

**DÉBORA TOMAZI PEREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DAS RADIAÇÕES  
ULTRAVIOLETA A E ULTRAVIOLETA B NA ORGANIZAÇÃO  
CELULAR E NA FISIOLOGIA DA MACROALGA VERMELHA  
*Acanthophora spicifera* COLETADA EM DOIS AMBIENTES  
DA ILHA DE SANTA CATARINA (LAGOA DA CONCEIÇÃO E  
PRAIA DE SAMBAQUI)**

**Dissertação de Mestrado  
apresentada como requisito  
parcial à obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e  
do Desenvolvimento, do  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento, da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Zenilda  
Laurita Bouzon**

**Coorientador: Dr. Éder Carlos  
Schmidt**

**Florianópolis,**

**2016**

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

Pereira, Débora Tomazi

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DAS RADIAÇÕES  
ULTRAVIOLETA A E ULTRAVIOLETA B NA ORGANIZAÇÃO CELULAR E  
NA FISILOGIA DA MACROALGA VERMELHA *Acanthophora spicifera*  
COLETADA EM DOIS AMBIENTES DA ILHA DE SANTA CATARINA  
(LAGOA DA CONCEIÇÃO E PRAIA DE SAMBAQUI) / Débora Tomazi  
Pereira ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon ;  
coorientador, Éder Carlos Schmidt. - Florianópolis, SC, 2016.  
111 p.

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

Inclui referências

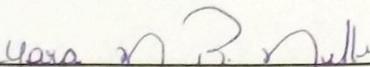
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Macroalga  
vermelha. 3. Radiação Ultravioleta. 4. Nutrientes. 5.  
Microscopia. I. Laurita Bouzon, Zenilda . II. Carlos  
Schmidt, Éder. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.

"Estudo comparativo dos efeitos das Radiações Ultravioleta A e Ultravioleta B na organização celular e na fisiologia da macroalga vermelha *Acanthophora spicifera* coletada em dois ambientes da Ilha de Santa Catarina (Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui)"

Por

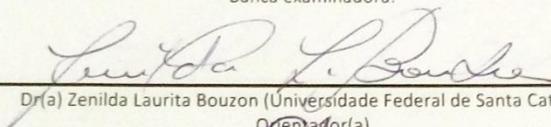
Débora Tomazi Pereira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (06/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

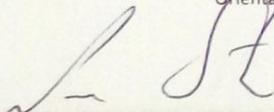


Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Mülle  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

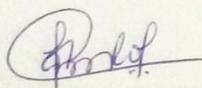
Banca examinadora:



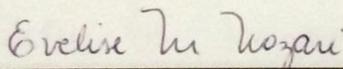
Dr(a) Zenilda Laurita Bouzon (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Neusa Steiner (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Fernanda Ramlov (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 05 de Abril de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Vilson Pereira e Benilde Tomazi Pereira, pelo incentivo, amor, carinho e ensino em todos os momentos da minha graduação e pós-graduação e por tornar possível a minha caminhada pela Universidade Federal de Santa Catarina. À minha irmã, Maria Luiza Tomazi Pereira, por ser um exemplo a seguir e pelo amparo.

À minha orientadora Zenilda Laurita Bouzon e ao meu coorientador Éder Carlos Schmidt, por todos os ensinamentos e por acreditarem na minha capacidade. Tudo que aprendi nesta caminhada pelo LABCEV foi graças a vocês, graças ao esforço, atenção e tempo dedicados a mim. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês!

À toda a equipe do laboratório: Carmen, Elisa, Chirle, Marianne, Luciane, Deonir, João e Felipe.

À Fernanda Ramlov pela colaboração em diversas análises e por ter dedicado tempo a este trabalho.

Aos amigos biólogos: Mariana, Roberta, Claudini, Gabriel, Tomás, Guilherme, Gabriela, Bárbara e Franciele, que mesmo distantes neste período, me incentivaram muito durante a graduação.

Aos amigos da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento por dividir as angústias, alegrias e conhecimentos durante as disciplinas.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento por todo conhecimento passado.

Ao meu namorado, Vitor Oliveira de Souza, pela ajuda nas coletas e limpeza de algas, pela paciência em escutar meus desabafos, pelos incentivos e pelas risadas proporcionadas, tornando tudo mais simples.

Agradeço à UFSC pelo ensino e a CAPES-CNPq pelo apoio financeiro.

*Dedico este trabalho ao meu pai Vilson  
Pereira, minha mãe Benilde Tomazi  
Pereira e aos meus orientadores  
Zenilda e Éder que me apoiaram e  
tornaram tudo possível.*

## RESUMO

A intensidade de radiação ultravioleta (RUV) aumenta a cada ano, afetando os organismos de diversas maneiras. Sabe-se que altos níveis de RUVB podem ser danosos aos organismos, principalmente aqueles sésseis, como as algas, que ficam diretamente expostos à radiação, especialmente em maré baixa. *Acanthophora spicifera* é uma macroalga vermelha de grande importância econômica, produzindo muitos compostos de interesse farmacêutico, além de ser fonte de agarana. O presente estudo avaliou os efeitos biológicos da PAR e da PAR+UVAB na morfologia e fisiologia de *A. spicifera* coletada em dois ambientes da Ilha de Santa Catarina (Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui) com condições abióticas distintas. Para tanto, foram feitos experimentos, com as águas de cada ambiente, por 7 dias de aclimação e 7 dias de exposição à RUV (3 horas por dia), seguidos de análises morfológicas, ultraestruturais e fisiológicas. A água coletada na Lagoa da Conceição possuía concentrações de  $1,06 \pm 0,27$  mM de  $\text{NH}_4^+$  (amônio),  $8,47 \pm 0,01$  mM de  $\text{NO}_3^-$  (nitrato),  $0,17 \pm 0,01$  mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  (fosfato), salinidade de 30 ups e pH 7,88. Para a Praia de Sambaqui, esses valores foram de  $1,13 \pm 0,05$  mM de  $\text{NH}_4^+$ ,  $3,73 \pm 0,01$  mM de  $\text{NO}_3^-$ ,  $0,52 \pm 0,01$  mM de  $\text{PO}_4^{3-}$ , 37 ups e pH 8,55.

Foram avaliadas as alterações morfológicas e fisiológicas através das taxas de crescimento (TC) e das microscopias de luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET); das concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas); da viabilidade celular; da concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água; das alterações nos compostos antioxidantes através do perfil carotenóidico e de micosporinas (MAAs), do conteúdo total de fenólicos e da atividade antioxidante (DPPH); e do conteúdo total de proteínas, açúcares solúveis e amido nos talos de *A. spicifera* dos ambientes e após as exposições à PAR e à RUVAB.

Após 7 dias de exposição à PAR e à PAR+RUVAB a alga da Lagoa da Conceição teve um aumento na TC de  $5,65 \text{ \%} \cdot \text{dia}^{-1}$  e  $4,05 \text{ \%} \cdot \text{dia}^{-1}$ , respectivamente, comparado com  $3,27 \text{ \%} \cdot \text{dia}^{-1}$  e  $0,40 \text{ \%} \cdot \text{dia}^{-1}$  respectivamente para a alga da Praia de Sambaqui. Maiores concentrações de nutrientes dissolvidos na água, como na Lagoa da Conceição, podem beneficiar o crescimento e respostas metabólicas de algas. Após o experimento, observou-se que os talos de ambos os locais tratados com PAR ficaram despigmentados, mas com crescimento de novos ramos. Os talos coletados na Lagoa da Conceição tratados com PAR+RUVAB apresentaram despigmentação, porém sem presença de

novos ramos. Já os talos coletados na Praia de Sambaqui, para o mesmo tratamento, ficaram sem forma definida, com processo de degeneração e despigmentação. Menores disponibilidades de nutrientes dissolvidos na água coletada na Praia de Sambaqui podem explicar essa resposta. Reduções na clorofila *a* e nas ficobiliproteínas foram verificadas para os tratamentos com PAR, devido à baixa intensidade de luz em laboratório, quando comparada com o ambiente. Uma maior queda nos pigmentos foi verificada para os tratamentos com RUV. Algas cultivadas no tratamento PAR+UVAB mostraram um decréscimo de 37,4 % e 49,4 % na viabilidade celular quando comparadas com amostras dos seus ambientes para a Lagoa da Conceição e Praia Sambaqui, respectivamente. Reação metacromática foi observada nas paredes celulares de todas as amostras, porém em menor intensidade nas que foram expostas à RUV, indicando uma menor quantidade de agarana. Após a exposição à RUV, as células corticais diminuíram de tamanho citoplasmático e apresentaram espessamento da parede celular com microfibrilas de celulose desorganizadas. Concentrações de carotenoides reduziram nas algas da PAR e da PAR+UVAB, em relação ao ambiente, sugerindo a expressão de mecanismos de defesa associados a esses compostos. As maiores quantidades totais de carotenoides foram vistas nas amostras da Lagoa da Conceição. Quanto mais nutrientes disponíveis, mais as chances de se formarem carotenoides. Após exposição à PAR+UVAB, o conteúdo total de MAAs diminuiu drasticamente, 61,1 % na amostra da Lagoa da Conceição e de 24 % na da Praia de Sambaqui, quando comparados com os controles. A quantidade de MAAs pode ser influenciada por fatores abióticos, como irradiação e nutrientes. Compostos fenólicos são antioxidantes, protegendo contra exposição direta à RUV. As amostras expostas à RUVAB não apresentaram diferenças de fenólicos entre os tratamentos e os locais. Ação antioxidante da alga exposta à RUV foi medida pelo sequestro do radical livre DPPH. Foi verificada uma maior ação na amostra exposta à PAR da Lagoa da Conceição, e uma menor ação na amostra do ambiente deste mesmo local. Todas as outras amostras não apresentaram diferenças estatísticas. Amostras da Lagoa da Conceição tratadas com RUVAB tiveram um aumento significativo no seu teor de proteínas. Por outro lado, a amostra da Praia de Sambaqui tratada com RUV teve o conteúdo total de proteínas diminuído. O aumento das proteínas na amostra da Lagoa pode estar relacionado com a síntese de enzimas antioxidantes. A concentração de açúcares solúveis totais foi mais elevada na amostra exposta à PAR da Praia de Sambaqui. Os grãos de amido das florídeas diminuíram com exposição à RUV para as

amostras de ambos os locais. Este decréscimo pode estar relacionado com a ativação da via de degradação, em busca de recursos para vias de defesa.

Pode-se concluir que a RUV em *A. spicifera*, coletada nos dois ambientes (Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui), degradou os mecanismos de proteção, causando mudanças metabólicas. Porém, o grau de alterações ocorreu de forma mais prejudicial para as amostras da Praia de Sambaqui, onde o estado inicial da alga era mais desfavorável devido à deficiência de nutrientes na água do mar.

**Palavras-chave:** *Acanthophora spicifera*, radiação ultravioleta, nutrientes, morfologia, fisiologia, microscopia.

## ABSTRACT

The intensity of ultraviolet radiation (UVR) increases every year, affecting organisms in different ways. It is known that high levels of UVBR can be harmful to organisms, especially those sessile such as algae, which are directly exposed to radiation, especially at low tide. *Acanthophora spicifera* is a red macroalgae of great economic importance, producing many compounds of pharmaceutical interest, besides being a source of agarana. This study evaluated the biological effects of PAR and PAR+UVAB in morphology and physiology of *A. spicifera* collected in two areas of the island of Santa Catarina (Conceição Lagoon and Sambaqui Beach) with different abiotic conditions. To this end, experiments were made with the water in each ambient for 7 days of acclimatization and 7 days of exposure to UVR (3 hours per day), followed by morphological, ultrastructural and physiological analyzes. The water of Conceição Lagoon had concentrations of  $1.06 \pm 0.27$  mM  $\text{NH}_4^+$  (ammonium),  $8.47 \pm 0.01$  mM  $\text{NO}_3^-$  (nitrate),  $0.17 \pm 0.01$  mM  $\text{PO}_4^{3-}$  (phosphate), salinity 30 sup and pH 7.88. For Sambaqui Beach, these values were  $1.13 \pm 0.05$  mM  $\text{NH}_4^+$ ,  $3.73 \pm 0.01$  mM  $\text{NO}_3^-$ ,  $0.52 \pm 0.01$  mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 37 sup and pH 8.55.

Morphological changes were evaluated by growth rates (GR), light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM); the concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and phycobiliproteins); cell viability; the concentration of dissolved oxygen (DO) in the water; changes in antioxidant compounds through carotenoidic profile and micosporines (MAAs), the total phenolic content and antioxidant activity (DPPH); and the total content of proteins, soluble sugars and starch in stems of *A. spicifera* ambients and after exposure to PAR and UVABR.

After 7 days of exposure to PAR and PAR+UVABR Conceição Lagoon seaweed had an increase in GR of  $1.565 \text{ \%} \cdot \text{day}^{-1}$  and  $4.05 \text{ \%} \cdot \text{day}^{-1}$  respectively, compared to  $3.27 \text{ \%} \cdot \text{day}^{-1}$  and  $0.40 \text{ \%} \cdot \text{day}^{-1}$  respectively for seaweed of Sambaqui Beach. Higher concentration of dissolved nutrients in the water as the Conceição Lagoon, can benefit the growth and metabolic responses of algae. After the experiment, it was observed that the stems of both sites treated with PAR were depigmented, but growth of new branches. The Conceição Lagoon of stalks treated with PAR+UVABR showed depigmentation, but without the presence of new branches. Already the stalks of Sambaqui Beach, for the same treatment, were shapeless, with necrosis process and depigmentation. Reduced availability of nutrients dissolved in water of

Sambaqui Beach can explain this response. Reductions in chlorophyll *a* and the phycobiliproteins were observed for the treatments with PAR due to low light intensity in the laboratory when compared with the ambient. A greater drop in pigment was observed for the treatment with UVR. Algae grown in the PAR+UVAB treatment showed a decrease of 37.4 % and 49.4 % in cell viability when compared with samples of their ambients to Conceição Lagoon and Sambaqui Beach, respectively. Metachromatic reaction was observed in the cell wall of all samples, but to a lesser degree on who were exposed to UVR, indicating a lower quantity of agarana. After exposure to UVR, the cortical cells had decreased in size and showed thickness of the cell wall cellulose microfibrils with disorganized. Concentrations of carotenoids in algae reduced in PAR and PAR+UVAB and in relation to the ambient, suggesting the expression of defense mechanisms associated with these compounds. The highest total amounts of carotenoids were seen in samples from the lagoon. The more nutrients available, the more the chances of forming carotenoid. After exposure to PAR and PAR+RUVAB, the total content of MAAs decreased dramatically, 61.1 % in Conceição Lagoon sample and 24 % in the Sambaqui Beach, compared with the ambient. The amount of MAAs can be influenced by abiotic factors, such as irradiation and nutrients. Phenolic compounds are antioxidants, protecting against direct exposure to UVR. The samples exposed to UVABR showed no differences between treatments of phenolic and local. Seaweed antioxidant exposed to UVR was measured by the kidnapping of free radical DPPH. A greater share in the sample exposed to PAR Conceição Lagoon, and a minor action in ambient sample of this same site was verified. All other samples did not show statistical differences. Conceição Lagoon samples treated with UVABR had a significant increase in their protein content. On the other hand, the Sambaqui Beach sample treated with UVR was fully reduced protein content. The increase in protein in the sample of the pond may be related to the synthesis of antioxidant enzymes. The high concentration of soluble sugars in the sample exposed to the PAR Sambaqui Beach is related to the high GR. The floridea of starch grains decreased with exposure to UVR for samples from both locations. This decrease can be related to the activation of the degradation in search of resources for defense pathways. It can be concluded that UVR in *A. spicifera*, collected in both ambients (Lagoa da Conceição and Sambaqui Beach), degraded the protection mechanisms, causing metabolic changes. However, the degree of change was more harmful

form for samples of Sambaqui Beach, where the initial state of the alga was more unfavorable due to nutrient deficiency in seawater.

**Keywords:** *Acanthophora spicifera*, ultraviolet radiation, nutrients, morphology, physiology, microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1.** Desenho esquemático representando os diferentes tipos de RUV e suas interações com a camada de ozônio.

Fonte: [www.beladomus.blogspot.com.br/](http://www.beladomus.blogspot.com.br/) acessado em 26/05/2015.....2

**Figura 2.** Macroalga *Acanthophora spicifera* coletada na Lagoa da Conceição com coloração vermelho-amarronzada, típica da espécie. Talo ereto ramificado alternada e abundantemente e revestido por numerosos ramos curtos papilosos, os quais possuem 4 a 5 pontas curtas espinescentes (seta).....7

**Figura 3.** Localização dos pontos de coleta: Praia de Sambaqui (costão rochoso) e Lagoa da Conceição (rochas submersas), Florianópolis-SC. ....10

**Figura 4.** Desenho experimental, onde 8 frascos com águas e algas da Lagoa da Conceição e 8 com águas e algas da Praia de Sambaqui foram expostos à PAR, e 8 frascos com águas e algas da Lagoa da Conceição e 8 com águas e algas da Praia de Sambaqui foram expostos à PAR+RUVAB.....13

### Capítulo II

**Figura 1.** Taxas de crescimento expressas em %/dia-1 dos talos expostos à PAR e à PAR+RUVAB de *A. spicifera* coletados na Lagoa da Conceição e na Praia de Sambaqui cultivados por 7 dias. Valores apresentados com média ( $n = 8$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....35

**Figura 2.** Morfologia dos talos da macroalga vermelha *A. spicifera* coletados na Lagoa da Conceição e na Praia de Sambaqui e algas cultivadas com radiação em laboratório. **(a)** Alga proveniente da Lagoa da Conceição com sua coloração vermelho-amarronzada, típica da espécie. **(d)** Alga da Praia de Sambaqui com coloração marrom-esverdeada. **(b)** **(e)** Note que as algas expostas à PAR apresentaram despigmentação e crescimento de novos ramos (setas). **(c)** Alga da

Lagoa da Conceição exposta à RUV com despigmentação e ausência de crescimento. **(f)** Alga proveniente da Praia de Sambaqui tratada com PAR+UVAB apresentou degeneração nas ramificações (setas) e perda de biomassa. .... 37

**Figura 3.** Viabilidade celular (%), por ensaio de MTT, de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui das amostras ambientais e tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 4$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 39

**Figura 4.** Microscopia de luz de secções transversais de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui de algas do campo (a, d), algas expostas à PAR (b, e) e algas expostas à PAR+UVAB (c, f) coradas com AT-O. (a-f) Note que a região cortical é formada por 1 a 2 camadas de células corticais (CC) e que houve reação metacromática na parede celular (PC) de células corticais (CC) e de células subcorticais (CS). **(a) (d)** Amostras ambientais com região cortical com células corticais (CC) pequenas e parede celular (PC) espessa. **(b) (e)** Amostras expostas à PAR apresentaram um menor espessamento de parede celular (PC). **(c) (f)** Perceba que células corticais (CC) e células subcorticais (CS) de amostras expostas à PAR+UVAB apresentaram redução no volume celular e aumento da espessura da parede celular (PC), observe o citoplasma mais denso de células corticais (CC) e células subcorticais (CS) e com granações metacromáticas (asteriscos). Note uma intensidade menor na coloração metacromática na parede celular (PC). ..... 42

**Figura 5.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de amostras dos ambientes e tratadas com PAR de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição **(a, c, f)** e da Praia de Sambaqui **(b, d, e)**. **(a)** Visão geral de uma célula cortical (CC) preenchida com organelas celulares, como cloroplastos (C) e mitocôndrias (M), envolvidas por uma parede celular (PC). **(b)** Detalhe de célula cortical (CC) com muitos cloroplastos (C) perinucleares com plastoglóbulos (P), núcleo (N) e pequenas mitocôndrias (M). **(c)** Detalhe das microfibrilas de celulose (setas) organizadas na parede celular (PC). **(d)** Cloroplastos (C) com tilacóides paralelos, e com plastoglóbulos (P). **(e)** Cloroplastos (C) e grãos de amido (A). **(f)** O núcleo interfásico (N) com nucléolo (Nu) evidente. .... 44

- Figura 6.** Imagens de MET de amostras de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição **(b, d, e, g)** e Praia de Sambaqui **(a, c, f, h, i)** tratadas com PAR+UVAB. **(a)** Note as células corticais (CC) mostrando parede celular (PC) com espessamento. **(b) (c)** Parede celular (PC) espessa causando deformação e redução do tamanho celular. **(c)** Note a presença de grandes grãos de amido (A) e cloroplastos (C). **(d) (e) (f)** Microfibrilas de celulose desorganizadas e onduladas da parede celular (PC) das células corticais (CC) (setas). **(g) (h)** Cloroplastos (C) com morfologia irregular e tilacóides rompidos (setas). **(i)** Células corticais com aumento de grãos de amido (A).....45
- Figura 7.** Oxigênio dissolvido na água (OD) em  $\text{mg.L}^{-1}$  de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição das amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 8$ ; média  $\pm$  DP). Letras iguais não indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .....46
- Figura 8.** Oxigênio dissolvido na água (OD) em  $\text{mg.L}^{-1}$  de *A. spicifera* da Praia de Sambaqui das amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 8$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). .....47

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

- Tabela 1.** Conteúdo de pigmentos fotossintetizantes ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa fresca), clorofila *a* (Cl. *a*) e ficobiliproteínas (AFC: aloficocianina, FC: ficocianina, FE: ficoeritrina), de *A. spicifera* proveniente da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui. Amostras do ambiente e amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 6$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 38
- Tabela 2.** Medidas de altura, largura e espessamento de parede celular de células corticais ( $n = 50$ ) e subcorticais ( $n = 50$ ) realizadas através de microscopia de luz e expressas em  $\mu\text{m}$ . 40
- Tabela 3.** Análise estatística em ANOVA-Bifatorial, onde são mostrados o grau de liberdade (GL), índice estatístico (F) e probabilidade (*p*)..... 48

### Capítulo III

- Tabela 1.** Conteúdo de carotenoides ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa seca) (luteína, zeaxantina, Tr (tempo de retenção) 5.5 minutos,  $\alpha$ -caroteno e carotenoides totais (soma de todos os carotenóides identificados)) de *A. spicifera* de amostras ambientais e amostras tratadas da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui após 7 dias com exposição à PAR e à PAR+UVAB ( $n = 3$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Asteriscos (\*): presença não verificada..... 71
- Tabela 2.** Conteúdos de MAAs: asterina, palitina, palitinol, *Porphyra*-334, shinorina e MAAs total (soma de todos identificados MAAs) em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa seca de *A. spicifera* das amostras ambientais da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias de exposição à PAR e PAR+UVAB ( $n = 3$ ; média  $\pm$  DP). Letras iguais não indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Asterisco (\*): composto não definido..... 73

- Tabela 3.** Conteúdo fenólico total ( $\text{mg.g}^{-1}$  de massa seca) e inibição do radical livre DPPH (%) de *A. spicifera* de amostras ambientais da Lagoa da Conceição e Praia Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias à exposição à PAR e PAR+UVAB ( $n = 3$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 74
- Tabela 4.** Conteúdos totais de proteína, açúcares solúveis e amido ( $\text{mg.g}^{-1}$  de massa seca) de *A. spicifera* de amostras ambientais da Lagoa da Conceição e da Praia Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias com exposição à PAR e PAR+UVAB ( $n = 3$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 76
- Tabela 5.** Análise estatística em ANOVA-Bifatorial, onde são mostrados o grau de liberdade (GL), índice estatístico (F) e probabilidade ( $p$ ).. ..... 77

## LISTA DE ABREVIATURAS

A- amido das florídeas  
AFC- aloficocianina  
AT-O- azul de toluidina  
C- cloroplasto  
CC- célula cortical  
CCA- Centro de Ciências Agrárias  
CCB- Centro de Ciências Biológicas  
Cl *a*- clorofila *a*  
CS- célula subcortical  
DNA- ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*  
DP- desvio padrão  
DPPH- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil  
DTT- ditioneitol  
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*  
EROs- espécies reativas de oxigênio  
FC- ficocianina  
FE- ficoeritrina  
g- grama  
INPE- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais  
h- hora  
LABCEV- Laboratório de Biologia Celular Vegetal  
LMBV- Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal  
m- metro  
M- molar  
M- mitocôndria  
mM- milimolar  
mg- miligrama  
mm- milímetro  
MAAs- aminoácidos tipo micosporina  
MCW- metanol:clorofórmio:água  
MET- microscopia eletrônica de transmissão  
min- minutos  
mL- mililitro  
ML- microscopia de luz  
MS- massa seca  
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio de brometo

