



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

DÉBORA TOMAZI PEREIRA

**TÍTULO: CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Pyropia
acanthophora* var. *brasiliensis*: EFEITO INTERATIVO DA
RADIÇÃO UVA+UVB COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE
NITRATO E DIFERENTES FATORES ABIÓTICOS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Débora Tomazi Pereira

TÍTULO: CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*: EFEITO INTERATIVO DA RADIAÇÃO UVA+UVB COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E DIFERENTES FATORES ABIÓTICOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Zenilda Laurita Bouzon

Co-orientadora: Dr^ª Carmen Simioni

Florianópolis

2019

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

Pereira, Débora

CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*: EFEITO INTERATIVO DA RADIAÇÃO UVA+UVB COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E DIFERENTES FATORES ABIÓTICOS / Débora Pereira ; orientadora, Zenilda Laurita Bouzon , coorientadora, Carmen Simioni , 2019.

137 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Cultivo de macroalga. 3. Biologia celular e do desenvolvimento. 4. Fisiologia. 5. Microscopia. I. , Zenilda Laurita Bouzon. II. , Carmen Simioni. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Débora Tomazi Pereira

Título: CULTIVO DA MACROALGA VERMELHA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*: EFEITO INTERATIVO DA RADIAÇÃO UVA+UVB COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E DIFERENTES FATORES ABIÓTICOS

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Aparecida Gomes Nassar

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Evelise Nazari

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^ª. Eva Regina de Oliveira

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Coordenador do Programa

Prof^ª. Dr^ª. Zenilda Laurita Bouzon

Orientadora

Florianópolis, 30 de julho de 2019.

Dedico este trabalho ao meu pai Vilson Pereira,
minha mãe Benilde Tomazi Pereira,
minha irmã Maria Luiza Tomazi Pereira,
e as minhas orientadoras Zenilda e Carmen
que foram meu porto seguro e meus exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFSC pelo ensino e à CAPES pelo apoio financeiro. À minha orientadora professora Dr^a Zenilda Laurita Bouzon, à minha co-orientadora Dr^a Carmen Simioni, e ao Dr 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 LABCEV, e laboratórios parceiros, principalmente à Dr^a Fernanda Ramlov pela colaboração em diversas análises e por ter dedicado tempo para discussão e ajuda a este trabalho.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento por todo conhecimento passado. Ao LAMEB e LCME, laboratórios multiusuários que proporcionaram o uso de equipamentos de excelente qualidade.

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

Agradeço aos meus pais, Vilson Pereira e Benilde Tomazi Pereira, pelo incentivo, amor, carinho e ensino em todos os momentos da minha vida e por tornar possível a minha caminhada pela Universidade Federal de Santa Catarina. À minha querida irmã, Maria Luiza Tomazi Pereira, pelas palavras e por todo o incentivo. Ao meu namorado, Vitor Oliveira de Souza, pela paciência em escutar meus desabafos, pelos incentivos e pelas risadas proporcionadas, tornando tudo mais simples.

RESUMO

Pyropia é considerado o gênero de macroalga marinha mais domesticada no planeta e é conhecida como Nori, a alga do sushi, utilizada na alimentação por todo o mundo. Este gênero apresenta alternância de gerações entre gametófitos haploides (n) macroscópicos, os quais são utilizados para o consumo alimentício, e esporófitos diploides (2n) microscópicos. Cada geração libera um tipo de esporo diferente, onde gametófitos liberam carpósporos, os quais formarão a fase 2n, enquanto os esporófitos liberam conchósporos, que formarão a fase n. Dependendo das condições, geralmente estresse, as duas fases também podem liberar monósporos, esporos que regeneram a sua própria fase. Por serem organismos sésseis, estão em condições propícias para receber diferentes e alterados fatores abióticos. Um dos fatores abióticos mais danosos para as algas é a elevada dose de radiação ultravioleta (RUV). Existem três tipos de RUV, a RUVA, a RUVB e a RUVVC, porém somente as duas primeiras atingem a superfície terrestre. A RUVA é conhecida por ser benéfica as plantas e algas, enquanto a RUVB é conhecida por ser prejudicial, causando negativas alterações morfológicas e fisiológicas. Outro fator muito importante para o desenvolvimento de algas são os nutrientes, principalmente o nitrato (NO_3^-). O NO_3^- é um íon que ocorre naturalmente no ambiente como um nutriente, proveniente de decomposição aeróbia, porém a sua presença em concentrações elevadas geralmente é devido à atividade antrópica, como a aplicação de fertilizantes orgânicos e inorgânicos e o uso de sistemas de saneamento *in situ*. O nitrogênio (N) presente no NO_3^- auxilia na formação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas, hormônios, pigmentos e aminoácidos tipo micosporinas. A presença destas duas últimas moléculas pode mitigar os efeitos da RUV, porém são poucas as informações que estão disponíveis na literatura para explicar os efeitos dessa atividade simultânea de NO_3^- e RUV em talos de macroalgas, faltando informações sobre as respostas na morfologia, ultraestrutura, na produção de metabólitos secundários. Assim como ausência total de estudos com esporos de algas tratadas com NO_3^- e RUV simultaneamente. Portanto, buscamos respostas dos efeitos de elevadas concentrações deste nutriente no cultivo da macroalga *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll expostos a PAR+RUVA+RUVB (PAB) nos primeiros dias de desenvolvimento dos carpósporos e na morfofisiologia do talo desta macroalga. Além disso, sabendo que as algas sofrem com mudanças em fatores abióticos (salinidade, temperatura, fotoperíodo, dessecação, entre outros) e que isto pode ser estressante para o organismo, o conhecimento de qual tipo de esporo a alga libera em condições de estresse poderá ajudar no alcance de uma estratégia para a produção desta macroalga, onde a pesquisa básica dá suporte à pesquisa aplicada. Para tanto foram realizados três experimentos: 1) cultivo dos talos em diferentes concentrações de NO_3^- e RUV; 2) cultivo dos carpósporos em diferentes concentrações de NO_3^- e RUV e 3) cultivo dos talos em diferentes fatores abióticos para verificar o estresse oxidativo e a liberação de monósporos. Para o talo, a presença de NO_3^- é um fator que contribuiu para mitigar os efeitos da RUV e é determinante para as respostas antioxidantes. Entretanto, a ausência deste nutriente não contribui para a mitigação dos efeitos gerados pela RUV. Para o segundo experimento, concluiu-se que a RUV é um fator limitante para o desenvolvimento de carpósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, enquanto o NO_3^- influencia, mas não limita, o desenvolvimento. E para o terceiro experimento, observou-se baixo estresse oxidativo em todos os tratamentos, com exceção aos expostos à RUV. Justamente nestes únicos tratamentos que encontramos a liberação de monósporos (monósporos que refazem a fase foliácea),

indicando que quanto maior o estresse oxidativo, maior o desequilíbrio metabólico e como forma de sobrevivência rápida da espécie ocorre a reprodução assexuada.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes; monósporos; estresse oxidativo; metabólitos; microscopia confocal; microscopia eletrônica de transmissão; carpósporos

ABSTRACT

Pyropia is considered the genus of the most domesticated macroalga on the planet and is known as Nori, the alga of sushi, used in food all over the world. This genus presents alternation of generations between macroscopic gametophytes haploid (n), which are used for food consumption, and microscopic sporophytes diploid (2n). Each generation releases a different spore type, where gametophytes release carpospores, which will form phase 2n, while the sporophytes release conchospores, that will form the phase n. Depending on the conditions, usually stress, the two phases can also release monospores, spores that regenerate their own phase. Because they are sessile organisms, they are able to receive different and altered abiotic factors. One of the most harmful abiotic factors for algae is the high dose of ultraviolet radiation (UVR). There are three types of UVR, UVA, UVB and UVC, but only the first two reach the Earth's surface. UVA is known to be beneficial plants and algae, while UVB is known to be harmful, causing negative morphological and physiological changes. Another very important factor for the development of algae is the nutrients, mainly nitrate (NO_3^-). NO_3^- is an ion that occurs naturally in the environment as a nutrient from aerobic decomposition, but its presence in high concentrations is usually due to anthropic activity, such as the application of organic and inorganic fertilizers and the use of inorganic sanitation systems *situ*. Nitrogen (N) in NO_3^- helps in the formation of molecules of proteins, nucleic acids, vitamins, enzymes, hormones, pigments and mycosporin-like amino acids. The presence of these two last molecules may mitigate the effects of UVR, but little information is available in the literature to explain the effects of this simultaneous NO_3^- and UVR activity on macroalgal thalli, lacking information on the responses in the morphology, ultrastructure, in the production of secondary metabolites. As well as total absence of studies with algae spores treated with NO_3^- and UVR simultaneously. Therefore, we searched for responses of the effects of high nutrient concentrations on *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll exposed to PAR+UVA+UVB (PAB) in the first days of carpospores development and in the thalli morphophysiology of this macroalga. In addition, knowing that algae suffer from changes in abiotic factors (salinity, temperature, photoperiod, desiccation, among others) and that this can be stressful for the organism, the knowledge of what type of spore the alga releases under stress conditions will can help in achieving a strategy for the production of this macroalga, where basic research supports applied research. For that, three experiments were carried out: 1) cultivation of thalli in different concentrations of NO_3^- and UVR; 2) culture of the carpospores in different concentrations of NO_3^- and UVR and 3) culture of the thalli in different abiotic factors to verify the oxidative stress and the release of monospores. For the thallus, the presence of NO_3^- is a factor that contributed to mitigate the effects of the UVR and is determinant for the antioxidant responses. However, the absence of this nutrient does not contribute to the mitigation of the effects generated by the UVR. For the second experimente, it is concluded that UVR is a limiting factor for the development of carpospores of *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, while NO_3^- influences, but does not limit, the development. Finally, for the third experimente, it was observed low oxidative stress for all treatments, except for those exposed to UVR. It is precisely in these unique treatments that we find the release of archeospores (monospores that redo the foliaceous phase), indicating that the higher the oxidative stress, the higher the metabolic imbalance and as a way of rapid survival of the species asexual reproduction occurs.

Keywords: antioxidant enzymes; monospores; confocal microscopy; metabolites; oxidative stress; transmission electronic microscopy; carpospores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida bifásico e heteromórfico de <i>Pyropia acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i>	5
Figura 2. Desenho experimental do experimento com talo de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> com oito grupos experimentais: quatro concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) e expostos à PAR e PAB. Cada grupo experimental tinha 6 réplicas compostas por béqueres com 2 g de alga e 500 mL de água do mar esterilizada.....	13
Figura 3. Taxas de crescimento expressas em % de crescimento.dia ⁻¹ do experimento com talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM). Valores apresentados com média (n = 6; média ± erro padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial seguida de teste de Tukey (p ≤ 0,05).....	22
Figura 4. Morfologia externa dos talos da macroalga vermelha <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório. Barras de escala = 1 cm. a. Talo esverdeado exposto à PAR [0]. b-d. Talos amarronzados e com porções férteis (setas) quando expostos à PAR [25], [50] e [100]. e-h. Talos delgados expostos à PAB. e. Talo esverdeado exposto à PAB [0]. f-h. Talos marrom escuros e bem fragmentados expostos à PAB [25], [50] e [100].....	23
Figura 5. Viabilidade mitocondrial (absorbância em 570 nm), por ensaio de MTT, de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) (n = 6; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05).....	24
Figura 6. Talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 10 µm) submetidos à reação com Azul de Toluidina (AT-O). a-d. Amostras expostas à PAR com reação metacromática nas paredes celulares (PC). e-h. Amostras expostas à PAB também com reação metacromática nas paredes celulares e um maior espessamento de PC (setas). Em todas as amostras o pirenoide (Pi) foi bem evidente.	27
Figura 7. Talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 10 µm) submetidos à reação com Ácido Periódico Schiff (PAS). a-h. Amostras com reação positiva ao PAS, presença de açúcares neutros. a-d. Amostras expostas à PAR não apresentaram diferenças entre si quanto à quantidade de amido. e-h. Amostras expostas à PAB com a menores quantidade de amido.	28
Figura 8. Talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 50 µm) e confocal (barras de escala = 10 µm). a-c. Amostra exposta à PAR [0] com cloroplastos despigmentados, com pouca autofluorescência e sem formato “estrelado”. d-i. Amostras expostas à PAR [25] e [50] com cloroplastos amarronzados e “estrelados” e autofluorescência intensa. j-l. Amostra exposta à PAR [100] com cloroplastos com pigmentação marrom, “estrelados” e autofluorescentes, e regiões com ausência de autofluorescência. m-o. Células do PAB [0] com citoplasma hialino e granuloso, e os cloroplastos com baixa autofluorescência e sem ramificações. p-x. Amostras tratadas com PAB [25], [50] e [100] com	

cloroplastos apresentando pigmentação marrom, com ramificações e com maior intensidade de autofluorescência em relação à PAB [0].	30
Figura 9. Talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> observados em microscopia de luz (barras de escala = 50 µm) e confocal (barras de escala = 30 µm). Todas as amostras, e com mais frequência aquelas expostas à RUV, apresentaram regiões com células transparentes (a, b) que apresentavam autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 405 nm (c, d), mas ausência de autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 488 nm (e, f). Junção das imagens com excitação em 405 nm, 488 nm e campo claro (g, h).	31
Figura 10. Detalhes de cloroplastos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia eletrônica de transmissão. a. Detalhe de cloroplasto do PAR [0] com tilacoides intactos, mas com grande quantidade de plastoglóbulos (P). b-d. Detalhe de cloroplastos do PAR [25], [50] e [100] com tilacoides paralelos e baixa quantidade de P. e. Detalhe de cloroplastos do PAB [0] com tilacoides normais e muitos P. f-h. Detalhe de cloroplastos do PAB [25], [50] e [100] com tilacoides bem definidos.	32
Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) de variáveis fisiológicas de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> (TC, MTT, clorofila <i>a</i> , AFC, FC, FE, espessamento de parede celular, luteína, zeaxantina, Tr 4,17 min, α-caroteno, β-caroteno, carotenoides totais, fenólicos totais, flavonoides totais, inibição do DPPH, açúcares solúveis totais, amido total) levando em consideração a concentração de NO ₃ ⁻ (a) e o tratamento (b). Dendrograma de análise de agrupamento hierárquico de variáveis fisiológicas de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> levando em consideração a concentração de NO ₃ ⁻ (c) e o tratamento (d). Os números, como rótulos de grupo, são definidos da seguinte forma: 1-3: PAR [0]; 4-6: PAR [25]; 7-9: PAR [50]; 10-12: PAR [100]; 13-15: PAB [0]; 16- 18: PAB [25]; 19-21: PAB [50]; 22-24: PAB [100].	37
Figura 12. Desenho experimental do experimento com carpósporos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> com oito grupos experimentais: quatro concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) e expostos à PAR e PAB. Cada grupo experimental tinha 5 réplicas composta por placa de Petri com 4 lâminas de vidro para liberação dos carpósporos.	52
Figura 13. Carpósporos da macroalga vermelha <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 µm) expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. a-h. Esporos com 24 h de desenvolvimento, de todos os tratamentos, foram visualizados com coloração amarronzada e em torno de 10 µm de diâmetro. a-d. Células do PAR com uma protuberância em um dos pólos da célula, para formação de tubo germinativo (setas). e-h. Células do PAB com uma polarização desorganizada nos pólos (setas). i-l. Esporos com 48 h de desenvolvimento e expostos à PAR apresentaram-se bem desenvolvidos, com tubo germinativo maiores que 20 µm de comprimento. m-p. Células expostas à PAB e 48 h de desenvolvimento apresentaram-se bem alterados e com um retardo do desenvolvimento, sem formação de tubo germinativo, com retração do citoplasma e com o conteúdo citoplasmático desorganizado, além da presença de carpósporos com coloração esverdeada indicando sua inviabilidade (setas).	59
Figura 14. Carpósporos da macroalga vermelha <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> , observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 µm), corados com AT-O e expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. a-h. Amostras expostas à PAR	

