed carbon partitioning in the red microalga *Porphyridium* sp.(Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 37(2), 289-297.

Li,R.; Brawley, S.H. (2004) Improved survival under heat stress in intertidal embryos (*Fucus spp.*) simultaneously exposed to hypersalinity and the effect of parental thermal history. *Mar Biol*, 144:205–213.

Lima, F. P.; Ribeiro, P. A.; Queiroz, N., Hawkins, S. J.; Santos, A. M. (2007). Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern?. *Global Change Biology*, 13(12), 2592-2604.

Lin, Z.H.; Chen, L. S.; Chen, R. B.; Zhang, F. Z., Jiang, H. X., Tang, N. 2009. CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology*.

Liu, B.H.; Lee, Y.K. (2000). Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J Appl Phycol* 12:301–307.

Lobban, C.; Harrison P. 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 366 pp.

Lobban, C.S.; Harrison, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 366 p.

Lopez-Figuero, F.; Niell, F.X. (1990). Effects of light quality on chlorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. *Mar. Biol.*, 104: 321-327.

- Machado, F.L.S.; Kaiser, C.R.; Costa, S.S.; Gestinari, L.M.; Soares, A.R. 2010. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(3): 441-452.
- Marquardt, J.; Hanelt, D. 2004. Carotenoid composition of *Delesseria lancifolia* and other marine red algae from polar and temperate habitats, *European journal of phycology*, 39(3), 285 - 292.
- Martins, C. D.; Lhullier, C.; Ramlov, F., Simonassi, J. C.; Gouvea, L. P.; Noernberg, M.; Horta, P. A. (2014). Seaweed chemical diversity: an additional and efficient tool for coastal evaluation. *Journal of Applied Phycology*, 26(5), 2037-2045.
- Martins, R.C.; Silva, C.L.M. 2002. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*. L.). *International Journal of Refrigeration*, v.25, p.966-974.
- McCready R.M., Guggolz J., Silviera V., Owens H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables: Application to peas. *Anal. Chem.* 22, 1156-1158.
- Nakamura, Y.; Imamura, M. 1985. Regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol* 78: 601-605.
- Necchi, O. 2004. Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycol. Res.* 52:140-148.
- Olita, A.; Sorgente, R.; Natale, S.; Ribotti, A.; Bonanno, A.; Patti, B. 2007. Effects of the 2003 European heatwave on the Central Mediterranean Sea: surface fluxes and the dynamical response. *Ocean Science*, 3(2), 273-289.
- Pagliosa, P.R.; Barbosa, F.A.R. 2006. Assessing the environment benthic fauna coupling in protected and urban areas of southern Brazil. *Biol Conserv* 129:408-417.
- Parjikolaei, B.R.; Kloster, L.; Bruhn, A.; Rasmussen, M.B.; Fretté, X.C.; Christensen, K.V. . (2013). Effect of Light Quality and Nitrogen

Availability on the Biomass Production and Pigment Content of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Chemical engineering* v.32.

Penniman, C.A.; Mathieson, A.C.; Penniman, C.E. 1986. Reproductive Phenology and Growth of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Botanica Marina*, 29: 147–154. *Phycol.* 20: 488-495.

Pereira, R. C.; Teixeira, V. L. 1999. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. *Quim Nova*, 22, 369-374.

Piazzini L.; Gennaro P.; Balata D. 2011. Effects of nutrient enrichment on macroalgal coralligenous assemblages. *Mar. Pollut. Bull.*, 62: 1830-1835.

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

Plouguerne, E.; K. Le Lann, S.; Connan, G.; Jechoux, E.; Deslandes, V.; Pouvreau, S. 2006. Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalgae *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquat. Bot.* 85: 337–344.

Ralph, P.J.; (1999). Photosynthetic response of *Halophila ovalis* (R- Br.) Hook. f. to combined environmental stress. *Aquat Bot* 65: 3–96

Reis, R. P., & Yoneshigue-Valentin, Y. (2000). Phenology of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) in three populations from Rio de Janeiro State, Brazil. *Botanica Marina*, 43(3), 299-304.