N- Normal  
N- núcleo  
nm- nanômetro  
Nu- nucléolo  
OD- oxigênio dissolvido  
P- plastoglóbulos  
PC- parede celular  
PAR- radiação fotossinteticamente ativa  
PMSF- do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*  
PVP- polivinilpirrolidona  
RI- radiação infravermelha  
RUV- radiação ultravioleta  
RUVA- radiação ultravioleta-A  
RUVB- radiação ultravioleta-B  
RUVC- radiação ultravioleta-C  
seg- segundos  
TC- taxa de crescimento  
Tr- tempo de retenção  
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro  
 $\mu\text{L}$ - microlitro  
ups - unidade padrão de salinidade  
UVA- ultravioleta-A  
UVB- ultravioleta-B  
UVC- ultravioleta-C

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Camada de ozônio e radiação ultravioleta .....	1
1.2 Relevância das macroalgas e efeitos da radiação ultravioleta ..	4
1.3 A Classe Rhodophyceae .....	5
1.4 <i>Acanthophora spicifera</i> .....	6
2. OBJETIVOS .....	8
2.1 Objetivo Geral .....	8
2.2 Objetivos Específicos .....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	9
3.1 Pontos de Coleta .....	9
3.2 Coleta e Processamento do Material Biológico.....	11
3.3 Condições de Cultivo.....	12
3.4 Determinação de Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos (nitrogênio amoniacal, nitrato e fosfato).....	13
3.4.1 Nitrogênio Amoniacal .....	13
3.4.2 Nitrato.....	14
3.4.3 Fosfato .....	14
4. REFERÊNCIAS .....	16

### CAPÍTULO II

RESUMO.....	26
ABSTRACT .....	28
1. INTRODUÇÃO .....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31

2.1 Pontos de Coleta; Coleta e Processamento do Material Biológico; Condições de Cultivo .....	31
2.2 Taxa de Crescimento.....	31
2.3 Extração e Dosagem de Clorofila <i>a</i> e Ficobiliproteínas.....	31
2.3.1 Clorofila.....	31
2.3.2 Ficobiliproteínas .....	31
2.4 Viabilidade Celular (MTT) .....	32
2.5 Microscopia de Luz (ML).....	32
2.5.1 Citoquímica.....	33
2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	33
2.7 Oxigênio Dissolvido (OD).....	34
2.8 Análise dos Dados.....	34
3. RESULTADOS.....	35
3.1 Taxas de Crescimento (TCs) e Morfologia dos Talos.....	35
3.2 Pigmentos Fotossintetizantes .....	38
3.3 Viabilidade Celular (MTT) .....	38
3.4 Descrição Micromorfológica .....	39
3.5 Microscopia de Luz (ML).....	41
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	43
3.7 Oxigênio Dissolvido (OD).....	46
3.8 Análises Estatísticas.....	48
4. DISCUSSÃO .....	49
5. REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO III	
1. INTRODUÇÃO .....	63
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	66

2.1 Pontos de Coleta; Coleta e Processamento do Material Biológico; Condições de Cultivo .....	66
2.2 Extração e Quantificação de Carotenoides .....	66
2.3 Extração e Quantificação de Aminoácidos Tipo Micosporinas (MAAs).....	66
2.4 Extração e Dosagem de Fenólicos Totais .....	67
2.5 Inibição do Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) .....	68
2.6 Extração e Dosagem de Proteínas Solúveis Totais .....	68
2.7 Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais .....	68
2.8 Extração e Dosagem de Amido .....	69
2.9 Análise dos Dados .....	69
3. RESULTADOS .....	70
3.1 Perfil Carotenóidico.....	70
3.2 Aminoácidos Tipo micosporina (MAAs) .....	72
3.3 Compostos Fenólicos e Inibição do Radical Livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) .....	74
3.4 Proteínas, Açúcares Solúveis e Amido .....	75
3.5 Análises Estatísticas.....	77
4. DISCUSSÃO .....	79
5. REFERÊNCIAS .....	83
CAPÍTULO IV	
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91

## **CAPÍTULO I**

### **RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E ALGAS**

#### **1. INTRODUÇÃO GERAL**

##### **1.1 Camada de ozônio e radiação ultravioleta**

A camada de ozônio ( $O_3$ ) é a única proteção natural da Terra contra a radiação ultravioleta (RUV) (Caseti & Macedo, 1990; Madronich, 1992). O  $O_3$  é formado pela junção de uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) com um átomo de oxigênio (O). Na estratosfera, camada atmosférica, o  $O_3$  forma-se e dissocia-se constantemente, mas é na ozonfera, camada atmosférica onde o  $O_3$  encontra-se, que a atenuação de parte da RUV ocorre (Caseti & Macedo, 1990; Okuno et al., 1996). Os fotobiologistas ambientais, juntamente com a Comissão Internacional de Iluminação, classificam a RUV em três grupos: UVA (400-320 nm), UVB (320-280 nm) e UVC (280-100 nm) (Okuno et al., 1996). A radiação UVA (RUVA) é fracamente atenuada pelo  $O_3$ ; a radiação UVB (RUVB) é atenuada de maneira eficiente, mas não completamente pelo  $O_3$ ; e a radiação UVC (RUV) é completamente atenuada pelo  $O_3$  (Beisert & Granstein, 1996; De Laat et al., 1996; Scharffetter-Kochanek et al., 1997) (Fig. 1).



**Figura 1.** Desenho esquemático representando os diferentes tipos de RUV e suas interações com a camada de ozônio. Fonte: [www.beladomus.blogspot.com.br/](http://www.beladomus.blogspot.com.br/) acessado em 26/05/2015.

Dos espectros de RUV que atingem a superfície Terrestre, a RUVB é a mais prejudicial aos organismos terrestres (Falkowski & Raven, 1997; Tsai et al., 2009; Godin-Beekmann, 2010) e a que mais provoca efeitos negativos, diretos e indiretos, sobre as plantas (Silva et al., 2012; De Almeida et al., 2013). A RUVB pode causar alterações tanto nos processos fisiológicos e bioquímicos, quanto na morfologia, incluindo danos ao DNA, proteínas e membranas; alterações na respiração, transpiração, reprodução, nos pigmentos relacionados à fotossíntese e à proteção contra a RUVB; e mudanças na anatomia e no crescimento vegetal (Poppe et al., 2003; Roleda et al., 2010; Randi et al., 2014). Por outro lado, a RUA é benéfica aos vegetais, impulsionando a produção da proteína RuBisCo, estimulando a fotossíntese (Bischof et al., 2002) e o crescimento (Henry & Alstyne, 2004). Até o início da década de 70, não se imaginava que a atividade humana poderia levar à destruição do  $O_3$  (Molina & Rowland, 1974; Stolarski & Cicerone, 1974). Pesquisas nesta área despontaram, até que, em 1973, dois cientistas californianos, Frank Sherwood Rowland e Mario Molina, verificaram os efeitos dos clorofluorcarbonetos (CFCs) e bromofluorcarbonos (BrFCs), classes de gases que podem ficar na sua forma estável por anos na atmosfera, e chegar à estratosfera (Molina & Rowland, 1974). Na estratosfera, esses gases podem ser dissociados por energia proveniente da RUV e liberar o elemento cloro, flúor e bromo,

os quais se se ligam ao O e O<sub>2</sub>, dissociando a molécula de O<sub>3</sub> estratosférico (Molina & Molina, 1987; Crutzen, 1974; Stolarski & Cicerone, 1974). Reduzindo 1 % da camada de O<sub>3</sub>, aumentam-se de 1,3 % a 1,8 % os níveis de RUVB que atingem a superfície do planeta (Hollósy, 2001).

De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), a região fitogeográfica Temperada Quente, a qual compreende o Estado de Santa Catarina, recebe RUVB de 2,2 a 3,5 W.m<sup>-2</sup>, com base em irradiâncias diárias de um verão típico. Estes valores variam de 9 a 14 na escala de índice de RUVB (IUV), a qual vai de 0 a 16.

A RUVB, em altas intensidades e doses, causa grande impacto na superfície terrestre, sendo um fator de estresse com potencial negativo sobre os organismos aquáticos. Mesmo sem a destruição da camada de O<sub>3</sub>, a RUVB é considerada um agente estressor significativo para macroalgas. Por outro lado, mudanças climáticas e ações antrópicas, além de afetarem a camada de O<sub>3</sub>, e conseqüentemente os níveis de RUV, podem também alterar fatores abióticos de ambientes aquáticos, como salinidade e concentração de nutrientes na água, sendo mais estressores para os organismos desses ambientes (Cunha, 2001; Faveri et al., 2015). Algumas espécies de algas possuem a habilidade de tolerar variações desses fatores. Alterações na salinidade podem ser dribladas utilizando rotas bioquímicas que facilitam a retenção ou absorção da água, mantendo as funções celulares e a homeostase iônica. As quantidades de nutrientes solúveis na água podem afetar o crescimento, a concentração de clorofila e carotenoides nas algas (Ramlov et al., 2011). Essas mudanças estão relacionadas com as diferentes capacidades ecofisiológicas do grupo em questão para sobreviver em ambientes urbanizados (Faveri et al., 2015).

Ações conjuntas da RUV com diferentes fatores abióticos da água podem influenciar na ação desses agentes estressores ambientais sobre as macroalgas, como visto em Zheng & Gao, (2009), Barufi et al., (2011) e Polo et al., (2015). Tanto a RUV, como alterações na qualidade da água podem impactar as macroalgas, levando à alterações morfológicas, celulares e bioquímicas. Porém, existem poucas informações, para algas, sobre esta ação simultânea.

## 1.2 Relevância das macroalgas e efeitos da radiação ultravioleta

As algas formam um grupo polifilético muito diverso, formado pelas classes de macroalgas pardas (classe Phaeophyceae), verdes (classe Ulvophyceae) e vermelhas (classe Rhodophyceae). Esses organismos são eucariontes; unicelulares ou pluricelulares, em forma de agregados, filamentos ou talos (van den Hoek. et al., 1989); fotossintetizantes; e não vasculares (South & Whittick, 2009), apresentando um talo muito simples desprovido de raiz, caule e folhas (van den Hoek et al., 1995; South & Whittick, 2009). As algas estão amplamente distribuídas, ocorrendo em todos os tipos de ambientes aquáticos e em praticamente todas as condições ambientais, sendo encontradas desde os solos mais férteis até os mais inóspitos (Lee, 1989).

As macroalgas são os principais produtores primários dos ecossistemas aquáticos (Sugget et al., 2010; Lima et al., 2013), fornecendo alimento e abrigo para uma variedade de espécies (Sugget et al., 2010). Alterações na produtividade ou diversidade de macroalgas são conhecidas por afetar gravemente a estrutura das cadeias alimentares marinhas costeiras (Zacher et al., 2009).

Produtores primários marinhos são afetados pela RUV a partir do nível de moléculas até comunidades. Altas doses de RUV podem causar alterações nas macroalgas, tais como: na taxa de crescimento (Navarro et al., 2010; Zhao & Li, 2014; Pereira et al., 2014; Simioni et al., 2014), no desempenho fotossintético (Aguilera et al., 1999; Polo et al., 2014), no teor de pigmentos (Roleda et al., 2004; Navarro et al., 2010; Schmidt et al., 2010; Borderie et al., 2011; De Almeida et al., 2013; Polo et al., 2014), na organização ultraestrutural (Poppe et al., 2003; Holzinger & Lütz, 2006; Schmidt et al., 2009), e lesões no DNA (Mitchell et al., 1992; Bischof et al., 2002; Heo et al., 2010). Todos estes danos podem levar a um comprometimento na produtividade marinha, causando mudanças negativas na estrutura destas comunidades.

Algas pardas são mais resistentes quando expostas à RUV. Henry & Alstynne (2004) realizaram estudos verificando o efeito de níveis ambientais de RUVA e RUVB no crescimento e na produção de florotaninos em embriões e estágios jovens da alga parda *Fucus gardeneri* (P. C. Silva). Após um período de três semanas, o tratamento com RUVB inibiu o crescimento, enquanto que o tratamento com RUVA ajudou no aumento dos embriões. A alga parda *Sargassum cymosum* (C. Agardh) tratada com RUVA mostrou resultados benéficos,

principalmente para a concentração de clorofila *a*, fenólicos, carotenoides e na ação antioxidante (Polo et al., 2014).

Macroalgas verdes e vermelhas são mais sensíveis à exposição à RUV. *Ulva* sp. exposta à RUVB sofre uma perda de pigmentos, proteínas e danos no DNA (Bischof et al., 2002). Por outro lado, a exposição à RUVA estimula a produção da enzima RuBisCo, impulsionando a fotossíntese (Bischof et al., 2002). *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) também apresenta respostas positivas com RUVA quando comparado com RUVB (Gómez et al., 1998).

Diversos estudos com RUVB e algas vermelhas já foram realizados, destacando-se os trabalhos com as espécies *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent (Navarro et al., 2010), *Porphyra acanthophora* (E. C. Oliveira & Coll) (Bouzon et al., 2012), *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux (Schmidt et al., 2012a), *Gelidium floridanum* (W. R. Taylor) (Schmidt et al., 2012b), *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützing (Schmidt et al., 2012c), *Laurencia catarinensis* (Cordeiro-Marino & Fujii) e *Palisada flagelifera* (J. Agardh) K. W. Nam (Pereira et al., 2014), *Grateloupia filicina* (J. V. Lamouroux) C. Agardh (Zhao & Li, 2014) e *Gracilaria lemaneiformis* (Bory) Greville (Zhu et al., 2015), onde as algas apresentaram diminuição na taxa de crescimento, alterações no conteúdo de pigmentos, aumento na espessura da parede celular, alterações na organização plastidial e alterações nas enzimas antioxidantes.

### 1.3 A Classe Rhodophyceae

Dentre as três grandes classes de macroalgas, a classe das macroalgas vermelhas é a que possui maior diversidade no litoral brasileiro, seguida das verdes e das pardas, respectivamente (Bicudo & Menezes, 2010). Isto se deve ao fato da classe Rhodophyceae ser a com maior número de espécies, entre 4.000 a 6.000 (Lee, 2008; Franceschini et al., 2010), sendo que a grande maioria é marinha (Franceschini et al., 2010).

A classe Rhodophyceae é caracterizada por possuir a clorofila *a* como pigmento principal, e ficobiliproteínas como pigmentos acessórios (Franceschini et al., 2010; Sugget et al., 2010). São estes pigmentos acessórios que mascaram o verde da clorofila e conferem cor à alga, podendo ser avermelhada, amarronzada ou azulada (van den Hoek et al., 1989). As algas vermelhas possuem cloroplastos com tilacóides paralelos, e “amido das florídeas” como produto de reserva

extraplástidial (De Reviere, 2006; Franceschini et al., 2010). Além disso, possuem ausência completa de flagelos em todos os seus representantes e fases do ciclo de vida (De Reviere, 2006; Franceschini et al., 2010).

Do ponto de vista econômico, as algas vermelhas são as mais exploradas, pois biossintetizam polissacarídeos sulfatados, as carragenanas e as agaranas (De Reviere, 2006; Franceschini et al., 2010). Esses polissacarídeos apresentam várias atividades biológicas com potenciais benefícios à saúde, como: atividade anticoagulante, antitrombótica, antiviral, antitumoral, imunomodulatória e antioxidante, além de aplicações bastantes diversificadas na área de alimentos, farmacêutica e biotecnológica (Vasconcelos et al., 2015). Desta forma, estas algas despertam interesse mundial devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter & Rudolph, 1997).

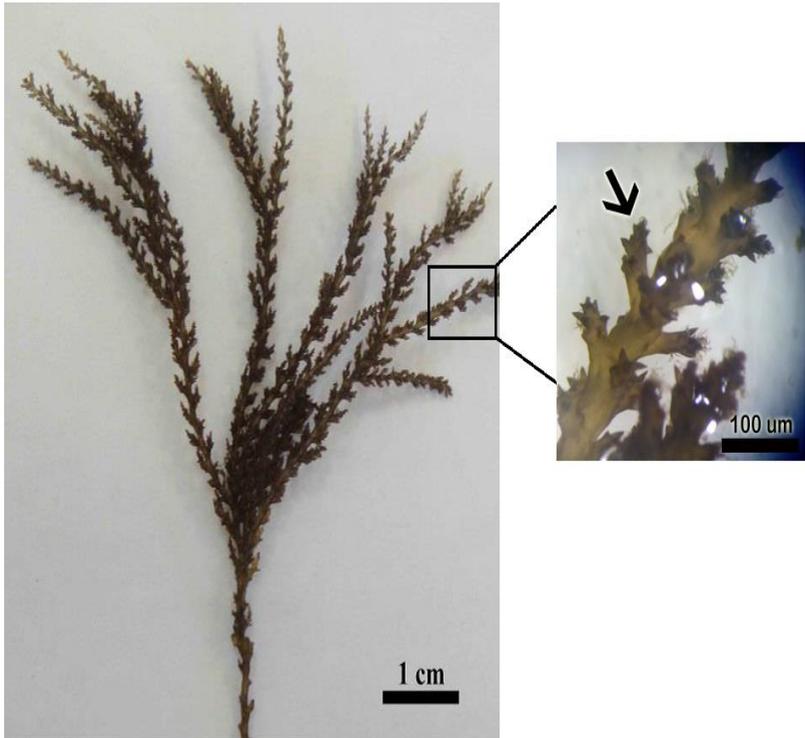
#### **1.4 *Acanthophora spicifera***

*Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Børgesen (Fig. 2) é uma macroalga vermelha pertencente à classe Rhodophyceae, ordem Ceramiales e família Rhodomelaceae. Esta alga é nativa do Caribe e da Flórida (Horn, 2012) e é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o litoral do Estado do Maranhão até o do Rio Grande do Sul (AlgaBase- [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). Cresce em zona de marés, fixadas em substratos duros como rochas, bordas basálticas, ou ainda flutuando (Wang et al., 1998; Fialho, 2013).

Essa espécie apresenta uma cor vermelho-amarronzada ou esverdeada, cresce em tufo de 8 a 10 cm e possui ramos eretos ramificados alternada e abundantemente (Cordeiro-Marino, 1978). Esses ramos são revestidos por numerosos ramos curtos papilosos, os quais possuem 4 a 5 pontas curtas espinescentes. O talo é polissifônico, com 5 células pericentraes revestidas por uma casca parenquimatosa (Cordeiro-Marino, 1978).

Vários compostos de interesse foram identificados em *A. spicifera*, entre eles: esteroides com ação antitumoral (Dayong et al., 2011); flavonoides com ação antimicrobiana (Seenivasan et al., 2012), antitumoral (Lavakumar et al., 2012), pró-coagulante e antioxidante (Zeng et al., 2001); e compostos fenólicos com ação antiproliferação celular (Murugan et al., 2014) e antioxidante (Ganesan et al., 2008). Esta espécie também é utilizada como biofiltro (Fialho, 2013), na dieta humana (Lang, 2006; Zakaria et al., 2011; Horn, 2012), além de ser uma importante fonte de alimento para peixes, ouriços, caranguejos e

tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) (Lang, 2006). *Acanthophora spicifera* também é produtora de agarana (Duarte et al., 2004), um polissacarídeo sulfatado de grande interesse econômico.



**Figura 2.** Macroalga *Acanthophora spicifera* coletada na Lagoa da Conceição com coloração vermelho-amarronzada, típica da espécie. Talo ereto ramificado alternada e abundantemente e revestido por numerosos ramos curtos papilosos, os quais possuem 4 a 5 pontas curtas espinescentes (seta).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

➤ Analisar comparativamente os possíveis efeitos biológicos da radiação ultravioleta-A e ultravioleta-B (RUVAB) na morfologia e na fisiologia da macroalga vermelha *A. spicifera* coletada na Lagoa da Conceição e na Praia de Sambaqui.

### 2.2 Objetivos Específicos

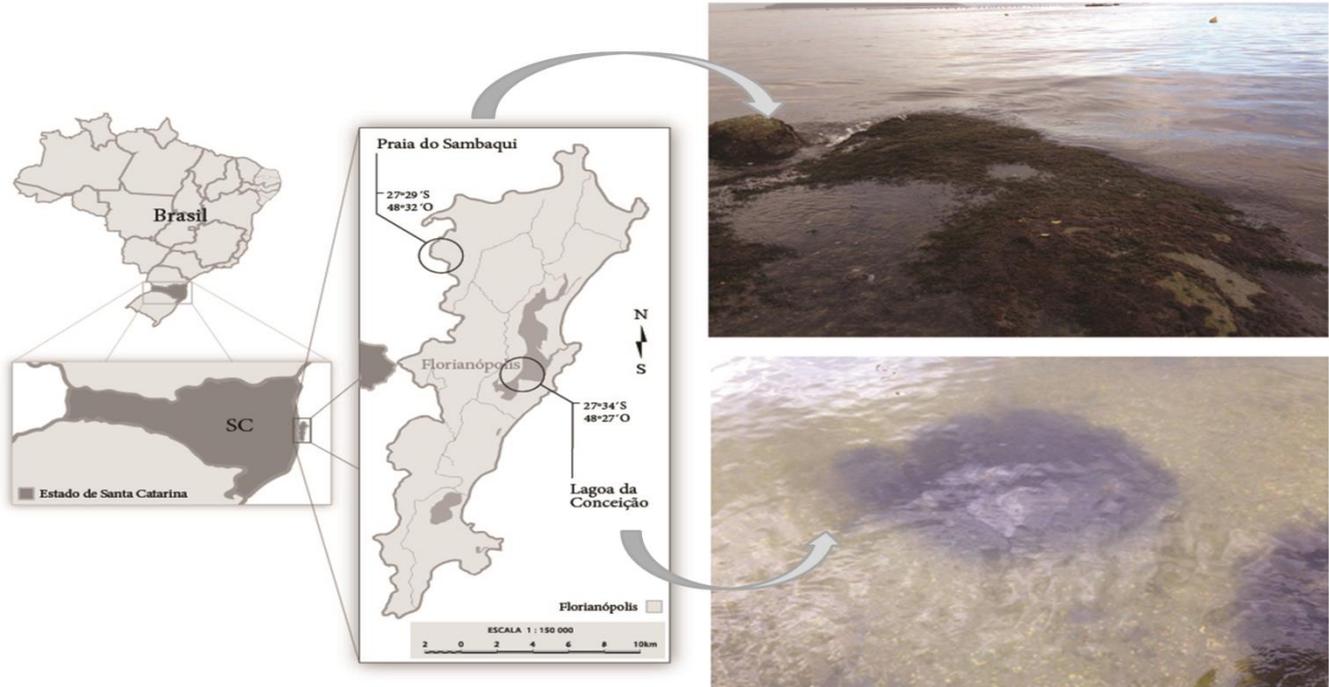
- Analisar as alterações morfológicas nos talos de *A. spicifera* dos ambientes e após as exposições à PAR e à RUVAB, através das taxas de crescimento e das microscopias de luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET);
- Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) dos ambientes e após as exposições à PAR e à RUVAB;
- Verificar a viabilidade celular através da técnica de MTT nos diferentes ambientes e após os tratamentos;
- Analisar diariamente a concentração de oxigênio dissolvido na água após as exposições à PAR e à RUVAB;
- Analisar as alterações nos compostos antioxidantes através do perfil carotenóidico e de micosporinas; do conteúdo total de fenólicos e da atividade antioxidante (DPPH) nos talos de *A. spicifera* dos ambientes e após as exposições à PAR e à RUVAB;
- Quantificar o conteúdo total de proteínas, açúcares solúveis e amido nos talos de *A. spicifera* dos ambientes e após as exposições à PAR e à RUVAB;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

#### 3.1 Pontos de Coleta (Fig. 3)

A Lagoa da Conceição localiza-se no centro-leste da Ilha de Santa Catarina, entre 27°34'S e 48°27'O. Está disposta paralelamente à linha da costa, separada do oceano por uma barreira arenosa, e possui uma ligação de fluxo e refluxo com o mar (Dias et al., 2014). Possui um perfil assimétrico com margens sinuosas e irregulares (Odreski, 2012). Bancos arenosos com profundidades inferiores a 1 m dominam suas margens, mas também existem canais de circulação estreitos e profundos no interior da Lagoa (Dias et al., 2014). A Lagoa da Conceição está localizada sob a isoterma de 20 °C (Bresciani, 1998; Odreski, 2012), apresentando uma amplitude de variação anual média de 7,9 °C, e diária de 4,2 °C (Bresciani, 1998). O índice pluviométrico mensal varia entre 74 e 172 mm, com maiores precipitações nos períodos de maior temperatura atmosférica. A variação da maré no interior do sistema lagunar é de no máximo 0,25 m (Bresciani, 1998). A Lagoa é alimentada por três recursos hídricos de água doce: águas das chuvas, dos riachos situados a oeste da Lagoa e das vazões dos rios Vermelho e João Gualberto (Odreski, 2012).