(a-d) e à PAB (e-h), após 24 h de desenvolvimento, apresentaram uma reação metacromática para roxo, com maior quantidade de polissacarídeos ácidos, e uma reação mais fraca na periferia do citoplasma. **i-l**. Amostras expostas à PAR e 48 h de desenvolvimento, apresentaram esporos com tubo germinativo, e com reação metacromática para roxo na parede celular e no tubo formado. **m-p**. Amostras expostas à PAB e 48 h de desenvolvimento, apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, não sendo evidenciada marcação na região central. 62

Figura 15. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 µm), corados com PAS e expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-b**. Amostras PAR [0] e [25], com 24 h de desenvolvimento, coradas com PAS apresentaram uma reação positiva na região central, e uma reação mais fraca pelo citoplasma. Polarização para o tubo germinativo corado com o PAS (seta). **c-d**. Amostras expostas à PAR [50] e [100], com 24 h, também apresentaram o padrão anterior, porém com uma intensidade muito mais forte. **e-h**. Amostras expostas à PAB e 24 h de desenvolvimento, com uma reação positiva e homogênea do PAS. Polarização para o tubo germinativo não corado com o PAS (seta). **i-l**. Amostras PAR, com 48 h de desenvolvimento, apresentaram uma reação positiva do PAS por todo o esporo, especialmente na espessa parede celular (setas). **m-p**. Amostras tratadas com PAB e 48 h, apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, sendo evidenciada uma leve marcação na região central e um citoplasma granuloso. 64

Figura 16. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, observados ao microscópio confocal (barras de escala = 10 µm), expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-d**. Amostras expostas à PAR e com 24 h de desenvolvimento, apresentaram um cloroplasto central, único e estrelado, e com mesma intensidade de autofluorescência (vermelho). O tamanho dos braços do cloroplasto foi menor na PAR [0]. **e-h**. Amostras expostas à PAB e com 24 h, apresentaram uma fraca autofluorescência dos cloroplastos dos carpósporos com [0], porém PAB [25], [50] e [100] apresentaram intensa autofluorescência. **i-l**. Amostras expostas à PAB e com 48 h de desenvolvimento, apresentavam esporos com tubo germinativo, uma autofluorescência do cloroplasto tanto na célula do esporo, como no tubo germinativo. **m-p**. Amostras expostas à PAB e 48 h, apresentaram fraca autofluorescência, principalmente na amostra PAB [0]. **a-p**. Uma reação positiva da parede celular foi evidenciada por todo o esporo (azul) e na mesma intensidade para todos os tratamentos. 66

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 48 h. **a-c**. Carpósporos tratados com [0] com formato esférico, com cloroplastos (C) e mitocôndrias (M) e com parede celular (PC) pouco desenvolvida. **d-f**. Carpósporos tratados com [25], com divisão celular (seta), pirenoide (Pi), tilacoides organizados (setas) e presença de PC. **g-i**. Carpósporos tratados com [50] com polarização (seta), plastoglôbulos (P) e PC. **j-l**. Carpósporos tratados com [100] com polarização (seta), Pi, vesículas (V) com material para formação de PC, e uma PC desenvolvida. 68

Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 48 h. **a-b**. Carpósporo sem divisões celulares e parede celular, com formato irregular e presença de

grãos de amido (A) e vesículas eletrón desnsas (V). **c.** Presença de grãos de amido já utilizados (setas). **d.** Cloroplasto (C) com tilacoides organizados, porém com presença de plastoglobulos (P). Mitocôndrias também foram observadas (M)..... 69

Figura 19. Microscopia de luz dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR [50] e à PAB [50] tratados por mais 5 dias somente com PAR. **a-d.** Os carpósporos da PAR [50] apresentaram estrutura filamentosa típica de *Pyropia*. **e.** No primeiro dia de desenvolvimento do carpósporo exposto à PAB [50] apresentou uma célula com citoplasma desorganizado e colapsado, de coloração marrom claro. **f-h.** No quarto e quinto dias do desenvolvimento, os carpósporos continuaram a se colapsar, tornando-se esverdeados e uma célula vazia..... 70

Figura 20. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 7 dias e observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 μm) (**a-d**) e média dos comprimentos dos tubos germinativos das mesmas amostras (**e**). Valores apresentados com média (n = 5; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 71

Figura 21. A) Taxas de ERO expressas em % dos experimentos com carpósporos com 48 h após a liberação de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR [50] e à PAB [50] por 48 h. Valores apresentados com média (n = 5; média \pm DP). Asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste T independente ($p \leq 0,05$). **B)** Microscopia confocal (barras de escala = 10 μm) dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR (**a**) e à PAB (**b**) em laboratório por 48 h e incubados com DCFH-DA. Fluorescência verde indica presença de ERO e fluorescência vermelha indica autofluorescência do cloroplasto. 72

Figura 22. Análise de componentes principais (PCA) de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* (esporos viáveis, viáveis com tubo, alterados e inviáveis) levando em consideração a concentração de NO_3^- (a,c) e o tratamento (b,d) após 24 e 48 h de desenvolvimento. 73

Figura 23. Morfologia externa de talos de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* no início do experimento (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, u, w, y) e após 14 dias de exposição aos tratamentos (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t, v, x, z) (n = 3, média \pm DP). Detalhe para a presença de bordas avermelhadas, indicando a presença de células reprodutivas, no controle (b), 15 ups (d), 15 °C (h), von Stoch 50 % (n) e nos experimentos com dessecação (p, r). Amostras expostas a 55 ups (f), von Stoch 0 % (l), e fotoperíodos (t, v) não apresentaram alterações entre o talo inicial e após os 14 dias de experimento. Enquanto amostras expostas a 30 °C (j) e das RUV (x, z) apresentaram fragmentação e alteração em sua textura do talo. 90

Figura 24. Esporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* liberados após 14 dias de tratamentos. **a,b.** Carpósporos liberados em todos os tratamentos. **c-f.** Monósporos liberados quando expostos por 14 dias à PAB e PAR+RUVB (barras de escala = 20 μm). 91

Figura 25. Detecção de ERO in vivo utilizando DCFH-DA em *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 92

Figura 26. Microscopia confocal utilizando DCFH-DA em *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média \pm DP). Em verde a fluorescência do DCF e em vermelho

a autofluorescência do cloroplasto. Nota-se maior presença de fluorescência verde nos tratamentos com RUV e exposição a dessecação por 48 h.93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de pigmentos fotossintetizantes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca), clorofila <i>a</i> (Cl. <i>a</i>) e ficobiliproteínas (AFC: aloficocianina, FC: ficocianina, FE: ficoeritrina) de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> exposta à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 6$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	26
Tabela 2. Espessamento da parede celular (μm) de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> exposta à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 30$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	28
Tabela 3. Conteúdo de carotenoides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) (luteína, zeaxantina, Tr 4,17 min, α -caroteno, β -caroteno e carotenoides totais (soma de todos os carotenóides identificados)) de talos <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n=3$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	33
Tabela 4. Conteúdo de fenólicos e flavonoides totais (mg.g^{-1} de massa seca), e inibição do radical livre DPPH (%) de talos <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 4$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	34
Tabela 5. Conteúdo de açúcares solúveis totais (a) e amido (b) (mg.g^{-1} de massa seca) de talos <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 3$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	35
Tabela 6. Taxas de germinação expressas em % de esporos dos experimentos com carpósporos com 24 h após a liberação de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) por 24 h. Valores apresentados com média ($n = 5$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	60
Tabela 7. Taxas de germinação expressas em % de esporos dos experimentos com carpósporos com 48 h após a liberação de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) por 48 h. Valores apresentados com média ($n = 5$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	61
Tabela 8. Taxa de dessecação em % de perda de água nos talos de <i>Pyropia acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> após 24 h secos e 24 h molhados, e 48 h secos e 24 h molhados. Valores apresentados com média ($n = 3$, média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	85
Tabela 9. Ausência ou presença de carpósporos e de monósporos de acordo com os tratamentos com diferentes fatores abióticos.	91

Tabela 10. Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT (U/mL/ μ g de proteína)), superóxido dismutase (SOD (U/ μ g de proteína)), e guaiacol peroxidase (POX (U/mL/ μ g de proteína)) de *Pyropia acanthophora var. brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....94

LISTA DE ABREVIATURAS

- A- amido das florídeas
AFC- aloficocianina
ANOVA- análise de variância unifatorial
AT-O- azul de toluidina
ATP- adenosina trifosfato
BrFC- bromofluorcarbonetos
C- cloroplasto
CAT- catalase
CCA- Centro de Ciências Agrárias
CCB- Centro de Ciências Biológicas
Cl *a*- clorofila *a*
CFC- clorofluorcarbonetos
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCF- 2',7'-diclorofluoresceína fluorescente
DCFH-DA- 2',7'-diclorodihidro fluoresceína diacetato
DNA- ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
DP- desvio padrão
DPPH- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTT- ditioneitol
EDTA- ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
ERO- espécies reativas de oxigênio
FC- ficocianina
FE- ficoeritrina
g- grama
h- hora
HCA- do inglês *hierarchical clustering analysis*
IPCC- do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*
IUV- índice ultravioleta
LABCEV- Laboratório de Biologia Celular Vegetal
LAMEB- Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia
LCME- Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LMBV- Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
M- molar
M- mitocôndria
mM- milimolar
mg- miligrama
MAA- aminoácidos tipo micospolina, do inglês *mycosporine like amino acids*
MANOVA- Análise de Variância Bifatorial
MC- microscopia confocal

MCW- metanol:clorofórmio:água
Md- massa dessecada
MET- microscopia eletrônica de transmissão
min- minutos
Mf- massa final
Mi- massa inicial
mL- mililitro
ML- microscopia de luz
Mm- massa molhada
Ms- massa seca
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio de brometo
n- haploide
nm- nanômetro
P- plastoglôbulos
PA- perda de água
PAB- PAR+RUVA+RUVB
PAR- radiação fotossinteticamente ativa
PAS- ácido periódico Schiff, do inglês *periodic acid-Schiff*
PC- parede celular
PCA- do inglês *principal components analysis*
Pi- pirenoide
PMSF- do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*
POX- guaiacol peroxidase
PVP- polivinilpirrolidona
RIV- radiação infravermelha
RUV- radiação ultravioleta
RUVA- radiação ultravioleta A
RUVB- radiação ultravioleta B
RUVC- radiação ultravioleta C
seg- segundos
SOD- superóxido dismutase
t- tempo
TC- taxa de crescimento
Tr- tempo de retenção
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina
 μm – micrômetro
 μL - microlitro
ups - unidade padrão de salinidade
V- vesícula
2n- diploide

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Radiação ultravioleta e camada de ozônio	1
Nitrato	2
<i>Pyropia acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i>	3
OBJETIVOS	6
Objetivo Geral.....	6
Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO I.....	7
O EFEITO COMBINADO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO NA MORFOFISIOLOGIA DA MACROALGA <i>Pyropia</i> <i>acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> (RHODOPHYTA, BANGIALES).....	7
Resumo	7
Abstract.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico	11
2.2 Condições de Cultivo	11
2.3 Taxa de Crescimento (TC).....	13
2.4 Viabilidade Mitocondrial (MTT).....	13
2.5 Pigmentos Fotossintetizantes	14
2.5.1 Ficobiliproteínas.....	14
2.5.2 Clorofila <i>a</i>	14
2.6 Microscopia de Luz (ML)	15
2.6.1 Citoquímica.....	15
2.7 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC).....	16

2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	16
2.9 Extração e Quantificação de Carotenoides.....	17
2.10 Extração e Dosagem de Fenólicos Totais.....	17
2.11 Extração e Dosagem de Flavonoides Totais.....	18
2.12 Inibição do Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	18
2.13 Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais.....	19
2.14 Extração e Dosagem de Amido.....	19
2.15 Análise e Interpretação dos Dados.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1 Efeitos de Concentrações de NO ₃ ⁻ e RUV nas Taxas de Crescimento (TC) e na Morfologia dos Talos.....	21
3.2 Efeitos de Concentrações de NO ₃ ⁻ e RUV na Viabilidade Mitocondrial.....	23
3.3 Efeitos de Concentrações de NO ₃ ⁻ e RUV na Quantificação dos Pigmentos Fotossintetizantes: Clorofila <i>a</i> e Ficobiliproteínas.....	24
3.4 Alterações Morfológicas: Espessamento de Parede Celular e Presença de Grãos de Amido.....	26
3.5 Organização e Autofluorescência dos Cloroplastos.....	29
3.6 Alterações na Ultraestrutura dos Cloroplastos.....	31
3.7 Perfil Carotenóidico.....	32
3.8 Compostos Fenólicos, Flavonoides e Inibição do Radical Livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	33
3.9 Açúcares Solúveis Totais e Amido.....	35
3.10 Análise de Componentes Principais e de Agrupamentos Hierárquicos de Variáveis Fisiológicas dos Talos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> Expostos à NO ₃ ⁻ e RUV.....	36
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	44
CAPÍTULO II.....	45
GERMINAÇÃO DE CARPÓSPOROS DA MACROALGA VERMELHA <i>Pyropia acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> (RHODOPHYTA, BANGIALES): EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UVA+UVB) E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50

2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico	50
2.2 Condições de Cultivo	50
2.3 Análise da Morfologia e Processos de Germinação	52
2.4 Microscopia de Luz (ML)	52
2.4.1 Citoquímica	53
2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
2.6 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC).....	54
2.7 Medida do Esporo e do Tubo Germinativo após 7 Dias de Desenvolvimento.....	54
2.8 Detecção de ERO por DCFH-DA	55
2.9 Análise e Interpretação dos Dados	55
3. RESULTADOS.....	57
3.1 Desenvolvimentos dos Carpósporos	57
3.2 Citoquímica dos Carpósporos	61
3.3 Autofluorescência dos Cloroplastos e Formação da Parede Celular	65
3.4 Alterações na Ultraestrutura dos Carpósporos	67
3.5 Morfologia dos CarpósporosApós 5 Dias sem Exposição à RUV	69
3.7 Formação de ERO nos Carpósporos	71
3.8 Análise de Componentes Principais de Variáveis Fisiológicas dos Carpósporos de <i>P. acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i> Expostos à Altas Concentrações de NO ₃ ⁻ e de RUV.....	72
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÃO	78
CAPÍTULO III	79
EFEITOS DE FATORES ABIÓTICOS NAS RESPOSTAS OXIDATIVAS E NA PRODUÇÃO DE MONÓSPOROS NA MACROALGA VERMELHA <i>Pyropia acanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i>	79
Resumo	79
Abstract.....	80
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.1 Ponto de Coleta	83
2.2 Coleta e Processamento do Material Biológico	83
2.3 Condições de Cultivo	83
2.4 Observação de Monósporos	86

2.5 Detecção de ERO <i>in vivo</i> usando DCFH-DA	86
2.6 Enzimas Antioxidantes.....	87
2.6.1 Precipitação e Quantificação de Proteínas	87
2.6.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	87
2.6.4 Guaiacol Peroxidase (POX).....	88
2.7 Análises Estatísticas.....	88
3. RESULTADOS.....	89
3.1 Morfologia Externa	89
3.2 Presença de Monósporos Observados sob Microscopia de Luz (ML)	91
3.3 Detecção de ERO <i>in vivo</i> usando DCFH-DA	92
3.4 Enzimas Antioxidantes.....	94
4. DISCUSSÃO	95
5. CONCLUSÃO	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS.....	101

INTRODUÇÃO GERAL

Radiação ultravioleta e camada de ozônio

A luz solar é de grande importância para a manutenção da vida no planeta Terra (DIFFEY, 1991) e é dividida de acordo com o comprimento de onda dentro do espectro solar eletromagnético em: radiação gama, radiação X, radiação ultravioleta (RUV), radiação fotossinteticamente ativa/visível (PAR), radiação infravermelho (RIV) e ondas de rádio (DIFFEY, 2002; BALOGH et al., 2011). Dentro desta divisão, e das radiações que chegam a superfície terrestre, o comprimento de onda com maior efeito deletério para os organismos, em altas doses, é a RUV.

