

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA  
E DO COBRE NA MORFOLOGIA, NA BIOQUÍMICA  
E NA ULTRAESTRUTURA DA ALGA VERMELHA  
*PTEROCLADIELLA CAPILLACEA***

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito para obtenção do grau de  
Licenciado em Ciências Biológicas.

Marianne Gabi Kreusch

Orientador: Dr. Éder Carlos Schmidt

Co-orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon

MARIANNE GABI KREUSCH

EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA  
E DO COBRE NA MORFOLOGIA, NA BIOQUÍMICA E  
NA ULTRAESTRUTURA DA ALGA VERMELHA  
*PTEROCLADIELLA CAPILLACEA*

Monografia apresentada ao  
Curso de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como  
requisito para obtenção do  
grau de Licenciado em  
Ciências Biológicas.



**Éder Carlos Schmidt, Dr.**

Presidente da Banca - Orientador



**Neusa Steiner, Dr.**

Membro



**Fernanda Ramlov, Dr.**

Membro



**Zenilda Laurita Bouzga, Dr.**

Membro Suplente - Co-orientadora

Florianópolis, 25 de maio de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus orientadores Éder e Zenilda, por acreditarem em mim, pela atenção e paciência.*

*À minha família, por todo apoio e dedicação durante a graduação.*

*Ao meu namorado André, por sete anos de amor, respeito e sonhos compartilhados!*

*À minha afilhada Adrielle, pela honra de fazer parte da sua vida.*

*Que as minhas conquistas alimentem os seus sonhos!*

*Aos colegas de LAMAR / LABCEV, em especial à Carmen, Marthi, LuzKa, Fernanda e*

*Rodrigo, por toda ajuda e amizade durante os dois anos em que estive no laboratório.*

*À querida professora Fungyi, pelo carinho e dedicação.*

*À todos os professores de ciências biológicas da UFSC.*

*Às amigas da bio, pelas alegrias e memórias da vida acadêmica!*

*E aos demais amigos que de alguma forma contribuíram em minha jornada.*

*Muito obrigada! <3*

## RESUMO

Os efeitos da radiação ultravioleta (UV) e do metal pesado cobre (Cu) foram examinados na macroalga vermelha *Pterocladia capillacea*. Segmentos apicais das algas foram expostos a duas diferentes condições de radiação, PAR (controle) e radiação ultravioleta (PAR+RUVAB), e a três concentrações de cobre, 0.62, 1.25 e 2.50  $\mu\text{M}$ . Os efeitos da radiação UV e do cobre foram avaliados nas taxas de crescimento, no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, na densidade de grãos de amido das florídeas e na ultraestrutura dos espécimes. As taxas de crescimento das algas expostas ao cobre não sofreram alterações significativas, porém a exposição à radiação UV resultou num decréscimo da taxa de crescimento. As algas expostas à radiação UV e ao cobre, de forma simultânea, obtiveram taxas de crescimento iguais ou superiores ao controle. O conteúdo de pigmentos fotossintetizantes diminuiu após a exposição à radiação UV e ao cobre. A radiação UV resultou em uma menor densidade de amido das florídeas, e a densidade de grãos diminuiu conforme aumentou-se a concentração de cobre. Ambos os tratamentos alteraram a ultraestrutura de células, porém estas mudanças foram mais drásticas nas amostras expostas à radiação UV, de forma isolada ou simultaneamente ao cobre. Os resultados obtidos indicam que a radiação UV e o cobre afetam negativamente a morfologia, a bioquímica e a ultraestrutura de *P. capillacea*, e que estes elementos agem de forma sinérgica nesta alga.

**Palavras-chave:** *Pterocladia capillacea*, radiação ultravioleta, cobre, interações, morfologia, bioquímica, ultraestrutura.

## ABSTRACT

The effects of ultraviolet radiation (UV) and copper (Cu) were examined on the red macroalga *Pterocladia capillacea*. Apical segments of the algae were exposed to two different conditions of radiation, PAR (control) and ultraviolet radiation (PAR+RUVAB), and three copper concentrations, 0.62, 1.25 e 2.50  $\mu\text{M}$ . The effects of UV radiation and copper on growth rates, pigments concentration, floridean starch grains and ultrastructure were analyzed. The growth rates of copper-treated algae didn't significantly change, however radiation-treated specimens presented a reduced growth rate. *P. capillacea* exposed to UV radiation and copper simultaneously revealed similar or increased growth rates, when compared to the control. Photosynthetic pigments were reduced after the exposure to both radiation and copper. UV radiation exposure resulted in decreased density of floridean starch grains, and the density of grains reduced as we increased copper concentrations. Both treatments changed the ultrastructure of the cells, however this changes were more relevant after exposure to UV radiation both isolated and simultaneously with copper. These results indicate that both UV radiation and copper negatively affect the morphology, biochemistry and ultrastructure of *P. capillacea*. UV radiation and copper also have synergistic effects on the algae.

**Key words:** *Pterocladia capillacea*, ultraviolet radiation, copper, interactions, morphology, biochemistry, ultrastructure.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espécime de <i>Pterocradiella capillacea</i> . . . . .	13
<b>Figura 2.</b> Desenho esquemático dos oito grupos experimentais utilizados no presente estudo . . . . .	20
<b>Figura 3.</b> Morfologia dos segmentos apicais de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de cultivo . . . . .	25
<b>Figura 4.</b> Taxas de Crescimento das amostras de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de experimento . . . . .	26
<b>Figura 5.</b> Microscopia de Luz de secções transversais de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de cultivo . . . . .	29
<b>Figura 6.</b> Micrografia Eletrônica de Transmissão das amostras do grupo controle de <i>P. capillacea</i> após a realização dos experimentos . . . . .	32
<b>Figura 7.</b> Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de exposição à radiação ultravioleta . . . . .	33
<b>Figura 8.</b> Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de cultivo com o cobre . . . . .	34
<b>Figura 9.</b> Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de <i>P. capillacea</i> após 7 dias de exposição simultânea à radiação ultravioleta e ao metal pesado cobre . . . . .	35
<b>Figura 10.</b> Artigo publicado na revista <i>Photochemistry and Photobiology</i> , utilizando-se os dados obtidos com o presente trabalho de conclusão de curso (DOI: 10.1111/php.12396) . . . . .	45

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Pigmentos fotossintetizantes de amostras de <i>P. capillacea</i> ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) após 7 dias de cultivo .....	27
---	----

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

**A** – Amido das florídeas

**AFC** – Aloficocianina

**C** – Cloroplasto

**CC** – Células corticais

**Chl *a*** – Clorofila *a*

**CS** – Células subcorticais

**Cu** – Cobre

**CuCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cobre

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**FC** – Ficocianina

**FE** – Ficoeretrina

**GMA** – Glicometacrilato

**LABCEV** – Laboratório de Biologia Celular Vegetal

**LCME** – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

**M** – Mitocôndria

**Mf** – Massa final

**Mi** – Massa inicial

**OsO<sub>4</sub>** – Tetróxido de Ósmio

**P** – Plastoglóbulo

**PAR** – Radiação fotossinteticamente ativa

**PAS** – Ácido Periódico de Schiff

**PC** – Parede celular

**RUVAB** – Radiação ultravioleta AB

**T** – Tempo

**TC** – Taxa de crescimento

**UV** – Ultravioleta

**V** – Vacúolo

# SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Importância das Algas .....	10
1.2 Divisão Rhodophyta .....	11
1.3 <i>Pterocliadiella capillacea</i> .....	12
1.4 Urbanização, Metais Pesados e o Cobre .....	13
1.5 Camada de Ozônio e Radiação Ultravioleta .....	14
1.6 Interação entre agentes estressores .....	15
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 Coleta e processamento do material biológico .....	19
4.2 Condições de cultivo .....	19
4.3 Avaliação da taxa de crescimento (TC) .....	21
4.4 Clorofila <i>a</i> e Ficobiliproteínas .....	21
4.5 Microscopia de Luz .....	22
4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	23
4.7 Análise e interpretação dos dados .....	24
<b>V. RESULTADOS</b> .....	25
5.1 Morfologia dos segmentos apicais .....	25
5.2 Taxa de Crescimento .....	26
5.3 Clorofila <i>a</i> e Ficobiliproteínas .....	27
5.4 Microscopia de Luz .....	28
5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	30
<b>VI. DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>VII. CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	44
<b>VIII. ARTIGO</b> .....	45
<b>IX. REFERÊNCIAS</b> .....	46

# I. INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância das Algas

As algas constituem um grupo polifilético de organismos micro ou macroscópicos fisiologicamente similares a plantas. Os pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a*, *b*, *c*, carotenóides e ficobiliproteínas), as estruturas reprodutivas sem proteção e a ausência de um sistema vascular são as principais características destes organismos (South & Whittick, 1987; van den Hoek *et al.*, 1989; Graham & Wilcox, 2000), os quais podem ser encontrados especialmente em ambientes aquáticos (Lee, 1989).

Responsáveis por grande parte da produção de energia primária em nosso planeta, as algas possuem grande importância ecológica e são essenciais à qualidade de vida e à manutenção da estabilidade dos ecossistemas (Oliveira, 2003; Pedrini *et al.*, 2010). Devido à produção de polissacarídeos, minerais, agentes estabilizantes, espessantes e compostos antioxidantes, antivirais, antibacterianos e antifúngicos (Anggadiredja *et al.*, 1997; Matsukawa *et al.*, 1997; Oliveira, 1997; Hudson *et al.*, 1999), as algas possuem também grande importância econômica, sendo utilizadas por indústrias alimentícias e farmacêuticas. Estes organismos são, ainda, bons indicadores biológicos, com eficiente aplicação em técnicas de biorremediação e demais técnicas biotecnológicas (Jensen, 1993; Oliveira, 1997).

As macroalgas formam um conjunto heterogêneo de organismos extremamente abundantes em nosso planeta. Estima-se que mais de 150 mil espécies de macroalgas possam ser encontradas em todos os oceanos (Harvey, 1988; Sousa *et al.*, 2008). De acordo com Lee (1989), as

macroalgas podem ser classificadas em três grupos: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas), e Rhodophyta (algas vermelhas).

## **1.2 Divisão Rhodophyta**

Compreendendo de 4 a 6 mil espécies (Woelkerling, 1990), dentro de aproximadamente 700 gêneros (Kraft, 1989), a divisão Rhodophyta é o mais diverso grupo de macroalgas. As algas vermelhas são essencialmente marinhas, encontradas desde a região entre marés até profundidades de 200 metros, principalmente na região equatorial do planeta (Lee, 1989).