A Praia de Sambaqui é uma praia de águas calmas, pois fica no canal da Ilha com o Continente. Encontra-se no norte da Ilha de Santa Catarina nas seguintes coordenadas: 27°29'S e 48°32'O. A praia possui 14,17 ha. e um volume de água de 425.100 m<sup>3</sup>, apresentando uma circulação intermediária, com vento norte predominante, sedimento areno-lodoso e uma profundidade de 2,5 a 3,5 m (Nunes, 2010). Na Praia de Sambaqui a salinidade varia pouco, com uma média de 33,8 ± 0,8 ups (Santos, 2009). A temperatura da água do mar sofre uma maior variação, com média mínima de 16,8 ± 0,8 °C e máxima de 25,4 ± 1,1 °C (Santos, 2009).



**Figura 3.** Localização dos pontos de coleta: Praia de Sambaqui (costão rochoso) e Lagoa da Conceição (rochas submersas), Florianópolis-SC.

### 3.2 Coleta e Processamento do Material Biológico

Os espécimes de *A. spicifera* foram coletados em rochas submersas da Lagoa da Conceição e no costão rochoso da Praia de Sambaqui, Florianópolis-SC, Brasil (Fig. 3), nos meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015. Os talos das algas foram transportados até o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), localizado no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Florianópolis), em recipientes plásticos contendo águas dos ambientes de coleta. Também foram coletadas amostras de águas dos dois ambientes e transportadas em bombonas ao laboratório, filtradas e utilizadas para os experimentos, mantendo cada alga com a água do ambiente natural. No laboratório, os talos foram lavados com água filtrada dos determinados ambientes, e triados para remoção dos contaminantes. Porções saudáveis foram selecionadas e, parte foi processada para as análises citológicas e armazenadas em nitrogênio líquido para extração dos metabólitos primários e secundários, sendo estas amostras ambientais consideradas os controles deste experimento, e parte foi cultivada para aclimatação com as águas dos dois locais enriquecida com a solução von Stosch 50 % (Edwards, 1970) durante 7 dias em condições controladas: temperatura de  $24 \pm 2$  °C, aeração constante, irradiância de  $80 \pm 10$   $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (lâmpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil), e fotoperíodo de 12 h, iniciando às 8:00 h. No início do quarto dia de aclimatação, as águas foram renovadas.

As águas utilizadas nos experimentos foram coletadas a partir de ambos os locais. Amostras de água de cada área foram filtradas, armazenadas em frascos plásticos e congeladas para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos: amônio, nitrato e fosfato. A salinidade foi medida através de um refratômetro (Alfakit, Brasil), e o pH foi medido com um pHmetro (206-Lutron, Taiwan).

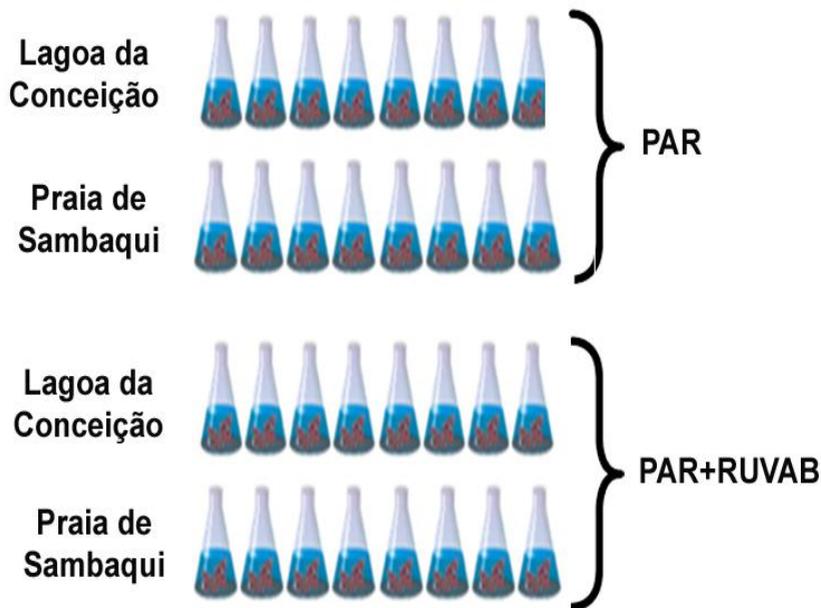
A água utilizada para aclimatação e experimentos das amostras da Lagoa da Conceição possuíam concentrações de  $1,06 \pm 0,27$  mM de  $\text{NH}_4^+$  (amônio),  $8,47 \pm 0,01$  mM de  $\text{NO}_3^-$  (nitrato),  $0,17 \pm 0,01$  mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  (fosfato), salinidade de 30 ups e pH 7,88. Para a Praia de Sambaqui, esses valores foram de  $1,13 \pm 0,05$  mM de  $\text{NH}_4^+$ ,  $3,73 \pm 0,01$  mM de  $\text{NO}_3^-$ ,  $0,52 \pm 0,01$  mM de  $\text{PO}_4^{3-}$ , 37 ups e pH 8,55.

### 3.3 Condições de Cultivo

As condições de cultivo foram: radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de  $80 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (lâmpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840), temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h e aeração contínua. As RUVA e RUVB artificiais foram fornecidas pela lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée - France, que emite os comprimentos de ondas de 312 nm (RUVB) e de 365 nm (RUVA). A irradiância foi de  $0,35 \text{ W.m}^{-2}$  para RUVB e  $0,70 \text{ W.m}^{-2}$  para RUVA (Radiometer modelo IL 1400A, International Light, Newburyport, MA, EUA).

Após a aclimação, porções de *A. spicifera* de aproximadamente  $4.0 \pm 0,05 \text{ g}$  foram cultivadas em frascos do tipo béquer com 500 mL de água filtrada, da Lagoa da Conceição ou da Praia de Sambaqui, enriquecida com solução von Stosch 50 %, composto por  $\text{MnCl}_2$ , EDTA,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ , biotina, cianocobalina e tiamina (Edwards, 1970), tanto para o tratamento PAR (8 repetições) quanto para o tratamento PAR+UVAB (8 repetições) (Fig. 4). No quarto dia de experimento foi acrescentado novamente o meio von Stosch. As algas foram expostas à RUVAB durante 3 h (das 12:00 às 15:00 h) por um período de 7 dias. Durante a exposição, a aeração foi aumentada no tratamento com RUV e com PAR para que os fragmentos se movimentassem de forma constante, para que todos os fragmentos recebessem intensidade similar de radiação. Foi realizado um rodízio dos béqueres aleatoriamente, a cada 1 h de exposição à RUV e diariamente aos expostos à PAR, para que todos os béqueres recebessem intensidade luminosa similar.

A câmara de cultivo contendo a lâmpada emissora de RUVA e RUVB foi isolada externamente com plásticos transparentes espessos durante o período de exposição, de forma que a RUV ficasse restrita aos tratamentos. No término do experimento as amostras da PAR e da PAR+UVAB foram processadas para as análises citológicas e armazenadas em nitrogênio líquido para extração dos metabólitos primários e secundários.



**Figura 4.** Desenho experimental, onde 8 frascos com águas e algas da Lagoa da Conceição e 8 com águas e algas da Praia de Sambaqui foram expostos à PAR, e 8 frascos com águas e algas da Lagoa da Conceição e 8 com águas e algas da Praia de Sambaqui foram expostos à PAR+RUVAB.

### 3.4 Determinação de Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos (nitrogênio amoniacal, nitrato e fosfato)

Amostras de água ( $n = 3$ ) dos ambientes foram filtradas com filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade, armazenadas em frascos plásticos e congeladas. Após, foram feitas análises de amônia, nitrato e fosfato de acordo com as metodologias citadas abaixo. As leituras ocorreram em um espectrofotômetro.

#### 3.4.1 Nitrogênio Amoniacal

Descrito em Lana et al., (2006), método de Koroleff (1969).

O método mede a totalidade do nitrogênio amoniacal, seja  $\text{N-NH}_3$  +  $\text{N-NH}_4^+$ .

A reação deu-se em duas etapas:

a) O nitrogênio amoniacal da amostra reagiu com o hipoclorito de sódio, em meio alcalino (pH entre 10,8 a 11,5) para formar a monocloramina.



b) A monocloramina reagiu com o fenol, na presença de um excesso de hipoclorito e também do nitroprussiato de sódio (catalisador), formando o azul de indofenol, cuja absorção máxima é em 630 nm. A fim de evitar a precipitação, nesse meio alcalino, dos íons alcalinos terrosos (Ca, Si, Ba, Mg) da água, adicionou-se citrato trissódico (complexante), evitando a interferência quanto a turbidez, que poderia ser causada pela precipitação destes íons.



### 3.4.2 Nitrato

Descrito em Lana et al., (2006), método desenvolvido por Wood et al., (1967) e adaptado por Aminot & Chaussepied (1983), com a modificação do uso do  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ao invés do EDTA, sendo descrito em Baumgarten et al., (1996).

O método fundamenta-se na dosagem dos íons nitritos (reação de Griess) obtidos por redução quantitativa (maior de 90 %) dos íons nitratos presentes nas amostras. Mediu-se a soma das concentrações dos íons nitritos e nitratos. O complexo colorido foi lido num comprimento de onda de 543 nm. Deduziu-se a concentração de nitrato, subtraindo-se o nitrito original da amostra da concentração de nitrito total dosado (somatório destes  $\text{NO}_2^-$  com o  $\text{NO}_3^-$  reduzido).

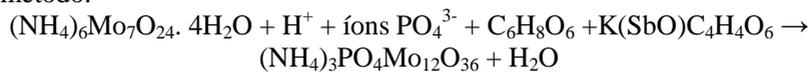
A redução do nitrato foi efetuada pela passagem da amostra por uma coluna redutora preenchida por grãos de cádmio tratados com solução cúprica (cádmio envelopado com cobre).

### 3.4.3 Fosfato

Descrito em Lana et al., (2006), método Murphy & Riley (1962), adaptado por Aminot & Chaussepied (1983).

Esse método dosa o fósforo sob as suas formas de íons ortofosfatos, os quais reagem com o molibdato de amônio em meio ácido, formando o complexo fosfomolibdato, o qual foi reduzido pelo ácido ascórbico, resultando num composto azul, cuja absorção máxima é

em 885 nm. Esta redução foi catalisada pelo tartarato de antimônio e potássio. Os polifosfatos e o fósforo orgânico não são dosados por este método.



#### 4. REFERÊNCIAS

Aguilera, J., U. Karsten, H. Lippert, B. Vögele, E. Philipp, D. Hanelt, C. Wiencke (1999) Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 191, 109-119.

AlgaBase. *Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen. Disponível em: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=3309](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=3309)  
Acessado em 02 de março de 2015.

Aminot, A., M. Chaussepied (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest: CNEXO, 379p.

Barufi, J. B., N. Korbee, M. C. Oliveira, F. L. Figueroa (2011) Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. App. Phycol.*, 23(3), 457-466.

Baumgarten, M. G. Z, J. M. Rocha, L. F. H. Niencheski (1996) Manual de análises em oceanografia química. Rio Grande: FURG, 132p.

Beisert, S., R. D. Granstein (1996) UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 31(5-6), 381-404.

Bicudo, C. E. M., M. Menezes (2010) Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 49-60p.

Bischof, K., G. Kräbs, C. Wiencke, D. Hanelt (2002) Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215(3), 502-509.

Borderie, F., A. S. Laurence, R. Naoufal, B. Faisl, O. Geneviève, R. Dominique, A. S. Badr (2011) UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *Int. Biodet. Biodegrad.*, 65(4), 579-584.

Bouzon, Z. L., F. Chow, C. S. Zitta, R. dos Santos, L. C. Ouriques, M. R. Felix, L. K. P. Osorio, C. Gouveia, R. P. Martins, A. Latini, F. Ramlov, M. Maraschin, E. C. Schmidt (2012) Effects of natural radiation, photosynthetically active radiation and artificial ultraviolet radiation-b on the chloroplast organization and metabolism of *Porphyra acanthophora* var. *brasiliensis* (Rhodophyta, Bangiales). *Microsc. Microanal.*, 18, 1467-1479.

Bresciani, L. (1998) Avaliação da Composição orgânica dos sedimentos de fundo da Lagoa da Conceição – Ilha de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.

Cassetti, V., J. E. A. Macedo Costa (1990) Algumas considerações sobre o ozônio e o projeto ozônio em Goiás. *Bol. Goiano Geo.*, 9(1), 21-42.

Cordeiro-Marino, M. (1978) Rodofíceas bentônicas marinhas do Estado de Santa Catarina. *Inst. de Botânica*.

Crutzen, P. J. (1974) Estimates of possible variation in total ozone due to natural causes and human activities. *Photochem Photobiol.*, 72, 652-659.

Cunha, A. C. (2001) Levantamento de Parâmetros Físico-químicos e Hidráulicos para a Avaliação da Qualidade da Água em escoamentos naturais – Desenv. do Distrito Industrial na Bac. do Rio Matapi”. *Rel. Na. p/ CNPq/IEPA. Macapá- AP, Set.*, 58p.

Dayong, S. H. I., G. U. O Shuju, F. A. N. Xiao (2011) A new ketosteroid from red alga *Acanthophora spicifera*. *Chin. J. Ocean. Limnol.*, 29(3), 674-678.

De Almeida, S. L., E. C. Schmidt, D. T. Pereira, M. Kreusch, M. Felix, L. K. Osorio, R. P. Martins, A. Latini, F. Ramlov, F. Chow, M. Maraschin, A. C. Rodrigues, Z. L. Bouzon (2013) Effect of ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of *Oryza sativa* L. *Protoplasma*, 250(6), 1303-1313.

De Laat, A., M. Tilburg, J. C. Leun, W. A. Vloten, F. R. Gruijl (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem. Photobiol.*, 63(4), 492-497.

De Reviers, B. (2006) *Bilogia de Filogenia das algas*. Artmed, 280p.

De Ruiter, G. A., B. Rudolph (1997) Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Tech.*, 8, 389-395.

Dias, B. B., B. A. D. M. Parizotto, C. Bonetti (2014) Agentes naturais e antrópicos modificadores da qualidade da água e dos sedimentos nas áreas marginais da Lagoa da Conceição, SC. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 18, 33-43.

Duarte, M. E., J. P. Cauduro, D. G. Nosedá, M. D. Nosedá, A. G. Gonçalves, C. A. Pujol, E. B. Damonte, A. S. Cerezo (2004) The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.*, 339, 335-347.

Edwards, P. (1970) *Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas*. *Contrib. Mar. Sci. Austin* 15, 1–228.

Falkowski, P. G., J. A. Raven (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Sci., Oxford.

Faveri, C., E. C. Schmidt, C. Simioni, C. D. Martins, J. Bonomi-Barufi, P. A. Horta, Z. L. Bouzon (2015) Effects of eutrophic seawater and temperature on the physiology and morphology of *Hypnea musciformis* JV Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta). *Ecotoxicology*, 1-13.

Fialho, F. A. N. (2013) *Aquicultura integrada multitrófica: biofiltros de macroalgas no cultivo do robalo flecha*. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Santa Catarina.

Franceschini, I. M., Burliga, A. L., de Reviers, B., Prado, J. F., Hamlaoui, S. (2010) *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Artmed.

Ganesan, P., S. Chandini, N. Bhaskar (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.*, 99, 2717–2723.

Godin-Beekmann, S. (2010) Spatial observation of the ozone layer. *Comptes Rendus Geosci.*, 342(4), 339-348.

Gómez, I., E. Pérez-Rodríguez, B. Viñepla, F. L. Figueroa, U. Karsten (1998) Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 47(1), 46-57.

Henry, B. E., K. L. Van Alstyne (2004) Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.*, 40, 527–533.

Heo, S. J., S. Ko, S. Kang, S. Cha, S. Lee, D. Kang, W. Jung, A. Affan, C. Oh, Y. Jeon (2010) Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1355–1361.

Hollósy, F. (2001) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Microbiology*, 33, 179-197.

Holzinger, A., C. Lütz (2006) Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37, 190-207.

Horn, R. A. (2012) The effect of *litopenaeus stylirostris* aquaculture on macroalgae growth in opunohu bay, moorea, French Polynesia. *Student Res. Papers*.

INPE. Índice ultravioleta. <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/> Acessado em 29 de fevereiro de 2016.

Koroleff, F. (1969) Determination of total nitrogen in natural seawaters by means of persulfate oxidation. *Int. Count. Explor. Sea (ICES)*. Pap. CM. 1969/C: 8; revised 1970.

Lana, P. C., A. Bianchini, C. A. Oliveira-Ribeiro, L. F. H. Niencheski, G. Fillmann, C. S. G. Santos (2006) Avaliação ambiental de estuários brasileiros: Diretrizes metodológicas. In: Projeto RECOS: Uso e apropriação de recursos costeiros. Grupo Temático Biodiversidade e Qualidade Ambiental. Rio de Janeiro: Museu Nacional., 155p.

Lang, K. L. (2006) Investigação Química E Biológica Da Alga Vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.

Lavakumar, V., K. F. H. Ahamed, V. Ravichandran (2012) Anticancer and antioxidant effect of *Acanthophora spicifera* against EAC induced carcinoma in mice. J. Pharm. Res., 5, 1503–1507.

Lee, R.E. (1989) Phycology. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Lee, R.E. (2008) Phycology, 4<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press.

Lima, T. B., M. L. Holanda, L. F. Caetano, H. C. Magalhães, G. M. C. de Castro, N. M. B. Benevides (2013) Perfil de textura de géis aquosos elaborados a partir da iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia.

Madronich, S. (1992) Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biological active ultravioleta radiation reaching the Earth's surface. Geop. Res. Let., 19, 37–40.

Mitchell D. L., J. Jen, J. E. Cleaver (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultravioleta-B) radiation. Nucleic Acids Res., 20, 225–229.

Molina, M. J., F. S. Rowland (1974) Chlorine atom-catalysed destruction of ozone. Nature, 249, 810–812.

Molina, L. T., M.J. Molina (1987) Production of Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from self-reaction of the ClO radical. Jour. Phys. Chem., 91, 433-436.

- Murphy, J., J. P. Riley (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27, 31-36.
- Murugan, K., V.V. Iyer (2014) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts of selected red and brown seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *J. Food Biochem.*, 38(1), 92-101.
- Navarro N. P., A. Mansilla, E. M. Plastino (2010) *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. *J. Appl. Phycol.*, 22, 385–394.
- Nunes, B. G. (2010) Monitoramento do ambiente do cultivo experimental da alga *Kappaphycus alvarezii* na Praia de Sambaqui, Florianópolis/sc. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Odreski, L. F. R. (2012) Influência hidrológica nos processos hidrodinâmicos da Lagoa da Conceição – Florianópolis – SC. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Okuno, E., T. Nakajima, E. M. Yoshimura, F. Hiodo, A. M. F. Fausto, W. S. Paes, N. K. Umisedo, E. S. Otsubo (1996) Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Pásqua. *RBE. Cad. Eng. Biom.*, 12, 143-153.
- Pereira, D. T., E. C. Schmidt, Z. L. Bouzon, L. C. Ouriques (2014) The effects of ultraviolet radiation-B response on the morphology, ultrastructure, and photosynthetic pigments of *Laurencia catarinensis* and *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta): a comparative study. *J. Appl. Phycol.*, 26, 2443-2452.
- Polo, L. K., M. R. Feliz, M. Kreusch, D.T. Pereira, G.B. Costas, C. Siminoni, L. C. Ouriques, F. Chow, F. Ramlov, M. Maraschin, Z.L. Bouzon, E.C. Schmidt (2014) Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum Cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *J. Photochem. Photobiol.*, 90, 560-573.

Polo, L. K., M. R. L. Felix, M. Kreusch, D. T. Pereira, G. B. Costa, C. Simioni, R. P. Martins, A. Latini, E. S. I. Floh, F. Chow, F. Ramlov, M. Maraschin, Z. L. Bouzon, É. C. Schmidt (2015) Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. *J. Appl. Phycol.*, 27, 887–899.

Poppe, F., R. A. Schmidt, D. Hanelt, C. Wiencke (2003) Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.*, 51(1), 11-19.

Ramlov, F., J. M. C. Souza, A. V. F. Faria, M. Maraschin, P. A. Horta, N. S. Yokoya (2011) Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Braz. J. Pharmacog.*, 21, 255-261.

Randi, A. M., M. C. A. Freitas, A. C. Rodrigues, M. Maraschin, M. A. Torres (2014) Acclimation and photoprotection of young gametophytes of *Acrostichum danaeifolium* to UV-B stress. *Photosynthetica*, 52(1), 50-56.

Roleda, M. Y., D. Hanelt, G. Kräbs, C. Wiencke (2004) Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycology*, 43, 603-613.

Roleda, M. Y., U. Lütz-Meindl, C. Wiencke, C. Lütz (2010) Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Urospora penicilliformis* from Arctic Spitsbergen to UV radiation. *Protoplasma*, 243, 105–116.

Santos, F. W. M. (2009) Período de permanência de cordas do mexilhão *Perna perna* (L., 1758) em cultivo. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Santa Catarina.

Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blaudschun, J. Wenk (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.*, 378(11), 1247-1258.

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

Schmidt, E. C., B. G. Nunes, M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2010) Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. *Photosynthetica* (Praha), 48, 161-172.

Schmidt, E. C., B. Pereira, R. dos Santos, C. Gouveia, G. Costa, G. S. M. Faria, F. Scherner, P. A. Horta, R. P. Martins, A. Latini, F. Ramlov, M. Maraschin, Z.L. Bouzon (2012a) Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aqua. Bot.*, 100, 8-17.

Schmidt, E. C., R. W. dos Santos, C. Faveri, P. A. Horta, R. de Paula Martins, A. Latini, F. Ramlov, M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2012b). Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after in vitro exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. *J. App. Phycol.*, 24(6), 1341-1352.

Schmidt, E. C., B. Pereira, C. L. Pontes, R. Santos, F. Scherner, P. A. Horta, R. P. Martins, A. Latini, M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2012c) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma*, 249, 353-367.

Seenivasan, R., M. Rekha, H. Indu, S. Geetha (2012) Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from Mandapam Coast, India. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(10), 159-169.

Silva, T. H. B., W. Bettiol, L. B. Costa, M. A.B. Morandi (2012) Efeito da radiação ultravioleta-B sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* e colonização em discos de morango. 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012.

Simioni, C., T. Rover, E. C. Schmidt, M. R. Felix, L. K. Polo, R. Santos, G. Burle, M. Kreuzsch, D. T. Pereira, L. C. Ouriques, Z. L. Bouzon

(2014) Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *J. Phycol.*, 50, 577-586.

South, G. R., & Whittick, A. (2009). *An Introduction to Phycology*. John Wiley & Sons.

Stolarski, R. S., R. J. Cicerone (1974) Stratospheric chlorine: a possible sink for ozone. *Can. J. Chem.*, 52(8), 1610-1615.

Sugget, D. J., O. Prášil, M. A. Borowitzka (2010) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Dordrecht: Springer.

Tsai, M. L., K. Y. Chang, C. S. Chiang, W. Y. Shu, T. C. Weng, C. R. Chen, C. L. Huang, H. K. Lin, I. C. Hsu (2009) UVB radiation induces persistent activation of ribosome and oxidative phosphorylation pathways. *Rad. Res.*, 171(6), 716-724.