A RUV (100-400 nm) é dividida, de acordo com o II Congresso Internacional sobre a Luz de 1932 em Copenhague, em três tipos: ultravioleta-A (RUVA), ultravioleta-B (RUVB) e ultravioleta-C (RUVC), sendo que RUVA compreende de 400-315 nm (RUVA-I de 400-340 nm e RUVA-II de 340-315 nm), RUVB de 315-280 nm e RUVC de 280-100 nm (DIFFEY, 2002). A quantidade e a qualidade/tipo da RUV que chega à superfície terrestre dependem das propriedades da atmosfera (DIFFEY, 1991), e a maior interação entre RUV e atmosfera ocorre na estratosfera, camada onde se encontram moléculas de ozônio (O_3), de nitrogênio (N_2) e de oxigênio (O_2), ocorrendo assim atenuação da radiação (DIFFEY, 2002). A RUVA é fracamente atenuada pelo O_3 , chegando em grandes quantidades à superfície terrestre; a RUVB é atenuada de maneira eficiente, mas não completamente pelo O_3 ; e a RUVC é completamente atenuada pelo O_3 (BEISSERT; GRANSTEIN, 1996; DE LAAT et al., 1996; SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 1997).

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 desmontaram, até que, em 1973, três cientistas, Paul Josef Crutzen, Frank Sherwood Rowland e Mario Molina, verificaram os efeitos dos clorofluorcarbonetos (CFC) e bromofluorcarbonetos (BrFC), classes de gases que podem ficar na sua forma estável por anos na atmosfera, e chegar à estratosfera (MOLINA; ROWLAND, 1974). Na estratosfera, estes gases podem ser dissociados por energia proveniente da RUV e liberar o elemento cloro, flúor e bromo, os quais se ligam ao átomo de oxigênio (O) e molécula de oxigênio (O_2), impedindo a formação de novas moléculas de O_3 estratosférico (MOLINA; MOLINA, 1987; CRUTZEN, 1974; STOLARSKI;

CICERONE, 1974). Essa problemática nos leva ao índice no qual a redução de 1 % da camada de O₃ leva a um aumento de 1,3 % a 1,8 % os níveis de RUVB que atingem a superfície do planeta (HOLLÓSY, 2002).

De acordo com o relatório do IPPC (Intergovernmental Panel on Climate Change), a concentração dos gases de efeito estufa na atmosfera é a mais alta desde os últimos 800 mil anos, e se nenhuma providência for tomada, a temperatura média global deve aumentar 5 °C e os níveis dos oceanos devem aumentar 0,7 metros até 2100 (IPCC, 2013). Esta elevada concentração de gases na atmosfera também pode diminuir a quantidade de reconstrução de moléculas de O₃, e consequentemente os níveis de RUV. 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 9 a 14 na escala de índice de RUVB (IUV), a qual vai de 0 a 16.

Biologicamente, a RUVA é conhecida por ser benéfica para plantas e algas, auxiliando no crescimento (POLO et al., 2014), no desenvolvimento de embriões (HENRY; ALSTYNE, 2004) e na produção da enzima RuBisCo (BISCHOF et al., 2002); enquanto que a RUVB, em doses elevadas, é a mais prejudicial aos organismos (TSAI et al., 2009; GODIN-BEEKMANN, 2010) e a que mais provoca efeitos negativos, diretos e indiretos, sobre as plantas (DE ALMEIDA et al., 2013), tanto nos seus processos fisiológicos, bioquímicos, quanto morfológicos e moleculares (FIGUEROA et al., 1997; FLORES-MOYA et al., 1999; WIENCKE et al., 2000; HEO et al., 2010, HOLZINGER; LÜTZ, 2006; SCHMIDT et al., 2009, POPPE et al., 2003; ROLEDA et al., 2010; BISCHOF et al., 2000; PEREIRA et al., 2014, ROLEDA et al., 2004; SCHMIDT et al., 2010; FIGUEROA et al., 2014; POLO et al., 2014). Porém, todos estes efeitos dependem da dose recebida e do objetivo, por exemplo, se o propósito for produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante a RUVB será uma ótima radiação para este fim.

Nitrato

O nitrato (NO₃⁻) é um íon que ocorre naturalmente no ambiente como um nutriente, proveniente de decomposição aeróbia (VESILIND; MORGAN, 2013). Segundo a resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (CONAMA, 2005), o teor máximo de NO₃⁻ em águas salinas é 44 mg.L⁻¹ (0,7 mM), porém a sua presença em concentrações elevadas geralmente é devido à atividade antrópica, como a aplicação de fertilizantes orgânicos e inorgânicos e o uso de sistemas de saneamento *in situ* (BARBOSA, 2005; BAIRD; CANN, 2011). O íon NO₃⁻ é

extremamente solúvel em água, o que facilita a disseminação e contaminação das águas (BARBOSA, 2005). O nitrogênio (N) presente no NO_3^- auxilia na formação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas e hormônios (BRAGA et al., 2005) e é o principal nutriente considerado limitante para o crescimento de algas marinhas (HANISAK, 1990). Estudos com macroalgas em diferentes concentrações de NO_3^- indicam um aumento na produção de aminoácidos tipo micospolina (MAA) (ZHENG; GAO, 2009; BARUFI et al., 2011) e de pigmentos fotossintetizantes (BARUFI et al. 2011), aumento da taxa de crescimento (JEANFILS et al., 1993) e de viabilidade celular (DO; CORMIER, 1991). Além disso, o favorecimento da produção destas moléculas (MAA e pigmentos) pela presença de N pode mitigar os efeitos da RUV, como sugerido por Barufi et al. (2011). Porém, estas são as poucas informações que estão disponíveis na literatura para explicar os efeitos dessa atividade simultânea de NO_3^- e RUV em talos de algas, faltando informações sobre as respostas na morfologia, ultraestrutura, na produção de metabólitos secundários, assim como ausência total de estudos com esporos de algas tratadas com NO_3^- e RUV simultaneamente. Portanto, buscamos respostas dos efeitos de elevadas concentrações do nutriente no cultivo da macroalga *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* expostos a PAR+RUVA+RUVB (PAB) nos primeiros dias de desenvolvimento dos carpósporos e na morfofisiologia do talo desta macroalga.

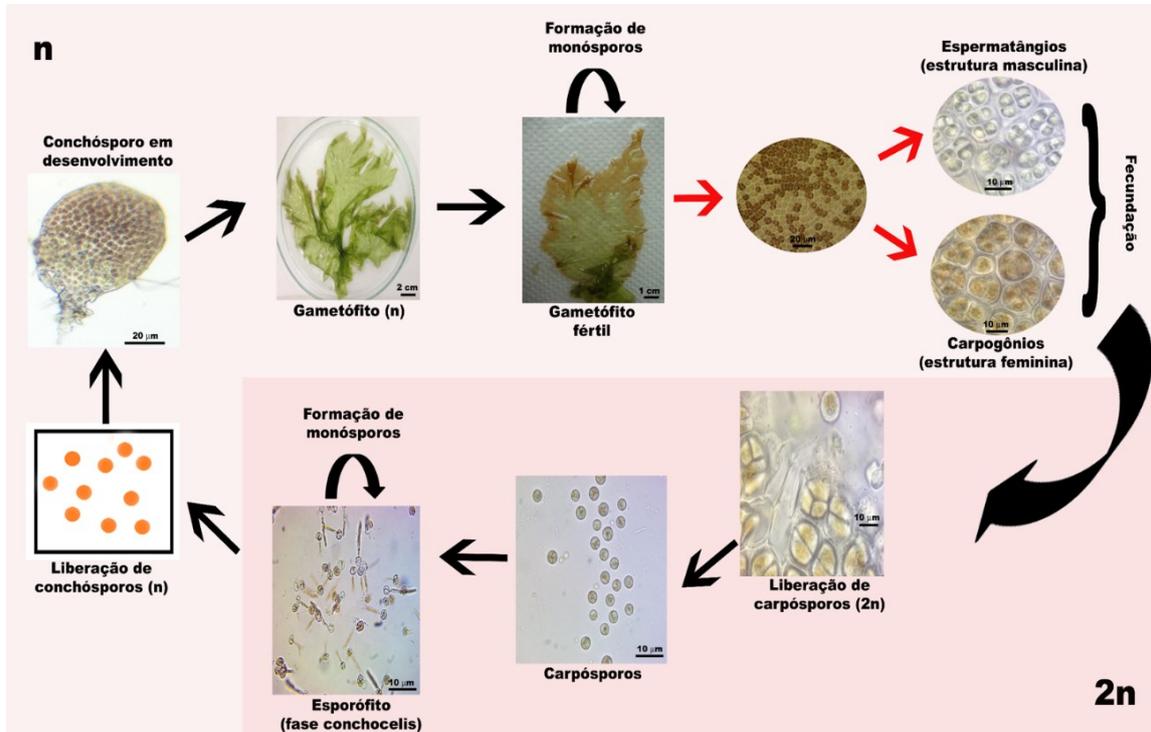
Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis

Porphyra é um gênero de macroalga vermelha pertencente à ordem Bangiales (BLOUIN et al., 2011), encontrada na zona de supra litoral e com tolerância ao estresse ambiental, como alta luminosidade, estresse osmótico e dessecação (CHAN et al., 2012). Recentemente, estudos moleculares dos genes da subunidade maior da proteína RuBisCo e da subunidade menor ribossomal, concluíram que todas as espécies do gênero *Porphyra*, encontradas no Brasil, tratam-se de espécies do gênero *Pyropia* (MILSTEIN et al., 2015). Ambos os gêneros pertencem à ordem Bangiales e possuem as mesmas características morfológicas, apenas com pequenas alterações genéticas. Além do Brasil, o gênero *Pyropia* já foi encontrado no Japão, Austrália, México e Mar Mediterrâneo (MILSTEIN et al., 2015).

Pyropia é considerado o gênero de macroalga marinha mais domesticada no planeta (SCHWEIKERT et al., 2011) e é conhecido como Nori, a alga do sushi, utilizada na alimentação por todo o mundo (ZHANG et al., 2003; ZHOU et al., 2012). *Pyropia* apresenta talo foliáceo com uma ou duas células de espessura, esta lâmina encontra-se

ligada ao substrato por células rizoidais finas e incolores (GRAHAM et al., 2009; BOUZON et al., 2012). As células desta alga são compostas por um ou dois grandes cloroplastos estrelados, com um grande pirenoide central, ocupando a maior parte do citoplasma (GRAHAM et al., 2009). *Pyropia* possui agarana na composição da parede celular, um polissacarídeo sulfatado, que para este gênero é conhecido como Porphyran (ZHANG et al., 2003; CHAN et al., 2012). Algas do gênero *Pyropia* possuem outros polissacarídeos com atividades fisiológicas importantes, como atividade antiviral, anticâncer, anticoagulante, antioxidante e regulação do sistema imune (ZHOU et al., 2012); além de ser fonte de ferro, vitaminas do complexo B e C (BLOUIN et al., 2011) e MAA com função fotoprotetora (MERCURIO et al., 2015). Apresenta alternância de gerações entre gametófitos (n) macroscópicos, os quais são utilizados para o consumo alimentício, e esporófitos (2n) microscópicos (BLOUIN et al., 2011). Cada geração libera um tipo de esporo diferente, onde gametófitos liberam carpósporos, os quais formarão a fase 2n, enquanto os esporófitos liberam conchósporos, que formarão a fase n (BLOUIN et al., 2011). Dependendo das condições, geralmente estresse, as duas fases também podem liberar monósporos, esporos que regeneram a sua própria fase (BLOUIN et al., 2011) (Fig. 1). De acordo com Bouzon et al. (2012), *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira e Coll exposta à RUV produz um grande número de esporos, agindo como um mecanismo de propagação da espécie sob condições de estresse, assim como o estresse oxidativo por H₂O₂ em *P. yezoensis* (Ueda) M.S.Hwang & H.G.Choi faz a alga liberar monósporos (TAKAHASHI; MIKAMI, 2017). Porém, faltam estudos sobre este mecanismo de sobrevivência. O conhecimento de qual tipo de esporo a alga libera em condições de estresse pode ajudar no alcance de uma estratégia para a produção comercial desta alga, onde a pesquisa básica dá suporte à pesquisa aplicada.

Figura 1 Ciclo de vida bifásico e heteromórfico de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*.



OBJETIVOS

Objetivo Geral

➤ Avaliar os efeitos da PAB (PAR+RUVA+RUVB) e do nitrato na morfologia e na fisiologia de talos e no desenvolvimento de carpósporos de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*. Além de determinar quais fatores estressores podem contribuir para a liberação de monósporos.

Objetivos Específicos

➤ Avaliar as taxas de crescimento nas porções foliáceas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* tratadas com PAR (radiação fotossinteticamente ativa) e com PAB juntamente com diferentes concentrações de nitrato;

➤ Verificar a viabilidade celular nas porções foliáceas e nos esporos, nos diferentes tratamentos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*;

➤ Caracterizar as alterações morfológicas e ultraestruturais nas porções foliáceas e nos esporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* dos tratados com PAR e com PAB juntamente com concentrações de nitrato;

➤ Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas e clorofila *a*) das porções foliáceas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* tratadas com PAR e com PAB juntamente com diferentes concentrações de nitrato;

➤ Definir o perfil carotenóidico das porções foliáceas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* tratadas com PAR e com PAB juntamente com diferentes concentrações de nitrato;

➤ Quantificar o conteúdo total de fenólicos, flavonoides, açúcares solúveis e amido nos diferentes tratamentos nas porções foliáceas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*;

➤ Analisar a atividade antioxidante nos esporos e nas porções foliáceas na presença de agentes estressores de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*;

➤ Avaliar a produção de monósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* na presença de agentes estressores.