Segundo Wynne (2005), as Rhodophyta são divididas em quatro classes: Florideophyceae, Compsopogonophyceae, Bangiophyceae e Rhodellophyceae. Geralmente macroscópicas e filamentosas, as algas vermelhas possuem células eucarióticas, porém, diferentemente da maioria das algas, estas não apresentam flagelos em nenhuma fase de seu ciclo de vida. Sua principal substância de reserva é o amido das florídeas, um polissacarídeo encontrado próximo ao núcleo celular (Bold & Wynne, 1985).

As células destas algas apresentam cloroplastos discóides ou em forma de fita, com tilacóides livres (Woelkerling, 1990). Além da clorofila *a*, seus cloroplastos apresentam na superfície dos tilacóides os ficobilissomos, estruturas formadas pelo agrupamento dos pigmentos acessórios ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina. Os ficobilissomos auxiliam na absorção de energia luminosa, transferindo-a a partir dos pigmentos acessórios para o centro do fotossistema II, possibilitando um maior fluxo de elétrons e um maior rendimento energético para as células (Gantt, 1981; Zuber, 1986). São os pigmentos acessórios os responsáveis pela coloração variada das rodófitas (Oliveira, 2003).

A parede celular das algas vermelhas são formadas por um esqueleto de celulose impregnado por galactanas sulfatadas (agaranas ou carragenanas), sendo estas as substâncias responsáveis pela grande importância alimentícia, biomédica e farmacêutica deste grupo (Gordon-Mills & McCandless, 1973). Algumas rodófitas da família Corallinaceae podem depositar, ainda, carbonato de cálcio ou carbonato de magnésio em suas paredes (Oliveira, 2003).

As rodófitas possuem estilo de vida bentônico, vivendo presas às rochas, substratos calcáreos, paredes oceânicas ou sobre conchas de moluscos ou outras algas (van den Hoek *et al.*, 1989). São abundantes na costa nordeste do Brasil, bem como em costões rochosos do Espírito Santo até Santa Catarina (Oliveira, 2003).

### **1.3 *Pterocladia* *capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand**

O gênero *Pterocladia* inclui 13 espécies distribuídas em regiões quentes e temperadas do mundo (Santelices & Hommersand 1997, Shimada *et al.*, 2000). *Pterocladia capillacea* é uma espécie de ocorrência predominante na região equatorial, existente entre as regiões de meso e infralitoral de costões rochosos (Horta, 2000). No Brasil, esta alga pode ser encontrada entre os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul. De acordo com Santelices & Hommersand (1997), os espécimes de *P. capillacea* são cartilaginosos, de coloração vermelho-arroxeadada, possuem base rizoidal, ramos opostos ou alternados e frondes achatadas, e tamanho médio de 2 mm de largura e 200 mm de altura (Figura 1). Além da utilização como alimento, a espécie é fonte de ágar de alta qualidade (Armisen e Galatas, 1987; Oliveira e Berchez, 1993), e produz lecitinas com atividade antiviral (Liao *et al.*, 2003).



**Figura 1:** Espécime de *P. capillacea*.

Modificado de: AlgaeBase.org. Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

#### **1.4 Urbanização, Metais Pesados e o Cobre**

A expansão industrial iniciada no Brasil nos anos 50 promoveu um rápido e desordenado crescimento, principalmente em regiões litorâneas, e atualmente quase metade da população do país vive em regiões litorâneas (Pagliosa *et al.*, 2006). Diversos registros de contaminação em áreas costeiras do país têm sido relacionados aos efeitos causados pela urbanização (Diegues, 1999; Braga *et al.*, 2000; Leão & Dominguez, 2000).

Segundo Pagliosa *et al.* (2006), áreas urbanas geralmente apresentam maior contaminação por metais pesados. Vallee & Ulmer (1972) afirmam que certos metais fazem parte de rotas metabólicas,

constituem sítios ativos de enzimas e podem atuar diretamente em catálises, além de estabilizarem macromoléculas de proteínas e ácidos nucleicos. Porém, quando em concentrações elevadas, estes elementos podem causar toxicidade à plantas e demais organismos. A contaminação por metais pode levar à inibição de rotas metabólicas, através da ruptura de estruturas ou do deslocamento de elementos essenciais à espécie, o que pode resultar em estresse oxidativo e consequente inibição do crescimento (Dietz *et al.*, 1999).

O cobre é um exemplo de metal pesado essencial para o crescimento e desenvolvimento natural das plantas (Hall, 2002). Porém, o cobre é também considerado um dos metais mais tóxicos para as algas marinhas, e, quando em concentrações elevadas, pode causar redução na taxa de crescimento e concentração de pigmentos (Rijstenbil *et al.*, 1994), danos aos cloroplastos e redução da taxa fotossintética (Vidotti & Rollemberg, 2004), afetar a permeabilidade da membrana plasmática (de Filippis, 1979), a mobilidade celular (Anderson & Morel, 1978) e a distribuição de compostos como proteínas e lipídios (Smith *et al.*, 1985).

### **1.5 Camada de Ozônio e Radiação Ultravioleta**

A estratosfera é a camada da atmosfera compreendida entre 15 a 25 km acima da superfície terrestre. Esta região contém 90% do ozônio atmosférico, o qual forma a camada de ozônio, responsável pela absorção de parte da radiação solar incidente sobre a terra (Okuno *et al.*, 1996). A radiação ultravioleta é crucial para a existência de organismos fotoautotróficos, e, consequentemente, para toda a vida em nosso planeta. A radiação UV é composta por três espectros: UV-A, UV-B e UV-C. A radiação UV-A (315 a 400 nm) não é absorvida pelo ozônio presente na

estratosfera, possui o comprimento de onda mais próximo à luz visível e é, portanto, a menos deletéria aos organismos. A radiação UV-B (280 a 315 nm) é parcialmente absorvida pela camada de ozônio, e a alta exposição à esta resulta em danos ao DNA. Por fim, a radiação UV-C (200 a 280 nm) é extremamente nociva às espécies, porém é eficientemente absorvida pela camada de ozônio (Häder *et al.*, 2007).

A liberação antrópica de poluentes atmosféricos, como os clorofluorcarbonos, halocarbonos, clorocarbonos e dióxido de carbono, resultou no que hoje conhecemos como o buraco na camada de ozônio, descoberto inicialmente na Antártida (Pessoa, 2012). Na estratosfera, estes gases são dissociados por fótons, liberando moléculas de cloro que reagem com moléculas de oxigênio e destroem a camada de ozônio (Molina e Rowland, 1974). De acordo com Hollósy (2001), uma redução de 1% na camada de ozônio resulta em um aumento de 1,3% a 1,8% na incidência de radiação UV-B. Altos níveis de radiação podem resultar em alterações na performance fotossintética (Aguilera *et al.*, 1999), nas respostas fisiológicas (Bischof *et al.*, 2000; Polo *et al.*, 2014), no conteúdo de pigmentos (Roleda *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2010) e na organização ultraestrutural (Schmidt *et al.*, 2009) das algas.

### **1.6 Interação entre agentes estressores**

Fatores ambientais e agentes estressores podem interagir e resultar em alterações na ecologia e fisiologia de organismos marinhos. Pesquisar os efeitos cumulativos resultantes destas interações é de extrema importância, pois os organismos marinhos enfrentam diariamente uma complexa combinação de fatores, os quais podem resultar em efeitos intensificadores ou mitigadores de estresse (Crain *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado os efeitos indiretos da radiação ultravioleta na toxicidade de nutrientes (Zepp *et al.*, 2006) e compostos químicos (Huovinen *et al.*, 2001), bem como os efeitos antagônicos ou sinérgicos que podem ocorrer na presença de metais pesados (Andrade *et al.*, 2006). Huovinen *et al.* (2010) observou que o metal pesado cobre pode interagir com a intensidade de radiação ultravioleta ao qual os organismos são expostos, de forma que intensifica-se o efeito oxidativo da radiação UV em substâncias protetoras das macroalgas, tais como florotaninos. Lupi *et al.* (1998) demonstraram que os efeitos deletérios causados pelo cobre e pela radiação UV em microalgas podem intensificar-se com a interação sinérgica destes agentes. Além disso, a combinação de fatores ambientais pode resultar em alterações na interação entre as espécies, bem como no recrutamento de macroalgas (Lotze e Worm, 2002).

## II. JUSTIFICATIVA

A concentração de cobre dissolvido em águas marinhas é geralmente muito baixa, porém em áreas litorâneas próximas a centros urbanos esta concentração pode aumentar (Gledhill, 1997). Casos de contaminação por metais pesados já foram relatados na Baía da Ilha de Santa Catarina (Pagliosa *et al.*, 2006). Algas marinhas podem acumular metais pesados, propiciando a entrada destes compostos na cadeia alimentar (Vallee & Ulmer, 1972).

A radiação ultravioleta pode penetrar águas marinhas em profundidades de 20 a 30 metros, variando de acordo com a incidência de radiação solar, a transparência da água e demais características (Dahms & Lee, 2010). O Sul do Brasil é constantemente exposto à elevados níveis de radiação UV (Kirchhoff *et al.*, 2000). Macroalgas que vivem em costões rochosos ficam expostas por longos períodos durante a maré baixa, sofrendo os efeitos deletérios destes altos níveis de radiação.

Diretrizes de qualidade da água continuam a basear-se apenas nos efeitos avulsos do cobre e da RUVAB, negligenciando os possíveis efeitos interativos destes elementos (West *et al.*, 2003). Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* do metal pesado cobre e da RUVAB, de forma isolada e concomitante, na macroalga vermelha *P. capillacea*.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os possíveis efeitos biológicos de diferentes concentrações do metal pesado cobre (0.62, 1.25 e 2.50  $\mu\text{M}$ ), bem como da radiação ultravioleta (UV-A e UV-B) na morfologia, na bioquímica e na ultraestrutura da macroalga vermelha *P. capillacea*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar as possíveis diferenças entre os efeitos isolados e interativos do metal pesado cobre e da radiação UV.
- Comparar as taxas de crescimento dos segmentos apicais de *P. capillacea* do controle e das amostras tratadas com cobre e radiação UV.
- Determinar as concentrações de pigmentos fotossintetizantes após o tratamento com o metal pesado cobre e a radiação UV.
- Analisar as possíveis alterações morfológicas, celulares e ultraestruturais causadas pelos agentes estressores nas amostras da macroalga.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e processamento do material biológico

Os espécimes de *P. capillacea* foram coletados da região mesolitoral de costões rochosos da praia da Armação (27°44'42''S), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, entre os meses de dezembro de 2011 e fevereiro de 2012. Talos das algas foram transportados em recipientes escuros contendo gelo para evitar a ocorrência de fotooxidação. As algas foram aclimatadas durante 14 dias ao Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada e as macroepífitas foram removidas.