Van den Hoek, C. D. G. Mann, H. M. Jahns (1989) *Algae an introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Van den Hoek, C., D. Mann, H. M. Jahns (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Vasconcelos, A. G., K. V. de Araújo, L. D. A. B. Santana (2015). Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. *Rev. Bras. Inov. Tecnol. Saúde*, 5(3), 2236-1103.

Wang, C., W. Mingyan, S. Jingyu, L. Du, Z. Longmei (1998) Research on the chemical constituents of *Acanthophora spicifera* in the South China Sea. *Chin. J. Magn. Reson.*, 15, 237-242.

Wood, E. D., F. A. J. Armstrong, F. A. Richards (1967) Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47, 23-31.

Zacher, K., M. Y. R., A. Wulff, D. Hanelt, C. Wiencke (2009) Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores

exposed to ultraviolet radiation. *Phycol. Res.*, 57, 186–193.

Zakaria, N. A., I. Darah, F. S. Shaida, N. A. Supardy (2011) Phytochemical composition and antibacterial potential of hexane extract from Malaysian red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. *World Appl. Sci. J.*, 15, 496-501.

Zeng, L. M., W. Chao-Jie, S. Jing-Yu, L. Du, O. Noel, L. Yang, L. Nan, Z. Qi-Tai (2001) Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese. J. Chem.*, 19, 1097-1100.

Zhao, J., L. Li (2014). Effects of UV-B irradiation on isoforms of antioxidant enzymes and their activities in red alga *Grateloupia filicina* (Rhodophyta). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 32, 1364-1372.

Zheng, Y., K. Gao (2009) Impacts of solar UV radiation on the photosynthesis, growth and UV-absorbing compounds in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different nitrate concentrations. *J. Phycol.*, 45, 314-323.

Zhu, L., H. Xiao, Y. Wang, X. Jian, Z. Zhang, H. Zhang, X. Tang (2015) Physiological responses of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) to UV-B radiation exposure. *Chin. J. Ocean. Limnol.*, 33, 389-399.

## CAPÍTULO II

### **EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-A E ULTRAVIOLETA-B NA ORGANIZAÇÃO CELULAR E NO CONTEÚDO DE PIGMENTOS FOTOSINTETIZANTES DA MACROALGA VERMELHA *Acanthophora spicifera*: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Artigo submetido ao Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. Revista com fator de impacto de 2,960, sendo qualis B1. A submissão ocorreu em 26/08/2015, os revisores analisaram e pediram algumas mudanças. As devidas mudanças foram feitas e o artigo está sob análise.

#### **RESUMO**

A intensidade da radiação ultravioleta-B (RUVB) aumenta a cada ano, o que afeta os organismos de diversas maneiras. Importantes economicamente, produtores primários, as algas sofrem com esse aumento da radiação. Portanto, este estudo teve como objetivo comparar o efeito em laboratório das radiações UVA+UVB (UVAB) (3 h por dia durante 7 dias) em *Acanthophora spicifera* coletada em duas áreas com diferentes condições abióticas, focando na taxa de crescimento, no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, na citoquímica e na ultraestrutura celular. Em primeiro lugar, as amostras de *A. spicifera* foram coletadas em dois locais de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil: Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui. Em seguida, amostras de *A. spicifera* foram selecionadas e expostas a duas condições diferentes de radiação: PAR e PAR+UVA+UVB (PAR+UVAB). Tratamentos diários de PAR, irradiâncias de UVA e de UVB foram de  $657.40 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $80 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $7.56 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $0.70 \text{ W.m}^{-2}$ ) e  $3.78 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $0.35 \text{ W.m}^{-2}$ ) respectivamente, durante um fotoperíodo de 12 h, onde a RUV foi ligada por 3 h por dia durante 7 dias (12:00 às 15:00). Usando técnicas como microscopia de luz, citoquímica e microscopia eletrônica de transmissão; estrutura celular, morfologia, fisiologia e bioquímica foram analisadas, e junto com anormalidades ultraestruturais, taxa de crescimento e conteúdo de pigmentos fotossintetizantes diminuíram após a exposição à RUV. As viabilidades celulares também diminuíram 37,4 % e 49,4 % em relação às amostras ambientais para a Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui, respectivamente. Além disso, o tratamento com RUVAB causou alterações na ultraestrutura das células

corticais, incluindo o aumento da espessura da parede celular, bem como tilacóides rompidos no cloroplasto. Com base nestes resultados, o presente estudo demonstra que a RUV afeta negativamente muitos parâmetros fisiológicos em *A. spicifera*, causando diminuição da taxa de crescimento, do teor de pigmentos fotossintetizantes e da viabilidade celular, assim como as alterações morfológicas, tais como espessamento da parede celular e perturbação de organelas.

**Palavras-chave:** *Acanthophora spicifera*, radiação ultravioleta, morfologia, pigmentos fotossintetizantes, microscopia, nutrientes.

**ABSTRACT**

The intensity of ultraviolet-B (UVB) radiation increases every year, affecting organisms in various ways. As economically important primary producers, algae suffer from this increased radiation. Therefore, this study aimed to compare the laboratory effect of UV-A+UV-B (UVAB) radiation (3 h per day for 7 days) on *Acanthophora spicifera* collected from two areas with differing abiotic conditions, focusing on growth rate, content of photosynthetic pigments, cytochemistry, and cell ultrastructure. First, *A. spicifera* specimens were collected from two sites in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil: Conceição Lagoon and Sambaqui Beach. Next, samples of *A. spicifera* were prepared and examined with two different conditions of radiation: PAR and PAR+UVA+UVB (PAR+UVAB). Daily treatments of PAR, UV-A and UV-B irradiances were  $657.40 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $80 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $7.56 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $0.70 \text{ W.m}^{-2}$ ), and  $3.78 \text{ kJ.m}^{-2}$  ( $0.35 \text{ W.m}^{-2}$ ), respectively, during a 12-h photocycle, and UV was on for 3 h per day for 7 days from 12:00 to 15:00). Using such techniques as light microscopy, cytochemistry and transmission electron microscopy, cell structure, morphology, physiology and biochemistry were analyzed, and along with ultrastructural abnormalities, growth rate and content of photosynthetic pigments decreased after exposure to ultraviolet radiation. Cell viability also decreased by 37.4 % and 49.4 % compared to ambient samples for Conceição Lagoon and Sambaqui Beach, respectively. In addition, UVAB treatment caused changes in the ultrastructure of cortical cells, including increased cell wall thickness, as well as disrupted thylakoids in the chloroplast. Based on these findings, the present study demonstrates that ultraviolet radiation negatively affects many physiological parameters in *A. spicifera*, causing decreased growth rate, content of photosynthetic pigments and cell viability, as well as morphological changes, such as cell wall thickening and disruption of organelles.

**Keywords:** *Acanthophora spicifera*, ultraviolet radiation, morphology, photosynthetic pigments, microscopy, nutrients.

## 1. INTRODUÇÃO

Os componentes da radiação solar que atingem a superfície da Terra são a radiação ultravioleta (RUV), a radiação visível, conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (PAR), e a radiação infravermelha (RI) (Diffey, 2002). A RUV é subdividida em três diferentes regiões espectrais: UVA (400-320 nm), UVB (320- 280 nm) e UVC (280-100 nm) (Okuno et al., 1996). A radiação UVA (RUVA) é fracamente atenuada pela camada de ozônio ( $O_3$ ); a radiação UVB (RUVB) é atenuada de maneira eficiente, mas não completamente pelo  $O_3$ ; e a radiação UVC (RUVVC) é completamente atenuada pelo  $O_3$  (Beissert & Granstein, 1996; De Laat et al., 1996; Scharffetter-Kochanek et al., 1997). Dentre essas três RUV, a mais perigosa para os organismos vivos é a RUVB (Silva et al., 2012; Costa, 2014).

Com a descoberta do buraco na camada de  $O_3$  na Antártida (Stolarski, 1988), e o entendimento das consequências das atividades de industrialização e antropogênicas, e da liberação de poluentes no ar, como os clorofluorocarbonetos (CFC), halocarbonos, clorocarbonos (CCs), dioxinas ( $NO_x$ ) e de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), fez com que muitos estudos com ênfase nos efeitos da RUVB ocorressem.

Devido à destruição do  $O_3$ , estima-se um aumento da incidência de RUVB na superfície terrestre, reforçando os efeitos nocivos sobre os organismos (IPCC, 2013). A RUV tem o potencial de penetrar profundidades ecologicamente significativas nos sistemas aquáticos (Pérez Rodrigues et al., 1998; Wiencke et al., 2000), até 30 metros de coluna d'água, dependendo da transparência da água (Karentz & Lutze, 1990), causando efeitos negativos aos organismos destes ecossistemas. Organismos sésseis, como as algas, grandes produtores primários do ecossistema aquático, não conseguem se movimentar, sendo atingidos diretamente pela RUV, especialmente durante a maré baixa, atingindo assim todos os consumidores na cadeia alimentar (Häder et al., 2007).

Esse aumento na RUV resulta em uma incidência de radiação prejudicial que altera respostas biológicas nas algas, incluindo respostas fisiológicas (Bischof et al., 2000; Pereira et al., 2014) como o desempenho fotossintético (Aguilera et al., 1999; Figueroa et al., 2014; Polo et al., 2014), o teor de pigmentos (Roleda et al., 2004; Schmidt et al., 2010; Polo et al., 2014), a organização ultraestrutural (Holzinger & Lütz, 2006; Schmidt et al., 2009) e danos ao DNA (Wiencke et al., 2000; Heo et al., 2010).

Para sobreviver a níveis elevados de exposição à RUV, algas vermelhas são capazes de sintetizar e acumular compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporina (MAAs) e carotenoides, que direta ou indiretamente, absorvem a energia da RUV (Karsten & Wiencke, 1999; Schubert et al., 2011). Outro meio de proteção contra a RUV é a produção de compostos fenólicos, os quais estão envolvidos na proteção das algas contra a exposição direta à radiação da luz solar, tanto pela barreira à RUV, como a capacidade antioxidante, como observado nas algas pardas *Ascophyllum nodosum* (Pavia & Gunilla, 1997), *Sargassum cymosum* (Polo et al., 2014), *Cystoseira tamariscifolia* (Celis-Plá et al., 2014), *Laminaria hyperborea* (Kilar & McLachlan, 1986) e *Fucus* ssp. (Zakaria et al., 2011).

*Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Børgesen é uma macroalga vermelha amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais (Wang et al., 1998), e ao longo do litoral brasileiro encontra-se da costa do Estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul (Algabase- [www.algabase.org](http://www.algabase.org)). Esta alga ocorre em zonas entre marés e em uma ampla variedade de substratos, como epífita sobre outras algas, ou como uma população de vida livre (Wang et al., 1998; Fialho, 2013). A espécie pode ser usada em saladas, como tempero, (Lang, 2006; Zakaria et al., 2011; Horn, 2012) e também em indústrias alimentícia, científica, farmacêutica e higiênica, devido à presença de agarana na sua parede celular (Duarte et al., 2004). Estudos têm mostrado que *A. spicifera* produz compostos bioativos que possuem ação antibacteriana, antioxidante, antiviral, antitumoral e anti-incrustantes (Zeng et al., 2001; Duarte et al., 2004; Lang, 2006; Ganesan et al., 2008; Dayong et al., 2011; Lavakumar et al., 2012; Seenivasan et al., 2012).

Apesar do impacto significativo da RUV e da importância ecológica e econômica da macroalga vermelha *A. spicifera*, estudos que avaliam os efeitos da RUV na arquitetura celular, na ultraestrutura e nos parâmetros fisiológicos são escassos na literatura. Assim, neste presente estudo, investigou-se o efeito em laboratório da radiação UVA+UVB (RUVAB) em talos de *A. spicifera* coletados a partir de duas áreas de Florianópolis, Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui, com ênfase nos efeitos sobre a taxa de crescimento, o teor de pigmentos fotossintetizantes e a organização ultraestrutural. Assim, o objetivo do estudo foi comparar as respostas na mesma espécie de alga, proveniente de diferentes ambientes, com diferentes condições abióticas, quando expostas à RUV.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Pontos de Coleta; Coleta e Processamento do Material Biológico; Condições de Cultivo

Vide itens 3.1; 3.2 e 3.3 do capítulo I (páginas 9 a 12).

### 2.2 Taxa de Crescimento

O efeito da RUVAB no crescimento dos talos de *A. spicifera* foi avaliado através da diferença entre a massa da matéria fresca no início e no final dos tratamentos ( $n = 8$ ). As taxas de crescimento foram apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculadas segundo a fórmula de Penniman et al., (1986).

### 2.3 Extração e Dosagem de Clorofila *a* e Ficobiliproteínas

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras provenientes dos ambientes e dos tratados foram armazenadas em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC-Florianópolis.

#### 2.3.1 Clorofila *a*

A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de 1 g (massa fresca) em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, de acordo com o método de Hiscox & Israelstam (1979). A determinação da concentração de clorofila *a* foi feita utilizando-se a equação descrita por Wellburn (1994). As análises foram realizadas com  $n = 6$  e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de pigmentos por g de massa fresca.

#### 2.3.2 Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas [aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeretrina (FE)] foi realizada através da dessalinização das amostras em formiato de amônio 0,5 M por 30 seg, seguida por duas lavagens em água destilada. As amostras de 1 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 3 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A solução foi centrifugada por 20 min (4000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro

(Shimadzu – UV 1800;  $\lambda = 498,5, 615$  e  $651$  nm). A determinação das concentrações das ficobiliproteínas foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Kursar et al., (1983). As análises foram realizadas com  $n = 6$  e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de pigmentos por g de massa fresca.

#### **2.4 Viabilidade Celular (MTT)**

As análises foram obtidas a partir de amostras de *A. spicifera* (0,250 g de massa fresca) baseadas na redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio de brometo (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A viabilidade celular foi determinada através da redução do sal de tetrazólio em formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais, as quais reduzem o MTT em um composto insolúvel púrpura. A concentração de formazan foi determinada espectrofotometricamente, uma vez que este é proporcional à quantidade de mitocôndrias ativas e, por consequência, o número de células vivas. Os segmentos de alga foram lavados com água do mar esterilizada, e as amostras foram incubadas com uma solução de  $30 \mu\text{L}$  de MTT ( $0,17 \text{ g.L}^{-1}$  de MTT) em tubos de ensaio com água do mar esterilizada ( $3 \text{ mL}$  de volume final), os quais foram mantidos a  $37^\circ \text{C}$  durante  $3 \text{ h}$ . Fragmentos de alga foram lavados em água destilada e transferidos para um tubo de ensaio contendo  $1,0 \text{ mL}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) (Mendes et al., 2013). A absorbância foi determinada a  $570 \text{ nm}$ . As análises foram realizadas com  $n = 4$  e a viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando a absorbância de amostras ambientais (controle) ( $100 \%$ ).

#### **2.5 Microscopia de Luz (ML)**

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a  $2,5 \%$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7,2$ , à temperatura de  $4^\circ \text{C}$ , *overnight*. Após a fixação, em temperatura ambiente, o material foi lavado com tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7,2$ , duas vezes, por  $10 \text{ min}$  em cada troca (Bouzon, 1993), e em seguida foi desidratado com etanol. A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de  $1:1$  de etanol  $100 \%$  e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante  $12 \text{ h}$ . Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de  $5 \mu\text{m}$  foram coletadas nas

lâminas sobre gotas de água destilada e secas a 37 °C por 30 min para as análises citoquímicas.

### 2.5.1 Citoquímica

O material foi submetido ao seguinte teste citoquímico:

**Azul de Toluidina (AT-O):** Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O a 0,5 %, acidificada com HCl 1 N para pH 3,0, por 30 seg, lavadas em água destilada e secas ao ar (McCully, 1970; Gordon & McCandless, 1973). Após as lâminas prontas e coradas, as imagens foram adquiridas no sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América) do microscópio de Epifluorescência (Olympus BX 41, Tokyo, Japan). Nesse mesmo sistema de captura foram realizadas as medidas de largura e altura das células corticais e subcorticais, assim como medida do espessamento de parede destas mesmas células (n = 50).

### 2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras provenientes dos ambientes e das exposições à PAR e PAR+UVAB foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5 %, tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2 e sacarose 0,2 M. A pré-fixação foi realizada *overnight* a 4 °C e seguida por três lavagens no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 (Pueschel, 1979). Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e em seguida desidratado em acetona. Após a desidratação, o material foi infiltrado em resina Spurr (Spurr, 1969). O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70 °C por 24 h. As secções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM)1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC-Florianópolis.

### **2.7 Oxigênio Dissolvido (OD)**

Após o início dos experimentos a concentração de oxigênio dissolvido (OD) ( $\text{mg.L}^{-1}$ ;  $n = 8$ ) na água foi medida diariamente. As medidas ocorreram em todos os béqueres após as exposições à PAR e à PAR+UVAB. Para isto, utilizou-se um oxímetro portátil Lutron DO-5519, com ajuste para a salinidade da água marinha de cada local (30 e 37 ups).

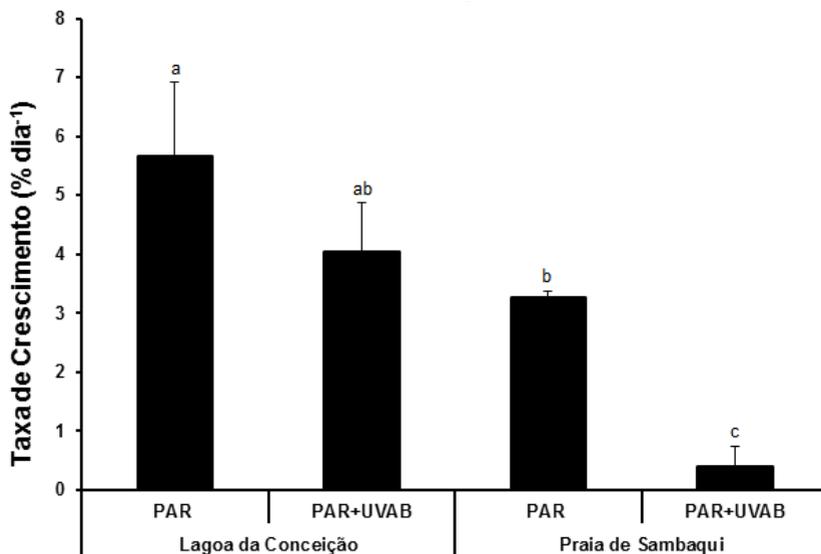
### **2.8 Análise dos Dados**

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) Bifatorial, seguida do teste a posteriori de Tukey para verificar as significâncias das diferenças ( $p \leq 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas no Programa Statistica (versão 7.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Taxas de Crescimento (TCs) e Morfologia dos Talos

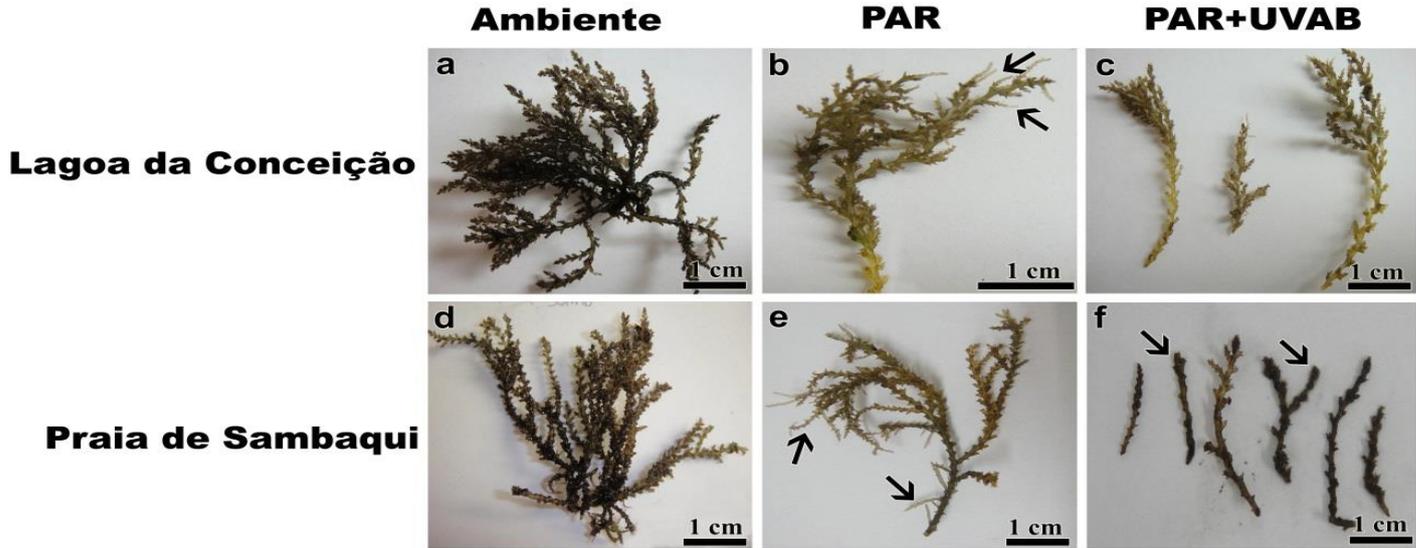
Após 7 dias de exposição, os espécimes de *A. spicifera* apresentaram diferenças estatisticamente significativas (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ) entre as algas cultivadas com PAR e com PAR+RUVAB (Fig. 1). As algas coletadas na Lagoa da Conceição cultivadas com PAR e com PAR+UVAB apresentaram um aumento nas TCs de 5,65 % dia<sup>-1</sup> e 4,05 % dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Os espécimes provenientes da Praia de Sambaqui cultivados com PAR e PAR+UVAB apresentaram acréscimo nas TCs de 3,27 % dia<sup>-1</sup> e 0,40 % dia<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 1.** Taxas de crescimento expressas em % dia<sup>-1</sup> dos talos expostos à PAR e à PAR+RUVAB de *A. spicifera* coletados na Lagoa da Conceição e na Praia de Sambaqui cultivados por 7 dias. Valores apresentados com média (n=8) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os espécimes de *A. spicifera* provenientes da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui apresentavam um talo carnudo com ramificações pequenas. Os espécimes coletados na Lagoa da Conceição apresentaram coloração vermelho-amarronzada, característica da espécie, com até 11 cm de comprimento (Fig. 2a). Entretanto, os

espécimes coletados na Praia de Sambaqui apresentaram coloração marrom-esverdeada com ápices amarelados (Fig. 2d), com até a 6 cm de comprimento. Após o experimento, observou-se que os talos provenientes de ambos os locais tratados com PAR ficaram despigmentados, porém com crescimento de novos ramos (Fig. 2b, e). Os talos tratados com PAR+UVAB provindos da Lagoa da Conceição também apresentaram despigmentação, porém sem presença de novos ramos (Fig. 2c). Por outro lado, os talos provenientes da Praia de Sambaqui tratados com RUV ficaram sem forma definida e amolecidos, um processo de degeneração dos ápices fazendo com que as ramificações ficassem mais curtas e com um início do processo de despigmentação (Fig. 2f).



**Figura 2.** Morfologia dos talos da macroalga vermelha *A. spicifera* coletados na Lagoa da Conceição e na Praia de Sambaqui e algas cultivadas com radiação em laboratório. **(a)** Alga proveniente da Lagoa da Conceição com sua coloração vermelho-amarronzada, típica da espécie. **(d)** Alga da Praia de Sambaqui com coloração marrom-esverdeada. **(b)** **(e)** Note que as algas expostas à PAR apresentaram despigmentação e crescimento de novos ramos (setas). **(c)** Alga da Lagoa da Conceição exposta à RUV com despigmentação e ausência de crescimento. **(f)** Alga proveniente da Praia de Sambaqui tratada com PAR+UVAB apresentou degeneração nas ramificações (setas) e perda de biomassa.

### 3.2 Pigmentos Fotossintetizantes

A quantidade de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) de *A. spicifera*, apresentada na Tabela 1, indicou que as amostras dos dois ambientes apresentaram, significativamente, as maiores concentrações de clorofila *a* e ficobiliproteínas [(aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE)] quando comparadas com amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB. As algas expostas ao tratamento de PAR+UVAB registraram menores concentrações de pigmentos do que as amostras controle e tratamento com PAR. Apesar da diminuição na quantidade dos pigmentos em amostras tratadas com PAR+UVAB, não houve diferença entre as duas áreas sob este tratamento.