CAPÍTULO I

O EFEITO COMBINADO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO NA MORFOFISIOLOGIA DA MACROALGA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* (RHODOPHYTA, BANGIALES)

Resumo

Macroalgas são organismos sésseis, assim precisam suportar as condições presentes no local em que estão fixadas para sobreviverem. Condições estas que podem estar desreguladas, como quantidade de nutrientes, principalmente nitrato (NO_3^-), devido ao despejo de esgoto diretamente no mar; ou até mesmo altas irradiâncias, causadas pela diminuição da camada de ozônio (O_3). Este trabalho procurou avaliar se a quantidade de NO_3^- na água influencia nas respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da macroalga *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll quando exposta à radiação ultravioleta (RUV). Portanto, experimentos com talos de *P. acanthophora* foram realizados após aclimatação de 7 dias, e expostos à 0, 25, 50 e 100 mM de NO_3^- e à PAR+RUVA+RUVB (PAB) por 3 h ao dia, durante 7 dias, com dose diária de 5,05 J.cm^{-2} para RUVA e de 0,095 J.cm^{-2} para RUVB. As taxas de crescimento, a viabilidade celular e os pigmentos fotossintéticos foram menores nas amostras expostas à PAB, quando comparadas com aquelas expostas à PAR. A autofluorescência do cloroplasto foi menor nas amostras tratadas sem NO_3^- , resultando num talo despigmentado. A ultraestrutura dos cloroplastos não sofreu nenhuma alteração após os tratamentos, mas apresentou grande quantidade de plastoglóbulos nas amostras com ausência do nutriente. Os metabólitos secundários antioxidantes aumentaram nas amostras expostas à PAB, enquanto as maiores concentrações de açúcares solúveis totais foram encontradas nas amostras expostas à PAR [0] e [100] e à PAB [0]. A presença de NO_3^- foi um fator que contribui para mitigar os efeitos da RUV e foi determinante para as respostas antioxidantes.

Palavras-chave: antioxidantes; metabólitos secundários; microscopia confocal; microscopia eletrônica de transmissão, pigmentos fotossintéticos.

Abstract

Macroalgae are sessile organisms, so they must withstand the conditions present where they are fixed to survive. These conditions may be modified, such as nitrate (NO_3^-) owing to the discharge of sewage directly into the sea, or even high irradiances caused by the decrease of the ozone layer (O_3). This work aimed to evaluate if the amount of NO_3^- in the water influences the morphological, physiological and biochemical responses of the macroalga *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll when exposed to ultraviolet radiation (UVR). Therefore, experiments with *P. acanthophora* were performed after acclimation of 7 days and subsequent exposure to 0, 25, 50 and 100 mM of NO_3^- and PAB (=PAR+UVAR+UVBR) for 3 hours per day for 7 days, with a daily dose of 5.05 J.cm^{-2} for UVRA and of 0.095 J.cm^{-2} for UVRB. Growth rates, cell viability and photosynthetic pigments were lower in the samples exposed to PAB, when compared to those exposed to PAR. The autofluorescence of the chloroplast was lower in the treated samples without NO_3^- , resulting in a depigmented thalli. The ultrastructure of the chloroplasts did not change after the treatments, but presented a large amount of plastoglobuli in the samples with absence of the nutrient. The antioxidant secondary metabolites increased in the samples exposed to PAB, while the highest concentrations of total soluble sugars were found in samples exposed to PAR [0] and [100] and to PAB [0]. The presence of NO_3^- was a contributing factor to mitigate the effects of UVR and was determinant for antioxidant responses.

Keywords: antioxidants; confocal microscopy; photosynthetic pigments; secondary metabolites; transmission electronic microscopy

1. INTRODUÇÃO

Pyropia acanthophora var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll é uma macroalga vermelha encontrada na zona de supra litoral, e apresenta tolerância ao estresse ambiental, como alta luminosidade, estresse osmótico e dessecação (CHAN et al., 2012). Esta macroalga é conhecida como Nori, utilizada na fabricação do sushi, um alimento conhecido e consumido em todo o mundo (ZHANG et al., 2003; ZHOU et al., 2012), apresentando grande importância econômica. Macroalgas são organismos sésseis, portanto não se movimentam em busca de ótimas condições abióticas, tendo que suportar as condições ocorrentes no local em que estão fixadas para sobreviverem. Muitas vezes estas condições podem estar desreguladas, como disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrato (NO_3^-), devido ao despejo de esgoto diretamente no mar; ou até mesmo altas irradiâncias, causadas pela diminuição da camada de ozônio (O_3) e pela exposição natural da alga em marés baixas; assim como alterações na temperatura e salinidade.

O NO_3^- é um íon que ocorre naturalmente no ambiente como um nutriente, proveniente de decomposição aeróbia (VESILIND; MORGAN, 2013), porém sua presença em concentrações elevadas geralmente é devido à ação humana, como a aplicação de fertilizantes orgânicos e inorgânicos e o uso de sistemas de saneamento *in situ* (BARBOSA, 2005; BAIRD; CANN, 2011). Estudos com macroalgas em diferentes concentrações de NO_3^- indicam a produção de aminoácidos tipo micosporina (MAA) (ZHENG; GAO, 2009; BARUFI et al., 2011), de pigmentos fotossintetizantes (BARUFI et al., 2011), alterações nas taxas de crescimento (JEANFILS et al., 1993; LI et al., 2008) e na viabilidade celular (DO; CORMIER, 1991).

Biologicamente, a radiação ultravioleta-A (RUVA) é conhecida por ser benéfica para plantas e algas, auxiliando no crescimento (POLO et al., 2014), no desenvolvimento de embriões (HENRY; ALSTYNE 2004) e na produção da enzima RuBisCo (BISCHOF et al., 2002); enquanto que a radiação ultravioleta-B (RUVB), em doses elevadas, é a mais prejudicial aos organismos, levando à alterações nos processos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e moleculares (FIGUEROA et al., 1997; FLORES-MOYA et al., 1999; WIENCKE et al., 2000; HEO et al., 2010, HOLZINGER; LÜTZ, 2006; POPPE et al., 2003; FREITAS, 2012; BISCHOF et al., 2000; ROLEDA et al., 2004; FIGUEROA et al., 2014; POLO et al., 2014).

As ações conjuntas da radiação ultravioleta (RUV) com diferentes fatores abióticos da água podem ampliar ou amenizar a ação destes agentes ambientais sobre as

macroalgas, tornando-os estressores. Tanto a RUV, como alterações na qualidade da água podem impactar simultaneamente as macroalgas, levando à alterações morfológicas, celulares e bioquímicas. Sabe-se que o NO_3^- reduz o efeito da RUV na macroalga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui* Zhang & Xia devido ao aumento das concentrações de MAA, clorofila, ficocianina e ficoeritrina (BARUFI et al., 2012). Entretanto, poucas informações estão disponíveis na literatura para explicar os efeitos dessa atividade simultânea de NO_3^- e RUV em algas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se as concentrações de NO_3^- na água do mar podem influenciar na taxa de crescimento, na viabilidade celular, na ultraestrutura e na produção de metabólitos secundários da macroalga *P. acanthophora* var. *brasiliensis* quando exposta à RUV.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico

Os gametófitos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* foram coletados na porção mais alta da zona intertidal do costão rochoso da Praia de Sambaqui, Florianópolis-SC, Brasil, (27°29'S e 48°32'O), nos meses de agosto e setembro de 2015. A concentração média de NO_3^- nas águas desta praia é de $3,73 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (PEREIRA et al., 2019a).

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 água do mar da Praia de Sambaqui. No laboratório, os talos foram lavados com água do mar, da Praia do Sambaqui, filtrada e esterilizada e triados para remoção de contaminantes. Porções saudáveis (talos firmes e com coloração verde amarronzada, típica da alga) foram selecionadas e seguiram para o cultivo com água do mar, da Praia do Sambaqui, esterilizada acrescida de meio von Stosch (50 %; EDWARDS, 1970) (composto por NaNO_3^- , MnCl_2 , EDTA, NaHPO_4 , FeSO_4 , biotina, cianocobalina e tiamina) durante 7 dias em condições controladas, sendo este período o de aclimação. As condições controladas da sala de cultura foram: temperatura do ar de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 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), salinidade de 35 ups e fotoperíodo de 12 h, iniciando às 8:00 h. No início do quarto dia de aclimação, 50 % do volume de água foi renovado e acrescentando novamente meio von Stoch 50 %.

2.2 Condições de Cultivo

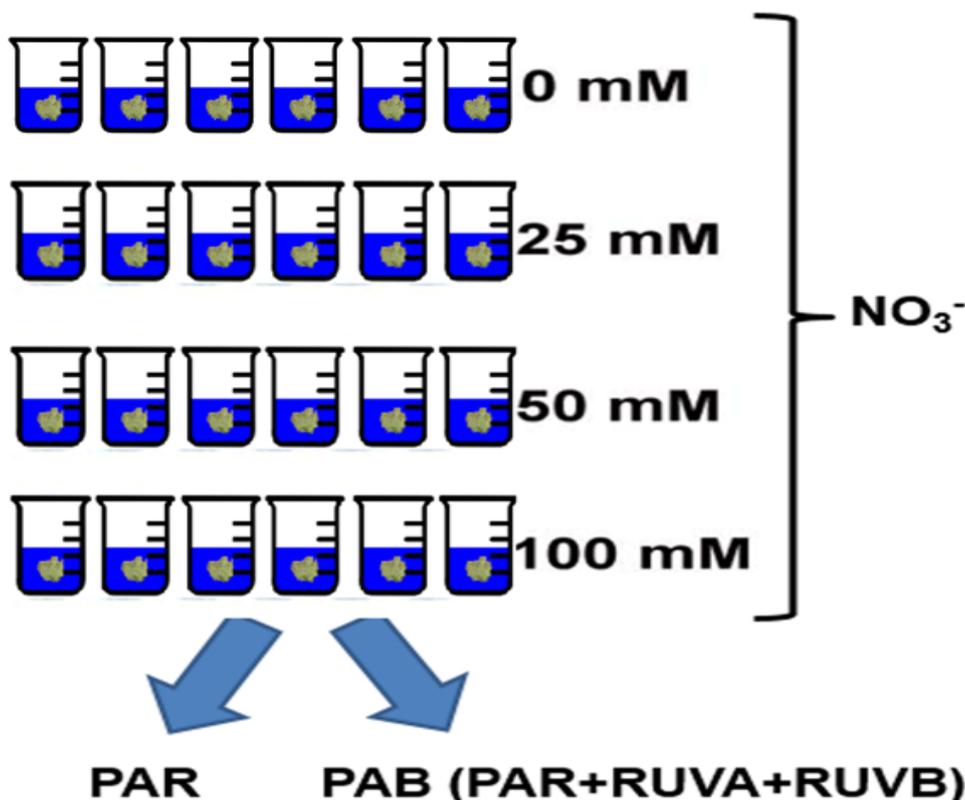
Após a aclimação, os gametófitos foram cultivados nas mesmas condições citadas acima. As RUVA e RUVB artificiais foram fornecidas pela lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée - France, que emite picos nos comprimentos de onda de 312 nm (RUVB) e de 365 nm (RUVA). A dose diária foi de $5,05 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVA e de $0,095 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVB (Light Radiometer Model PMA 2100, usando PMA 2107B-UW (underwater) UV sensor (UVA+UVB) e PMA 2102 (UVB) (Solar Light, USA). As doses de RUVA e RUVB ocorreram simultaneamente e foram baseadas nas intensidades que estas radiações ocorrem durante o inverno de Florianópolis (PEREIRA et al., 2019b), já que o gametófito desta alga ocorre no inverno.

Logo após a aclimação, porções de *P. acanthophora* de aproximadamente $2.0 \pm 0,05$ g foram cultivadas em frascos do tipo béquer com 500 mL de água do mar filtrada e esterilizada, acrescida de meio von Stosch 50 % modificado sem NO_3^- (EDWARDS, 1970), e concentrações de 0 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM de NO_3^- (concentrações baseadas em outros trabalhos com algas (DO; CORMIER, 1991; JEANFILS et al., 1993; CHEN et al., 2011)). Foram realizados experimentos com RUV e diferentes concentrações de NO_3^- , totalizando oito grupos experimentais:

- 1) PAR 0 mM de NO_3^- (PAR [0]);
- 2) PAR 25 mM de NO_3^- (PAR [25]);
- 3) PAR 50 mM de NO_3^- (PAR [50]);
- 4) PAR 100 mM de NO_3^- (PAR [100]);
- 5) PAR+RUVA+RUVB 0 mM de NO_3^- (PAB [0]);
- 6) PAR+RUVA+RUVB 25 mM de NO_3^- (PAB [25]);
- 7) PAR+RUVA+RUVB 50 mM de NO_3^- (PAB [50]);
- 8) PAR+RUVA+RUVB 100 mM de NO_3^- (PAB [100]).

Foram feitas seis réplicas para cada grupo experimental (Fig. 2). No quarto dia de experimento foi acrescentado novamente o meio von Stosch 50 % sem NO_3^- . As algas foram expostas à PAB durante 3 h (das 12:00 às 15:00 h, horários com maior pico de RUV no ambiente) por um período de 7 dias. Durante a exposição, a aeração foi aumentada nos tratamentos 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 aos expostos à PAR, para que todos os béqueres recebessem intensidade luminosa similar. No término do experimento parte dos talos frescos foram utilizados para as análises da taxa de crescimento, viabilidade celular e processados para as análises citológicas, e a outra parte foi armazenada em nitrogênio líquido para extração dos metabólitos primários e secundários.

Figura 2. Desenho experimental do experimento com talo de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* com oito grupos experimentais: quatro concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) e expostos à PAR e PAB. Cada grupo experimental tinha 6 réplicas compostas por béqueres com 2 g de alga e 500 mL de água do mar esterilizada.



2.3 Taxa de Crescimento (TC)

O efeito da PAB e do NO_3^- no crescimento dos talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* foi avaliado através da diferença entre a massa da matéria fresca no início e no final dos tratamentos ($n = 6$ béqueres por grupo). As taxas de crescimento foram apresentadas como porcentagem de crescimento diário ($\% \text{ dia}^{-1}$), sendo calculadas segundo a fórmula de Yong e Anton, (2013): $\text{TC} = [(Mf/Mi)^{1/t-1}] * 100$; onde TC é taxa de crescimento ($\% \text{ dia}^{-1}$); Mf é massa final em gramas; Mi é massa inicial (Mi) em gramas; e t é tempo em dias.

2.4 Viabilidade Mitocondrial (MTT)

A viabilidade mitocondrial foi determinada através da redução do brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)) em formazan (produto cromogênico púrpura resultante da redução de sais de tetrazólio) por enzimas desidrogenases mitocondriais, as quais reduzem o MTT em um

composto insolúvel púrpura. A concentração de formazan foi determinada espectrofotometricamente, uma vez que esta é proporcional à quantidade de mitocôndrias ativas e, por consequência, o número de células vivas. Os segmentos de alga (0,050 g de massa fresca) foram incubados com uma solução de 30 μL de MTT (0,17 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MTT) com água do mar esterilizada (3 mL de volume final) durante 3 h em estufa a 37 °C, posteriormente lavados e transferidos para um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) (MENDES et al., 2013). A absorvância foi determinada a 570 nm (SpectraMax Paradigm Molecular Devices) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), localizado no CCB da UFSC-Florianópolis. As análises foram realizadas com $n = 6$ (béqueres por grupo) e a viabilidade mitocondrial foi expressa no valor das absorvâncias.

2.5 Pigmentos Fotossintetizantes

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes, as amostras provenientes dos experimentos foram armazenadas em freezer -80 °C. As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC-Florianópolis.

2.5.1 Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas [aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeretrina (FE)] foi realizada através da trituração de amostras de 0,500 g (massa fresca) em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 3 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4 °C. A solução foi centrifugada a 2000 x g, por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Tp Reader; Thermoplate, China; $\lambda = 498,5, 615$ 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 $n = 6$ (béqueres por grupo) e os resultados foram expressos em μg de pigmentos por g de massa seca.