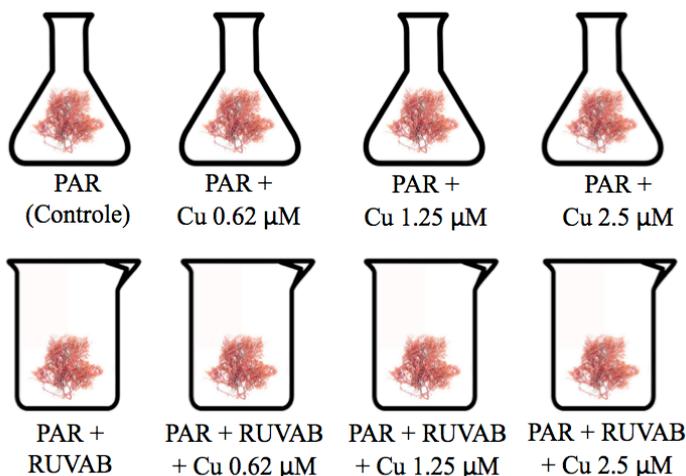
### 4.2 Condições de cultivo

As algas foram mantidas nas câmaras de cultivo em erlenmeyers de 600mL, com água do mar esterelizada, salinidade de 35, e 4mL de solução von Stosch 50%, sob a temperatura de 25°C ( $\pm 1$ ), fotoperíodo de 12h (início às 8h) e com aeração contínua. A irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) foi de 80  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ao dia (Li-cor light meter 250, EUA). Após o período de aclimação, segmentos apicais de *P. capillacea* com peso de aproximadamente 2,00g ( $\pm 0.05\text{g}$ ) foram expostos durante 7 dias ao metal pesado cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) e à radiação ultravioleta (Lâmpada Vilber Lourmat - VL-6LM, Marne La Vallée, França), bem como à ambos os agentes estressores, de forma simultânea.

As concentrações de cobre utilizadas no presente estudo foram definidas a partir de um experimento piloto. Segmentos apicais de *P. capillacea* foram expostos a 0 (controle), 0.62, 1.25, 2.5 e 5.0  $\mu\text{M}$  de cloreto

de cobre. Devido à grande redução da taxa de crescimento, bem como às características morfológicas apresentadas, dentre elas a despigmentação e necrose dos segmentos apicais, a concentração de 5.0  $\mu\text{M}$  foi considerada letal aos espécimes da macroalga, não sendo utilizada nos experimentos oficiais da pesquisa.

As doses totais de PAR (controle), UV-A e UV-B foram de 657.40  $\text{kJ m}^{-2}$  ( $70 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), 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. Para evitar a exposição das amostras à radiação UV-C, utilizou-se uma folha de acetato de celulose com espessura de 0.075 mm. Ao total, oito tratamentos foram realizados, com quatro réplicas para cada grupo experimental (Figura 2).



**Figura 2.** Desenho esquemático dos oito grupos experimentais utilizados no presente estudo.

### 4.3 Avaliação da taxa de crescimento (TC)

As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca das amostras e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, calculadas de acordo com fórmula de Lignell e Pedersén (1989):

$$TC [\% \text{ dia}^{-1}] = [(Mf/Mi)^{1/t} - 1] \times 100, \text{ sendo:}$$

Taxa de crescimento (*TC*) em  $\% \cdot \text{dia}^{-1}$ ;

Massa final (*Mf*) em gramas;

Massa inicial (*Mi*) em gramas;

Tempo (*t*) em dias.

### 4.4 Clorofila *a* e Ficobiliproteínas

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras do controle e do tratamento foram armazenadas em nitrogênio líquido. As extrações foram realizadas em quadruplicatas no 7º dia de cultivo, no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Itacorubi – Florianópolis). A extração de clorofila *a* foi realizada a partir do método de Hiscox & Israelstam (1979), tendo sido a extração realizada a partir de amostra de aproximadamente 1g de massa fresca para cada repetição em 3mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG), a 40°C durante 30 minutos. A determinação da concentração de clorofila *a* foi feita utilizando-se a equação descrita por Wellburn (1994). Já a extração de ficobiliproteínas (aloficocianina - AFC, ficocianina - FC e ficoeretrina – FE) foi realizada através da trituração de 1g de massa fresca para cada repetição

em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão fosfato 0.1M, pH 6.4, no escuro e em temperatura de 4°C. O homogenato foi centrifugado a 2000xg, durante 20 minutos, e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800;  $\lambda = 498,5, 615$  e  $651$  nm). A concentração de ficobiliproteínas foi determinada utilizando-se as equações descritas por Kursar *et al.* (1983).

#### 4.5 Microscopia de Luz

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5%, tampão fosfato 0.1M e pH 7.2, em temperatura média de 4°C, *overnight*. As amostras fixadas foram então lavadas em temperatura ambiente com tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos, segundo metodologia de Bouzon (1993). Em seguida, o material foi desidratado em séries de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A pré-infiltração das amostras ocorreu em historesina glicolmetacrilato (GMA) 1:1 em álcool 100%, com posterior infiltração em resina pura (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Após a secagem das amostras, estas foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, em secções de 5 $\mu$ m. As secções foram secas em lâminas de vidro a 37°C durante 30 minutos, sendo submetidas, então ao teste histoquímico de Ácido Periódico de Schiff (PAS), utilizado para indicar a presença de polissacarídeos neutros, tais como o amido e a celulose, nas células amostradas. Para tal, amostras do controle e dos tratamentos de *P. capillacea* foram oxidadas com solução de ácido periódico 1%, durante 20 minutos. Após a oxidação, as amostras foram coradas com reativo de Schiff

por mais 20 minutos, sendo posteriormente lavadas em água corrente, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá, de acordo com as metodologias de Gahan (1984) e Schmidt *et al.* (2009).

#### **4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para observação em Microscopia Eletrônica de Transmissão, as amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2.5% com sacarose 2% e tampão cacodilato 0.1M, com pH resultante em 7.2. A pré-fixação foi realizada em *overnight*, em temperatura média de 4°C. Após a pré-fixação, foram feitas quatro lavagens das amostras, em tampão cacodilato 0.1M e sacarose 2%, e as lavagens foram seguidas da pós-fixação, que foi realizada em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em tampão cacodilato 0.1M, com pH 7.2, durante 4h à temperatura ambiente (Pueschel, 1979). Após a pós-fixação, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato 0.1M e pH 7.2, sendo em seguida lavado em água destilada, e desidratado em séries de concentrações crescentes de soluções aquosas de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos em cada solução. Finalizada a desidratação, todo o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). Esta infiltração foi realizada em sete etapas durante quatro dias, com resina Spurr diluída em concentrações crescentes de acetona. O material foi então polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70°C durante 24h. As secções ultrafinas foram realizadas em ultramicrótomos Power Tome XL e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

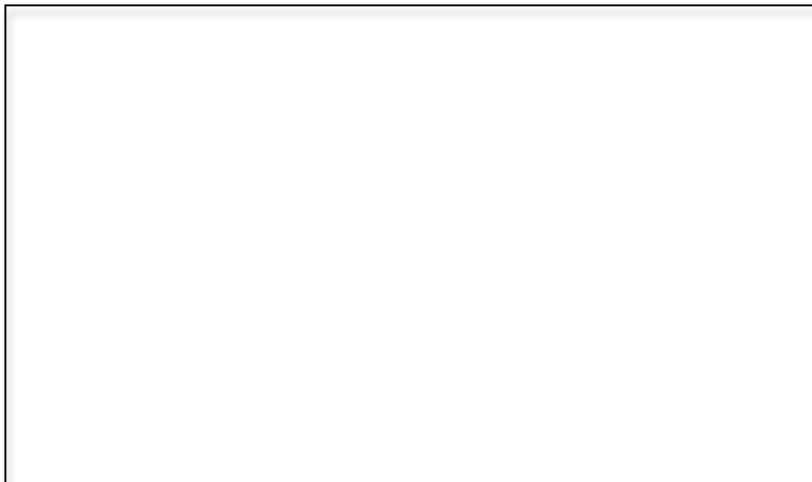
#### **4.7 Análise e interpretação dos dados**

Os dados obtidos foram submetidos à análise do teste de ANOVA bifatorial, seguida do teste *a posteriori* de Tukey, para verificar a significância das diferenças encontradas entre os tratamentos com cobre, radiação ultravioleta e seus respectivos controles. Todas as análises foram realizadas no Programa *Statistica* (versão 6.0).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Morfologia dos segmentos apicais

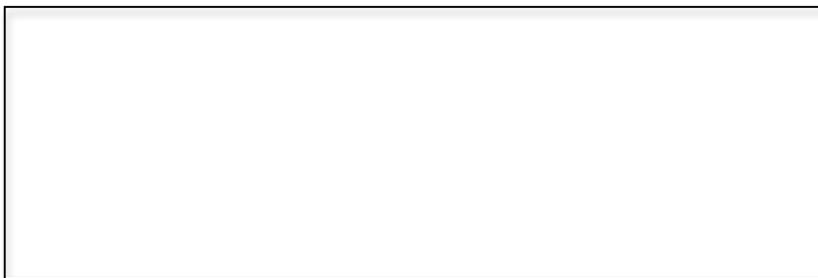
Ao final dos experimentos, as amostras do grupo controle de *P. capillacea* apresentaram coloração e ramificações típicas da espécie (Figura 3A). Por outro lado, a exposição à radiação UV e ao metal pesado cobre resultou na despigmentação dos segmentos apicais das algas (Figura 3B-H, setas). A intensidade da despigmentação foi maior conforme aumentou-se a concentração do cobre (Figura 3C-E), porém esta foi ainda maior nas amostras expostas à radiação UV, especialmente quando simultaneamente ao cobre. As amostras expostas ao cobre e à radiação, simultaneamente, apresentaram uma maior liberação de mucilagem (Figura 3F-H).