Reis, R.P.; Yoneshigue-Valentin, Y. 1998. Variação espaço-temporal de populações de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) na Baía de Sepetiba e Armação de Búzios, R.J., Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 12:465-483.

Ritchie, R.J., 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and total chlorophylls in natural assemblages of

photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46, 115–126.

Rocha, F. D.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A. C.; Teixeira, V. L. 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev Bras Farmacogn*, 17, 631-639.

Rodriguez-Amaya, D.; Kimura, M.; Godoy, H.T.; Amaya-Farfan, J. 2008. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 445– 463.

Rosemberg, G.; Ramus, J. 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva sp.* (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Mar. Bid.*, 66: 251-259.

Sabeena Farvin, K. H.; Jacobsen, C. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food chemistry*, 138(2), 1670-1681.

Scherner F.; Horta P.A.; Oliveira E.C.; Simonassi, J.C.; Hall-Spencer J.; Chow, F.; Nunes, J.M.; Pereira, S.B. 2013. Coastal urbanization leads to remarkable seaweed species loss and community shifts along the SWAtlantic. *Mar Pollut Bull* 76:106–115.

Scherner, F.; Barufi, J. B.; Horta, P. A. Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: Evidence of selection of pollution-tolerant species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, p. 2380-2390, 2012.

Schreiber,U.; Bilger ,W.; Neubauer,C.; 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D.,Caldwell,M.M.(Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, vol.100, Springer,Berlin, pp. 49±70.

Shannon, J. C. 1968. Carbon-14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays*. kernels following  $^{14}\text{CO}_2$  treatment of intact plants. *Plant physiology*, 43(8), 1215-1220.

Southward, A. J.; Langmead, O.; Hardman-Mountford, N. J.; Aiken, J.; Boalch, G.T.; Dando, P.R.; Genner, M.J. 2004. Long-term oceanographic and ecological research in the western English Channel. *Adv. Mar. Biol.* 47:1–105.

Souza, B. W.; Cerqueira, M. A.; Martins, J. T.; Quintas, M. A.; Ferreira, A. C.; Teixeira, J. A.; Vicente, A. A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5589-5594.

Sparnocchia, S.; Schiano, M. E.; Picco, P.; Bozzano, R.; Cappelletti, A. 2006. The anomalous warming of summer 2003 in the surface layer of the Central Ligurian Sea (Western Mediterranean), *Annals Geophysicae*, 24, 443-452.

Staeher, P. A.; Wernberg, T. (2009). Physiological responses of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to a latitudinal gradient in ocean temperature. *Journal of Phycology*, 45(1)

Stee, J.A.; Tong, C.H. 1996. Degradation Kinetics of Green Color and Chlorophylls in Peas by Colorimetry and HPLC. *J. Fd. Sci.* 61: 924-927.

Stein, E. M.; Andreguetti, D. X.; Rocha, C. S.; Fujii, M. T.; Baptista, M. S.; Colepicolo, P.; Indig, G. L. 2011. Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo. *Rev. bras. farmacogn.* 21(2), 239-243.

Steller, D.L.; Hernandez-Ay, J. M.; Cabello-Pasini, A. 2007. Effect of temperature on photosynthesis, growth and calcification rates of the free-living coralline alga *Lythophyllum margariat*. *Cencias Marinas*.

Sterner, R. W.; ELSEER, J.J. 2002. Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the atmosphere, 1st ed. Princeton Univ. Press.

Streit, N. M.; Canterle, L. P.; Canto, M. W. D.; Hecktheuer, L. H. H. 2005. The chlorophylls. *Ciência Rural*, 35(3), 748-755.

Strickland, J.D.H.; Parsons, T.R.; 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of Fishery Research*. Bd., Canada, 310p.



Tait, A.; Ganzerli, S.; Di Bella, M. 1996. Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl) phenols *Tetrahedron*. 52:1287-12596.