2.5.2 Clorofila *a*

Ao resíduo da centrifugação do extrato do item 2.5.1 foi acrescentado 3 mL de acetona a 90 %. A solução foi centrifugada a 2000 x g, por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante retirado e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro (Tp Reader; Thermoplate,

China; $\lambda = 630, 647$ e 664 nm). Utilizou-se a fórmula descrita por Jeffrey e Humphrey, (1975). As análises foram realizadas com $n = 6$ (béqueres por grupo) e os resultados foram expressos em μg de pigmentos por g de massa seca.

2.6 Microscopia de Luz (ML)

Porções frescas, íntegras e da região central do talo foram fixadas em solução de paraformaldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, à temperatura de 4°C , por uma noite (12 h). Após, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100 %) (BOUZON, 1993). Posteriormente, o material foi infiltrado em historresina (Leica Historesin). As amostras foram seccionadas no LABCEV em micrótomo rotativo modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções, com espessura de $5\ \mu\text{m}$, foram coletadas nas lâminas de vidro sobre gotas de água destilada e secas a 37°C por 30 min para as análises citoquímicas (cada lâmina continha secções apenas de um tratamento). Foram feitas sextuplicatas ($n = 6$ béqueres por grupo) para cada grupo experimental, e as duas melhores, apresentaram mais talos transversais, foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.6.1 Citoquímica

O material foi submetido aos seguintes testes citoquímicos:

Azul de Toluidina (AT-O): Este corante básico foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (propriedade que certas moléculas têm de mudar a cor original do corante. Naturalmente o AT-O é azul, mas observamos metacromasia para rosa para polissacarídeos ácidos, verde para fenólicos, e roxa para ácidos nucleicos (O'BRIEN; THIMANN, 1965)). 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).

Ácido Periódico Schiff (PAS): Este corante foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. O ácido periódico oxida os grupos 1,2-glicol dos polissacarídeos neutros (amido e celulose), assim expõe os grupos aldeídos. Estes grupos reagem com a fucsina do reativo Schiff e geram a cor rosa. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1 % durante 20 min no escuro, lavados em água corrente e

corados com reativo Schiff por 20 min. Após, lavadas em água corrente e secas ao ar (GAHAN, 1984).

2.6.2 Medida do Espessamento da Parede Celular

As medidas de espessamento de parede celular foram realizadas usando o software ImageJ (versão 1.43) com as imagens obtidas por microscopia de luz das amostras reagidas com AT-O. Foram medidas 30 células de cada tratamento, sendo realizada uma medida por célula.

2.7 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC)

Porções frescas, íntegras e da região central do talo foram estendidas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio confocal (Leica TCS SP-5) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC-Florianópolis. A autofluorescência do cloroplasto foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida de 510 a 750 nm (vermelho) (ZITTA et al., 2013). A autofluorescência de células sem cloroplasto, sugerindo presença de algum patógeno, foi excitada no comprimento de onda de 405 nm e emitida de 420 a 470 nm (azul). O programa LAS-AF Lite (Leica) foi utilizado para o processamento final das imagens. Foram feitas sextuplicatas (n = 6 béqueres por grupo) para cada grupo experimental, e as duas melhores foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para analisar a ultraestrutura dos cloroplastos, amostras frescas, íntegras e da região central do talo provenientes das exposições à PAR e PAB foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5 %, tampão cacodilato de sódio 0,1 M e sacarose 0,2 M (pH 7,2). A pré-fixação foi realizada por uma noite (12 h) a 4 °C e seguida por três lavagens no mesmo tampão. Após, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 4 h (PUESCHEL, 1979). Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e em seguida desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 %). 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 (60 nm) foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e

contrastadas com acetato de uranila 2 % (o qual se liga ao OsO₄, contrastando estas regiões) e citrato de chumbo 2 % (com objetivo de preservar a amostra), de acordo com os procedimentos de Reynolds, (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM)1011 do LCME. Foram feitas sextuplicatas (n = 6 béqueres por grupo) para cada grupo experimental, e as duas melhores foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.9 Extração e Quantificação de Carotenoides

As amostras foram preparadas segundo Aman et al. (2005) com modificações. As amostras de 0,500 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⁻¹ de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras ficaram em repouso por 1 h em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de N₂ gasoso. O extrato foi ressuspenso em 3 mL de hexano. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), do LMBV, 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⁻¹. 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. O pico do carotenoide no tempo de retenção (Tr) 4,17 min foi significativo, mas não foi identificado. A quantificação dos carotenoides totais utilizou de curva padrão-externa de β-caroteno (Sigma, 6,25 a 50 µg.mL⁻¹ – r² = 0,99; y = 1,624x). A concentração de carotenoides foi expressa em µg por g de massa seca, sendo que os valores apresentados correspondem a média de 3 injeções/leituras por grupo experimental (n = 3 béqueres por grupo).

2.10 Extração e Dosagem de Fenólicos Totais

Amostras de 0,500 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em 10 mL da solução de metanol a 80 %. Após a maceração, foram mantidas em repouso por 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 e 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 reagente Folin-Ciocalteu (Vetec) e 30 μL de carbonato de sódio a 20 %, 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) do LMBV. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (1 a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ – $r^2 = 0,99$; $y = 0,0004x$). As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$ béqueres por grupo) e os resultados expressos em mg de ácido gálico por g de massa seca.

2.11 Extração e Dosagem de Flavonoides Totais

Amostras de 0,500 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em 10 mL da solução de metanol a 80 %. Após a maceração, foram mantidas em repouso por 1 h em câmara escura e em seguida, filtradas sob vácuo. Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato foi utilizada para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, na presença de 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2 % em metanol) e 2,5 mL de etanol, de acordo com Zacarias et al. (2007), com modificações. Após repouso de 1 h, fez-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro (Tp Reader; Thermoplate, China) do LMBV. A quantificação dos flavonoides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (0,5 a 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – $r^2 = 0,99$; $y = 0,01x$). As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$ béqueres por grupo) e os resultados expressos em mg de quercetina por g de massa seca.

2.12 Inibição do Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A fim de analisar a capacidade antioxidante, uma alíquota de 250 μL da solução metanólica do radical livre DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol a 80 %) foi acrescida a 50 μL da amostra preparada conforme descrito no item 2.10. O DPPH é uma molécula de radical livre que possui coloração violeta, e ao sofrer uma reação de oxirredução, por agentes antioxidantes, passa a apresentar coloração amarelada. Portanto, o decréscimo da absorbância em 530 nm, que indica a atividade antioxidante presente na amostra, foi medido em leitor de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, China) do LMBV após 30 min de incubação da amostra, de acordo com Kim et al. (2002). As amostras foram analisadas

em triplicata (n = 3 béqueres por grupo) e expressas em % de sequestro do radical livre DPPH.

2.13 Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais

Amostras de 0,500 g (massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas com 2 mL da solução metanol:clorofórmio:água (MCW) (12:5:3, v/v). A solução foi centrifugada a 2000 x g, por 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (2000 x g, por 5 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água, e o extrato foi novamente centrifugado (2000 x g, por 5 min a 4 °C). A fase superior dos extratos foi coletada, de acordo com a metodologia de Shannon, (1968). A dosagem foi realizada com o método de Umbreit e Burris, (1964) utilizando-se reagente antrona (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 (Tp Reader; Thermoplate, China) do LMBV. A quantificação dos açúcares solúveis totais foi a partir da curva padrão de glucose (3 a 30 mg.mL⁻¹ - r²= 0,99; y = 0,0143x). As análises foram realizadas em triplicatas (n = 3 béqueres por grupo) e os resultados expressos em mg de glucose por g de massa seca.

2.14 Extração e Dosagem de Amido

Ao resíduo da centrifugação do extrato estabelecido conforme o item 2.13, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico a 30 %. A solução foi centrifugada a 2000 x g, por 5 min a 4 °C, o sobrenadante coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico a 30 % (2000 x g, por 5 min 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 e Burris, (1964). Aliquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona a 0,02 %, 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 (Tp Reader; Thermoplate, China) do LMBV. A quantificação do amido total foi feita a partir da curva padrão de glucose (10 a 100 mg.mL⁻¹ - r²= 0,99; y = 0,0076x). As análises foram realizadas em triplicatas (n = 3 béqueres por grupo) e os resultados expressos em mg de glucose por g de massa seca.

2.15 Análise e Interpretação dos Dados

Após passarem pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos à Análise de Variância Bifatorial (MANOVA), sendo os fatores independentes a radiação (PAR ou PAB) e a concentração de NO_3^- (0, 25, 50 ou 100 mM), seguida do teste *a posteriori* de Tukey para verificar as significâncias das diferenças ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no Programa Statistica (versão 10.0). Além disso, os dados foram testados para análise de componentes principais (PCA) e análise de *clusters* hierárquicos (HCA), a fim de inspecionar o conjunto de variáveis analisadas e procurar padrões relacionados aos tratamentos testados. Todos os desenhos gráficos foram realizados utilizando-se scripts escritos em linguagem R (versão 3.1.1). Os dados e os relatórios HTML gerados a partir da análise (utilizando recursos de R Markdown) para determinar semelhanças de variáveis fisiológicas foram analisadas no presente trabalho.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos de Concentrações de NO_3^- e RUV nas Taxas de Crescimento (TC) e na Morfologia dos Talos

Após o período experimental, todas as TC foram positivas, com exceção do tratamento PAB [0] (Fig. 3). Os tratamentos com PAB apresentaram talos mais delgados quando comparados com os talos expostos à PAR (Fig. 4a-h). As amostras do PAR [0] cresceram 1,10 % ao dia e apresentavam talo todo esverdeado (Fig. 4a). PAR [25], [50] e [100] tiveram TC positivas (2,35 %, 1,53 % e 2,34 % ao dia, respectivamente) e apresentaram talos com porções férteis (Fig. 4b, c, d setas) e tonalidade marrom (Fig. 4b, c, d). Já o PAB [0] obteve o maior decréscimo da TC (-0,41 % ao dia) e o talo apresentou coloração verde claro (Fig. 3e). Nas amostras expostas à PAB [25], [50] e [100] as TC foram positivas de 0,54 %, 0,38 % e 0,88 % ao dia, respectivamente, e apresentaram talos marrom escuro e bem fragmentados (Fig. 4f, g, h).

O fator radiação (PAR ou PAB) foi o que possui um maior efeito na taxa de crescimento das algas [$\eta^2 = 30,10$ %, $F_{(1,40)} = 47,06$, $p < 0,001$], seguido do fator concentração de NO_3^- [$\eta^2 = 4,64$ %, $F_{(3,40)} = 7,26$, $p \leq 0,005$], enquanto a interação entre os dois fatores não apresentou significância estatística (Tab. 1).

Figura 3. Taxas de crescimento expressas em % de crescimento.dia⁻¹ do experimento com talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM). Valores apresentados com média (n = 6; média ± erro padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial seguida de teste de Tukey (p ≤ 0,05).

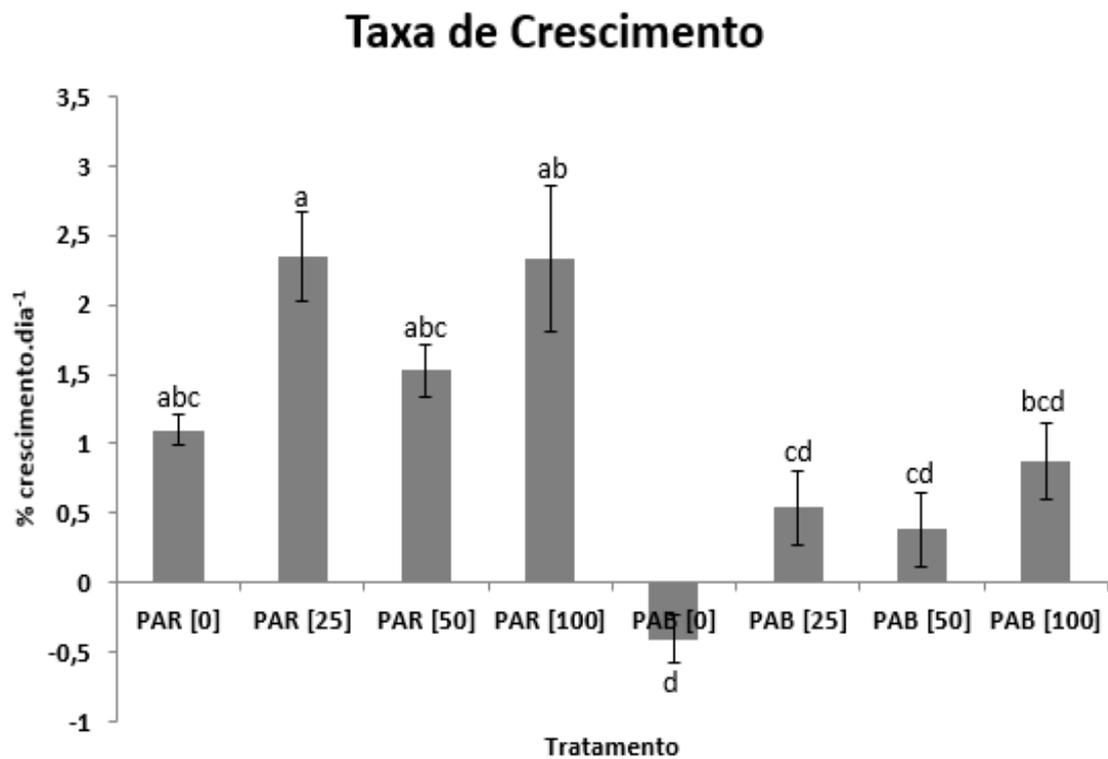
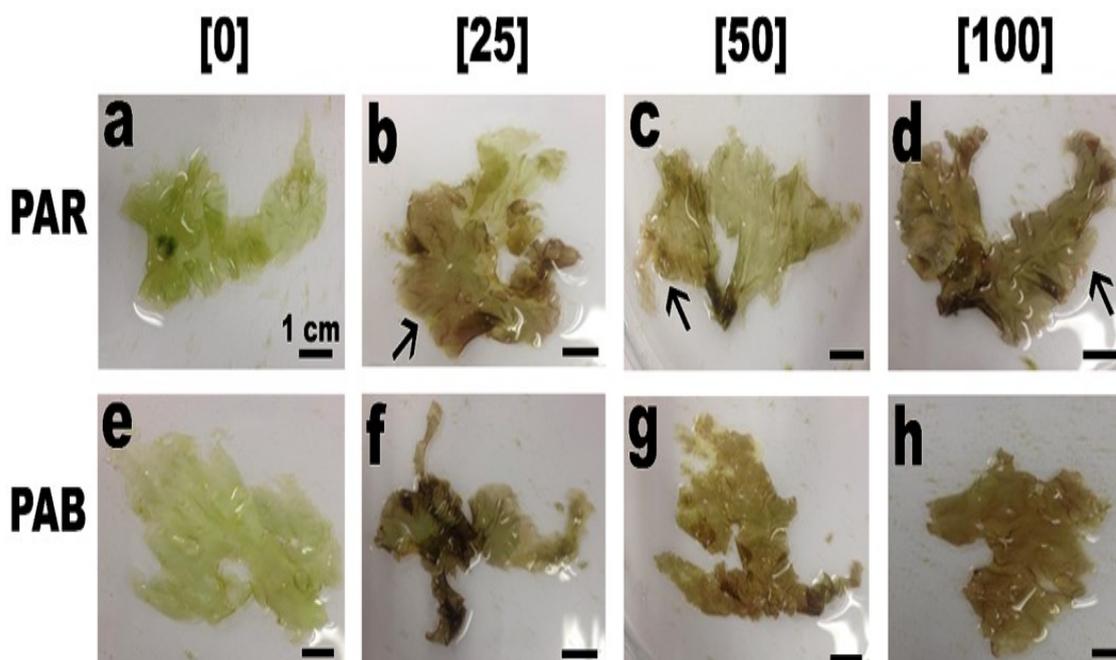