**Figura 3.** Morfologia dos segmentos apicais de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo. **A.** Controle. **B.** Amostra exposta à radiação ultravioleta. **C-E.** Amostras tratadas com cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  e 2.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. **F-H.** Amostras expostas à RUVAB e tratadas com cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  e 2.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

## 5.2 Taxa de Crescimento

Após os sete dias de experimento, observou-se que o cultivo das amostras apenas com o metal pesado cobre não resultou em diferenças significativas nas taxas de crescimento (Figura 4, PAR). Entretanto, a exposição das algas apenas à radiação ultravioleta resultou em uma redução da taxa de crescimento, enquanto que o cultivo das algas em metal pesado, quando simultâneo à exposição à radiação UV, resultou em um aumento significativo ( $P < 0.05$ ) das taxas de crescimento (Figura 4, PAR + RUVAB). As espécimes cultivadas com PAR+RUVAB+Cu 1.25  $\mu\text{M}$  e PAR+RUVAB+Cu 2.5  $\mu\text{M}$  demonstraram aumentos de 48.4% e 69.9%, respectivamente, quando comparados ao controle.

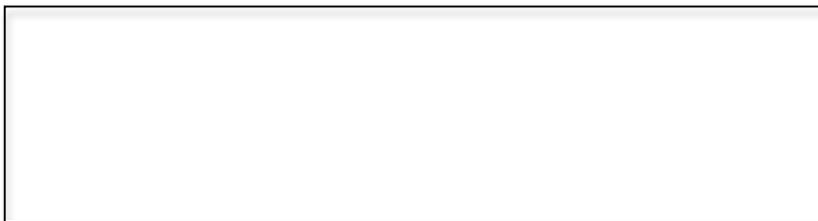


**Figura 4.** Taxas de Crescimento das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de experimento ( $n = 4$ ; média  $\pm$  DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3 Clorofila *a* e Ficobiliproteínas

A concentração de pigmentos fotossintetizantes nas amostras de *P. capillacea* foi significativamente influenciada pela exposição à radiação UV, bem como pelos tratamentos com cobre. Praticamente todos os tratamentos obtiveram um valor reduzido em relação ao valor obtido com o grupo controle (Tabela 1). Os valores obtidos para a concentração de clorofila *a* apresentaram uma maior redução nas amostras tratadas, em relação aos valores obtidos para ficobiliproteínas (AFC, FC e FE).

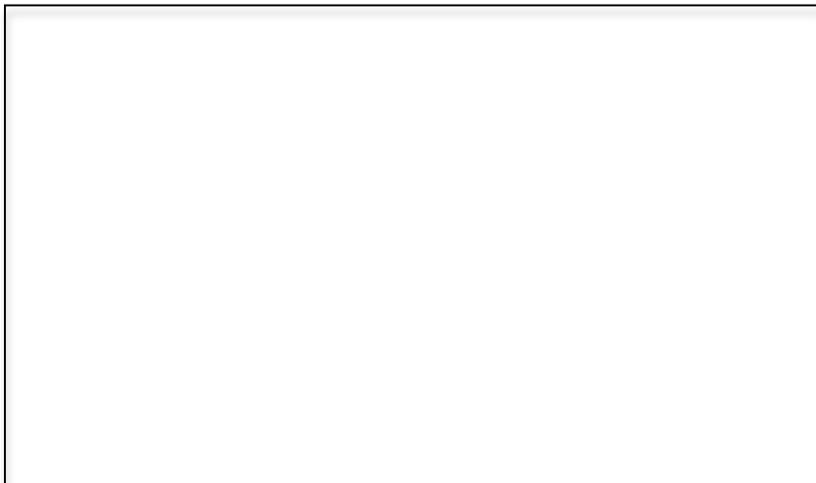
**Tabela 1.** Pigmentos fotossintetizantes de amostras de *P. capillacea* ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) após 7 dias de cultivo ( $n = 4$ ;  $\text{media} \pm \text{DP}$ ). Chl *a*, clorofila *a*; AFC, aloficocianina; FC, ficocianina; FE, ficoeritrina. As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste bifatorial ANOVA e o teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



## 5.4 Microscopia de Luz

Os cortes transversais do grupo controle de *P. capillacea* tratados com PAS (Figura 5A) apresentaram uma reação positiva na parede celular, indicando a presença de celulose neste local. Também no citoplasma pode-se observar uma reação positiva do corante com polissacarídeos neutros, os quais apresentam-se em grande quantidade na forma de grãos de amido das flóridas.

As amostras tratadas com a radiação UV e expostas ao metal pesado cobre apresentaram reações na parede celular e nos grãos de amido similares às observadas nas amostras do grupo controle. O cultivo das algas com solução de cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , com ou sem a exposição simultânea à radiação UV (Figuras 5C e 5F), não levou a alterações significativas na densidade de grãos de amido das flóridas. Entretanto, a exposição à radiação UV (Figura 5B) levou à uma importante diminuição na concentração de grãos de amido, assim como o cultivo das amostras em cobre 1.25  $\mu\text{M}$  e 2.5  $\mu\text{M}$ , com ou sem a simultânea exposição à radiação (Figuras 5D, 5E, 5G e 5H).



**Figura 5.** Microscopia de Luz de secções transversais de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo. **A.** Controle. **B.** Amostra exposta à radiação ultravioleta. **C-E.** Amostras tratadas com cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  e 2.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. **F-H.** Amostras expostas à RUVAB e tratadas com cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , 1.25  $\mu\text{M}$  e 2.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A, amido das florídeas; CC, células corticais; CS, células subcorticais; PC, parede celular.

## 5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Quando observadas em microscopia eletrônica de transmissão, as amostras do grupo controle de *P. capillacea* apresentaram células corticais vacuolizadas, preenchidas por numerosos cloroplastos e alguns grãos de amido das florídeas e cercadas por uma espessa parede celular (Figura 6A). Os cloroplastos apresentaram-se com uma organização interna típica daquela encontrada em algas vermelhas, com tilacóides livres e uniformemente espaçados (Figuras 6B-D). Plastoglóbulos, gotículas elétron-densas de lipídios, puderam ser observados entre os tilacóides (Figura 6B). Pequenas mitocôndrias também encontravam-se presentes, em associação com os cloroplastos (Figura 6B).

A exposição das algas à radiação ultravioleta resultou em alterações na ultraestrutura das mesmas (Figura 7). Células corticais com formato irregular puderam ser observadas (Figuras 7A e 7B), bem como um aumento na vacuolização das células (Figura 7D) e na espessura da parede celular (Figuras 7A e 7B), cujas camadas de microfibrilas podem ser facilmente observadas (Figura 7A). Vesículas de conteúdo fibroso também puderam ser observadas em diversas células corticais (Figura 7C, setas). Além disso, diversos cloroplastos com morfologia irregular também puderam ser observados (Figuras 7B e 7E). Nestes cloroplastos, os

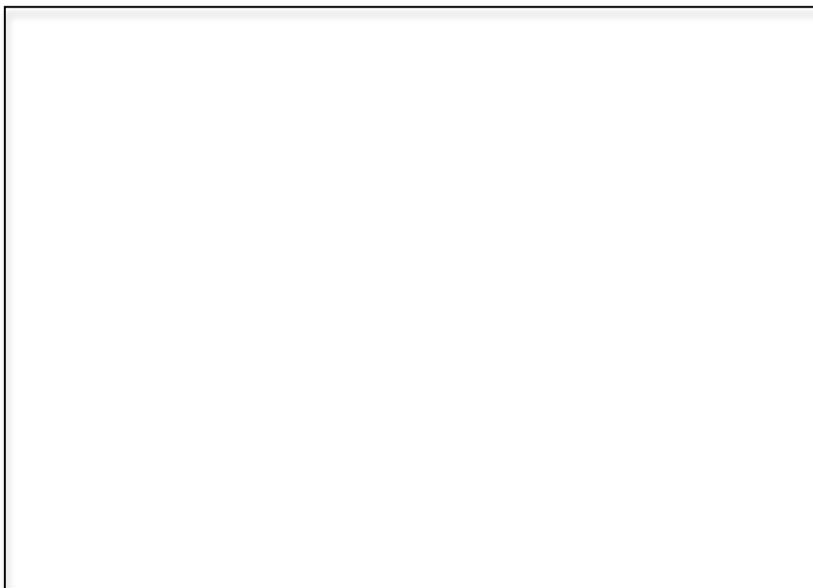
tilacóides encontravam-se degenerados e os plastoglóbulos podia ser observados em maior quantidade (Figura 7E).

As amostras de *P. capillacea* cultivadas com o metal pesado cobre apresentaram poucas alterações ultraestruturais (Figura 8). O citoplasma encontrava-se tipicamente preenchido por cloroplastos (Figuras 8A-F), pequenos vacúolos (Figura 8D) e alguns grãos de amido das florídeas (Figuras 8A-E). Alguns cloroplastos apresentaram membranas tilacoides dilatadas (Figura 8E), porém as cristas mitocondriais não foram modificadas (Figura 8F).

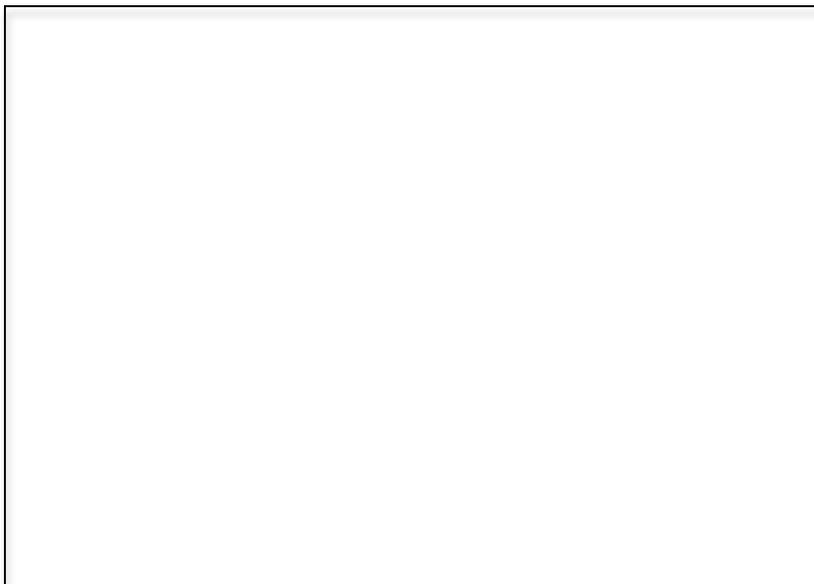
Por fim, os espécimes de *P. capillacea* cultivadas com simultânea exposição ao metal pesado cobre e à radiação ultravioleta apresentaram diversas alterações estruturais (Figura 9). As células corticais destas amostras apresentaram um conteúdo citoplasmático de volume bastante reduzido (Figuras 9A e 9B), e as paredes celulares exibiram um aspecto bastante compacto (Figuras 9A-D). Cloroplastos encontravam-se degenerados (Figuras 9E e 9F), e com um aumentado número de plastoglóbulos (Figura 9F). Poucos grãos de amido das florídeas puderam ser observados no citoplasma (Figuras 9A-D).