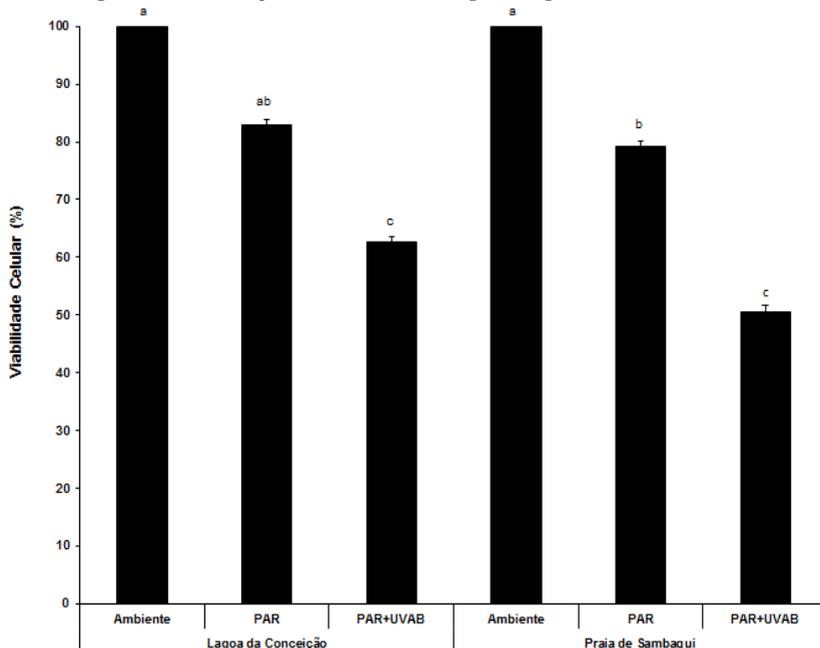
**Tabela 1.** Conteúdo de pigmentos fotossintetizantes ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa fresca), clorofila *a* (Cl. *a*) e ficobiliproteínas (AFC: aloficocianina, FC: ficocianina, FE: ficoeritrina), de *A. spicifera* proveniente da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui. Amostras do ambiente e amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 6$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamentos		Cl. <i>a</i>	AFC	FC	FE
Lagoa da	Ambiente	55,53 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	34,28 $\pm$ 5,45 <sup>ab</sup>	61,44 $\pm$ 11,91 <sup>a</sup>	121,22 $\pm$ 9,08 <sup>a</sup>
	PAR	17,79 $\pm$ 0,27 <sup>cd</sup>	28,14 $\pm$ 2,93 <sup>bc</sup>	41,43 $\pm$ 4,33 <sup>b</sup>	88,89 $\pm$ 9,53 <sup>b</sup>
	PAR+UVAB	13,33 $\pm$ 1,18 <sup>cd</sup>	24,33 $\pm$ 2,61 <sup>c</sup>	25,94 $\pm$ 9,35 <sup>c</sup>	58,86 $\pm$ 15,70 <sup>cd</sup>
Praia de	Ambiente	40,91 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>	52,84 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>	46,18 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	123,46 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>
	PAR	21,68 $\pm$ 2,75 <sup>c</sup>	38,98 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	32,80 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>	80,41 $\pm$ 0,49 <sup>bc</sup>
	PAR+UVAB	8,42 $\pm$ 1,04 <sup>d</sup>	23,69 $\pm$ 1,98 <sup>c</sup>	16,03 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	44,74 $\pm$ 2,66 <sup>d</sup>

### 3.3 Viabilidade Celular (MTT)

Foram observadas diferenças estatísticas entre as viabilidades celulares das amostras dos ambientes, expostas à PAR e à PAR+UVAB da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui (Fig. 3). Houve uma pequena queda na viabilidade celular das amostras da PAR quando

comparadas com os ambientes. Algas cultivadas no tratamento PAR+UVAB mostraram uma queda de 37,4 % e 49,4 % nas viabilidades celulares quando comparadas com amostras dos ambientes para a Lagoa da Conceição e Praia Sambaqui, respectivamente.



**Figura 3.** Viabilidade celular (%), por ensaio de MTT, de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui das amostras ambientais e tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias (n = 4; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

### 3.4 Descrição Micromorfológica

A região cortical de amostras de campo de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui é formada por 1 a 2 camadas de células corticais. O conteúdo citoplasmático das células corticais variou entre 2,1 e 9,5  $\mu\text{m}$  de altura e 2,6 e 9,25  $\mu\text{m}$  de largura. Essas células são envolvidas por parede celular com espessura de 0,15 a 1,1  $\mu\text{m}$ . As células subcorticais são maiores do que as células corticais, e mais vacuolizadas (Fig. 4a, d), com tamanhos variados do conteúdo

citoplasmático: 7 a 34  $\mu\text{m}$  de altura, 7 a 26,9  $\mu\text{m}$  de largura e espessamento da parede celular de 0,4 a 1,5  $\mu\text{m}$  (Fig. 4a, d).

As amostras da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui tratadas com PAR mostraram uma gama de medidas dos conteúdos citoplasmáticos, onde as células corticais apresentaram alturas variando de 2,5 a 9,7  $\mu\text{m}$ , larguras de 2,25 a 10,5  $\mu\text{m}$ , e espessamento da parede celular de 0,10 a 0,90  $\mu\text{m}$  (Fig. 4b, e). As células subcorticais mediram 6,9 a 27  $\mu\text{m}$  de altura e 6,8 a 36  $\mu\text{m}$  de largura, e a parede celular com 0,35 a 1,7  $\mu\text{m}$  de espessura (Fig. 4b, e).

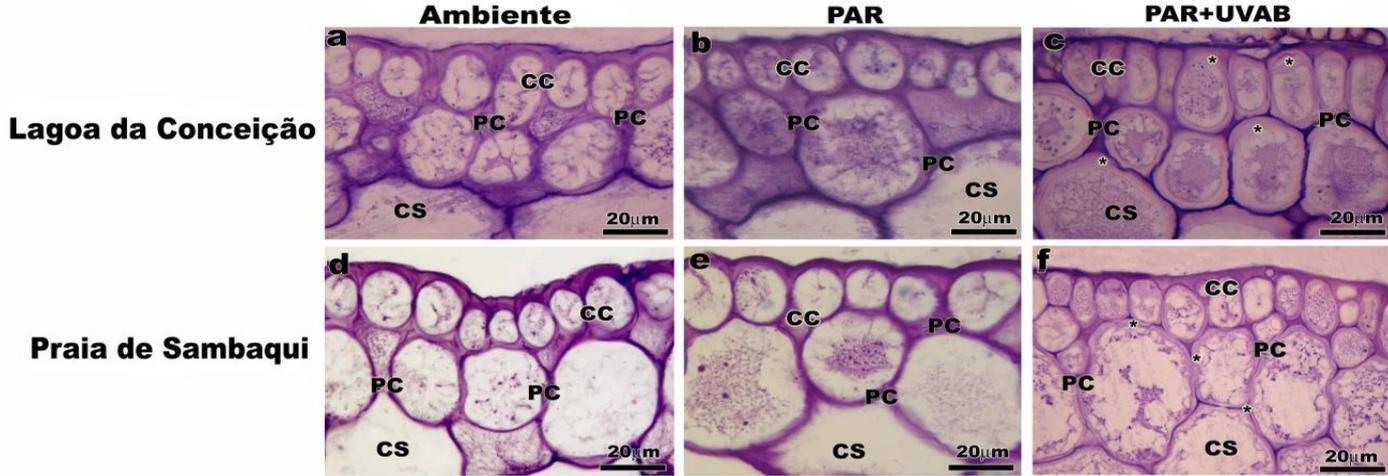
As células corticais e subcorticais das amostras de ambos os locais tratadas com PAR+UVAB apresentaram uma redução no volume citoplasmático e aumento na espessura da parede celular (Fig. 4c, f). Células corticais mediram entre 1,9 e 6,8  $\mu\text{m}$  de altura, 2,7 e 6,1  $\mu\text{m}$  de largura, e espessura da parede celular de 0,5 a 2,35  $\mu\text{m}$  (Fig. 4c, f). As células subcorticais mediram 4,4 a 19  $\mu\text{m}$  de altura e 5 a 27  $\mu\text{m}$  de largura, e espessura de parede celular de 0,6 a 4,3  $\mu\text{m}$  (Fig. 4c, f).

**Tabela 2.** Medidas de altura, largura e espessamento de parede celular de células corticais (n = 50) e subcorticais (n = 50) realizadas através de microscopia de luz e expressas em  $\mu\text{m}$ .

		<b>Tratamentos</b>		
		<b>Altura</b>	<b>Largura</b>	<b>Espessamento de Parede Celular</b>
<b>Células Corticais</b>	<b>Ambientes</b>	2,1 a 9,5	2,6 a 9,25	0,15 a 1,10
	<b>PAR</b>	2,5 a 9,7	2,25 a 10,5	0,1 a 0,90
	<b>PAR+UVAB</b>	1,9 a 6,8	2,7 a 6,1	0,5 a 2,35
<b>Células Subcorticais</b>	<b>Ambientes</b>	7,0 a 34,0	7,0 a 26,9	0,4 a 1,5
	<b>PAR</b>	6,9 a 27,0	6,8 a 36,0	0,35 a 1,7
	<b>PAR+UVAB</b>	4,4 a 19,0	5,0 a 27,0	0,6 a 4,3

### 3.5 Microscopia de Luz (ML)

Amostras dos ambientes de *A. spicifera* coradas com azul de toluidina (AT-O) apresentaram uma reação metacromática nas paredes celulares, indicando a presença de polissacáridos sulfatados, tais como agaranas (Fig. 4a, d). Amostras da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui tratadas com PAR (Fig. 4b, e) mostraram uma reação metacromática na parede celular semelhante à observada para as amostras dos ambientes. Amostras de *A. spicifera* expostas à PAR+UVAB também reagiram metacromaticamente, porém com uma menor intensidade na coloração (Fig. 4c, f) quando comparadas com os controles e expostas à PAR. Além disso, o citoplasma das células corticais e subcorticais é mais denso, com granulações metacromáticas, quando comparado com as amostras de campo e tratadas com PAR (Fig. 4c, f).

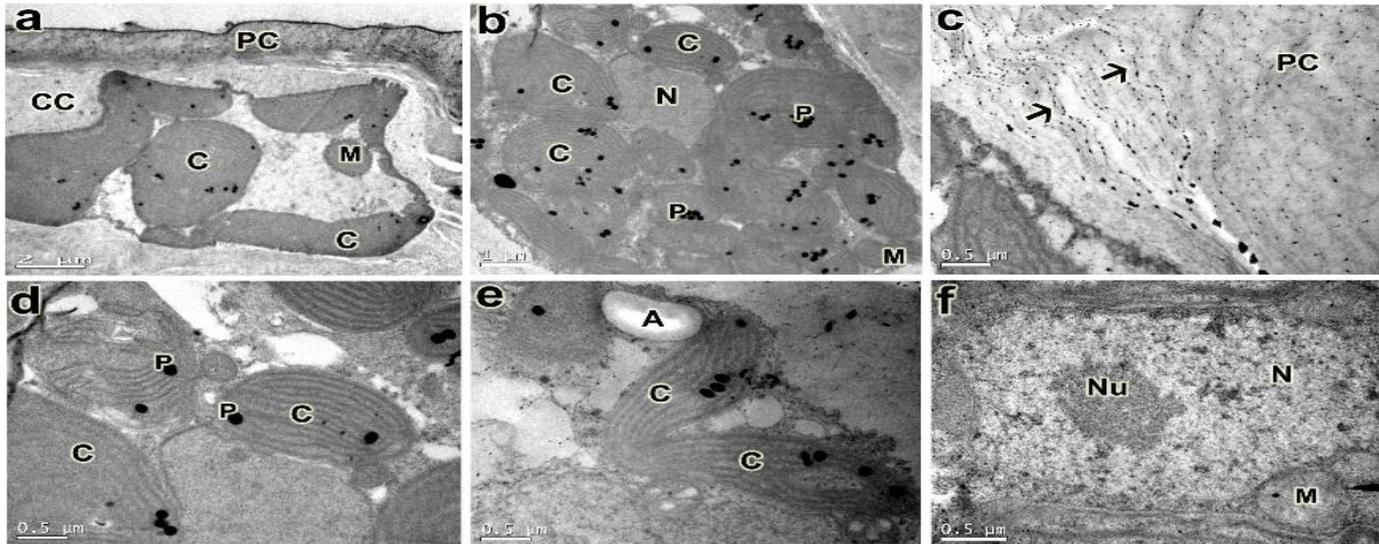


**Figura 4.** Microscopia de luz de secções transversais de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui de algas do campo (a, d), algas expostas à PAR (b, e) e algas expostas à PAR+UVAB (c, f) coradas com AT-O. (a-f) Note que a região cortical é formada por 1 a 2 camadas de células corticais (CC) e que houve reação metacromática na parede celular (PC) de células corticais (CC) e de células subcorticais (CS). **(a) (d)** Amostras ambientais com região cortical com células corticais (CC) pequenas e parede celular (PC) espessa. **(b) (e)** Amostras expostas à PAR apresentaram um menor espessamento de parede celular (PC). **(c) (f)** Perceba que células corticais (CC) e células subcorticais (CS) de amostras expostas à PAR+UVAB apresentaram redução no volume celular e aumento da espessura da parede celular (PC), observe o citoplasma mais denso de células corticais (CC) e células subcorticais (CS) e com granulações metacromáticas (asteriscos). Note uma intensidade menor na coloração metacromática na parede celular (PC).

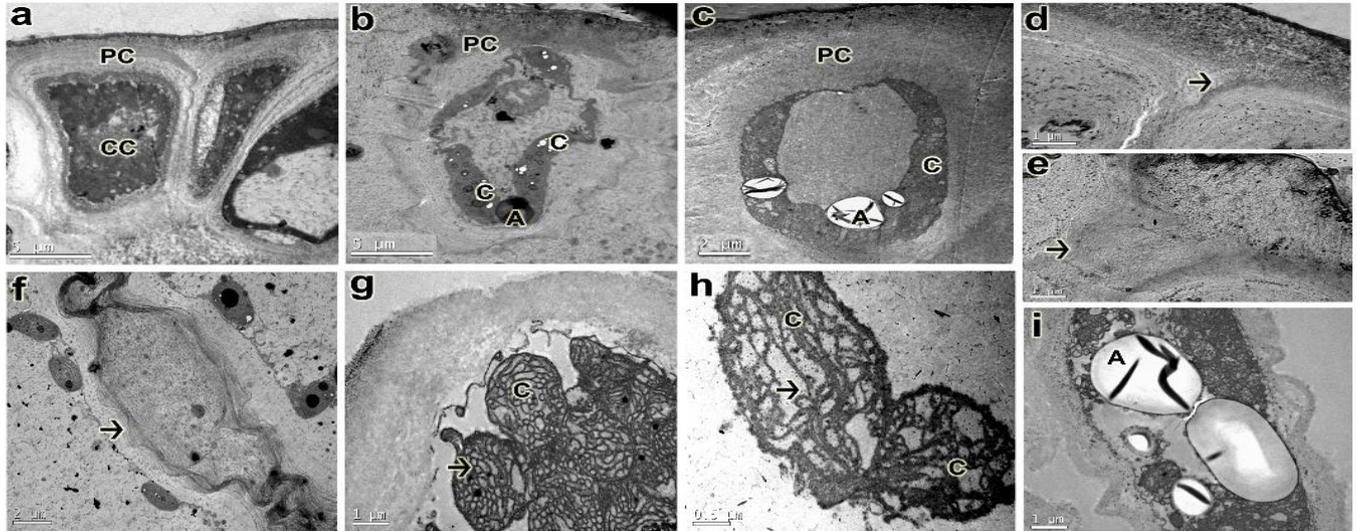
### 3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Quando observadas na MET, as amostras de *A. spicifera* dos ambientes e tratados com PAR da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui não apresentaram diferenças ultraestruturais (Fig. 5.a-f). Células corticais mostraram a presença de pequenas mitocôndrias (Fig. 5a), numerosos cloroplastos parietais (Fig. 5a), núcleo (Fig. 5b) e alguns grãos de amido (Fig. 5e). As células são envolvidas por uma parede celular espessa com microfibrilas de celulose bem organizadas (Fig. 5c). Os cloroplastos apresentaram organização interna típica de algas vermelhas, com tilacóides paralelos uniformemente espaçados (Fig. 5d, e). Plastoglóbulos, gotas lipídicas elétrondensas, foram observadas entre os tilacóides (Fig. 5b, d). Pequenas mitocôndrias presentes em associação com os cloroplastos e o núcleo também foram observadas (Fig. 5a, b, f). O núcleo e o nucléolo estavam conservados, ocupando um grande volume da célula (Fig. 5f).

Por outro lado, após a exposição à PAR+UVAB as amostras de *A. spicifera* de ambos os locais apresentaram algumas alterações ultraestruturais. Células corticais apresentaram uma forma irregular e com um aspecto mais compacto (Fig. 6a, b, c), e parede celular mais espessa com microfibrilas de celulose desorganizadas e onduladas (Fig. 6d, e, f). Além disso, os cloroplastos apresentaram mudanças visíveis na organização ultraestrutural, incluindo morfologia irregular e tilacóides interrompidos (Fig. 6g, h). Alguns grãos de amido das florídeas foram observados no citoplasma (Fig. 6i).



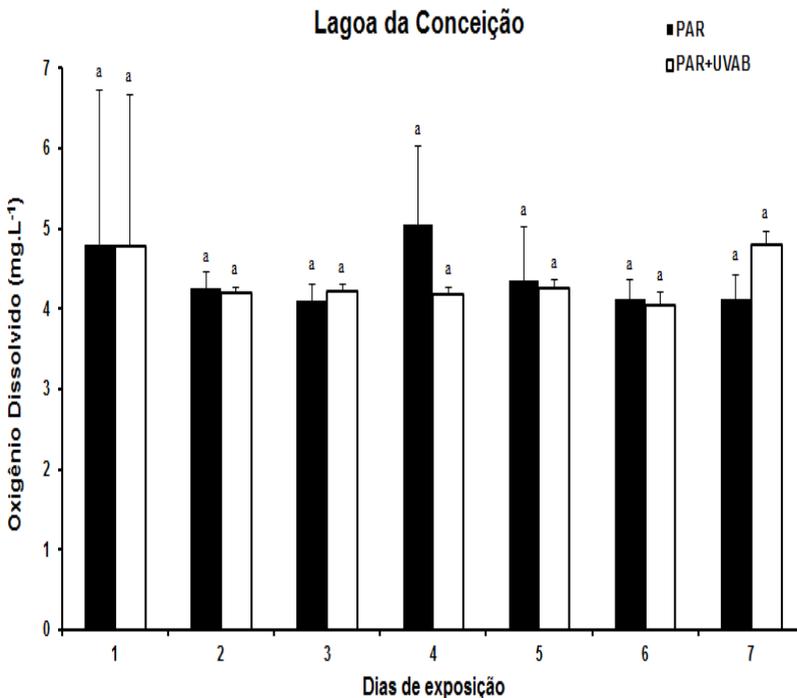
**Figura 5.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de amostras dos ambientes e tratadas com PAR de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição (**a**, **c**, **f**) e da Praia de Sambaqui (**b**, **d**, **e**). (**a**) Visão geral de uma célula cortical (CC) preenchida com organelas celulares, como cloroplastos (C) e mitocôndrias (M), envolvidas por uma parede celular (PC). (**b**) Detalhe de célula cortical (CC) com muitos cloroplastos (C) perinucleares com plastoglóbulo (P), núcleo (N) e pequenas mitocôndrias (M). (**c**) Detalhe das microfibrilas de celulose (setas) organizadas na parede celular (PC). (**d**) Cloroplastos (C) com tilacóides paralelos, e com plastoglóbulo (P). (**e**) Cloroplastos (C) e grãos de amido (A). (**f**) O núcleo interfásico (N) com nucléolo (Nu) evidente.



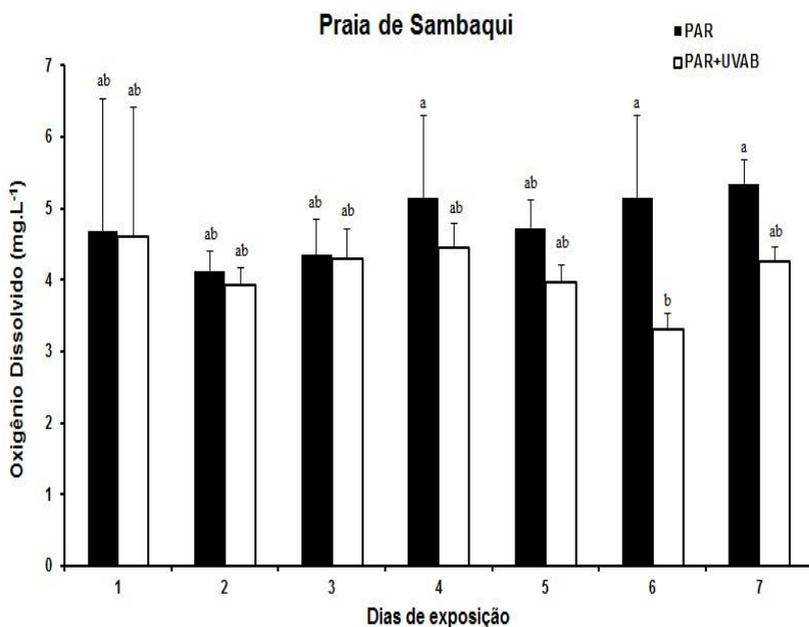
**Figura 6.** Imagens de MET de amostras de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição **(b, d, e, g)** e Praia de Sambaqui **(a, c, f, h, i)** tratadas com PAR+UVAB. **(a)** Note as células corticais (CC) mostrando parede celular (PC) com espessamento. **(b) (c)** Parede celular (PC) espessa causando deformação e redução do tamanho celular. **(c)** Note a presença de grandes grãos de amido (A) e cloroplastos (C). **(d) (e) (f)** Microfibrilas de celulose desorganizadas e onduladas da parede celular (PC) das células corticais (CC) (setas). **(g) (h)** Cloroplastos (C) com morfologia irregular e tilacóides rompidos (setas). **(i)** Células corticais com aumento de grãos de amido (A).

### 3.7 Oxigênio Dissolvido (OD)

As quantidades de OD nas águas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) das amostras de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui são apresentadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. As quantidades de OD nas amostras PAR e PAR+UVAB da Lagoa da Conceição (Fig. 7) não apresentaram diferenças estatísticas durante os dias de experimentação. Em contrapartida, as amostras da Praia de Sambaqui (Fig. 8) apresentaram algumas diferenças, onde a quantidade de OD nas amostras expostas à PAR+UVAB foram menores que nas expostas somente à PAR.



**Figura 7.** Oxigênio dissolvido na água (OD) em  $\text{mg.L}^{-1}$  de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição das amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 8$ ; média  $\pm$  DP). Letras iguais não indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 8.** Oxigênio dissolvido na água (OD) em  $\text{mg.L}^{-1}$  de *A. spicifera* da Praia de Sambaqui das amostras tratadas com PAR e PAR+UVAB por 7 dias ( $n = 8$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.8 Análises Estatísticas

**Tabela 3.** Análise estatística em ANOVA-Bifatorial, onde são mostrados o grau de liberdade (GL), índice estatístico (F) e probabilidade (*p*).