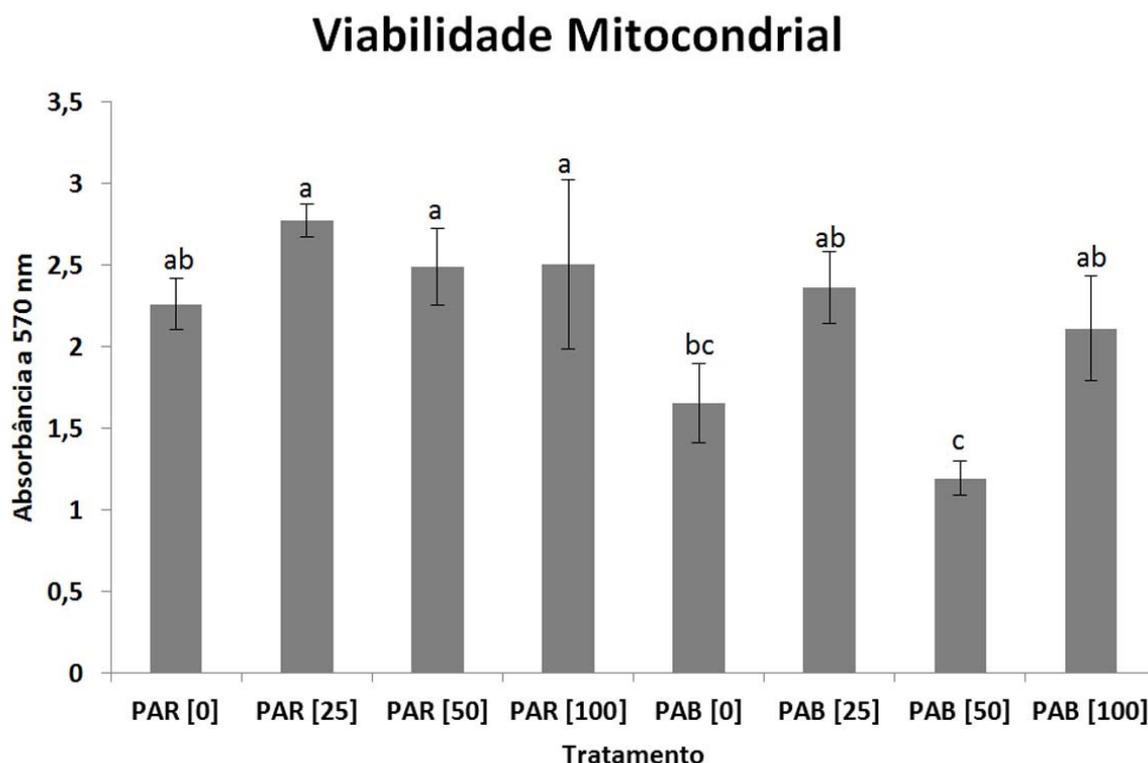
Figura 4. Morfologia externa dos talos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório. Barras de escala = 1 cm. **a.** Talo esverdeado exposto à PAR [0]. **b-d.** Talos amarronzados e com porções férteis (setas) quando expostos à PAR [25], [50] e [100]. **e-h.** Talos delgados expostos à PAB. **e.** Talo esverdeado exposto à PAB [0]. **f-h.** Talos marrom escuros e bem fragmentados expostos à PAB [25], [50] e [100].



3.2 Efeitos de Concentrações de NO_3^- e RUV na Viabilidade Mitocondrial

As amostras dos tratamentos PAR [25], [50] e [100] foram as que apresentaram as maiores viabilidades mitocondriais, enquanto PAB [0] e [50] apresentaram as menores viabilidades (Fig. 5). O fator radiação (PAR ou PAB) é o que possuiu mais efeito na viabilidade mitocondrial das algas [$\eta^2 = 41,03\%$, $F_{(1,40)} = 38,02$, $p < 0,0001$], seguido do fator concentração de NO_3^- [$\eta^2 = 29,57\%$, $F_{(3,40)} = 9,13$, $p < 0,001$], e da interação entre os dois fatores [$\eta^2 = 12,12\%$, $F_{(3,40)} = 3,74$, $p < 0,05$].

Figura 5. Viabilidade mitocondrial (absorbância em 570 nm), por ensaio de MTT, de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) (n = 6; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05).



3.3 Efeitos de Concentrações de NO₃⁻ e RUV na Quantificação dos Pigmentos Fotossintetizantes: Clorofila *a* e Ficobiliproteínas

Para a clorofila *a* (Tab. 1), a concentração em PAR [0] foi de 99,13 µg.g⁻¹ de massa seca. Para PAR [25] não houve variação estatística na concentração deste pigmento, e PAR [50] e [100] aumentaram 22,2 % e 71,1 % em relação ao exposto à ausência de nutriente e à PAR. Nas amostras expostas à RUV, PAB [0] apresentou a menor concentração de clorofila *a* do experimento. Já PAB [25], [50] e [100] apresentaram um aumento de 152,6 %, 77,6 % e 32,4 %, respectivamente, quando comparados com a PAR [0].

Em relação às concentrações de AFC (Tab. 1), amostras expostas à PAR [0] e PAB [0] apresentaram as menores concentrações, sendo de 158 e 89,11 µg.g⁻¹ de massa seca, respectivamente. Também foi observado um aumento da concentração deste pigmento à medida que aumentou a concentração de NO₃⁻, tanto para as amostras expostas à PAR, como as expostas à PAB.

Em relação às concentrações de FC (Tab. 1), PAR [0] e PAB [0] apresentaram as menores concentrações deste pigmento (220,31 e 112,57 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca, respectivamente). PAR [25], [50] e [100] aumentaram suas concentrações em relação a PAR [0], enquanto que PAB [25], [50] e [100] (235,09; 328,38 e 299,49 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca, respectivamente) aumentaram suas concentrações em relação à PAB [0].

Para às concentrações de FE (Tab. 1), em PAR [0] a concentração foi extremamente baixa, 31,54 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca. PAR [25], [50] e [100] tiveram concentrações aumentadas (1015,52; 578,54 e 554,58 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca, respectivamente). Já para as amostras expostas à RUV, em PAB [0] observou-se a menor concentração de FE, com 176,82 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca. Para as outras amostras expostas à RUV (PAB [25], [50] e [100]) as concentrações de FE aumentaram de forma diretamente proporcional em relação à concentração de NO_3^- .

Em geral, as maiores concentrações dos pigmentos fotossintetizantes foram encontradas nas amostras expostas à PAR quando comparadas com as expostas à PAB.

A interação entre os dois fatores (radiação e concentração de NO_3^-) apresentou o maior efeito na concentração de clorofila *a* das algas [$\eta^2 = 47,88\%$, $F_{(3,40)} = 981,71$, $p < 0,0001$], para a AFC é a concentração de NO_3^- que apresenta maior efeito [$\eta^2 = 57,96\%$, $F_{(3,40)} = 6340,7$, $p < 0,001$], para a FC é a radiação (PAR ou PAB) [$\eta^2 = 43,73\%$, $F_{(1,40)} = 35036,5$, $p < 0,001$], e para a FE também é a concentração de NO_3^- que apresenta maior efeito [$\eta^2 = 70,64\%$, $F_{(3,40)} = 87705,0$, $p < 0,001$].

Tabela 1. Concentrações de pigmentos fotossintetizantes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca), clorofila *a* (Cl. *a*) e ficobiliproteínas (AFC: aloficocianina, FC: ficocianina, FE: ficoeritrina) de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* exposta à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 6$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Cl. <i>a</i>	AFC	FC	FE
PAR [0]	99,13 \pm 0,25 ^d	158,00 \pm 2,02 ^g	220,32 \pm 1,33 ^g	31,54 \pm 1,58 ^h
PAR [25]	104,71 \pm 0,23 ^d	613,93 \pm 0,55 ^a	887,57 \pm 1,52 ^a	1015,52 \pm 3,18 ^a
PAR [50]	121,10 \pm 0,26 ^c	309,13 \pm 6,88 ^d	574,74 \pm 0,54 ^b	578,55 \pm 1,37 ^b
PAR [100]	169,60 \pm 0,84 ^b	426,54 \pm 7,02 ^b	541,72 \pm 7,12 ^c	554,69 \pm 2,29 ^c
PAB [0]	38,02 \pm 0,10 ^e	89,11 \pm 1,56 ^h	112,57 \pm 1,30 ^h	176,82 \pm 0,98 ^g
PAB [25]	250,39 \pm 0,21 ^a	230,70 \pm 05,63 ^f	235,10 \pm 6,39 ^f	443,77 \pm 3,85 ^f
PAB [50]	176,04 \pm 0,63 ^b	283,23 \pm 0,85 ^e	328,38 \pm 2,35 ^d	507,00 \pm 0,53 ^e
PAB [100]	131,25 \pm 0,34 ^c	356,87 \pm 0,92 ^c	299,49 \pm 5,49 ^e	546,77 \pm 1,69 ^d

3.4 Alterações Morfológicas: Espessamento de Parede Celular e Presença de Grãos de Amido

Todas as amostras de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* reagidas com azul de toluidina (AT-O) apresentaram uma reação metacromática para rosa nas paredes celulares, indicando a presença de polissacarídeos sulfatados, como a agarana, conhecida como Porphyrana, principalmente nas amostras expostas à PAB, já que estas paredes celulares estavam mais espessas. As amostras também apresentaram metacromasia para verde azulado indicando presença de fenólicos e para roxo indicando ácidos nucleicos no citoplasma celular (Fig. 6a-h).

Os maiores espessamentos de parede celular foram encontrados nas amostras expostas à PAB quando comparadas com as expostas à PAR (Fig. 6e-h-setas) (Tab. 2). O tratamento com radiação (PAR ou PAB) foi o que apresentou o maior efeito no espessamento da parede celular [$\eta^2 = 60,00\%$, $F_{(1,232)} = 450,587$, $p < 0,0001$].

Já com a reação do Ácido Periódico Schiff (PAS) percebeu-se a presença de açúcares neutros formadores da parede celular, apenas nas extremidades das paredes celulares, e presença de grãos de amido por todo o citoplasma, exceto no pirenoide. As quantidades de grãos de amido nas amostras tratadas com PAR não apresentaram diferenças entre si (Fig. 7a-d). Para as amostras expostas à PAB, a menor quantidade de

grãos de amido foi verificada na amostra PAB [50], enquanto que as maiores quantidades e sem diferença entre elas foram observadas nas outras amostras, PAB [0], [25] e [100] (Fig. 7e-h).

Figura 6. Talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 10 μm) submetidos à reação com Azul de Toluidina (AT-O). **a-d.** Amostras expostas à PAR com reação metacromática nas paredes celulares (PC). **e-h.** Amostras expostas à PAB também com reação metacromática nas paredes celulares e um maior espessamento de PC (setas). Em todas as amostras o pirenoide (Pi) foi bem evidente.

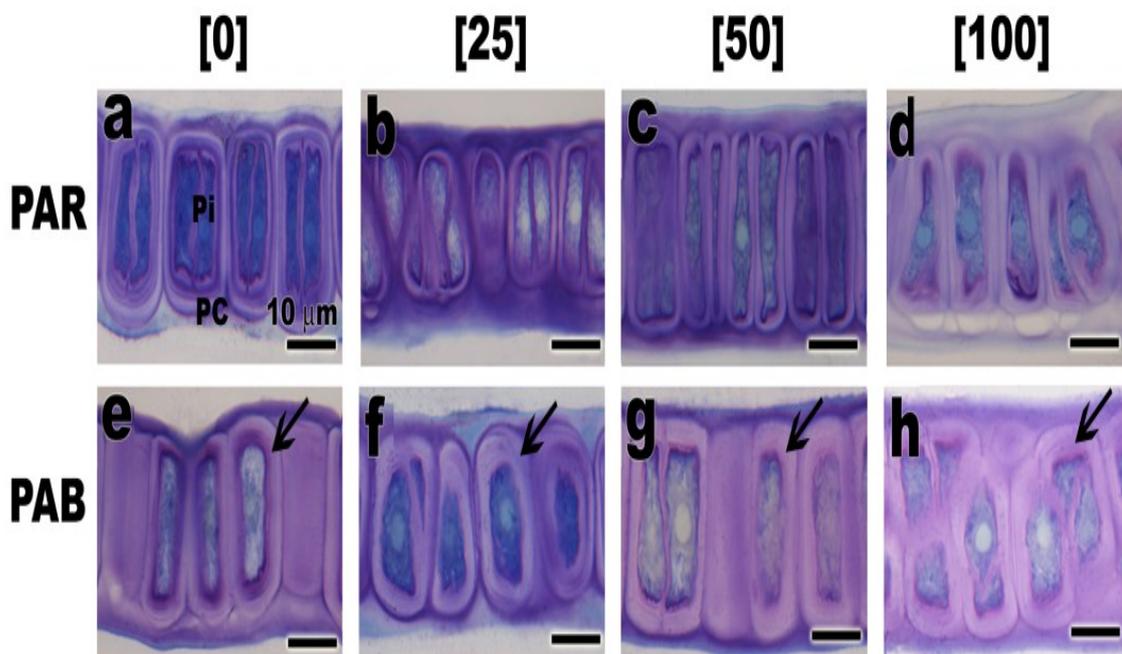
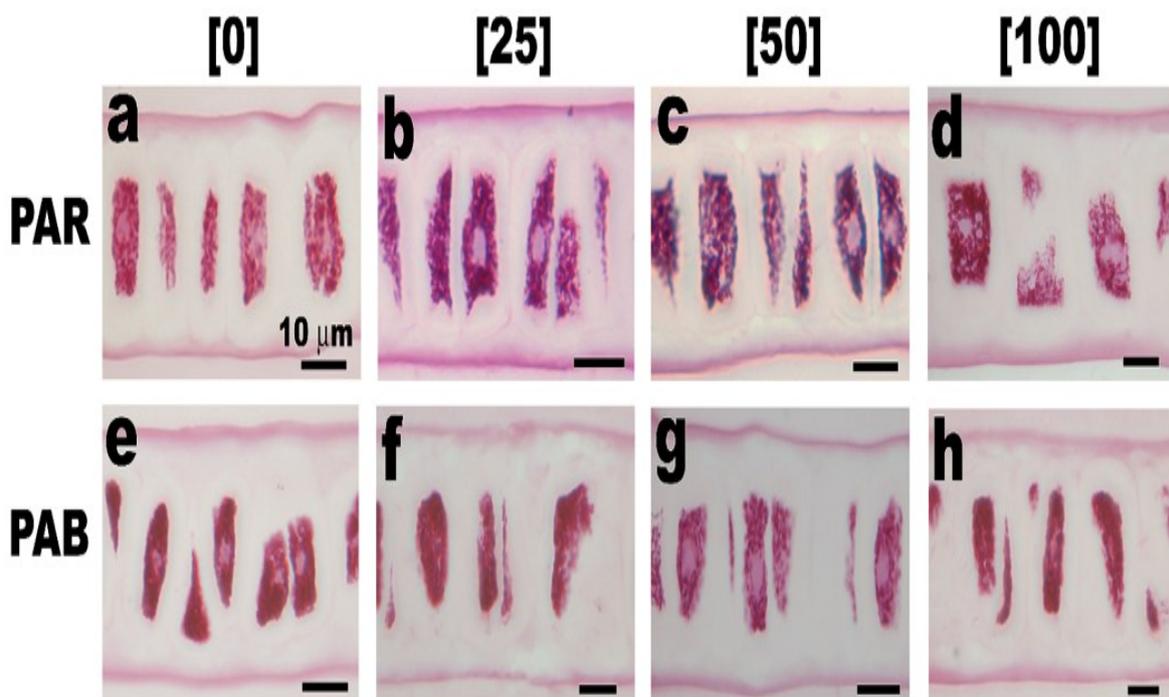


Tabela 2. Espessamento da parede celular (μm) de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* exposta à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n = 30$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Espessamento da Parede Celular
PAR [0]	1,51 \pm 0,56 ^{cd}
PAR [25]	1,26 \pm 0,27 ^d
PAR [50]	1,59 \pm 0,43 ^{cd}
PAR [100]	1,88 \pm 0,52 ^c
PAB [0]	4,10 \pm 0,87 ^a
PAB [25]	3,08 \pm 0,85 ^b
PAB [50]	2,94 \pm 0,65 ^b
PAB [100]	3,40 \pm 0,87 ^b

Figura 7. Talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 10 μm) submetidos à reação com Ácido Periódico Schiff (PAS). **a-h.** Amostras com reação positiva ao PAS, presença de açúcares neutros. **a-d.** Amostras expostas à PAR não apresentaram diferenças entre si quanto à quantidade de amido. **e-h.** Amostras expostas à PAB com a menores quantidade de amido.