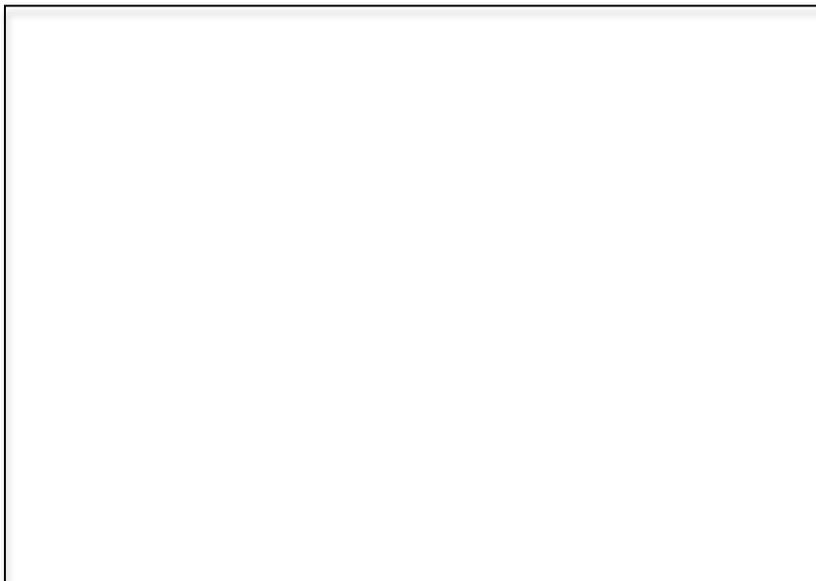
**Figura 6.** Micrografia Eletrônica de Transmissão das amostras do controle de *P. capillacea* após a realização dos experimentos **A.** Visão geral de uma célula cortical. **B e C.** Detalhes dos cloroplastos, demonstrando a típica organização interna destas organelas em algas vermelhas. **D.** Amplificação de um cloroplasto, com detalhes das membranas tilacoides (setas). A, amido das florídeas; C, cloroplasto; CC, células corticais; M, mitocôndria; P, plastoglóbulo; PC, parede celular.



**Figura 7.** Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de *P. capillacea* após 7 dias de exposição à radiação ultravioleta. **A e B.** Células corticais com formato irregular e parede celular espessa. **C.** Vesículas de conteúdo fibroso (setas). **D.** Grande quantidade de vacúolos nas células corticais. **E.** Cloroplasto com formato irregular e maior quantidade de plastoglóbulos. A, amido das florídeas; C, cloroplasto; P, plastoglóbulo; PC, parede celular; V, vacúolo.



**Figura 8.** Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo com o cobre. **A-F.** Células corticais contendo organelas com ultraestrutura normal para a espécie. Poucas modificações ultraestruturais podem ser observadas. **E.** Observa-se uma leve dilatação nos tilacóides da membrana dos cloroplastos. A, amidos das florídeas; C, cloroplasto; M, mitocôndria; PC, parede celular; V, vacúolo.



**Figura 9.** Micrografia Eletrônica de Transmissão de amostras de *P. capillacea* após 7 dias de exposição simultânea à radiação ultravioleta e ao metal pesado cobre. **A e B.** Células corticais apresentando grande redução no volume citoplasmático celular. **A-D.** Parede celular com aspecto mais compacto. **E e F.** Detalhe de cloroplastos degenerados e rompidos. A, amido das florídeas; C, cloroplasto; P, plastoglóbulo; PC, parede celular.

## VI. DISCUSSÃO

As amostras de *P. capillacea* utilizadas nos presente estudo apresentaram diversas alterações morfológicas, bioquímicas e ultra-estruturais, quando expostas ao metal pesado cobre e à radiação ultravioleta. Quando expostas à ambos os agentes estressores, de forma simultânea, as alterações encontradas foram ainda maiores, revelando uma possível ação sinérgica entre o cobre e a radiação ultravioleta.

O cobre é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas (Sorentino, 1979), entretanto, quando em concentrações elevadas, este elemento pode ser tóxico (Hall, 2002). Segundo Leonardi & Vasquez (1999), a concentração total de cobre encontrada naturalmente no mar varia entre 0.002 e 0.6µg/L, porém estes valores podem aumentar consideravelmente em áreas costeiras.

Sendo o cobre um elemento essencial para o metabolismo das algas, é possível que estas possuam transportadores específicos para este elemento (Tonon *et al.*, 2011). Assim, o cobre possui uma maior capacidade de ser transportado para dentro das células. Em geral, quanto maior a mobilidade de um metal pesado, mais significativa é o efeito tóxico deste (Hu *et al.*, 2010). Uma vez dentro das células, o cobre pode facilitar e acelerar o processo de produção de espécies reativas de oxigênio (Mallick & Mohn, 2000), promovendo alterações a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Cöllén *et al.*, 2003), e levando à uma diminuição da eficiência fotossintética.

De forma similar, a radiação ultravioleta, apesar de essencial aos organismos fotossintéticos e, conseqüentemente, a todas as formas de vida, tem sido observada em proporções elevadas em diversas regiões do planeta,

dentre elas a América do Sul (Cabrol *et al.*, 2009). Altas exposições à RUVAB resultam especialmente em danos ao DNA. Estes danos podem ser causados por alterações estruturais diretas (Lois & Buchanan, 1994), como também por alterações indiretas, resultantes da produção de espécies reativas de oxigênio (Mitchell & Karentz, 1993). Danos a pigmentos (Strid *et al.*, 1990), lipídios (Murphy, 1983), proteínas e enzimas (Strid *et al.*, 1990; Vass, 1997), e organelas (Schmidt *et al.*, 2009; Polo *et al.*, 2014) também ocorrem em decorrência da exposição à RUVAB, os quais podem resultar em alterações bioquímicas e fisiológicas nos espécimes, reduzindo sua eficiência fotossintética (Strid *et al.*, 1990), bem como seu crescimento e sucesso reprodutivo (Bischof *et al.*, 2006).

Ao final dos 7 dias de experimento, as amostras de *P. capillacea* tratadas com o cobre apresentaram uma despigmentação leve, enquanto que a RUVAB resultou em uma despigmentação mais acentuada. A despigmentação foi ainda maior nas amostras tratadas com o cobre concomitantemente à exposição à RUVAB. A despigmentação dos segmentos apicais das amostras tratadas com o cobre é possivelmente resultante da diminuição na concentração de pigmentos fotossintetizantes. A despigmentação de segmentos apicais, bem como reduções no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes foram observadas em outras macroalgas vermelhas tratadas com cobre, tais como *Gracilaria domingensis* (Gouveia *et al.*, 2013), *G. lemaneiformis* (Xia *et al.*, 2004) e *Gelidium floridanum* (Santos *et al.*, 2014). Alterações na concentração de pigmentos fotossintetizantes também puderam ser observadas em *Sargassum cymosum* (Polo *et al.*, 2014), *Gelidium floridanum* (Simioni *et al.*, 2014), e *Chondracanthus teedei* (Schmidt *et al.*, 2012) expostas à radiação ultravioleta.

Quando tratadas com o cobre, as amostras de *P. capillacea* não apresentaram alterações significativas em suas taxas de crescimento. A exposição das amostras à RUVAB, por outro lado, resultou em uma significativa redução das TCs. Quando em grandes concentrações, o cobre pode resultar em efeitos tóxicos às macroalgas, dentre estes, menores taxas de crescimento. Tal efeito foi observado por Gouveia *et al.* (2013) em *G. domingensis* e Santos *et al.* (2014) em *G. floridanum*. Entretanto, sendo o cobre um elemento essencial aos organismos, baixas concentrações deste elemento são saudáveis e podem não alterar processos metabólicos relacionados ao crescimento das algas (Linder, 1991). De modo contrário, a RUVAB é geralmente tóxica aos organismos, reduzindo, assim, seu metabolismo e, conseqüentemente, sua biomassa (Bischof *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos para *K. alvarezii*, *G. domingensis* e *Chondracanthus teedei* (Schmidt *et al.*, 2009, 2010 e 2012, respectivamente).

A exposição concomitante do cobre com a RUVAB resultou em TCs iguais ou superiores às do controle. Entretanto, estas amostras exibiram também uma grande quantidade de mucilagem. A mucilagem, rica em polissacarídeos, pode ser resultante de um mecanismo de defesa contra a exposição à elementos estressores, especialmente contra a absorção do cobre (Wang *et al.*, 2009). Assim, o aumento na biomassa destas amostras reflete a liberação de grande quantidade de mucilagem, não estando relacionado a um real aumento nas TCs das amostras tratadas.

A redução na concentração de clorofila *a* em plantas pode estar associada à deficiência de magnésio e ferro (Greger & Ogren, 1991), ou à inibição da síntese de enzimas responsáveis pela produção de clorofila (Stobart *et al.*, 1985). Além disso, o cobre pode ter alterado a estrutura dos

ficobilissomos, reduzindo a concentração de ficobiliproteínas (Xia *et al.*, 2004). A radiação ultravioleta, por outro lado, parece apresentar um efeito mais deletério sobre estes pigmentos. A RUVAB é uma importante fonte de dano ao DNA, especialmente através da formação de dímeros de pirimidina, os quais inibem o progresso de DNA polimerases durante os processos de transcrição e replicação, levando à necrose de parte dos segmentos apicais (Britt *et al.*, 1995). Resultados similares foram obtidos em *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVAB (Schmidt *et al.*, 2010).