	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
<b>TC</b>			
<b>Tratamento</b>	1	32,71	0,0000
<b>Local</b>	1	59,01	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	1	2,59	0,1333
<b>Cl. a</b>			
<b>Tratamento</b>	2	64,05	0,0000
<b>Local</b>	1	3,32	0,0739
<b>Tratamento X Local</b>	2	4,13	0,0214
<b>AFC</b>			
<b>Tratamento</b>	2	57,70	0,0000
<b>Local</b>	1	31,25	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	14,11	0,0000
<b>FC</b>			
<b>Tratamento</b>	2	53,45	0,0000
<b>Local</b>	1	25,13	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	0,33	0,7186
<b>FE</b>			
<b>Tratamento</b>	2	105,82	0,0000
<b>Local</b>	1	6,43	0,0166
<b>Tratamento X Local</b>	2	2,58	0,0922
<b>MTT</b>			
<b>Tratamento</b>	2	94,71	0,0000
<b>Local</b>	1	0,10	0,7508
<b>Tratamento X Local</b>	2	5,72	0,0119
<b>OD Lagoa da Conceição</b>			
<b>Tratamento</b>	1	0,15	0,6934
<b>Dia</b>	6	2,71	0,0255
<b>Tratamento X Dia</b>	6	2,15	0,0664
<b>OD Praia de Sambaqui</b>			
<b>Tratamento</b>	1	16,68	0,0001
<b>Dia</b>	6	1,87	0,1082
<b>Tratamento X Dia</b>	6	2,21	0,0600

#### 4. DISCUSSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, os espécimes de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui (Ilha de Santa Catarina, Brasil) expostos ao tratamento PAR+UVAB mostraram alterações importantes na morfologia, organização celular e respostas fisiológicas, quando comparadas com as amostras cultivadas com PAR, indicando que a RUV, na dose e intensidade empregadas, provoca diferentes danos morfofisiológicos na referida espécie.

Os espécimes presentes na Praia de Sambaqui ocorrem, naturalmente, fixados em uma plataforma rochosa paralela à lâmina d'água e em baixa profundidade, ficando expostos ao ar em marés baixas. Por outro lado, os espécimes da Lagoa da Conceição ocorrem, predominantemente, em rochas soltas sempre submersas. Desta forma, pode-se supor que as algas da Praia de Sambaqui, regularmente expostas à maior intensidade de RUV, estariam mais adaptadas a este fator de estresse. Assim, poderia-se inferir que os espécimes presentes na Praia de Sambaqui estariam mais adaptados à RUV em condições laboratoriais. Entretanto, os espécimes provenientes da Praia de Sambaqui apresentaram maior sensibilidade à RUV, quando comparados aos coletados na Lagoa da Conceição. Portanto, podemos inferir que os espécimes da Praia de Sambaqui, apesar estarem naturalmente mais expostos à RUV, em condições de laboratório não demonstram adaptações morfofisiológicas a esta radiação. Porém, segundo a literatura, adaptações de algas bentônicas à ambientes com maior irradiância foram observadas em *Lobophora variegata*, *Dictyota spec* (Hanelt & Roleda, 2009), *Porphyra endiviifolium*, *Monostroma hariotii*, *Adenocystis utricularis* (Houvinen & Gómez, 2013), *Desmarestia menziesii* e *Ascoseira mirabilis* (Rautenberger et al., 2015), fornecendo evidências de que as algas em águas rasas respondem melhor à RUV do que aquelas encontradas em águas mais profundas, mais protegidas.

Por outro lado, os espécimes da Lagoa da Conceição, menos expostos naturalmente à radiação, apresentaram maior resistência à radiação em laboratório. Estes resultados podem ser sustentados pela absorção e assimilação de nutrientes pelas algas da Lagoa da Conceição, que devem ter sido maiores do que as observadas em algas da Praia de Sambaqui. Esta tendência está relacionada com a maior disponibilidade de nutrientes dissolvidos em amostras de água, de maneira que a assimilação anterior foi capaz de manter uma quantidade maior de

metabólitos. A água da Praia de Sambaqui mostrou altas concentrações de fosfato, potencial de N-limitação e salinidade de 37 ups, enquanto que a da Lagoa da Conceição apresentou altas concentrações de nitrogênio, sem N-limitação e salinidade de 30 ups. Níveis ambientais de nutrientes podem melhorar as quantidades de compostos de nitrogênio na água, necessários para sintetizar metabólitos, podendo beneficiar o crescimento e respostas celulares da macroalga (Chow et al., 2001; Costa, 2006; Dailer et al., 2012; Rojas et al., 2013). Experimentos com *Gracilaria lemaneiformis* (Zheng & Gao, 2009) e *Gracilaria tenuistipitata* (Barufi et al., 2011) tratadas com concentrações de nitrato e RUV sustentam esta hipótese, mostrando que quanto maior a disponibilidade do nutriente, menores os danos causados pela RUV.

As taxas de crescimento e biomassas elevadas de *A. spicifera* a partir de amostras da Lagoa Conceição podem ser suportadas pelo estado nutricional da água, como proposto por Chow (2012). Em contraste, *A. spicifera* da Praia de Sambaqui foi mais suscetível à exposição à RUVAB, na qual foi observada uma maior redução na taxa de crescimento após este tratamento. Menor disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos, como sugerido pelos parâmetros físicos e químicos da água do mar da Praia de Sambaqui, faz com que o estado inicial da alga seja menos favorável quando comparado com o estado inicial da alga proveniente da Lagoa da Conceição. Menor produção de metabólitos e, portanto, menores estoques de nitrogênio juntamente com menor disponibilidade de nutrientes na água poderiam explicar essa grande queda no crescimento.

Tem sido relatado (Cronin & Lodge, 2003; Jormalainen et al., 2003; Navarro et al., 2014; Polo et al., 2015) que macroalgas com grandes concentrações nutricionais internas (compostos inorgânicos ou orgânicos à base de nitrogênio) podem suportar condições de estresse e combate ao estresse oxidativo melhor do que espécies com limitada disponibilidade de nitrogênio. Neste sentido, as espécies de ambientes com melhores condições de nitrogênio podem melhorar a sua capacidade de tolerar o estresse e, até mesmo, gerar uma série de respostas para manter o controle sobre a homeostase biológica (Viñegla & Figueroa, 2009). Algumas respostas de *A. spicifera* expostas à PAR+UVAB forneceram provas do efeito negativo no desempenho biológico, incluindo, por exemplo, a despigmentação, a redução na formação de novos ramos, e degeneração celular, especialmente para amostras da Praia de Sambaqui. Esta última resposta pode estar

relacionada com o atraso no processo de divisão celular, resultado da formação de dímeros de pirimidina induzidos por RUV e suportados pelos baixos valores de concentração de nitrogênio na água do mar.

A viabilidade celular também foi alterada em *A. spicifera* exposta à RUV. De acordo com Berridge et al., (2005), a redução do corante de tetrazólio depende de enzimas oxidoreductase dependentes de NAD(P)H presentes no compartimento mitocondrial. Portanto, a redução de MTT e outros corantes de tetrazólio dependem da atividade metabólica celular do fluxo de NAD(P)H. Em resposta à RUV, estudos recentes mostraram que as mitocôndrias e cloroplastos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem danificar os componentes celulares (enzimas mitocondriais e membranas) inibindo a atividade metabólica celular (Nawkar et al., 2013). De acordo com Yao et al., (2004), também foi relatado que as diferentes condições de estresse causam alterações no potencial transmembranar mitocondrial (PTM) liberando citocromo *c* no citoplasma, ativando a atividade de caspase e, subsequentemente, a morte celular. Como relatado por Mittler et al., (2011), EROs são descritas como as moléculas de sinalização secundárias, além de atuar como um agente danificador de células. Sinalização mediada por EROs é um mecanismo complexo que depende da natureza da classe da espécie reativa para atingir um equilíbrio entre as enzimas produtoras de EROs e os estados de oxidação-redução de vários antioxidantes (De Tullio, 2010). Nas plantas, em resposta à RUV, níveis elevados de EROs causam danos oxidativos resultante da interrupção das atividades metabólicas e aumento da atividade da membrana onde localiza-se a NADPH-oxidase (Kalbina & Strid, 2006). Com a exposição à RUV, *A. spicifera* pode ter aumentado a produção de EROs, danificando as mitocôndrias, apresentando assim uma menor viabilidade celular. Por outro lado, uma maior viabilidade celular foi observada na amostra da Lagoa da Conceição exposta à PAR, quando comparada com o mesmo tratamento para a amostra da Praia de Sambaqui. Novamente, este resultado pode ser suportado pela quantidade de nutrientes na água deste local. Com um *pool* maior de nutrientes solúveis na água, a alga da Lagoa torna-se mais adaptada, facilitando a manutenção celular.

Os resultados do presente trabalho mostram teores de pigmentos fotossintetizantes elevados em amostras ambientais de *A. spicifera*, em comparação com todos os tratamentos de laboratório (PAR e PAR+UVAB). Maiores concentrações de pigmentos são esperados em ambientes com variáveis abióticas maiores, permitindo que as plantas

mantenham o equilíbrio de energia por meio de pigmentos acessórios, pela versatilidade de absorção de energia no espectro através destes pigmentos (Ramlov et al., 2011). Sob o tratamento PAR, observou-se uma pequena queda estatística entre as amostras dos dois pontos de coleta quando comparadas com os controles. Esta queda no teor de pigmentos deve-se à intensidade de PAR da cultura, a qual é menor que a encontrada no ambiente. Enquanto isso, amostras expostas à RUV apresentaram fortes efeitos negativos, causando modificações nos cloroplastos observadas através da MET. Essas alterações podem estar relacionadas à variação do conteúdo de pigmentos em algas de ambos os ambientes. Com a ruptura de membrana do cloroplasto, as amostras tratadas com PAR+UVAB tiveram uma redução no conteúdo de ficobiliproteínas, provavelmente associada com o processo degenerativo da biossíntese de pigmentos, a fim de manter a disponibilidade de compostos de nitrogênio para a síntese de compostos antioxidantes, como observado em *Grateloupia lanceola* (Huovinen et al., 2006), *Palmaria decipiens* (Holzinger & Lütz, 2006), *Palmaria palmata* (Holzinger & Lütz, 2006), *Phycodrys austrogeorgica* (Poppe et al., 2003) expostas à RUV. Nutrientes limitados durante todo o período experimental também podem ter causado a redução do conteúdo de pigmentos observados em ambos os locais.

A quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido em água representa a quantidade de fotossíntese que ocorre (Oliveira, 2011). Elevado O<sub>2</sub> dissolvido em água reflete melhor a qualidade da água e a maior produtividade primária (Oliveira, 2011). A variação desta molécula dissolvida na água durante os 7 dias de exposição à radiação não mostrou uma diferença significativa nas amostras da Lagoa da Conceição, afetando pouco a taxa de crescimento das amostras expostas à RUV. Por outro lado, para as amostras da Praia de Sambaqui, a quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido em água diminuiu durante o período experimental sob PAR+UVAB. Esta diminuição resultou em uma perda significativa de biomassa pela redução na taxa de crescimento. Para este trabalho, não foi possível estabelecer uma correlação entre a quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido e o nível de nutrientes nos dois ambientes, porque as quantidades de O<sub>2</sub> dissolvido eram praticamente as mesmas nas algas dos dois locais, variando de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> a 5,5 mg.L<sup>-1</sup>.

A morfologia interna de *A. spicifera* tratada com PAR+UVAB foi alterada em comparação com as amostras controles e as tratadas com PAR, apresentando um contorno irregular de células corticais e subcorticais, e um aumento na espessura da parede celular. As paredes

celulares de *A. spicifera* dos ambientes, cultivadas com PAR e com PAR+UVAB reagiram metacromaticamente à coloração AT-O, indicando a presença de polissacáridos sulfatados. Porém, a intensidade da coloração foi mais fraca para as amostras expostas à RUV, mostrando que a síntese deste composto de interesse deve ter diminuído. Quando analisada na MET, amostras da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui expostas à PAR+UVAB revelaram aumento da espessura da parede celular. Este aumento pode ser interpretado como um mecanismo de defesa física contra a exposição à RUV, sem a produção da agarana.

Quando observados na MET, os cloroplastos das amostras de *A. spicifera* dos ambientes e expostas à PAR assumiram uma organização interna típica de algas vermelhas. Em contraste, os cloroplastos de células expostas à PAR+UVAB mostraram alterações estruturais significativas, incluindo a morfologia irregular e interrupção dos tilacóides. Estas mudanças em *A. spicifera* podem ser resultado do efeito tóxico da RUV, um fenômeno que promove uma condição de tensão que resulta na formação de EROs (Hollósy, 2002; Yannarelli et al., 2006), causando a peroxidação (Neil et al., 2002) e a desestabilização das membranas dos tilacóides (Hollósy, 2002) e conduzindo, por sua vez, a uma redução das taxas de crescimento e dos conteúdos de pigmentos fotossintetizantes.

Algas dos ambientes e expostas à PAR apresentaram presença de plastoglóbulos, gotas lipídicas elétrondensas nos cloroplastos. Sob condições desfavoráveis, compostos celulares são degradados e agrupados nos plastoglóbulos para não desestabilizarem os tilacóides (Bréhélin et al., 2007). A diminuição da intensidade de PAR no laboratório e a RUV presente normalmente no ambiente podem ser a causa da formação desses plastoglóbulos. Essas gotas lipídicas, típicas de algas em estresse, não foram observadas sob MET nas amostras expostas à PAR+RUVAB. Essa ausência pode ter ocorrido, pois eles já foram degradados como fonte de moléculas utilizadas no sistema de defesa, como carbono para ativação do sistema antioxidante a fim de proteger as células contra danos da RUV (Polo et al., 2015).

## 5. REFERÊNCIAS

Aguilera, J., U. Karsten, H. Lippert, B. Vögele, E. Philipp, D. Hanelt, C. Wiencke (1999) Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 191, 109-119

Algalbase. *Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen. Disponível em: [http://www.algalbase.org/search/species/detail/?species\\_id=3309](http://www.algalbase.org/search/species/detail/?species_id=3309)  
Acessado em 02 de março de 2015.

Barufi, J. B., N. Korbee, M. C. Oliveira, F. L. Figueroa (2011) Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. App. Phycol.*, 23(3), 457-466.

Beisert, S., R. D. Granstein (1996) UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 31(5-6), 381-404.

Berridge, M. V., P. M. Herst, A. S. Tan (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127-152.

Bischof, K., D. Hanelt, C. Wiencke (2000) Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions marine macroalgae. *Planta*, 211, 555-562.

Bouzon, Z. L. (1993) Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta). Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Bréhélin, C., F. Kessler, K. J. van Wijk (2007) Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci.*, 12(6), 260-266.

Celis-Plá, P., N. Korbee, A. Gómez-Garreta, F. L. Figueroa (2014) Seasonal acclimation patterns in the intertidal macroalga *Cystoseira tamariscifolia* (Ochrophyta). *Sci. Mar.*, 78(3), 377-388.

Chow, F., J. Maxxiavello, S. S. Cruz, E. Fonck, J. Olivares (2001) Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta: Gracilariaceae) as a

biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. *J. World Aquac. Soc.*, 32, 2515-220.

Chow, F. (2012) Nitrate assimilation: the role of in vitro nitrate reductase assay as nutritional predictor. *Agric. and Biol. Sci., Appl. photosynthesis*, In Tech: 105-120.

Costa, V. M. F. (2006) Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{2-}$ ) provenientes da carcinocultura. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Costa, L. B. (2014) Efeito da radiação UV-B na interação *Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* em morangueiro e do ácido 4-aminobenzóico no controle do patógeno em tabaco. Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP.

Cronin, G., D. M. Lodge (2003) Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia*, 137, 32–41.

Dailer, M. L., J. E. Smith, C. E. Smith (2012) Responses of bloom forming and non-bloom forming macroalgae to nutrient enrichment in Hawai'i, USA. *Harmful Algae*, 17, 111–125.

Dayong, S. H. I., G. U. O Shuju, F. A. N. Xiao (2011) A new ketosteroid from red alga *Acanthophora spicifera*. *Chin. J. Ocean. Limnol.*, 29(3), 674-678.

De Laat, A., M. Tilburg, J. C. Leun, W. A. Vloten, F. R. Gruijl (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem. Photobiol.*, 63(4), 492-497.

De Tullio, M. C (2010) Antioxidants and redox regulation: Changing notions in a changing world. *Plant Physiol. Biochem.*, 48: 289–291.

Diffey, B. L. (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.

Duarte, M. E., J. P. Cauduro, D. G. Nosedá, M. D. Nosedá, A. G. Gonçalves, C. A. Pujol, E. B. Damonte, A. S. Cerezo (2004) The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.*, 339, 335-347.

Fialho, F. A. N. (2013) Aquicultura integrada multitrófica: biofiltros de macroalgas no cultivo do robalo flecha. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figueroa, F. L., B. Domínguez-González, N. Korbee (2014) Vulnerability and acclimation to increased UVB radiation in three intertidal macroalgae of different morpho-functional groups. *Mar. Environ. Res.*, 101, 8-21.

Ganesan, P., S. Chandini, N. Bhaskar (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.*, 99, 2717–2723.

Gordon E. M., E. L. McCandless (1973) Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. *N. S. Inst. Sci.*, 27, 111-133.

Häder, D. P., H. D. Kumar, R. C. Smith (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate changes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 267–285.

Hanelt, D., M. Y. Roleda (2009) UVB radiation may ameliorate photoinhibition in specific shallow-water tropical marine macrophytes. *Aqua. Bot.*, 91(1), 6-12.

Heo, S. J., S. Ko, S. Kang, S. Cha, S. Lee, D. Kang, W. Jung, A. Affan, C. Oh, Y. Jeon (2010) Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1355–1361.

Hiscox, J. D., G. F. Israelstam (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, 57, 1332-

1334.

Hollósy, F. (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33, 179-197.

Holzinger, A., C. Lütz (2006) Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37, 190-207.

Horn, R. A. (2012) The effect of *litopenaeus stylirostris* aquaculture on macroalgae growth in opunohu Bay, moorea, French polynesia. *Stud. Res. Papers*, 1,1-12.

Huovinen, P., J. Matos, I. Sousa-Pinto, F. L. Figueroa (2006) The role of nitrogen in photoprotection against high irradiance in the Mediterranean red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic. Bot.*, 84, 208-316.

Huovinen, P., I. Gómez (2013) Photosynthetic characteristics and UV stress tolerance of Antarctic seaweeds along the depth gradient. *Polar Biol.*, 36(9), 1319-1332.

IPCC (2013) Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. IPCC Working Group I Contribution to AR5. WHO and UNEP. 1535p.*

Jormalainen, V., T. Honkanen, R. Koivikko, J. Eränen (2003) Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? *Oikos*, 103, 640-650.

Kalbina, I., A. Strid (2006) The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 29, 1783-1793.

Karentz, D., L. H. Lutze (1990) Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol. Oceanol.*, 35, 549-561.

Karsten, U., C. Wiencke (1999) Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red

alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant Physiol.*, 155, 407-415.

Kilar, J. A., J. McLachlan (1986) Ecological studies of the alga, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borg. (Ceramiales: Rhodophyta): vegetative fragmentation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 104, 1-21.

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

Lang, K. L. (2006) Investigação Química E Biológica Da Alga Vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.

Lavakumar, V., K. F. H. Ahamed, V. Ravichandran (2012) Anticancer and antioxidant effect of *Acanthophora spicifera* against EAC induced carcinoma in mice. *J. Pharm. Res.*, 5, 1503–1507.

Mc Cully, M. E. (1970) The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Ann. NY Acad. Sci.*, 175, 702-711.

Mendes, L. F., L. Zambotti-Villela, P. Colepicolo, E. Marinho-Soriano, C. V. Stevani, N. S. Yokoya (2013) Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingenses* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. *J. Appl. Phycol.*, 25, 1939-1947.

Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaey, F. Van Breusegem (2011) ROS signalling: The new wave? *Trends Plant Sci.*, 16, 300–309.

Navarro, N. P., A. Mansilla, F. L. Figueroa, N. Korbee, J. Jofre, E. Plastino (2014) Short-term effects of solar UV radiation and NO<sub>3</sub>-supply on the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under spring ozone depletion in the sub-Antarctic region. *Chile. Bot. Marina*, 57(1), 9-20.

Nawkar, G. M., P. Maibam, J. H. Park, V. P. Sahi, S. Y. Lee, C. H. Kang (2013) UV-Induced Cell Death in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 1608-1628.

- Neill, S. J., R. Desikan, A. Clarke, R.D. Hurst, J.T. Hancock (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.*, 53(372), 1237-1247.
- Okuno, E., T. Nakajima, E. M. Yoshimura, F. Hiodo, A. M. F. Fausto, W. S. Paes, N. K. Umisedo, E. S. Otsubo (1996) Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Pásqua. *RBE. Cad. Eng. Biom.*, 12, 143-153.
- Oliveira, L. R. (2011) Avaliação de um método para realização de medidas locais num sistema hídrico aberto. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Uberlândia.
- Pavia, H., B. T. Gunilla (1997) Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, 81, 3212–3225.
- Penniman, C. A., A. C. Mathieson, C. E. Penniman (1986) Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahien* McLachlan (Gigartiales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Bot. Mar.*, 29, 147-154.
- Pereira, D. T., E. C. Schmidt, Z. L. Bouzon, L. C. Ouriques (2014) The effects of ultraviolet radiation-B response on the morphology, ultrastructure, and photosynthetic pigments of *Laurencia catarinensis* and *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta): a comparative study. *J. Appl. Phycol.*, 26, 2443-2452.
- Pérez Rodríguez, E., I. Gómez, F. L. Figueroa (1998) Effects of UV radiation on photosynthesis and excretion of UV-absorbing pigments of *Dasycladus vermicularis* (Chlorophyta, Dasycladales) from Southern Spain. *Phycologia*, 37, 379-387.
- Polo, L. K., M. R. Feliz, M. Kreusch, D. T. Pereira, G. B. Costa, C. Siminoni, L. C. Ouriques, F. Chow, F. Ramlov, M. Maraschin, Z. L. Bouzon, E. C. Schmidt (2014) Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum Cymosum* to the combined influence of UV

radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *J. Photochem. Photobiol.*, 90, 560-573.

Polo, L. K., M. R. L. Felix, M. Kreuzsch, D. T. Pereira, G. B. Costa, C. Simioni, R. P. Martins, A. Latini, E. S. I. Floh, F. Chow, F. Ramlov, M. Maraschin, Z. L. Bouzon, É. C. Schmidt (2015) Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. *J. Appl. Phycol.*, 27, 887–899.

Poppe, F., R. A. Schmidt, D. Hanelt, C. Wiencke (2003) Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.*, 51(1), 11-19.

Pueschel, C. M. (1979) Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 15, 409-424.

Ramlov, F., J. M. C. Souza, A. V. F. Faria, M. Maraschin, P. A. Horta, N. S. Yokoya (2011) Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Braz. J. Pharmacog.*, 21, 255-261.

Rautenberger, R., P. Huovinen, I. Gómez (2015) Effects of increased seawater temperature on UV tolerance of Antarctic marine macroalgae. *Mar. Biol.*, 162(5), 1087-1097.

Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 17, 208.

Rojas, M. O. A. I., J. J. G. C. Neto, R. Barbieri, L. F. S. Siqueiraos (2013) Avaliação físico-química da água da Laguna da Jansen, São Luis, MA. *Acta Technol.*, 8, 19-24.

Roleda, M. Y., D. Hanelt, G. Kräbs, C. Wiencke (2004) Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycology*, 43, 603-613.

Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blandschun, J. Wenk (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.*, 378(11), 1247-1258.

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

Schmidt, E. C., M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2010) Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. *Hidrobiologia*, 649, 171-182.

Schubert, N., E. García-Mendoza, S. Enríquez (2011) Is the photo-acclimatory response of Rhodophyta conditioned by the species carotenoid profile? *Limnol. Oceanogr.*, 56, 2347-2361.

Seenivasan, R., M. Rekha, H. Indu, S. Geetha (2012) Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from Mandapam Coast, India. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(10), 159-169.

Silva, T. H. B., W. Bettioli, L. B. Costa, M. A.B. Morandi (2012) Efeito da radiação ultravioleta-B sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* e colonização em discos de morango. 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2012.

Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26, 31-43.

Stolarski, R. S. (1988) The Antarctic ozone hole. *Sci. Am.*, 258(1), 30-36.

Viñegla B., F. L. Figueroa (2009) Effect of solar and artificial UV radiation on photosynthetic performance and carbonic anhydrase activity in intertidal macroalgae from southern Spain. *Cienc. Mar.*, 35, 59-74.

Wang, C., W. Mingyan, S. Jingyu, L. Du, Z. Longmei (1998) Research

on the chemical constituents of *Acanthophora spicifera* in the South China Sea. *Chin. J. Magn. Reson.*, 15, 237-242.

Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144, 307–313.

Wiencke, C., I. Gómez, H. Pakker, A. Flores-Moya, M. Altamirano, T. D. Hanelt, F. K. Bischof, F. L. Figueroa (2000) Impact of UV radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA on algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 197, 217–219.