Takamiya, K. I.; Tsuchiya, T.; Ohta, H. 2000. Degradation pathway (s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed?. *Trends in plant science*, 5(10), 426-431.

Teichberg, M.; Fox, S. E.; Olsen, Y. S.; Valiela, I.; Martinetto, P.; Iribarne, O.; Muto, E.B.; Petti, M.V.; Corbisier, T.; E' Nezk, J.M.; Paez-Osunak, F., Castro, P.; Freitas,H.; Cardinale, T. T. I., M.; Tagliapietra, D. 2010. Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global change biology*, 16(9), 2624- *Global Change Biology*, 16, 2624–2637

Teichberg, M.; Fox, S.E.; Aguila, C.; Olsen, Y.S.; Valiela, I. 2008 Macroalgal response to experimental nutrient enrichment in shallow coastal waters: growth, internal nutrient pools, and isotopic signatures. *Marine Ecology Progress Series*, 368:117–126.

Tjahjono, A. E.; Hayama, Y.; Kakizono, T.; Terada, Y.; Nishio, N.; Nagai, S. 1994. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters*, 16(2), 133-138.

Tréguer, P., & Le Corre, P. 1975. Manuel D'analyse des Sels Nutritifs Dans l'eau de Mer (Utilisation de L'autoanalyseur II Technicon) Université de Bretagne Occidentale.

Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stauffer, J.E. 1957. *Manometric Techniques*. New York, Burgess, Publishing., 338.

Vairappan, C. S.; Kawamoto, T.; Miwa, H., & Suzuki, M. 2004. Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Planta medica*, 70(11), 1087-1090.

Vo, T. D., Nishihara, G. N., Kitamura, Y., Shimada, S., Kawaguchi, S., & Terada, R. 2014. The effect of irradiance and temperature on the

photosynthesis of *Hydropuntia edulis* and *Hydropuntia eucheumatoides* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Vietnam. *Phycologia*, 54(1), 24-31.

Wang, S.; Zhang, D.; Pan, X. (2012). Effects of arsenic on growth and photosystem II (PSII) activity of *Microcystis aeruginosa* Ecotoxicology and environmental safety, 84, 104-111.

Watanabe, Y., Nishihara, G. N., Tokunaga, S., & Terada, R. (2014). Effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of a cultivated red alga, *Pyropia tenera* (= *Porphyra tenera*), at the southern limit of distribution in Japan. *Phycological Research*, 62(3), 187-196.

Webb, W.L.; Newton, M.; Starr, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia* 17:281-291.

Wernberg, T.; Smale, D. A.; Tuya, F.; Thomsen, M. S.; Langlois, T. J.; Bettignies, T.; Rousseaux, C. S. 2012. An extreme climatic event alters marine ecosystem structure in a global biodiversity hotspot. *Nature Climate Change*, 3(1), 78-82.

Wernberg, T.; Thomsen, M. S.; Tuya, F.; Kendrick, G. A. 2011. Biogenic habitat structure of seaweeds change along a latitudinal gradient in ocean temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 400(1), 264-271.

Wheeler, W.N. & Weidner, M. 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 19: 92-96.

Yokoya, N. S.; Necchi Jr, O.; Martins, A. P.; Gonzalez, S. F.; Plastino, E. M. (2007). Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 19(3), 197-205.

Yu D.Z.; Qin S.; Sun G.Q. 2002. Transient expression of *lacZ* reporter gene in the economic seaweed *Undaria pinnatifida*. *High Scientific Letters* 12: 93-95.

Zou, D. H.; Gao, K. S. 2014. The photosynthetic and respiration responses to temperature and nitrogen supply in the marine green macroalga *Ulva conglobata* (Chlorophyta). *Phycologia* 53: 86-94.