Em algas vermelhas, a ficoeritrina é responsável pelos processos de aclimatação, sendo, portanto, o pigmento acessório localizado mais externamente no ficobilissomo (Talarico, 1996). Assim, a ficoeritrina é o primeiro pigmento a ser afetado em condições de estresse, seguido da ficocianina, aloficocianina, carotenoides e, finalmente, a clorofila *a* (Eswaran *et al.*, 2002). No presente estudo, esta escala de sensibilidade ficou bastante evidente para as amostras tratadas com cobre 0.62  $\mu\text{M}$ , cobre 2.5  $\mu\text{M}$  e RUVAB. Porém, para as amostras de *P. capillacea* tratadas com o metal pesado concomitantemente à exposição à radiação, os maiores efeitos puderam ser observados na clorofila *a*, cuja redução foi próxima ou superior a 50%. Com exceção de PAR+RUVAB+Cu 0.62  $\mu\text{M}$  para aloficocianina, PAR+RUVAB+Cu 0.62  $\mu\text{M}$  para ficocianina e PAR+RUVAB+Cu 2.5  $\mu\text{M}$  para ficoeritrina, todos os tratamentos de cobre com radiação resultaram em maiores reduções nas concentrações de pigmentos fotossintetizantes, quando comparados ao tratamento apenas com o metal pesado.

O amido das florídeas possui grande importância como substância de reserva para as algas vermelhas, e em certos casos a densidade de grãos pode chegar a 80% do volume celular total (Ekman *et al.*, 1991). As imagens obtidas em microscopia de luz revelaram uma grande redução na

quantidade de grãos de amido das florídeas nas amostras expostas à radiação. Em algas vermelhas, a síntese e reserva de grãos de amido ocorre no citosol (Pueschel, 1990), sendo, portanto, mais suscetível à alterações devido à estresses ambientais. Mudanças na rota de biossíntese destas reservas, tais como no Ciclo de Calvin, podem resultar na inibição da síntese de reservas, bem como na ativação de vias de degradação, de forma a gerar energia para a produção de compostos de defesa, dentre eles amino ácidos, enzimas e carotenoides (Bouzon *et al.*, 2012).

Para as amostras de *P. capillacea* expostas a soluções de cobre, com ou sem a exposição à RUVAB, a quantidade de grãos diminuiu conforme aumentou-se a concentração do metal. Uma redução na concentração de amido das florídeas foi observado em *G. domingensis* tratadas com cobre (Gouveia *et al.*, 2013). Entretanto, plantas em condições de estresse podem ampliar a produção e reserva de grãos de amido (Daud *et al.*, 2009; Najeeb *et al.*, 2011), e estudos demonstraram um aumento na quantidade de amido das florídeas em rodófitas tratadas com o metal pesado cádmio (Santos *et al.*, 2013; Simioni *et al.*, 2015). Assim, pode-se inferir que a exposição simultânea de *P. capillacea* à radiação ultravioleta e ao cobre resultou em um equilíbrio entre a produção e degradação de grãos de amido das florídeas.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações ultraestruturais em todas as amostras de *P. capillacea* tratadas, em diferentes intensidades. As amostras tratadas com o metal pesado cobre apresentaram poucas alterações, especialmente relacionadas aos cloroplastos, os quais apresentaram algumas membranas tilacóides dilatadas. A radiação ultravioleta resultou em alterações mais profundas nas amostras, tais como aumento na espessura da PC, degeneração de

cloroplastos, e aumento na quantidade de plastoglóbulos e vacúolos. Por fim, as amostras de *P. capillacea* expostas ao cobre e à RUVAB de forma simultânea revelaram grandes alterações ultraestruturais, dentre eles PCs mais compactadas, cloroplastos rompidos e totalmente degenerados, volume citoplasmático reduzido, e uma grande quantidade de plastoglóbulos. Alterações ultraestruturais causadas por agentes estressores como o metal pesado cobre e a RUVAB já foram relatados em diversos estudos com algas (Buma *et al.*, 1995; Correa *et al.*, 1999; Gouveia *et al.*, 2013; Holzinger *et al.*, 2004; Polo *et al.*, 2014). Entretanto, poucos estudos demonstram as alterações ultraestruturais causadas por ambos os agentes estressores, quando em ação simultânea.

A parede celular de rodófitas possui, dentre outros compostos, grandes quantidades de polissacarídeos sulfatados, tais como agar e carragenana. Estes compostos, muito utilizados em indústrias farmacêuticas e alimentícias, fornecem proteção para as algas (Craigie, 1990), evitando a entrada de elementos potencialmente prejudiciais. Algumas das estratégias de resistência à entrada de metais pesados são a absorção, imobilização e precipitação destes compostos (Andrade *et al.*, 2004).

As soluções de cobre utilizadas no presente estudo não alteraram significativamente a espessura da PC de *P. capillacea*. Sendo o cobre um metal pesado essencial, baixas concentrações destes elemento são absorvidas através de transportadores específicos e metabolizados normalmente pelas células, não alterando de forma comprometedor a ultraestrutura das algas. A RUVAB, por outro lado, é altamente tóxica às células, e PCs mais espessas puderam ser observadas após a exposição a este agente estressor. Um aumento na espessura das folhas pode ser observado em plantas (Hollósy, 2001), e estudos demonstram PCs mais

espessas em algas expostas à radiação (Polo *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2009). Esta espessura aumentada deve-se à uma maior atividade do complexo de Golgi, com uma maior deposição de vesículas levando à um espessamento da PC (Bouzon *et al.*, 2012).

De acordo com Häder e Worrest (1991), a radiação ultravioleta pode aumentar a permeabilidade da parede celular, facilitando, assim, a entrada de compostos nas células. As algas tratadas com RUVAB simultaneamente com o cobre apresentaram alterações ultraestruturais graves. Assim, infere-se que a exposição de *P. capillacea* à RUVAB concomitantemente ao cobre resultou em uma maior permeabilidade da PC, permitindo uma maior entrada do metal pesado nas células e resultando em efeitos deletérios maiores nas amostras.

A radiação ultravioleta resultou em maiores alterações aos cloroplastos das algas, quando comparada com o cobre, e os efeitos foram ainda maiores com a exposição simultânea dos dois elementos. Segundo Najeeb *et al.* (2011), os cloroplastos são altamente suscetíveis à estresse oxidativo, e a toxicidade do cobre é significativamente influenciada pela RUVAB (West *et al.*, 2003). Alterações na ultraestrutura dos cloroplastos podem torná-los mais acessíveis à ação de proteases, as quais podem degradar proteínas como a Rubisco, através, por exemplo, da via da ubiquitina (Feller *et al.*, 2008).

Por fim, uma maior quantidade de plastoglóbulos pode ser observada nas amostras expostas à radiação, bem como nas amostras expostas à RUVAB e ao cobre, simultaneamente. Os plastoglóbulos são partículas de material lipídico com a função principal de reserva. Holzinger *et al.* (2009) observou que a exposição de macroalgas à radiação resulta em

um aumento na quantidade destas partículas, as quais são resultantes da supressão de vias de biossíntese protéica em decorrência da limitação de nitrogênio. Além disso, Lichtenthaler (1968) sugere uma relação entre a desconstrução de tilacoides e uma maior reserva lipídica na forma de plastoglóbulos, em resposta à situações de estresse.

## VII. CONCLUSÕES FINAIS

Prever os efeitos cumulativos de agentes estressores pode ser bastante desafiador. Uma grande quantidade de fatores, bióticos e abióticos, podem estar relacionados às interações, tais como especificidade, nível trófico, taxa de reprodução, magnitude dos elementos e padrões temporais (Crain *et al.*, 2008). Consequentemente, dados obtidos em experimentos laboratoriais podem não representar a realidade de uma comunidade frente à determinados agentes estressores. Entretanto, tais experimentos ainda são relevantes e necessários, pois experimentos baseados em mesocosmos são custosos e demandam uma grande quantidade de tempo.

Interações entre as mudanças climáticas, a radiação ultravioleta e um aumento na deposição de elementos poluidores em ambientes aquáticos estão alterando os efeitos resultantes da exposição à radiação UV (Häder *et al.*, 2014). Diversos estudos apontam interações sinérgicas entre a RUVAB e demais elementos. Estas interações são reflexo de mudanças em reações químicas resultantes da combinação destes agentes estressores, como a fototoxicidade (Crain *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram modificações na morfologia, nos pigmentos fotossintetizantes e na ultraestrutura de *P. capillacea* após os tratamentos com o cobre e a radiação UV. A exposição à radiação UV resultou em efeitos mais drásticos às amostras de *P. capillacea*, quando comparados aos efeitos do cobre. Porém, quando em ação simultânea, estes elementos estressores resultaram em efeitos ainda mais deletérios para os parâmetros estudados. Assim, conclui-se que a radiação UV e o metal pesado cobre agem de forma sinérgica sobre a morfologia, a bioquímica e a ultraestrutura da macroalga *P. capillacea*.

## VIII. ARTIGO

Photochemistry and Photobiology, 2015, 91: 359–370

### Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) and Copper on the Morphology, Ultrastructural Organization and Physiological Responses of the Red Alga *Pterocladia capillacea*

Éder C. Schmidt<sup>1,2</sup>, Marianne Kreusch<sup>2</sup>, Marthielen R. de L. Felix<sup>2</sup>, Debora T. Pereira<sup>2</sup>, Giulia B. Costa<sup>2</sup>, Carmen Simioni<sup>2</sup>, Luciane C. Ouriques<sup>2</sup>, Francine L. Farias-Soares<sup>2</sup>, Neusa Steiner<sup>2</sup>, Fungyi Chow<sup>4</sup>, Fernanda Ramlov<sup>2</sup>, Marcelo Maraschin<sup>5</sup> and Zenilda L. Bouzon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Postdoctoral Research of Postgraduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Plant Cell Biology Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>3</sup>Department of Botany, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>4</sup>Department of Botany, Institute of Bioscience, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup>Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Received 29 October 2014, accepted 18 November 2014, DOI: 10.1111/php.12396

#### ABSTRACT

The effect of ultraviolet (UV) radiation and copper (Cu) on apical segments of *Pterocladia capillacea* was examined under two different conditions of radiation, PAR (control) and PAR+UVA+UVB (PAR+UVAB), and three copper concentrations, ranging from 0 (control) to 0.62, 1.25 and 2.50  $\mu\text{M}$ . Algae were exposed *in vitro* to photosynthetically active radiation (PAR) at 70  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , PAR + UVB at 0.35  $\text{W m}^{-2}$  and PAR +UVA at 0.70  $\text{W m}^{-2}$  during a 12-h photocycle for 3 h each day for 7 days. The effects of radiation and copper on growth rates, content of photosynthetic pigments and photosynthetic performance were analyzed. In addition, samples were processed for light and transmission electron microscopy. The content of photosynthetic pigments decreased after exposure to radiation and Cu. Compared with PAR radiation and copper treatments modified the kinetics patterns of the photosynthesis/irradiance curve. The treatments also caused changes in the ultrastructure of cortical and subcortical cells, including increased cell wall thickness and accumulation of chloroglobuli, as well as changes in the organization of chloroplasts. The results indicate that the synergistic interaction between UV radiation and Cu in *P. capillacea*, led to the failure of protective mechanisms and causing more drastic changes and cellular imbalances.