Yannarelli, G. G., G. O. Noriega, A. Batlle, M. L. Tomaro (2006) Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta*, 224(5), 1154-1162.

Yao, N., B. J. Eisfelder, J. Marvin, J. T. Greenberg (2004) The mitochondrion-an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 40, 596–610.

Zakaria, N. A., I. Darah, F. S. Shaida, N. A. Supardy (2011) Phytochemical composition and antibacterial potential of hexane extract from malaysian red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. *World Appl. Sci. J.*, 15, 496-501.

Zeng, L. M., W. Chao-Jie, S. Jing-Yu, L. Du, O. Noel, L. Yang, L. Nan, Z. Qi-Tai (2001) Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese. J. Chem.*, 19, 1097-1100.

Zheng, Y., K. Gao (2009) Impacts of solar UV radiation on the photosynthesis, growth and UV-absorbing compounds in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different nitrate concentrations. *J. Phycol.*, 45, 314-323.

### CAPÍTULO III

## **RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DA MACROALGA VERMELHA *Acanthophora spicifera* PROVENIENTE DA LAGOA DA CONCEIÇÃO E DA PRAIA DE SAMBAQUI SUBMETIDA À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-A E ULTRAVIOLETA-B**

### **1. INTRODUÇÃO**

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética que está dividido e designado de acordo com o comprimento de onda, podendo ser radiação ultravioleta (RUV) (100-400nm), visível (PAR) (400-780nm) ou infravermelho (RI) (>780 nm) (Diffey, 2002). A distribuição destas radiações eletromagnéticas na superfície da Terra ocorre de forma irregular, sendo 56 % da radiação incidente na Terra de RI, 39 % de PAR e 5 % de RUV (Balogh et al., 2011). A RUV é a que menos atinge a superfície terrestre, mas é a radiação mais prejudicial aos organismos. Esta radiação é subdividida em três regiões espectrais diferentes: UVA (400-320 nm), UVB (320-280 nm) e UVC (280-100 nm). A radiação UVA (RUVA) está mais próxima do espectro visível, e não é atenuada pela camada de ozônio (O<sub>3</sub>). A radiação UVB (RUVB) é atenuada em partes pelo O<sub>3</sub>, mas o que chega à superfície terrestre é prejudicial aos organismos vivos e pode causar danos no DNA. A radiação UVC (RUV) é extremamente prejudicial aos organismos, porém ela é completamente atenuada pelo O<sub>3</sub> (De Laat et al., 1996; Scharffetter-Kochanek et al., 1997).

Devido à redução de O<sub>3</sub> estratosférico, ocorre um aumento da exposição à radiação na superfície da Terra, especialmente de RUVB, resultando em uma intensidade de radiação prejudicial. Altas doses e intensidades de RUV podem causar alterações nas macroalgas, tais como: na taxa de crescimento (Navarro et al., 2010; Pereira et al., 2014; Simioni et al., 2014; Zhao & Li, 2014), no desempenho fotossintético (Aguilera et al., 1999; Polo et al., 2014), no teor de pigmentos (Roleda et al., 2004; Navarro et al., 2010; Schmidt et al., 2010; Borderie et al., 2011; Polo et al., 2014), na organização ultraestrutural (Poppe et al., 2003; Holzinger & Lütz 2006; Schmidt et al., 2009) e lesões no DNA (Mitchell et al., 1992; Bischof et al., 2002; Heo et al., 2010). Danos no DNA podem afetar a expressão de proteínas importantes, como a RuBisCO (Fukuyama et al., 2012; Recuenco-Muñoz et al., 2015).

Dentre as estratégias produzidas pelas macroalgas para contornar os efeitos aos níveis elevados de RUV estão a síntese e acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporina (MAAs), carotenoides e fenólicos (Falkowski & Raven, 1997; Simioni et al., 2014), que direta ou indiretamente absorvem energia da RUV (Karsten & Wiencke, 1999). MAAs são compostos nitrogenados solúveis em água e em grande parte encontrados em organismos de água doce e salgada (Barufi et al., 2011). Estes compostos são fortemente estudados, pois possuem a capacidade de fotoproteção contra RUVB e RUVA (Barufi et al., 2011; Rastogi & Incharoensakdi, 2013). Os carotenoides são pigmentos secundários que têm sido utilizados como um aditivo alimentar, sob a forma de corantes e vitaminas, e também nas indústrias cosmética e farmacêutica por conta da sua proteção contra os radicais livres (Fré et al., 2014). Já os compostos fenólicos, os quais também são antioxidantes (Borges et al., 2011), estão envolvidos na proteção do talo contra a exposição direta à radiação da luz solar, em especial à RUV, como observado nas algas pardas *Ascophyllum* (Pavia & Gunilla, 1997) e *Sargassum cymosum* (Polo et al., 2014).

*Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen é uma macroalga vermelha pertencente à classe Rhodophyceae, ordem Ceramiales e família Rhodomelaceae. As algas desta classe são eucariontes com ficobiliproteínas, clorofila *a* e grão de amido, substância de reserva, também conhecido como "amido das florídeas" (Lang, 2006). Esta espécie é nativa da Flórida e do Caribe e é cultivada para consumo humano devido seus altos valores nutricionais (Horn, 2012). No Brasil, esta espécie ocorre a partir do Estado do Maranhão ao Rio Grande do Sul (AlgaBase- [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). *A. spicifera* é facilmente encontrada em regiões de mar calmo, águas rasas e bancos rochosos. Normalmente está ligada a substratos duros, como rochas, ou flutuante, devido à sua frágil constituição (Wang et al., 1998; Fialho, 2013).

A espécie é utilizada para consumo humano, em países asiáticos (Zakaria et al., 2011; Horn, 2012), e nos ecossistemas marinhos como parte da dieta de peixes, ouriços, caranguejos e tartarugas marinhas (Lang, 2006). Também tem sido utilizada em pesquisas pela indústria farmacêutica por conta da presença de compostos bioativos (Wang et al., 1998; Zeng et al., 2001; Lang, 2006) com ação antibacteriana, antioxidante, antiviral, antitumoral e anti-incrustantes (Zeng et al., 2001; Duarte et al., 2004; Lang, 2006; Ganesan et al., 2008; Dayong et al., 2011; Lavakumar et al., 2012; Seenivasan et al., 2012).

Para tentar entender o efeito do fator estressor, RUV, sobre alguns aspectos fisiológicos da alga vermelha *A. spicifera* proveniente de dois diferentes ambientes, com condições abióticas distintas, este estudo investigou o efeito combinado *in vitro* destes fatores sobre as concentrações de carotenoides, de MAAs, compostos fenólicos, ação antioxidante através da capacidade de eliminação do radical livre DPPH, e concentrações totais de proteína, açúcares solúveis e amido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Pontos de Coleta; Coleta e Processamento do Material Biológico; Condições de Cultivo

Vide itens 3.1; 3.2 e 3.3 do capítulo I (páginas 9 a 12).

### 2.2 Extração e Quantificação de Carotenoides

As amostras foram preparadas segundo Aman et al., (2005), com modificações. As amostras foram dessalinizadas com formiato de amônio 0,5 M por 30 seg, seguida por duas lavagens com água destilada. As amostras de 1 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100 mg.L<sup>-1</sup> de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras ficaram em repouso (1 h) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub> gasoso. O extrato foi ressuspense em 3 mL de hexano. Aliquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm Ø interno), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 dm) e detector espectrofotométrico UV-visível (UV-vis) operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol:acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina, β e α-caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A concentração de carotenoides foi expressa em µg por g de massa seca, sendo que os valores apresentados correspondem a média de 3 injeções por amostra.

### 2.3 Extração e Quantificação de Aminoácidos Tipo Micosporinas (MAAs)

As amostras foram preparadas no Departamento de Ecologia e Geologia da Universidade de Málaga, Espanha, segundo Figueroa et al., (2014). Amostras de 100 mg (massa fresca) dos ambientes e tratados foram secas em sacos plásticos contendo sílica. As amostras secas foram inseridas em tubos eppendorf e os MAAs extraídos em 1 mL de metanol 20 %, sonicados por 5 min e incubados por 2 h a 45 °C. Aliquotas de 600 µL dos extratos foram transferidas para novos tubos, e o conteúdo líquido dos tubos removido por meio de uma microcentrífuga a vácuo. A esse resíduo sólido foram adicionados 600 µL de metanol 100 % para

cromatografia, misturados por agitação em vórtex e centrifugados a 1300 g, 4 °C por 10 min. 100 µL de sobrenadante desse extrato foram transferidos para os tubos de vidro de sistema Waters (Barcelona, Spain) de HPLC.

O volume de 30 µL das amostras foi injetado em fluxo isocrático de fase móvel filtrada e desgaseificada composta por metanol a 2,5 % e ácido acético a 0,1 %. Essa fase móvel foi bombeada num fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> através da fase fixa, uma coluna C8 (Spheroclone Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) de 5 µm de diâmetro, com tamanho de 250X4,6 mm. Uma pré-coluna (Phenomenex, Alemanha) foi utilizada para filtrar as amostras antes que as mesmas passassem pela coluna. O tempo de eluição de cada amostra foi de 25 min.

As amostras foram detectadas por meio de um diodo UV-visível (Photodiode Array Detector 996). A cada seg foram tomados dados de absorbância para cada comprimento de onda entre 290 e 400 nm. Ao final, um cromatograma selecionado para a absorbância 330 nm foi obtido e os picos observados foram identificados de acordo com o espectro e os tempos de retenção, comparando-se com um padrão de *Porphyra*. Os dados foram recolhidos e analisados pelo programa Millennium 3.2, a partir do valor da área dos picos presentes em cada cromatograma (relacionados a cada uma das micosporinas ou o seu total) e também dos coeficientes de extinção molar. A concentração de MAAs foi expressa em mg por g de massa seca, sendo que os valores apresentados correspondem a média de 3 injeções por amostra.

## 2.4 Extração e Dosagem de Fenólicos Totais

Amostras foram dessalinizadas com formiato de amônio 0,5 M por 30 seg, seguidas por duas lavagens com água destilada. As amostras de 1 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em 10 mL da solução de metanol 80 %. Após a maceração, foram mantidas em repouso (1 h) em câmara escura e em seguida, filtradas sob vácuo. A análise dos compostos fenólicos foi realizada usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu baseado em Waterman & Mole (1994). Alíquotas de 50 µL provenientes do sobrenadante dos extratos foram adicionadas a uma solução concentrada de 180 µL de água destilada, 10 µL do reativo Folin-Ciocalteu (Vetec) e 30 µL de carbonato de sódio a 20 % (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, p/v), e incubados durante 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a leitura a 750 nm em leitor de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, China). A

quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico ( $50$  a  $1250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,0004x$ ). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por g de massa seca.

### **2.5 Inibição do Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

Uma alíquota de  $250 \mu\text{L}$  da solução metanólica do radical DPPH (Sigma,  $0,1 \text{ mM}$  em metanol  $80 \%$ ) foi acrescida a  $50 \mu\text{L}$  da amostra preparada conforme descrito no item 2.4. O decréscimo da absorbância em  $530 \text{ nm}$  foi medido em leitor de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, China) após  $30 \text{ min}$  de incubação da amostra, de acordo com Kim et al., (2002). As amostras foram analisadas em triplicata e expressas em  $\%$  de sequestro do radical livre DPPH.

### **2.6 Extração e Dosagem de Proteínas Solúveis Totais**

Amostras foram primeiramente dessalinizadas com formiato de amônio  $0,5 \text{ M}$  por  $30 \text{ seg}$ , seguidas por duas lavagens com água destilada. A extração foi realizada através da trituração de  $1\text{g}$  (massa fresca) de amostra em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão de extração ( $50 \text{ mM}$  tampão fosfato;  $\text{pH } 7$ ;  $1 \text{ mM}$  EDTA;  $1 \text{ mM}$  DTT;  $1 \text{ mM}$  PMSF;  $1 \%$  PVP) na proporção de  $1 \text{ g}$  de massa fresca para  $2 \text{ mL}$  de tampão. A solução foi centrifugada ( $4000 \text{ rpm}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por  $30 \text{ min}$ . A leitura ocorreu em microplacas (Tp Reader; Thermoplate, China) em  $595 \text{ nm}$ , após a adição de solução de Coomassie Blue (Sigma), segundo o método de Bradford (1976). A concentração proteica foi determinada em triplicata com a utilização de curva padrão externa, utilizando-se soro albumina bovina (BSA, Sigma) como padrão ( $2$  a  $10 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,035x$ ). Os resultados foram expressos em  $\text{mg}$  de proteína por g de massa seca.

### **2.7 Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais**

Amostras foram dessalinizadas com formiato de amônio  $0,5 \text{ M}$  por  $30 \text{ seg}$ , seguidas por duas lavagens com água destilada. As amostras de  $1 \text{ g}$  (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas com  $2 \text{ mL}$  da solução MCW (metanol:clorofórmio:água) ( $12:5:3$ , v/v). A solução foi centrifugada ( $4000 \text{ rpm}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por  $5 \text{ min}$ , o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com  $2 \text{ mL}$  da solução de MCW ( $5 \text{ min}$ ,  $4000 \text{ rpm}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados  $1 \text{ mL}$  de clorofórmio e  $1,5 \text{ mL}$  de água, e o extrato foi novamente centrifugado. A fase superior dos extratos foi

coletada, de acordo com a metodologia de Shannon (1968). A dosagem foi realizada com o método de Umbreit & Burris (1964) utilizando-se reagente atrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), agitando em vórtex e aquecendo em banho-maria a 100 °C por 3 min.. A leitura das amostras ocorreu a 630 nm em leitor de microplacas. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi a partir da curva padrão de glucose (1 a 200 µg. mL<sup>-1</sup>-  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,008x$ ). As análises foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em mg de glucose por g de massa seca.

## **2.8 Extração e Dosagem de Amido**

Ao resíduo da centrifugação do extrato estabelecido conforme o item 2.7, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 4 °C) por 5 min, o sobrenadante coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 min, 4000 rpm a 4 °C). Os sobrenadantes foram reunidos, de acordo com a metodologia descrita por McCready et al., (1950). 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, sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100 °C por 3 min. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em leitor de microplacas. A quantificação dos amidos totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 7,5 µg.mL<sup>-1</sup>-  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,341x$ ). As análises foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em mg de glucose por g de massa seca.

## **2.9 Análise dos Dados**

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) Bifatorial, seguida do teste a posteriori de Tukey para verificar as significâncias das diferenças ( $p \leq 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas no Programa Statistica (versão 7.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Perfil Carotenóidico

A quantidade de carotenoides presentes em *A. spicifera* (amostras ambientais, tratamentos com PAR e com PAR+UVAB) está expressa na Tabela 1. A análise cromatográfica permitiu a identificação dos seguintes carotenoides: luteína, zeaxantina, um composto não identificado (tempo de retenção (Tr) em 5,5 min) e  $\alpha$ -caroteno. O composto Tr 5,5 não foi identificado na amostra ambiental da Lagoa da Conceição, e o  $\alpha$ -caroteno não foi identificado na amostra da Praia de Sambaqui exposta à PAR+UVAB.

Dentre as amostras da Lagoa da Conceição observou-se concentrações decrescentes de carotenoides, 27,32 mg.g<sup>-1</sup> de massa seca (MS) para amostra ambiental, 23,97 mg.g<sup>-1</sup> de MS para amostra exposta à PAR, e 15,62 mg.g<sup>-1</sup> de MS para amostra exposta à PAR+UVAB. Por outro lado, a amostra da Praia de Sambaqui exposta à PAR mostrou um pequeno aumento no teor de carotenoides (19,05 mg.g<sup>-1</sup> de MS) em comparação com amostra ambiental (18,59 mg.g<sup>-1</sup> de MS) e redução nas algas expostas à PAR+UVAB (14,55 mg.g<sup>-1</sup> de MS).

Percebe-se uma diferença inicial na quantidade de carotenoides nas algas dos dois ambientes, onde a alga proveniente da Lagoa da Conceição apresentou uma maior quantidade inicial de carotenoides (27,32 mg.g<sup>-1</sup> MS) quando comparada com a alga proveniente da Praia de Sambaqui (18,59 mg.g<sup>-1</sup> de MS).

**Tabela 1.** Conteúdo de carotenoides (mg.g<sup>-1</sup> de massa seca) (luteína, zeaxantina, Tr (tempo de retenção) 5.5 minutos,  $\alpha$ -caroteno e carotenoides totais (soma de todos os carotenóides identificados)) de *A. spicifera* de amostras ambientais e amostras tratadas da Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui após 7 dias com exposição à PAR e à PAR+UVAB (n = 3; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Asteriscos (\*): presença não verificada.

		<b>Tratamentos</b>				
		<b>Luteína</b>	<b>Zeaxantina</b>	<b>Tr 5.5</b>	<b><math>\alpha</math>-caroteno</b>	<b>Total Carotenoides</b>
<b>Lagoa da Conceição</b>	<b>Ambiente</b>	3,76 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	7,93 $\pm$ 1,44 <sup>c</sup>	*	15,63 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup>	27,32
	<b>PAR</b>	1,76 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	5,79 $\pm$ 0,60 <sup>d</sup>	0,25 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	16,17 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	23,97
	<b>PAR+UVAB</b>	0,79 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	8,81 $\pm$ 0,47 <sup>bc</sup>	4,43 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1,59 $\pm$ 0,19 <sup>bc</sup>	15,62
<b>Praia de Sambaqui</b>	<b>Ambiente</b>	3,94 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	10,20 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	2,43 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,02 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup>	18,59
	<b>PAR</b>	1,68 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	11,28 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	2,71 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	3,38 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	19,05
	<b>PAR+UVAB</b>	2,39 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	7,46 $\pm$ 0,41 <sup>cd</sup>	4,70 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	*	14,55

### 3.2 Aminoácidos Tipo micosporina (MAAs)

Cinco tipos de MAAs foram identificados em *A. spicifera*: asterina, palitina, palitinol, *Porphyra*-334 e shinorina (Tab. 2). Os MAAs palitina, palitinol e shinorina ocorreram em todas as amostras. Enquanto que asterina e *Porphyra*-334 não foram encontrados nas amostras da Lagoa da Conceição expostas à PAR+UVAB. Os conteúdos dos cinco tipos de MAAs identificados mostraram flutuações, mas com nenhuma tendência clara para as diferentes amostras. Entretanto, percebeu-se, para ambos os locais, um decréscimo no total de MAAs das algas expostas à PAR, seguido de um maior decréscimo nas expostas à PAR+UVAB, quando comparadas com os controles. Após 7 dias de exposição à PAR+UVAB, o total do conteúdo de MAAs diminuiu drasticamente, 61,1 % na amostra da Lagoa da Conceição e de 24 % na amostra da Praia de Sambaqui, quando comparadas com os ambientes.

As maiores quantidades de MAAs foram observadas nas amostras da Praia de Sambaqui, onde o ambiente apresentou 1,261 mg.g<sup>-1</sup> de massa seca (MS), seguida da alga exposta à PAR, com 1,071 mg.g<sup>-1</sup> de MS, e da exposta à RUV, com 0,958 mg.g<sup>-1</sup> de MS. Para as amostras provenientes da Lagoa da Conceição a concentração inicial de MAAs, amostra controle, é menor que a amostra exposta à RUV da Praia de Sambaqui, sendo um total de 0,779 mg.g<sup>-1</sup> de MS.

**Tabela 2.** Conteúdos de MAAs: asterina, palitina, palitinol, *Porphyra-334*, shinorina e MAAs total (soma de todos identificados MAAs) em mg.g<sup>-1</sup> de massa seca de *A. spicifera* das amostras ambientais da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias de exposição à PAR e PAR+UVAB (n = 3; média ± DP). Letras iguais não indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05). Asterisco (\*): composto não definido.

		<b>Tratamentos</b>					
		<b>Asterina</b>	<b>Palitina</b>	<b>Palitinol</b>	<b><i>Porphyra-334</i></b>	<b>Shinorina</b>	<b>Total MAAs</b>
<b>Lagoa da Conceição</b>	<b>Ambiente</b>	0,017±0,006 <sup>a</sup>	0,058±0,015 <sup>a</sup>	0,434±0,125 <sup>a</sup>	0,233±0,029 <sup>a</sup>	0,037±0,011 <sup>a</sup>	0,779
	<b>PAR</b>	0,021±0,014 <sup>a</sup>	0,120±0,035 <sup>a</sup>	0,221±0,022 <sup>a</sup>	0,088±0,035 <sup>a</sup>	0,062±0,036 <sup>a</sup>	0,512
	<b>PAR+UVAB</b>	*	0,049±0,003 <sup>a</sup>	0,237±0,011 <sup>a</sup>	*	0,017±0,005 <sup>a</sup>	0,303
<b>Praia de Sambaqui</b>	<b>Ambiente</b>	0,194±0,167 <sup>a</sup>	0,126±0,015 <sup>a</sup>	0,494±0,390 <sup>a</sup>	0,271±0,226 <sup>a</sup>	0,176±0,137 <sup>a</sup>	1,261
	<b>PAR</b>	0,175±0,158 <sup>a</sup>	0,123±0,044 <sup>a</sup>	0,318±0,088 <sup>a</sup>	0,225±0,067 <sup>a</sup>	0,230±0,155 <sup>a</sup>	1,071
	<b>PAR+UVAB</b>	0,040±0,030 <sup>a</sup>	0,060±0,032 <sup>a</sup>	0,324±0,170 <sup>a</sup>	0,281±0,085 <sup>a</sup>	0,253±0,050 <sup>a</sup>	0,958

### 3.3 Compostos Fenólicos e Inibição do Radical Livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A concentração de fenólicos totais não foi significativamente afetada pelos tratamentos PAR e PAR+UVAB (Tab. 3), em comparação com amostras ambientais. Entretanto, a inibição do radical livre DPPH foi maior nas amostras expostas à PAR da Lagoa da Conceição, e menor nas amostras ambientais deste mesmo local.

**Tabela 3.** Conteúdo fenólico total ( $\text{mg.g}^{-1}$  de massa seca) e inibição do radical livre DPPH (%) de *A. spicifera* de amostras ambientais da Lagoa da Conceição e Praia Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias à exposição à PAR e PAR+UVAB (n = 3; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamentos		Fenólicos	DPPH
Lagoa da Conceição	Ambiente	10,15 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	47,82 $\pm$ 1,42 <sup>b</sup>
	PAR	7,05 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	55,69 $\pm$ 5,26 <sup>a</sup>
	PAR+UVAB	10,66 $\pm$ 4,24 <sup>a</sup>	49,35 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>
Praia de Sambaqui	Ambiente	13,03 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	52,52 $\pm$ 2,15 <sup>ab</sup>
	PAR	9,96 $\pm$ 3,72 <sup>a</sup>	53,48 $\pm$ 1,89 <sup>ab</sup>
	PAR+UVAB	9,44 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	52,12 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>

### **3.4 Proteínas, Açúcares Solúveis e Amido**

Os teores totais de proteína, açúcares solúveis e amido variaram significativamente entre as amostras ambientais e os tratamentos com PAR e RUVAB (Tab. 4).

Amostras da Lagoa da Conceição tratadas com PAR+UVAB tiveram um aumento significativo no teor de proteínas. Por outro lado, a amostra da Praia de Sambaqui tratada com RUV teve o conteúdo total de proteínas diminuído. Para ambos os locais, o tratamento com PAR não alterou a concentração de proteínas nas amostras, quando comparado com o controle.

O teor de açúcares solúveis totais da amostra da Praia de Sambaqui exposta à PAR mostrou a maior concentração em relação a todas as outras amostras da Praia de Sambaqui e da Lagoa da Conceição. Entretanto, para as amostras provenientes da Lagoa da Conceição, não houve diferença estatística significativa.

O teor de amido apresentou uma maior concentração nas amostras ambientais, com 0,22 e 0,26 mg.g<sup>-1</sup> de massa seca para amostra da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui, respectivamente. Observou-se uma queda no teor de amido nas amostras expostas à PAR, seguida das expostas à PAR+UVAB, quando comparadas com amostras controles, para ambos os locais.