3.5 Organização e Autofluorescência dos Cloroplastos

Nas células da amostra exposta à PAR [0], os cloroplastos apresentaram-se muito despigmentados, com pouca autofluorescência e sem formar ramificações do tipo “estrelado”, característico da espécie (Fig. 8a-c). No PAR [25] e [50] os cloroplastos apresentaram uma pigmentação amarronzada, com ramificações e autofluorescência maior que nas células da amostra do tratamento PAR [0] (Fig. 8d-i). Por outro lado, PAR [100] apresentou células normais, com cloroplastos ramificados e autofluorescentes, e regiões com ausência de autofluorescência (Fig. 8j-l). As células do PAB [0] apresentaram-se com citoplasma hialino e granuloso, e os cloroplastos apresentaram baixa autofluorescência e sem ramificações (Fig. 8m-o). Nas amostras tratadas com PAB [25], [50] e [100] os cloroplastos apresentaram pigmentação mais escura (marrom), com ramificações e foram observados com maior intensidade de autofluorescência em relação à PAB [0] (Fig. 8p-x). Nas amostras expostas à RUV foram observadas regiões com células sem autofluorescência.

Todas as amostras, e com mais frequência naquelas expostas à RUV, foram observadas regiões com células transparentes (Fig. 9a,b) que apresentavam autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 405 nm (Fig. 9c,d), mas ausência de autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 488 nm (Fig. 9e, f).

Figura 8. Talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia de luz (barras de escala = 50 μm) e confocal (barras de escala = 10 μm). **a-c.** Amostra exposta à PAR [0] com cloroplastos despigmentados, com pouca autofluorescência e sem formato “estrelado”. **d-i.** Amostras expostas à PAR [25] e [50] com cloroplastos amarronzados e “estrelados” e autofluorescência intensa. **j-l.** Amostra exposta à PAR [100] com cloroplastos com pigmentação marrom, “estrelados” e autofluorescentes, e regiões com ausência de autofluorescência. **m-o.** Células do PAB [0] com citoplasma hialino e granuloso, e os cloroplastos com baixa autofluorescência e sem ramificações. **p-x.** Amostras tratadas com PAB [25], [50] e [100] com cloroplastos apresentando pigmentação marrom, com ramificações e com maior intensidade de autofluorescência em relação à PAB [0].

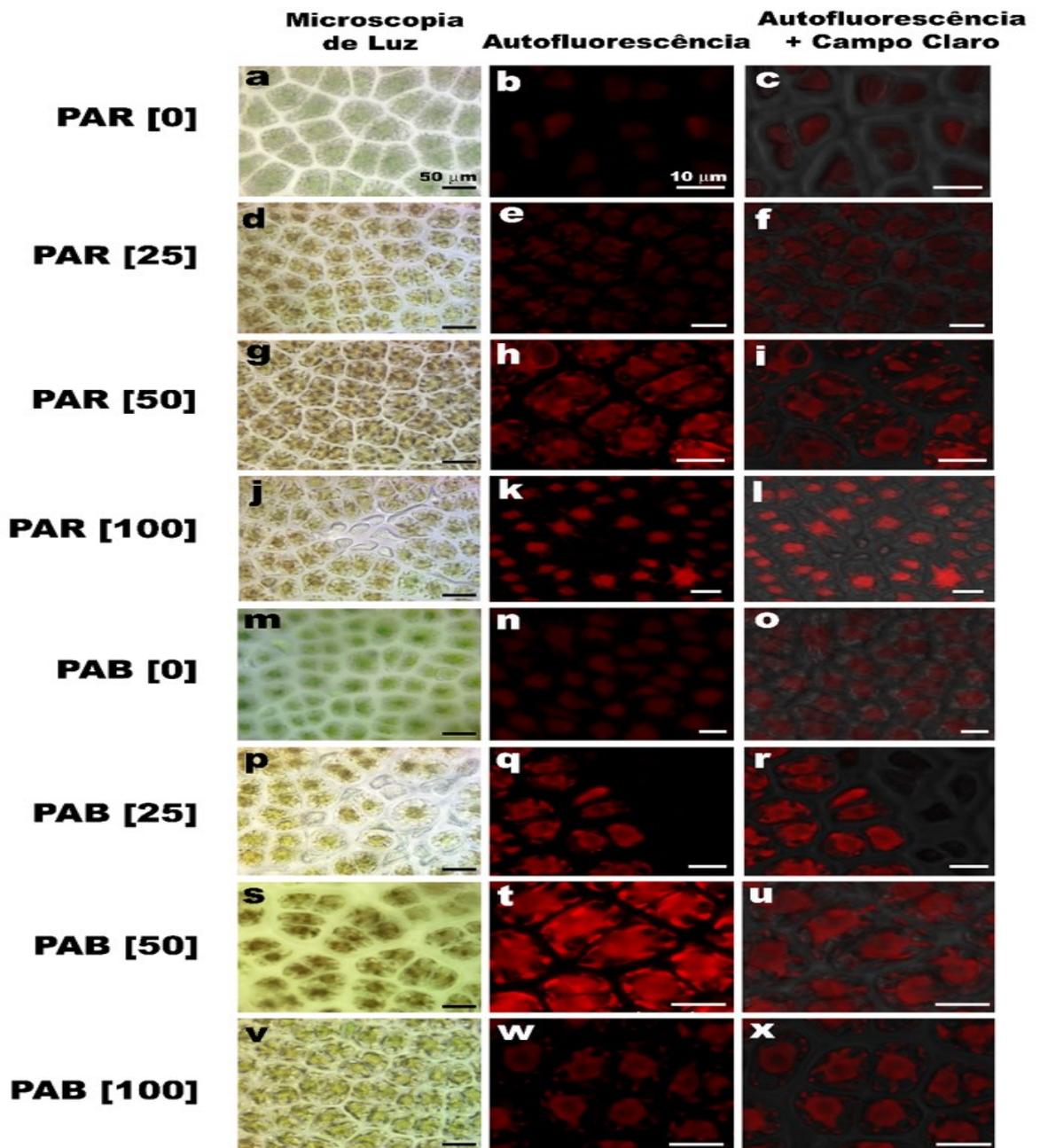
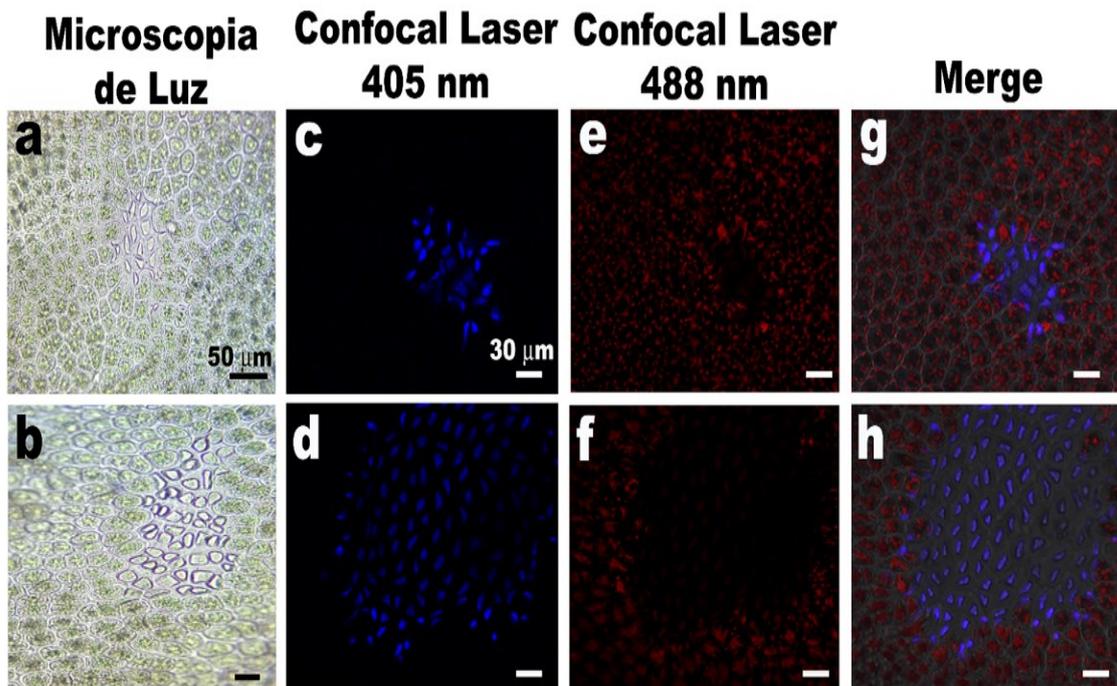


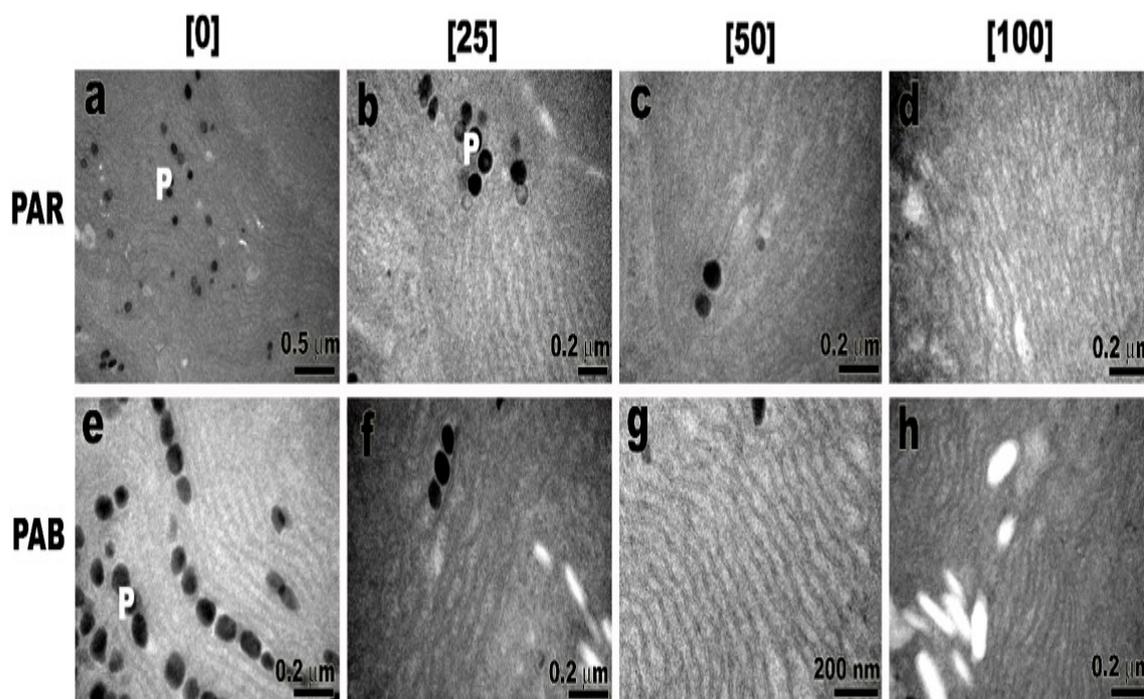
Figura 9. Talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* observados em microscopia de luz (barras de escala = 50 μm) e confocal (barras de escala = 30 μm). Todas as amostras, e com mais frequência aquelas expostas à RUV, apresentaram regiões com células transparentes (**a, b**) que apresentavam autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 405 nm (**c, d**), mas ausência de autofluorescência quando excitadas com comprimento de onda 488 nm (**e, f**). Junção das imagens com excitação em 405 nm, 488 nm e campo claro (**g, h**).



3.6 Alterações na Ultraestrutura dos Cloroplastos

Talos de *P. acanthophora* tratados com PAR [0] (Fig. 8a) e PAB [0] (Fig. 10e) apresentaram cloroplastos com tilacoides paralelos intactos, típicos de alga vermelha, porém com elevada presença de plastoglóbulos. Amostras tratadas com PAR [25], [50] e [100] (Fig. 10b-d) também mostraram cloroplastos com tilacoides paralelos intactos. Por outro lado, poucos plastoglóbulos foram observados. Nos talos tratados com PAB [25], [50] and [100] (Fig. 10f-h), os cloroplastos possuíam tilacoides intactos e bem definidos.

Figura 10. Detalhes de cloroplastos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) observados na microscopia eletrônica de transmissão. **a.** Detalhe de cloroplasto do PAR [0] com tilacoides intactos, mas com grande quantidade de plastoglobulos (P). **b-d.** Detalhe de cloroplastos do PAR [25], [50] e [100] com tilacoides paralelos e baixa quantidade de P. **e.** Detalhe de cloroplastos do PAB [0] com tilacoides normais e muitos P. **f-h.** Detalhe de cloroplastos do PAB [25], [50] e [100] com tilacoides bem definidos.



3.7 Perfil Carotenóidico

Em relação à luteína, as amostras PAR [100] e PAB [100] foram as que apresentaram as maiores concentrações deste metabólito; sendo 6,10 e 5,38 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de luteína por massa seca, respectivamente (Tab. 3). Para o carotenoide zeaxantina não foi observado um padrão na concentração deste metabólito (Tab. 3). No tempo de retenção (Rt) 4,17 minutos foi detectado um carotenoide que somente foi verificado nas amostras PAR [100], PAB [50] e [100]. As maiores concentrações deste carotenoide foram verificadas na amostra exposta somente à PAR (Tab. 3). Para o α -caroteno, percebemos as maiores concentrações nas amostras PAB [50] e [100], sendo as concentrações de 0,55 e 0,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de α -caroteno por massa seca, respectivamente. Por outro lado, as menores concentrações foram observadas nas amostras PAR [0] e PAB [0], sendo 0,07 e 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de α -caroteno por massa seca, respectivamente. O β -caroteno seguiu o mesmo padrão do α -caroteno, tendo as maiores concentrações nas amostras PAB [50] e [100], sendo as concentrações de 0,94 e 0,93 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de β -caroteno por massa seca, respectivamente.

Em geral, nota-se maiores concentrações de todos os carotenoides identificados na corrida cromatográfica, assim como dos carotenoides totais, nas amostras expostas à PAB quando comparadas com as expostas à PAR (Tab. 3).