#### INTRODUCTION

Ultraviolet (UV) radiation has become a major issue since the discovery of the ozone hole in Antarctica resulting from the anthropogenic release of atmospheric pollutants such as chlorofluorocarbons (CFCs), halocarbons, chlorocarbons (CCs), dioxins (Nox) and carbon dioxide (1). Scenarios related to observed and predicted climate changes can increase UV-B radiation from

ozone depletion, reinforcing its damaging effects on aquatic organisms. Ultraviolet radiation has three spectral regions, UV-C (200–280 nm), UV-B (280–315 nm) and UV-A (315–400 nm), but only UV-A and UV-B can reach the Earth's surface and have impacts on organisms (1). Higher absorption of UV waveband can cause lesions to nucleic acids (2), lipids and proteins, and alter physiological responses (3,4) and pigment content (3,5,6), besides change ultrastructural organization (7,8). Taken all together, the alterations caused by increased radiation exposure result in decreasing photosynthetic performance (2,3,9) by the organisms.

Despite biogeochemical natural processes, anthropogenic activities have been increasing the content of heavy metal pollutants in water bodies (10). Copper (Cu) is an essential micronutrient for plant growth and development. This metal participates with structural element in regulatory proteins, in photosynthetic electron transport, mitochondrial respiration, oxidative stress, cell wall metabolism, transcription, protein trafficking and hormone signaling (11). However, in excess Cu inhibits growth and impairs important cellular process (photosynthetic electron transport, photosynthesis and respiration). The membrane transport systems seem to be Cu targets, playing a central role in the toxicity processes (11).

However, Cu is also one of the most toxic trace metals to marine macroalgae (11,12), and higher concentrations of this element resulting from industrial and urban effluents are bioaccumulated and biomagnified through the food chains (13). Several studies have shown the harmful effects of copper in macroalgae, such as lower photosynthesis rates (14,15), and increased or inhibited enzymatic activities (16,17), as well as alterations in microtubule and actin filaments morphology (18) and ultrastructure (19,20).

*Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Sammelis & Hommersand is a red macroalgae (Rhodophyta, Gelidiales) and cosmopolitan species that can be found between the shallow intertidal and subtidal rocky shores of Brazil. The genus has great ecological and economic importance for human consumption and agar extraction (21).

\*Corresponding author e-mail: edersch@chsc.us.br (Éder C. Schmidt)  
© 2014 The American Society of Photochemistry

**Figura 10.** Artigo publicado na revista *Photochemistry and Photobiology*, utilizando-se os dados obtidos com o presente trabalho de conclusão de curso (DOI: 10.1111/php.12396).

## IX. REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J.; KARSTEN, U.; LIPPERT, H.; Vogele, B.; PHILIPP, E.; HANELT, D.; WIENCKE, C. 1999. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. **Marine Ecology Progress Series**, 191: 109-119.
- ANDERSON, M. A. & MOREL, F. M. M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax lamarensis*. **Limnology and Oceanography**, 23: 283-95.
- ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; AMADO-FILHO, G. M. 2004. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 58: 117-125.
- ANDRADE, S.; MEDINA, M. H.; MOFFETT, J. W.; CORREA, J. A. 2006. Cadmium-Copper antagonism in seaweeds inhabiting coastal areas affected by copper mine waste disposal. **Environmental Science & Technology**, 40: 4382-87.
- ANGGADIREDDA, J.; ANDYANI, R. & HAYATI, M. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Journal of Applied Phycology**, 9: 477-479.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F. 1987. Production, properties and uses of agar - In: McHugh D.J. (Ed.): **Production and utilization of products from commercial seaweeds - FAO**, 1-57.
- BISCHOF, K.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. **Planta**, 211: 555-562.

BISCHOF, K.; GÓMEZ, I.; MOLIS, M.; HANELT, D.; KARSTEN, U.; LÜDER, U.; ROLEDA, M. Y.; ZACHER, K.; WIENCKE, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 5:141–166.

BOLD, H. C. & WYNNE, M. J. 1985. **Introduction to the Algae**: structure and reproduction. 2 ed. New Jersey: Princeton, 720p.

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

BOUZON, Z. L.; FERREIRA, E. C.; SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E. C. 2012. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. **Protoplasma**, 249(3): 637-350.

BRAGA, E.S.; BONETTI, C.V.D.H.; BURONE, L. & BONETTI-FILHO, J. 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System - Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 40(2): 165-173.

BRITT, A. B. 1995. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. **Plant Physiology**, 108: 891-896.

BUMA, A. G. J.; VAN ROZA, L.; VELDHUIS, M. J. W.; GIESKES, W. W. C. 1995. Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescence thymine dimer detection. **Journal of Phycology**, 31:314-321.

CABROL, N. A.; GRIN, E. A.; CHONG, G.; MINKLEY, E.; HOCK, A. N.; YU, Y.; BEBOUT, L.; FLEMING, E.; HÄDER, D. P.; DEMERGASSO, C.; GIBSON, J.; ESCUDERO, L.; DORADOR, C.; LIM, D.; WOOSLEY, C.; MORRIS, R. L.; TAMBLEY, C.; GAETE, V.; GALVEZ, M. E.; SMITH, E.; USKIN-PEATE, I.; SALAZAR, C. 2009. The High-Lakes Project. **Journal of Geophysical Research**, 114: 01-20.

CÓLLEN, J.; PINTO, E.; PEDERSÉN, M.; COLEPICCOLO, P. 2003. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 45: 337-342.

CORREA, J. A.; CASTILLA, J. C.; RAMIREZ, M.; VARAS, M.; LAGOS, N.; VERGARA, S.; MOENNE, A.; ROMÁN, D.; BROWN, M. T. 1999. Copper, copper mine tailings and their effect on marine algae in Northern Chile. **Journal of Applied Phycology**, 11: 57-67.

CRAIGIE, J. S. 1990. Cells walls. In: KATHLEEN, M. C.; ROBERTO, G. S. (eds.). **Biology of the Red Algae**. Cambridge University Press, 251p.

CRAIN, C. M.; KROEKER, K.; HALPERN, B. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. **Ecology Letters**, 11: 1304-1315.

DAHMS, H.U.; LEE, J.S. 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. **Aquatic Toxicology**, 97: 03-14.

DAUD, M. K.; SUN, Y.; DAWOOD, M.; HAYAT, Y.; VARIATH, M. T.; WU, Y. X.; RAZIUDDIN; MISHKAT, U.; SALAHUDDIN; NAJEEB, U.; ZHU, S. 2009. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. **Journal of Hazardous**

**Materials**, 161: 463–473.

DE FILIPPIS, L. F. 1979. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella cells*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, 92: 39-49.

DIEGUES, A.C. 1999. Human populations and coastal wetlands: conservation and management in Brazil. **Ocean and Coastal Management**, 42: 187-210.

DIETZ, K. J.; BAIER, M.; KRAMER, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In*: PRASAD, M. N. V.; HAGEMEYER J. **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag. 401p.

EKMAN, P.; YU, S. K.; PEDERSÉN, M. 1991. Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, algalactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. **British Phycological Journal**, 26: 123-131.

ESWARAN, L.; MAIRH, O. P.; SUBBA-RAO, P. V. 2002. Inhibition of pigments and phycocolloid in a marine red alga *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. **Biologia plantarum**, 45(1): 157-159.

GAHAN, P.B. 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press, 301p.

FELLER, U.; ANDERS, I.; DEMIREVSKA, K. 2008. Degradation of Rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress. **General and Applied Plant Physiology**, 34: 5-18.

GANTT, E. 1981. Phycobilisomes. **Annual Review Plant Physiology**, 32:

327-347.

GLEDHILL, M.; NIMMO, M.; HILL, S. J. 1997. The toxicity of copper(II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. **Journal of Phycology**, 33: 02-11.

GORDON, E. M. & MCCANDLESS, E. L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J. *Chondrus crispus*. Halifax: Nova Scotian Institute of Science, 155p.

GOUVEIA, C.; KREUSCH, M.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. R. L.; OSORIO, L. K. P.; PEREIRA, D. T.; SANTOS, R.; OURIQUES, L. C.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; CARVALHO, T. J. G.; CHOW, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, C. L. 2013. The Effects of Lead and Copper on the Cellular Architecture and Metabolism of the Red Alga *Gracilaria domingensis*. **Microscopy and Microanalysis**, 19, 513–524.

GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. 2000. **Algae**. 1 ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 640p.

GREGER, M.; ÖGREN, E. 1991. Direct and indirect effects of  $CD^{2+}$  on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiologia Plantarum**, 83(1): 129-135.

HÄDER, D. P.; WORREST, R. C. 1991. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. **Photochemistry and Photobiology**, 53: 717-725.

HÄDER, D. P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C.; WORREST, R. C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with

climate change. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, 46: 53-68.

HÄDER, D. P.; CRAIG, E. W.; WÄNGBERG, S. A.; RAUTIO, M.; ROSE, K. C.; GAO, K.; HELBLING, E. W.; SINHA, R. P.; WORREST, R. 2014. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 14(1): 108-126.

HALL, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 53: 01–11.

HARVEY, W. 1988. Cracking open marine algae. **Biological Treasure Chest Biotechnology**, 06: 487-490.

HISCOX, J. D & ISRAELSTAM, G. F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany**, 57: 1332-1334.

HOLLÓSY, F. 2001. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Microbiology**, 33: 179- 197.

HOLZINGER, A.; LÜTZ, C.; KARSTEN, U.; WIENCKE, C. 2004. The Effect of Ultraviolet Radiation on Ultrastructure and Photosynthesis in the Red Macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic Waters. **Plant Biology**, 06: 568-577.

HOLZINGER, A.; ROLEDA, M. Y.; LÜTZ, C. 2009. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. **Micron**, 40: 831-838.

HORTA, P.A. 2000. Macroalgas do infralitoral sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia. **Tese de Doutorado, Universidade de São**

**Paulo**, São Paulo, Brasil. 301p.

HU, J. Z.; ZHENG, A. Z.; PEI, D. L.; SHI, G. X. 2010. Bioaccumulation and Chemical Forms of Cadmium, Copper and Lead in Aquatic Plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53(1): 235-240.