**Tabela 4.** Conteúdos totais de proteína, açúcares solúveis e amido ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa seca) de *A. spicifera* de amostras ambientais da Lagoa da Conceição e da Praia Sambaqui e amostras tratadas após 7 dias com exposição à PAR e PAR+UVAB ( $n = 3$ ; média  $\pm$  DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Tratamentos</b>		<b>Proteínas</b>	<b>Açúcares Solúveis</b>	<b>Amido</b>
<b>Lagoa da Conceição</b>	<b>Ambiente</b>	0,52 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>	0,68 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,22 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
	<b>PAR</b>	0,62 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,85 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>cd</sup>
	<b>PAR+UVAB</b>	1,20 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,76 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	0,13 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
<b>Praia de Sambaqui</b>	<b>Ambiente</b>	0,46 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	0,79 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	0,26 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>
	<b>PAR</b>	0,43 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	2,26 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>bcd</sup>
	<b>PAR+UVAB</b>	0,39 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	0,43 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>

### 3.5 Análises Estatísticas

**Tabela 5.** Análise estatística em ANOVA-Bifatorial, onde são mostrados o grau de liberdade (GL), índice estatístico (F) e probabilidade (*p*).

	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>F</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Luteína</b>			
<b>Tratamento</b>	2	91,57	0,0000
<b>Local</b>	1	13,76	0,0030
<b>Tratamento X Local</b>	2	11,63	0,0016
<b>Zeaxantina</b>			
<b>Tratamento</b>	2	2,58	0,1170
<b>Local</b>	1	40,43	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	34,64	0,0000
<b>Tr 5,5</b>			
<b>Tratamento</b>	2	484,60	0,0000
<b>Local</b>	1	308,52	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	54,90	0,0000
<b><math>\alpha</math>-caroteno</b>			
<b>Tratamento</b>	2	111,31	0,0000
<b>Local</b>	1	298,63	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	51,59	0,0000
<b>Asterina</b>			
<b>Tratamento</b>	2	1,00	0,3953
<b>Local</b>	1	5,11	0,0431
<b>Tratamento X Local</b>	2	0,60	0,5642
<b>Palitina</b>			
<b>Tratamento</b>	2	5,63	0,0188
<b>Local</b>	1	2,88	0,1151
<b>Tratamento X Local</b>	2	1,58	0,2458
<b>Palitinol</b>			
<b>Tratamento</b>	2	1,39	0,2847
<b>Local</b>	1	0,58	0,4602
<b>Tratamento X Local</b>	1	0,01	0,9897
<b>Porphyra-334</b>			
<b>Tratamento</b>	2	1,41	0,2822
<b>Local</b>	1	6,71	0,0237
<b>Tratamento X Local</b>	2	1,43	0,2772

<b>Shinorina</b>			
<b>Tratamento</b>	2	0,18	0,8305
<b>Local</b>	1	10,78	0,0072
<b>Tratamento X Local</b>	2	0,25	0,7768
<b>Fenólicos</b>			
<b>Tratamento</b>	2	0,47	0,6409
<b>Local</b>	1	0,86	0,3800
<b>Tratamento X Local</b>	2	0,74	0,5034
<b>DPPH</b>			
<b>Tratamento</b>	2	5,46	0,0205
<b>Local</b>	1	2,18	0,1650
<b>Tratamento X Local</b>	2	3,00	0,0874
<b>Proteínas</b>			
<b>Tratamento</b>	2	31,96	0,0000
<b>Local</b>	1	105,19	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	47,49	0,0000
<b>Açúcares Solúveis</b>			
<b>Tratamento</b>	2	44,51	0,0000
<b>Local</b>	1	19,39	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	33,35	0,0000
<b>Amido</b>			
<b>Tratamento</b>	2	23,17	0,001
<b>Local</b>	1	12,91	0,0000
<b>Tratamento X Local</b>	2	1,91	0,1648

#### 4. DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou que os espécimes de *A. spicifera* provenientes da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui (Ilha de Santa Catarina, Brasil) expostos ao tratamento PAR+UVAB apresentaram alterações na fisiologia quando comparados com o tratamento PAR. Foram observadas quedas nas concentrações totais de carotenoides, de MAAs e de amido; aumento na concentração de proteínas; e sem alterações significativas para os fenólicos, açúcares solúveis totais e sequestro do radical livre DPPH. Os espécimes de *A. spicifera* provenientes de ambos os locais apresentaram respostas similares frente à RUV, porém com concentrações diferentes dos metabólitos. Estas diferentes quantidades são devido o estado inicial das algas dos ambientes, visto que as quantidades de nutrientes solúveis na água da Lagoa da Conceição são maiores que as da água da Praia de Sambaqui.

Nas amostras de *A. spicifera* foram identificados os carotenoides luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno e um carotenoide com tempo de retenção em 5,5 minutos (Tr 5,5). Com exceção do Tr 5,5, todos os outros diminuíram com a exposição à RUV, para ambos os locais. Isto indica que eles já foram utilizados como agentes fotoprotetores e o Tr 5,5 ainda poderá ser usado. Estes mesmos resultados foram observados em *Oryza sativa* (De Almeida et al., 2013) e *Sargassum cymosum* (Polo et al., 2014). A quantidade total de carotenoides foi maior para as amostras da Lagoa da Conceição, do que para as da Praia de Sambaqui, e isto pode estar relacionado à quantidade de nutrientes na água do mar. Para ocorrer a formação da luteína deve acontecer a hidroxilação do  $\alpha$ -caroteno; e a formação da zeaxantina, a hidroxilação do  $\beta$ -caroteno (Filho, 2010; Quilan et al., 2012). Para estas hidroxilações ocorrerem, os nutrientes do meio externo são recrutados. Portanto, quanto mais nutrientes no meio, como na Lagoa da Conceição, maiores as chances da formação de carotenoides na alga. A baixa concentração total de carotenoides observada nas amostras da Praia de Sambaqui pode ser devido à condição prévia do ambiente. Como as algas do Sambaqui são muito expostas à RUV estes compostos são muito utilizados como ação fotoprotetora, restando baixas concentrações dos mesmos.

Além de serem pigmentos acessórios, os carotenoides podem contribuir como agentes antioxidantes, eliminando espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pela RUV (Aple & Hirt, 2004; Kottuparambil et al., 2012). Portanto, os carotenoides agem a favor da fotossíntese e da fotoproteção (Quinlan et al., 2012).

Os aminoácidos tipo micosporina (MAAs) são compostos de nitrogênio solúveis em água (Barufi et al., 2011) e agem como fotoprotetores que, direta ou indiretamente, absorvem energia da RUV (Karsten & Wiencke, 1999). A quantidade de MAAs pode ser influenciada por vários fatores abióticos, tais como irradiação, calor, tensão iônica e nutrientes (Rastogi & Incharoensakd, 2013). Além da atividade fotoprotetora, a formação de MAAs pode funcionar como reservas de nitrogênio (Barufi et al., 2011; Carreto & Carignan, 2011) e como agente antioxidante (De La Coba et al., 2009; Carreto & Carignan, 2011).

Para *A. spicifera* proveniente da Lagoa da Conceição e da Praia de Sambaqui foram identificados cinco MAAs, os quais não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Porém, o teor total de MAAs apresentou queda para as amostras expostas à RUV, quando comparadas com amostras expostas à PAR e amostras controles. Todas as amostras da Praia de Sambaqui apresentaram maiores concentrações de MAAs do que as amostras da Lagoa da Conceição. Este resultado pode ser devido à adaptabilidade da alga proveniente da Praia de Sambaqui às condições ambientais. Como esta alga, no ambiente, fica diretamente exposta à RUV, a síntese desses compostos ocorre em maior quantidade do que nos espécimes submersos da Lagoa da Conceição. Por outro lado, a degradação de MAAs observada para os dois locais expostos à RUV pode estar relacionada com o recrutamento de moléculas para formação de outras respostas celulares contra o estresse da radiação. Entretanto, em condições laboratoriais *Anabaena* sp., *Nostoc commune* e *Scytonema* sp. (Sinha et al., 2001), *Gracilaria tenuistipitata* (Carreto & Carignan, 2011) e *Tetraspora* sp. (Rastogi & Incharoensakd, 2013) são capazes de produzir MAAs quando expostas à RUV.

Os compostos fenólicos também são antioxidantes (Borges et al., 2011), estando envolvidos na proteção contra a exposição direta à radiação da luz solar, em especial da RUV. Os resultados observados em *A. spicifera* exposta à RUVAB não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e os locais. Estudos com *Chlamydomonas nivalis* (Durval et al., 2000), *Acrostichum danaeifolium* (Randi et al., 2014), *Oryza sativa* (De Almeida et al., 2013), *Zygnema* (Pichrtová et al., 2013) e *Sargassum cymosum* (Polo et al., 2014) expostos à RUV tiveram os conteúdos fenólicos aumentados.

A ação antioxidante da alga exposta à RUV foi medida pelo sequestro do radical livre DPPH, e percebeu-se uma maior ação

antioxidante na amostra exposta à PAR da Lagoa da Conceição, e uma menor ação na amostra do ambiente deste mesmo local. Carotenoides, fenólicos e MAAs são alguns dos metabólitos secundários responsáveis pela ação antioxidante. A alta concentração de  $\alpha$ -caroteno observada na amostra exposta à PAR da Lagoa da Conceição pode responder esta ação antioxidante. Porém, a compreensão de quais fenólicos estão envolvidos com as respostas à PAR e à RUV, nesta alga, podem ajudar a explicar este resultado. *Sargassum cymosum* (Polo et al., 2014), *Ecklonia cava* (Kim et al., 2014) e *Tetraspora* sp. (Rastogi & Incharoensakd, 2013) expostos à RUV apresentaram um maior potencial antioxidante nas amostras irradiadas.

No fotossistema II, durante a fotossíntese, produz-se o oxigênio, o que aumenta a concentração desta molécula no interior das células (Zhao & Li, 2014). Em condições de estresse, como exposição à RUV, este oxigênio livre pode formar espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zhao & Li, 2014). As algas possuem mecanismos para retirar essas EROs através de enzimas antioxidantes, como a catalase, glutatona-peroxidase, superperóxido dismutase, entre outras (Maia et al., 2012; Batista et al., 2015). As amostras de *A. spicifera* da Lagoa da Conceição tiveram a quantidade de proteínas totais aumentada quando expostas à RUV. As enzimas contra o estresse oxidativo podem ter sido sintetizadas como forma de defesa. Para as amostras da Praia de Sambaqui, este mecanismo não foi observado. Com exposição à RUV, a quantidade de proteínas totais diminuiu. Com menos nutrientes livres na água do mar, estas algas não foram capazes de produzir este tipo de defesa. A proteína RuBisCO, responsável por assimilar CO<sub>2</sub> para o ciclo de Calvin (Fukuyama et al., 2012; Recuenco-Muñoz et al., 2015), é uma das proteínas que mais sofre com a RUV (Galmés et al., 2013), como visto em *Alaria esculenta*, *Laminaria solidungula*, *Monostroma arcticum*, *Palmaria palmata*, *Phycodryis rubens* (Bischof et al., 2000) e *Oryza sativa* L. (Yu et al., 2013), e pode estar relacionada com esta diminuição neste resultado.

O amido das florídeas é o material de reserva das algas vermelhas (Lang, 2006). Com exposição à RUV a concentração desta reserva diminuiu tanto para as amostras da Lagoa da Conceição, como para as da Praia de Sambaqui. Este decréscimo pode estar relacionado com uma alteração na via de biossíntese de amido, no ciclo de Calvin, possivelmente através da ativação da via de degradação. A via de degradação pode ser utilizada para ativar a biossíntese de compostos de defesa. A inibição da síntese de grãos de amido, por meio de UDP-

glicose, é desviada para a produção de componentes da parede celular, espessando-a, como visto em ML e MET no capítulo anterior (Schmidt et al., 2012).

## 5. REFERÊNCIAS

Aguilera, J., U. Karsten, H. Lippert, B. Vögele, E. Philipp, D. Hanelt, C. Wiencke (1999) Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 191, 109-119

AlgaBase. *Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen. Disponível em: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=3309](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=3309)  
Acessado em 02 de março de 2015.

Aman, R., A. Schieber, R. Carle (2005) Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolate spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9512-9518.

Aple K., H. Hirt (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Bio.*, 55, 373-399.

Balogh, T. S., M. V. R. Velasco, C. A. Pedriali, T. M. Kaneko, A. R. Baby (2011). Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Ann. Bras. Dermatol.*, 86(4), 732-42.

Barufi, J. B., N. Korbee, M. C. Oliveira, F. L. Figueroa (2011) Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. App. Phycol.*, 23(3), 457-466.

Batista, R. D., R. D. Batista, G. R. Santos, A. C. Rodrigues, A. Bonifacio de Lima (2015) Respostas antioxidativas em nódulos de caupi inoculado com bradyrhizobium. *Ver. Interdisc. UFT*, 2, 76-88.

Bischof, K., D. Hanelt, C. Wiencke (2000) Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions marine macroalgae. *Planta*, 211, 555-562.

Bischof, K., G. Kräbs, C. Wiencke, D. Hanelt, D. (2002) Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215(3), 502-509.

Borderie, F., A. S. Laurence, R. Naoufal, B. Faisl, O. Geneviève, R. Dominique, A. S. Badr (2011) UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *Int. Biodet. Biodegrad.*, 65(4), 579-584.

Borges, J. C., M. R. Silva, J. D. Guimaraes, C. R. Esper, P. H. Franceschini (2011) Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Ver. Bras. Reprod. An.*, 35(3), 303-14.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.

Carreto, J. I., M. O. Carignan (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. *Chem. Ecol. Aspects. Mar. Drugs*, 9(3), 387-446.

Dayong, S. H. I., G. U. O Shuju, F. A. N. Xiao (2011) A new ketosteroid from red alga *Acanthophora spicifera*. *Chin. J. Ocean. Limnol.*, 29(3), 674-678.

De Almeida, S. L., E. C. Schmidt, D. T. Pereira, M. Kreuzsch, M. Felix, L. K. Osorio, R. P. Martins, A. Latini, F. Ramlov, F. Chow, M. Maraschin, A. C. Rodrigues, Z. L. Bouzon (2013) Effect of ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of *Oryza sativa* L. *Protoplasma*, 250(6), 1303-1313.

De La Coba, F., J. Aguilera, F. L. Figueroa, M. V. De Gálvez, E. Herrera (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.*, 21, 161-169.

De Laat, A., M. Tilburg, J. C. Leun, W. A. Vloten, F. R. Gruijl (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem. Photobiol.*, 63(4), 492-497.

Diffey, B. L. (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.

Duarte, M. E., J. P. Cauduro, D. G. Nosedá, M. D. Nosedá, A. G. Gonçalves, C. A. Pujol, E. B. Damonte, A. S. Cerezo (2004) The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.*, 339, 335-347.

Duval, B., K. Shetty, W. H. Thomas (2000) Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. App. Phycol.*, 11(6), 559-566.

Falkowski, P. G., J. A. Raven (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Sci., Oxford.

Filho, J. G. (2010) Diversidade dos pigmentos e do gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase (Via biossintética dos carotenóides) em quatro espécies do gênero *Capsicum* L. Dissertação de Mestrado da Universidade de Brasília.

Fialho, F. A. N. (2013) *Aquicultura integrada multitrófica: biofiltros de macroalgas no cultivo do robalo flecha*. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figuroa, F. L., B. Domínguez-González, N. Korbee (2014). Vulnerability and acclimation to increased UVB radiation in three intertidal macroalgae of different morpho-functional groups. *Mar. Environ. Res.*, 101, 8-21.

Fré, N. C., R. Rech, N. Marcílio (2014) Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift. *Blucher Chem. Eng. Proc.*, 1(2), 1607-1614.

Fukayama, H., C. Ueguchi, K. Nishikawa, N. Katoh, C. Ishikawa, C. Masumoto, T. Hatanaka, S. Misoo (2012) Overexpression of Rubisco activase decreases the photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. *Plant Cell Physiol.*, 53(6), 976-986.

Galmés, J., I. Aranjuelo, H. Medrano, J. Flexas (2013) Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosyn. Res.*, 117(1-3), 73-90.

Ganesan, P., S. Chandini, N. Bhaskar (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.*, 99, 2717–2723.

Heo, S. J., S.Ko, S.Kang, S. Cha, S. Lee, D. Kang, W. Jung, A. Affan, C. Oh, Y. Jeon (2010) Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1355–1361.

Holzinger, A., C. Lütz (2006) Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37, 190-207.

Horn, R. A. (2012) The effect of *litopenaeus stylirostris* aquaculture on macroalgae growth in opunohu Bay, moorea, French polynesia. *Stud. Res. Papers*, 1,1-12.

Karsten, U., C. Wiencke (1999) Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant Physiol.*, 155, 407–415.

Kim, D. O, K. W. Lee, Y. J. Lee, C. Y. Lee (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713-3717.

Kim, K. C., M. J. Piao, J. Zheng, C. W. Yao, J. W. Cha, M. H. S. R. Kumara, X. Han, H. K. Kang, H. L. Nam, J. W. Hyun (2014) Fucodiphlorethol G purified from *Ecklonia cava* suppresses ultraviolet B radiation-induced oxidative stress and cellular damage. *Biomol. Therap.*, 22(4), 301-307.

Kottuparambil, S., W. Shin, M. T. Brown, T. Han (2012) UV-B affects photosynthesis, ROS production and motility of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. *Aqua. Toxicol.*, 122, 206-213.

Lang, K. L. (2006) Investigação química e biológica da alga vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina.

Lavakumar, V., K. F. H. Ahamed, V. Ravichandran (2012) Anticancer and antioxidant effect of *Acanthophora spicifera* against EAC induced carcinoma in mice. *J. Pharm. Res.*, 5, 1503–1507.

Maia, J. M., S. L. Ferreira-Silva, E. L. Voigt, C. D. Macedo, L. F. A. Ponte, J. A. G. Silveira (2012) Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. *Acta Bot. Bras.*, 26(2), 342-349.

McCready, R.M., A. Guggolz, V. Silveira, H. S. Owens (1950) Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. *Anal. Che.*, 22, 1156-1158.

Mitchell D. L., J. Jen, J. E. Cleaver (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultravioleta-B) radiation. *Nucleic Acids Res.*, 20, 225–229.

Navarro N. P., A. Mansilla, E. M. Plastino (2010) *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. *J. Appl. Phycol.*, 22, 385–394.

Pavia, H., B. T. Gunilla (1997) Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, 81, 3212–3225.

Pereira, D. T., E. C. Schmidt, Z. L. Bouzon, L. C. Ouriques (2014) The effects of ultraviolet radiation-B response on the morphology, ultrastructure, and photosynthetic pigments of *Laurencia catarinensis* and *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta): a comparative study. *J. Appl. Phycol.*, 26, 2443-2452.

Pichtrová, M., D. Remias, L. A. Lewis, A. Holzinger (2013) Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio. *Micro. Ecol.*, 65(1), 68-83.

Polo, L. K., M. R. Feliz, M. Kreusch, D. T. Pereira, G. B. Costa, C. Siminoni, L. C. Ouriques, F. Chow, F. Ramlov, M. Maraschin, Z. L. Bouzon, E. C. Schmidt (2014) Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum Cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *J. Photochem. Photobiol.*, 90, 560-573.

Poppe, F., R. A. Schmidt, D. Hanelt, C. Wiencke (2003) Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.*, 51(1), 11-19.

Quinlan, R. F., M. Shumskaya, L. M. Bradbury, J. Beltrán, C. Ma, E. J. Kennelly, E. T. Wurtzel (2012) Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. *Plant Physiol.*, 160(1), 204-214.

Randi, A. M., M. C. A. Freitas, A. C. Rodrigues, M. Maraschin, M. A. Torres (2014) Acclimation and photoprotection of young gametophytes of *Acrostichum danaeifolium* to UV-B stress. *Photosynthetica*, 52(1), 50-56.

Rastogi, R. P., A. Incharoensakdi (2013) UV radiation-induced accumulation of photoprotective compounds in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551. *Plant Physiol. Biochem.*, 70, 7-13.

Recueno-Muñoz L., P. Offre, L. Valledor, D. Lyon, W. Weckwerth, S. Wienkoop (2015) Targeted quantitative analysis of a diurnal RuBisCO subunit expression and translation profile in *Chlamydomonas reinhardtii* introducing a novel Mass Western approach. *J. Proteomics*, 113, 143-153.

Roleda, M. Y., D. Hanelt, G. Kräbs, C. Wiencke (2004) Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycology*, 43, 603-613.

Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blandschun, J. Wenk (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.*, 378(11), 1247-1258.

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

Schmidt, E. C., M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2010) Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. *Hidrobiologia*, 649, 171-182.

Schmidt, E. C., B. Pereira, C. L. Pontes, R. Santos, F. Scherner, P. A. Horta, R. P. Martins, A. Latini, M. Maraschin, Z. L. Bouzon (2012) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma*, 249, 353-367.

Seenivasan, R., M. Rekha, H. Indu, S. Geetha (2012) Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from Mandapam Coast, India. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(10), 159-169.

Shannon, J. C. (1968) A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Res. Bull.*, 842, 1-8.

Simioni, C., T. Rover, E. C. Schmidt, M. R. Felix, L. K. Polo, R. Santos, G. Burle, M. Kreusch, D. T. Pereira, L. C. Ouriques, Z. L. Bouzon (2014) Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *J. Phycol.*, 50, 577-586.

Sinha, R. P., M. Klisch, E. W. Helbling, D. P. Häder (2001) Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 60(2), 129-135.

Umbreit, W. W., R. H. Burris (1964) Method for glucose determination and other sugars. *Manometric techniques*. 1<sup>st</sup> ed. Burgess Publishing Co.

Wang, C., W. Mingyan, S. Jingyu, L. Du, Z. Longmei (1998) Research on the chemical constituents of *Acanthophora spicifera* in the South

China Sea. Chin. J. Magn. Reson., 15, 237-242.

Waterman, P. G., S. Mole (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 248p.

Yu, C. H., P. E. Lim, S. M. Phang (2013) Effects of irradiance and salinity on the growth of carpospore-derived tetrasporophytes of *Gracilaria edulis* and *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* (Rhodophyta). J. App. Phycol., 25(3), 787-794.

Zakaria, N. A., I. Darah, F. S. Shaida, N. A. Supardy (2011) Phytochemical composition and antibacterial potential of hexane extract from malaysian red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. World Appl. Sci., J. 15, 496-501.

Zeng, L. M., W. Chao-Jie, S. Jing-Yu, L. Du, O. Noel, L. Yang, L. Nan, Z. Qi-Tai (2001) Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. Chinese. J. Chem., 19, 1097-1100.

Zhao, J., L. Li (2014). Effects of UV-B irradiation on isoforms of antioxidant enzymes and their activities in red alga *Grateloupia filicina* (Rhodophyta). Chin. J. Oceanol. Limnol., 32, 1364-1372.

## CAPÍTULO IV

### **1. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo demonstra que a RUV afeta negativamente vias fisiológicas de *A. spicifera*, como uma diminuição na taxa de crescimento, na concentração de pigmentos fotossintetizantes, nos carotenoides, nas proteínas, no amido e na viabilidade celular. Alterações nos parâmetros morfológicos também foram observadas, como desorganização dos tilacóides e espessamento da parede celular.

Além disso, após a exposição à RUV, os teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) diminuíram, levando a um decréscimo das taxas de crescimento e uma redução da viabilidade celular.

Os carotenoides, pigmentos secundários, também foram afetados negativamente quando a alga foi exposta à RUV. A quantidade total de grãos de amido e proteínas diminuiu, o que indica que estas reservas de energia foram gastas para suprir este estresse. A quantidade de fenólicos, ação antioxidante (DPPH) e açúcares solúveis não apresentaram mudanças significativas aos tratamentos. Análises como o perfil desses metabólitos nos ajudariam a entender esta resposta. O perfil de MAAs não apresentou diferença quando expostas à RUV.

Os resultados indicaram claramente que a RUV em *A. spicifera*, coletada nos dois ambientes (Lagoa da Conceição e Praia de Sambaqui), degradou os mecanismos de proteção, causando mudanças metabólicas. Porém, o grau de alterações ocorreu de forma mais drástica nas amostras da Praia de Sambaqui, onde o estado inicial da alga era mais desfavorável devido a água do mar ser deficiente em alguns nutrientes.