## 6 Discussão Geral e Conclusão

As macroalgas entremarés por vivem na interface dos habitats marinhos e terrestres e por serem submetidas a desafios ambientais colocados por ambos os regimes climáticos aquáticos e atmosféricos (Helmuth et al. 2006), experimentam grandes mudanças temporais na temperatura, radiação solar e disponibilidade de nutrientes e são confrontados com a dessecação freqüente e stresses osmóticos (Li e Brawley, 2004). Em virtude de seu habitat, estas algas são expostas a pressões climáticas e antrópicas, e estão sendo cada vez mais utilizadas como um sistema de alerta para impactos das mudanças climáticas (Harley et al., 2006, Lima et al. 2007). Com a expectativa de vida relativamente curta, as algas podem responder mais rapidamente às mudanças climáticas do que as plantas terrestres (Southward et al. 2004). Dentro deste contexto, é possível inferir, com o presente estudo e outros já realizados, que pode ocorrer o aumento da sensibilidade de macrofitas aquáticas, principalmente de *Laurencia catarinensis* a vários fatores ambientais em águas eutrofizadas (Ralph 1999). Além disso, pode-se evidenciar com os experimentos realizados que determinados níveis de poluentes podem causar alterações bioquímicas na alga, aumentando a síntese da energia para demanda de reparos nos constituintes celulares ocorrendo um decréscimo de energia disponível para a macroalga crescer e manter seu ciclo reprodutivo (Lobban e Harrison 1994). Dessa forma, estes estudos representam importantes subsídios para monitoramento dos efeitos do aquecimento global e estressores locais sobre aspectos como alterações na abundância das espécies, nos padrões de reprodução, mudanças temporais e impacto nos ecossistemas.

## 7 Referencias

Arnaldos, T.L.; R. Munoz, M.A. ; Calderon, A.A. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*, 113: 315-322.

Buckeridge, M. S.; Mortari, L. C. ; Machado, M. R. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema?. IN: Rego, G. M.; Negrelle, R. R. B; Morellato, L. P. C. Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos (Editores Técnicos). - Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007 (prelo)

Connell, S.; Irving, A.D. 2008. Integrating ecology with biogeography using landscape characteristics: *a case study of subtidal habitat across continental Australia*. *Journal of Biogeography*, 35, 1608–1621.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1132.

Kursar, T.A.; Van der Meer, J.; Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.

Liu, J.; Dietz, T., Carpenter, S. R.; Alberti, M.; Folke, C.; Moran, E.; Taylor, W. W. 2007. Complexity of coupled human and natural systems. *science*, 317(5844), 1513-1516.

McCready R.M., Guggolz J., Silveira V., Owens H.S.1950. Determination of starch and amylose in vegetables: Application to peas. *Anal. Chem.* 22, 1156–1158.

PBMC, 2012. Base Científica das Mudanças Climáticas. Contribuição do Grupo de Trabalho 1 para o 1o Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. Volume Especial para a Rio+20. PBMC, Rio de Janeiro, Brasil, 1:34.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277, 494.

Ritchie, R.J., 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46, 115–126.

Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer, C.; 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, vol. 100, Springer, Berlin, pp. 49±70.

Strickland, J.D.H.; Parsons, T.R.; 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of Fishery Research. Bd., Canada*, 310p.

Schiavon, M.; Moro, I.; Pilon-Smits, E. A.; Matozzo, V., Malagoli, M.; Dalla Vecchia, F. 2012. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic toxicology*, 122, 222-231.

Tréguer, P., & Le Corre, P. 1975. *Manuel D'analyse des Sels Nutritifs Dans l'eau de Mer (Utilisation de L'autoanalyseur II Technicon)* Université de Bretagne Occidentale.

Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stauffer, J.E. 1957. *Manometric Techniques*. New York, Burgess, Publishing., 338.

Tait, A.; Ganzerli, S.; Di Bella, M. 1996. Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl) phenols *Tetrahedron*. 52:1287-12596

Wernberg, T., Smale, D. A., & Thomsen, M. S. 2012. A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biology*, 18(5), 1491-1498