HUDSON, J. B.; KIM, J. H.; LEE, M. K.; DEWREEDE, R. E.; HONG, Y. K. 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: evidence for multiple activities. **Journal of Applied Phycology**, 10: 427-434.

HUOVINEN, P. S.; SOIMASUO, M. R.; OIKARI, A. O. J. 2001. Photoinduced toxicity of retene to *Daphnia magna* under enhanced UV-B radiation. **Chemosphere**, 45: 683-91.

HUOVINEN, P.; LEAL, P.; GÓMEZ, I. 2010. Interacting effects of copper, nitrogen and ultraviolet radiation on the physiology of three south Pacific kelps. **Marine and Freshwater Research**, 61: 330-41.

JENSEN, A. 1993. Present and future needs for algae and algal products. **Hidrobiologia**, 260/261: 15-23.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E.; LEME, N.P. & SILVA, A.A. 2000. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa, Brazil. **Journal Geophysical**, 18: 63-73.

KRAFT, G. T. 1989. Rhodophyta: Morphology and classification. In: LIGNELL, A.; PEDERSÉN, M, M. Agar composition as a function of morphology and growth rate: Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**, 32: 219-227.

KURSAR, T.A., van DER MEER, J. & ALBERTE, R. S. 1983. Light-

harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. **Plant Physiology**, 73: 361-369.

LEÃO, A.M.N. & DOMINGUEZ, J.M.L. 2000. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 41: 112-122.

LEE, R. E. 1989. Phycology. 2 ed. New York: Cambridge University Press, 560p. LEONARDI, P. I. & VASQUEZ, J. A. 1999. Effects of copper pollution on the ultrastructure of *Lessonia* spp. **Hydrobiologia**, 398/399: 375-383.

LIAO, W. R.; LIN, J. Y.; SHIEH, W. Y.; JENG, W. L.; HUANG, R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 30: 433-439.

LICHTENTHALER, H. K. 1968. Plastoglobuli and the fine structure of plastids. **Endeavor**, 27: 144-149.

LIGNELL, A.; PEDERSÉN, M. 1989. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**, 32: 219-227.

LINDER, M. C. 1991. **Biochemistry of Copper**. Plenum Press, New York, 525p.

LOIS, R.; BUCHANAN, B. B. N. 1994. Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation: II. Mechanisms of UV-resistance in Arabidopsis. **Planta**, 194: 504-509.

LOTZE, H. K.; WORM, B. 2002. Complex interactions of climatic and ecological controls on macroalgal recruitment. **Limnology and**

**Oceanography**, 47(6): 1734-1741.

LUPI, F. M.; FERNANDES, H. M. L.; SÁ-CORREIA, I. 1998. Increase of copper toxicity to growth of *Chlorella vulgaris* with increase of light intensity. **Microbial Ecology**, 35: 193-98.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, 09: 29-35.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, 157: 183-193.

MITCHELL, D. L.; KARENTZ, D. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. *In*: YOUNG, A. R.; BJÖRN, L. O.; MOAN, J.; NULTSCH, W. (eds) **Environmental UV photobiology**. Plenum Press, New York, 480p.

MOLINA, M.J. & ROWLAND, F.S. 1974. Chlorine atom-catalysed destruction of ozone. **Nature**, 249: 810–812.

MURPHY, T. M. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. **Physiologia Plantarum**, 58: 381–388.

NAJEEB, U.; JILANI, G.; ALI, S.; SARWAR, M.; XU, L.; ZHOU, W. 2011. Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. **Journal of Hazardous Materials**, 186: 565-574.

OKUNO, E.; NAKAJIMA, T.; YOSHIMURA, E. M.; HIEDO, F.; FAUSTO, A. M. F.; PAES, W. S.; UMISEDÓ, N. K. & OTSUBO, E. S.

1996. Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Páscoa. RBE. **Caderno de Engenharia Biomédica**, 12: 143- 153.

OLIVEIRA, E.C.; BERCHEZ, F.A.S. 1993. Resource biology of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) populations in Brazil. **Hydrobiologia**, 260: 255-261.

OLIVEIRA, E.C. 1997. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, 06(7): 24-26.

OLIVEIRA, E. C. 2003. **Introdução à Biologia Vegetal**. 2 ed. São Paulo: EDUS, 272p.

PAGLIOSA, P. R.; FONSECA, A.; BARBOSA, F. A. 2006. Evidence of systemic changes in trace metal concentrations in subtropical estuarine sediments as a result of urbanization. **Journal of Coastal Research**, SI 39 (Proceedings of the 8th International Coastal Symposium), 1078-1083.

PEDRINI, A. de G.; MESSAS, T. P.; ROSA, F. C.; PINA, R. S. 2010. Levantamento taxonômico das macroalgas marinhas da Ilha Comprida, estação ecológica de Tamoios, Tarituba, Paraty, Rj, Brasil. **Anais do XIII Simpósio de Biologia Marinha**, Santos/SP, 63: 03.

PESSOA, M. F. 2012. Algae and aquatic macrophytes responses to cope to ultraviolet radiation - a Review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 24(6): 527-545.

POLO, L. K.; FELIX, M. R. L.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; COSTA, G. B.; SIMIONI, C.; OURIQUES, L. C.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, E. C. 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. **Photochemistry and Photobiology**, 90(3): 560-573.

PUESCHEL, C.M. 1979. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, 15: 409-424.

PUESCHEL, C. M. 1990. Cell structure. *In*: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. (orgs.) **Biology of the red algae**. New York: Cambridge University Press, 517p.

REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 17: 208-12.

RIJSTENBIL, J. W.; DERKSEN, J. W. M.; GERRINGA, L. J. A.; POORTVLIET, T. C. W.; SANDEE, A; van den BERG, M.; van DRIE, J.; WIJNHOLDS, J. A. 1994. Oxidative stress induced by copper: defence and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum hightwellii* grown in continuous cultures with high and low zinc levels. **Marine Biology**, 119: 583-90.

ROLEDA, M. Y.; HANELT, D.; KRABS, G.; WIENCKE, C. 2004. Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. **Phycologia**, 43(5): 603-613.

SANTELICES, B.; HOMMERSAND, M. 1997. *Pterocliadiella*, a new genus in the Gelidiaceae (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycologia**, 36(2): 114-119.

SANTOS, R. W.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. L. R.; POLO, L. K.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; COSTA, G. B.; SIMIONI, C.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2014. Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 105: 80–89.

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

SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, 41: 919-930.

SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, B.; PONTES, C. L. M.; SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2012. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, 249: 353- 367.

SHIMADA, S.; HORIGUCHI, T.; MASUDA, M. 2000. Confirmation of the status of three *Pterocladia* species (Gelidiales, Rhodophyta) described by K. Okamura. **Phycologia**, 39: 10- 18.

SIMIONI, C.; SCHMIDT, E. C.; FELIX, M. R. L.; POLO, L. K.; ROVER, T.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D. T.; CHOW, F.; RAMLOV, F.;

MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2014. Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) on Young Gametophytes of *Gelidium floridanum*: Growth Rate, Photosynthetic Pigments, Carotenoids, Photosynthetic Performance, and Ultrastructure. **Photochemistry and Photobiology**, 90: 1050-1060.

SIMIONI, C.; SCHMIDT, E. C.; ROVER, T.; SANTOS, R.; FILIPIN, E. P.; PEREIRA, D. T.; COSTA, G. B.; OLIVEIRA, E. R.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; OURIQUES, L.; MARSCHING, M.; BOUZON, Z. L. Effects of cadmium metal on young gametophytes of *Gelidium floridanum*: metabolic and morphological changes. **Protoplasma**, DOI: 10.1007/s00709-015-0768-7.

SMITH, K. L.; BRYAN, G. W.; HARWOOD, J. L. 1985. Changes in endogenous fatty acids and lipid synthesis associated with copper pollution in *Fucus* spp. **Journal of Experimental Botany**, 36: 663-669.

SORENTINO, C. 1979. The effects of heavy metals on phytoplankton - a review. **Phykos**, 18: 149-161.

SOUSA, M. B.; PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. 2008.  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em algas marinhas in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28(4): 953-958.

SOUTH, G. R. & WHITTICK, A. 1987. **Introduction to Phycology**. 1 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 352p.

SPURR, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, 26: 31-43.

STOBART, A.; GRIFFITHS, W.; BUKHARI, I.; SHERWOOD, P. 1985. The effect of  $Cd^{2+}$  on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley.

**Physiologia Plantarum**, 63: 293-298.

STRID, A.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1020: 260– 268.

TALARICO, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to Light. **Scientia Marina**, 60: 205-222.

TONON, A. P.; OLIVEIRA, M. C.; SORIANO, E. M.; COLEPICOLO, P. 2011. Absorption of metals and characterization of chemical elements present in three species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) Greville: a genus of economical importance. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(2): 355-360.

VALLEE, B. L.; ULMER, D.D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and Lead. **Annual Review Biochemistry**, 41: 19-128.

van den HOEK, C.; MANN, D. G. & JAHNS, H. M. 1989. **Algae: An Introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University press, 640p.

VASS, I. 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *In*: Pessarakli M (ed), **Handbook of photosynthesis**. Marcel Dekker Inc., New York, 952p.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Quimica Nova**, 27(1): 139-145.

WANG, L. K.; CHEN, J. P.; HUNG, Y.; SHAMMAS, N. K. 2009. **Heavy Metals in the Environment**. CRC Press, Boca Raton, FL, 516p.

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. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307–313.

WEST, L. J. A.; LI, K.; GREENBERG, B. M.; MIERLE, G.; SMITH, R. E. H. 2003. Combined effects of copper and ultraviolet radiation on a microscopic green alga in natural soft lake waters of varying dissolved organic carbon content. **Aquatic toxicology**, 64: 39-52.

WOELKERLING, W. An Introduction. *In*: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. 1990. **Biology of the red algae**. Cambridge: Cambridge University Press, 528p.

WYNNE, M. J. 2005. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic**: second revision. Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia, 166p.

XIA, J. R.; LI, Y. J.; LU, J.; CHEN, B. 2004. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 73: 979-986.

ZEPP, R. G.; ERICKSON III, D. J.; PAUL, N. D.; SULZBERGER, B. 2006. **Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling**. The Environmental Effects Assessment Panel Report for 2006.

ZUBER, H. 1986. Structure of light harvesting antenna complex of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. **Journal Trends Biochemical Sciences**, 11: 414-419.