O fator concentração de NO_3^- é o que mais tem efeito sobre a concentração de luteína das algas [$\eta^2 = 84,2\%$, $F_{(3,16)} = 76,21$, $p < 0,001$], de zeaxantina [$\eta^2 = 38,2\%$, $F_{(3,16)} = 5,19$, $p < 0,01$], de Tr 4,17 min [$\eta^2 = 64,9\%$, $F_{(3,16)} = 1154,46$, $p < 0,001$], de α -caroteno [$\eta^2 = 91,4\%$, $F_{(3,16)} = 439,89$, $p < 0,001$], de β -caroteno [$\eta^2 = 54,5\%$, $F_{(3,16)} = 73,04$, $p < 0,001$], como também para o total de carotenoides [$\eta^2 = 86,8\%$, $F_{(3,16)} = 139,95$, $p < 0,001$].

Tabela 3. Conteúdo de carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) (luteína, zeaxantina, Tr 4,17 min, α -caroteno, β -caroteno e carotenoides totais (soma de todos os carotenóides identificados)) de talos *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) ($n=3$; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Luteína	Zeaxantina a	Tr 4,17 min	α -caroteno	β -caroteno	Total
PAR [0]	3,39 \pm 0,03 ^{de}	0,12 \pm 0,03 ^{ab}	-	0,07 \pm 0,01 ^d	0,28 \pm 0,02 ^e	3,86 \pm 0,03 ^e
PAR [25]	4,18 \pm 0,40 ^{cd}	0,10 \pm 0,02 ^{ab}	-	0,42 \pm 0,03 ^{bc}	0,64 \pm 0,07 ^b	5,35 \pm 0,48 ^c
PAR [50]	4,27 \pm 0,14 ^c	0,07 \pm 0,01 ^b	-	0,38 \pm 0,02 ^c	0,48 \pm 0,02 ^{cd}	5,20 \pm 0,16 ^{cd}
PAR [100]	6,10 \pm 0,19 ^a	0,14 \pm 0,04 ^a	1,15 \pm 0,06 ^a	0,47 \pm 0,01 ^b	0,58 \pm 0,03 ^{bc}	8,43 \pm 0,21 ^a
PAB [0]	3,09 \pm 0,17 ^e	0,15 \pm 0,02 ^a	-	0,04 \pm 0,00 ^d	0,36 \pm 0,03 ^{de}	3,63 \pm 0,018 ^e
PAB [25]	3,22 \pm 0,08 ^e	0,11 \pm 0,01 ^{ab}	-	0,35 \pm 0,01 ^c	0,53 \pm 0,02 ^{bc}	4,21 \pm 0,07 ^{de}
PAB [50]	4,64 \pm 0,44 ^{bc}	0,12 \pm 0,01 ^{ab}	0,13 \pm 0,03 ^c	0,55 \pm 0,04 ^a	0,94 \pm 0,06 ^a	6,38 \pm 0,52 ^b
PAB [100]	5,38 \pm 0,56 ^{ab}	0,13 \pm 0,03 ^{ab}	0,26 \pm 0,02 ^b	0,55 \pm 0,04 ^a	0,93 \pm 0,12 ^a	7,24 \pm 0,66 ^b

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

Os compostos fenólicos apresentaram um aumento gradativo conforme o aumento da concentração de NO_3^- , sendo que as maiores concentrações de fenólicos totais foram nas amostras expostas à PAB quando comparadas com as expostas à PAR (Tab. 4). As amostras tratadas com PAB [25], [50] e [100] foram as que apresentaram as maiores

concentrações deste metabólito secundário, 8,00; 7,73 e 9,10 mg.g⁻¹ de fenólicos por massa seca, respectivamente (Tab. 4). O fator concentração de NO₃⁻ é o que mais teve efeito sobre a concentração de fenólicos totais das algas [$\eta^2 = 61,7\%$, $F_{(3,16)} = 59,625$, $p < 0,001$] seguido do fator radiação (PAR ou PAB) [$\eta^2 = 27,0\%$, $F_{(1,16)} = 78,395$, $p < 0,001$], seguido da interação destes dois fatores [$\eta^2 = 5,7\%$, $F_{(3,16)} = 5,531$, $p < 0,01$].

Em relação aos flavonoides totais, a concentração deste metabólito foi maior nas amostras tratadas com PAR [25] e [50], e PAB [25] e [50], e menor nas amostras dos tratamentos PAR [0] e [100], e PAB [0] e [100] (Tab. 5). O fator concentração de NO₃⁻ é o que mais tem efeito [$\eta^2 = 73,7\%$, $F_{(3,16)} = 17,590$, $p < 0,001$]. Por outro lado, o fator radiação (PAR ou PAB) e a junção dos dois fatores não apresentaram significância.

Em contrapartida, a interação dos dois fatores independentes traz uma resposta significativa para inibição do radical livre DPPH [$F_{(3,16)} = 32,72$, $p < 0,001$], sendo que a radiação (PAR ou PAB) é o fator com maior efeito sobre esta análise [$\eta^2 = 42,3\%$, $F_{(1,16)} = 510,55$, $p < 0,001$], seguido do fator concentração de NO₃⁻ [$\eta^2 = 28,6\%$, $F_{(3,16)} = 115,06$, $p < 0,001$]. As maiores inibições deste radical livre foram verificadas nas amostras expostas à PAB [100], onde a amostra inibiu 74,21 %; contra uma inibição de 34,44 % da amostra exposta à PAR [0] (Tab. 4).

Tabela 4. Conteúdo de fenólicos e flavonoides totais (mg.g⁻¹ de massa seca), e inibição do radical livre DPPH (%) de talos *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) (n = 4; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Tratamento	Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	DPPH
PAR [0]	4,27±0,25 ^f	0,76±0,18 ^c	34,44±1,47 ^e
PAR [25]	6,25±0,23 ^{de}	1,16±0,07 ^{ab}	42,04±4,81 ^d
PAR [50]	6,76±0,26 ^{cd}	1,22±0,13 ^{ab}	45,73±0,96 ^d
PAR [100]	6,43±0,84 ^d	0,91±0,20 ^{bc}	63,45±1,05 ^b
PAB [0]	5,14±0,10 ^{ef}	0,70±0,08 ^c	62,92±0,73 ^b
PAB [25]	8,00±0,21 ^{ab}	1,08±0,13 ^{abc}	68,07±0,46 ^b
PAB [50]	7,73±0,63 ^{bc}	1,35±0,10 ^a	56,37±2,01 ^c
PAB [100]	9,09±0,34 ^a	1,01±0,14 ^{abc}	74,21±1,26 ^a

3.9 Açúcares Solúveis Totais e Amido

As maiores concentrações de açúcares solúveis totais foram nas amostras expostas à PAB [0], seguido das expostas à PAR [0] e [100], enquanto todas as outras amostras não apresentaram diferença estatística entre si (Tab. 5). As amostras expostas à PAR [0] apresentaram uma média de 19,44 mg.g⁻¹ de açúcares solúveis por massa seca, PAR [25] e [50] diminuíram 23,5 % e 22,1 %, respectivamente em relação à PAR [0], e a amostra exposta à PAR [100] não apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao PAR [0] (Tab. 5). Com exceção do PAB [0], todas as outras amostras expostas à RUV tiveram suas concentrações de açúcares solúveis totais diminuídas quando comparadas às amostras expostas à PAR (Tab. 5). O fator concentração de NO₃⁻ [$\eta^2 = 61,4 \%$, $F_{(3,16)} = 84,597$, $p < 0,001$] foi o que mais influenciou no teor de açúcares solúveis totais das algas, seguido da interação entre os dois fatores independentes [$\eta^2 = 33,6 \%$, $F_{(3,16)} = 46,248$, $p < 0,001$].

Assim como nos açúcares, a maior concentração de amido foi na amostra do tratamento PAB [0]. Porém, não se observa um padrão no teor de amido em relação aos tratamentos (Tab. 5). A interação entre os dois fatores independentes foi o fator de maior efeito [$\eta^2 = 49,7 \%$, $F_{(3,16)} = 33,600$, $p < 0,001$].

Tabela 5. Conteúdo de açúcares solúveis totais (a) e amido (b) (mg.g⁻¹ de massa seca) de talos *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) (n = 3; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Açúcares Solúveis Totais	Amido Total
PAR [0]	19,43±0,30 ^b	53,95±0,59 ^{bc}
PAR [25]	14,86±0,42 ^c	43,04±5,85 ^d
PAR [50]	15,15±1,92 ^c	61,50±0,72 ^b
PAR [100]	19,41±0,48 ^b	60,35±6,90 ^b
PAB [0]	29,56±2,80 ^a	79,66±0,21 ^a
PAB [25]	11,80±0,38 ^c	61,24±02,74 ^b
PAB [50]	11,37±0,75 ^c	46,30±1,55 ^{cd}
PAB [100]	11,17±1,84 ^c	63,89±4,81 ^b

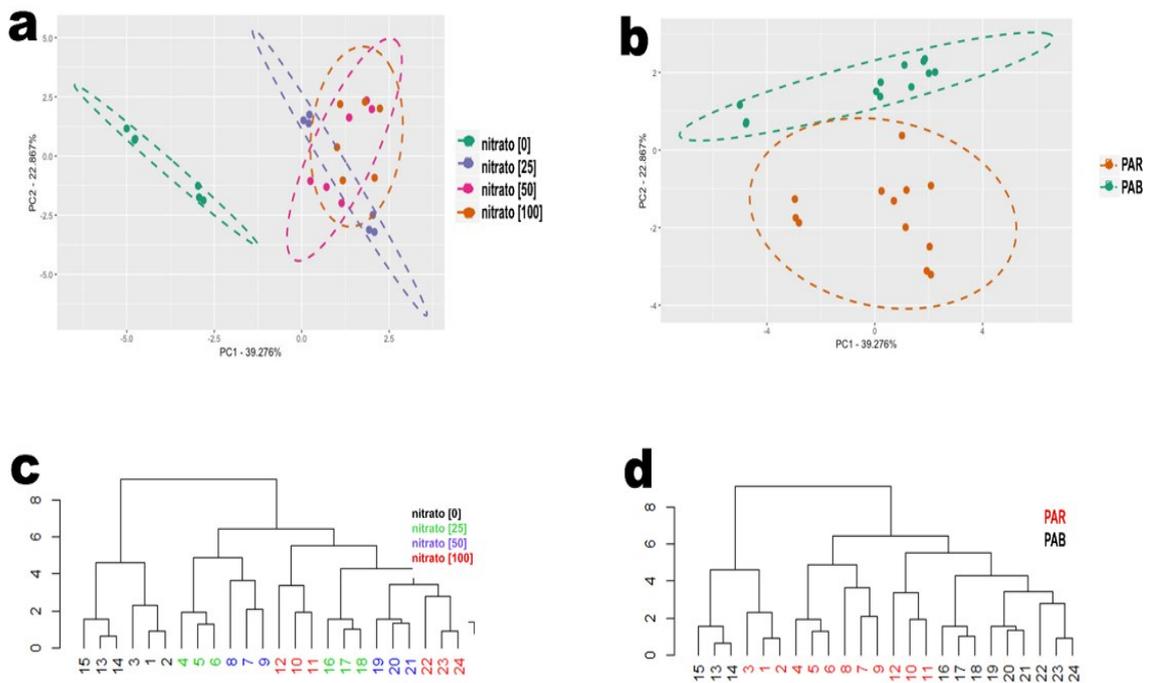
3.10 Análise de Componentes Principais e de Agrupamentos Hierárquicos de Variáveis Fisiológicas dos Talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* Expostos à NO_3^- e RUV

Os PC1 e PC2 explicaram 62 % da variação das amostras. Levando em conta a concentração de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) (Fig. 11a) e o tratamento com radiação (PAR ou PAB) (Fig. 11b), não se percebeu a formação de agrupamentos distintos, exceto pelos grupos tratados sem NO_3^- , que ficaram deslocados.

Com a análise de agrupamento hierárquico (HCA), observamos a formação de dois grandes *clusters*, um formado por amostras tratadas sem NO_3^- (números em preto) à esquerda, e o outro por amostras tratadas com [25], [50] e [100] à direita (Fig. 11c). Quando o HCA foi realizado levando-se em conta a radiação (PAR ou PAB) notou-se que o segundo *cluster*, aquele à direita, por sua vez, é dividido em dois *subclusters*, onde um é composto por amostras tratadas com PAR (números em vermelho) e o outro composto por amostras tratadas com PAB (números em preto) (Fig. 11d). Porém, observou-se uma exceção, onde amostras tratadas com PAR [100] assemelharam-se às aquelas tratadas com PAB [25], [50] e [100] (Fig. 11d).

Portanto, observou-se que a concentração de NO_3^- é o fator que mais diferencia as amostras entre si, quando comparadas com o tratamento com radiação (PAR ou PAB), porém percebeu-se uma tendência das amostras tratadas com 0 mM de NO_3^- se distinguirem das demais.

Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) de variáveis fisiológicas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* (TC, MTT, clorofila *a*, AFC, FC, FE, espessamento de parede celular, luteína, zeaxantina, Tr 4,17 min, α -caroteno, β -caroteno, carotenoides totais, fenólicos totais, flavonoides totais, inibição do DPPH, açúcares solúveis totais, amido total) levando em consideração a concentração de NO_3^- (**a**) e o tratamento (**b**). Dendrograma de análise de agrupamento hierárquico de variáveis fisiológicas de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* levando em consideração a concentração de NO_3^- (**c**) e o tratamento (**d**). Os números, como rótulos de grupo, são definidos da seguinte forma: 1-3: PAR [0]; 4-6: PAR [25]; 7-9: PAR [50]; 10-12: PAR [100]; 13-15: PAB [0]; 16- 18: PAB [25]; 19-21: PAB [50]; 22-24: PAB [100].



4. DISCUSSÃO

Os tratamentos com RUV afetaram a taxa de crescimento de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, como também visto na alga parda *Dictyota dichotoma* Suhr (KUHLENKAMP et al., 2001), e nas algas vermelhas *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (SCHMIDT et al., 2010), *Laurencia catarinensis* (PEREIRA et al., 2014), gametófitos de *Gelidium floridanum* W.R.Taylor (SIMIONI et al., 2014) e *Grateloupia filicina* (J.V.Lamouroux) C.Agardh (ZHAO; LIXIA, 2014), indicando que a RUV é um fator prejudicial para o crescimento e desenvolvimento de algas. Por outro lado, verificou-se que a menor taxa de crescimento ocorreu no tratamento com PAB sem NO_3^- . Pode-se considerar que a redução de nitrogênio, presente no NO_3^- , possui função chave na formação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, enzimas, hormônios e pigmentos fotossintetizantes (BRAGA et al., 2005; DAVIDSON et al., 2007; CHOW 2012). Cronin e Lodge, (2003); Jormalainen et al. (2003) e Navarro et al. (2014) mostraram que macroalgas com grandes concentrações nutricionais internas (compostos inorgânicos ou orgânicos à base de nitrogênio) podem suportar condições de estresse e combater o estresse oxidativo melhor do que espécies com limitada disponibilidade de nitrogênio, como visto nas amostras expostas à PAB e [25], [50] e [100] mM de NO_3^- . Portanto, a presença de NO_3^- na água fez com que a alga não precisasse degradar suas estruturas a fim de recrutar moléculas para construção de aparato de defesa. Com presença de aparato fotossintetizante, como verificado nas amostras expostas à PAR através da quantificação de pigmentos, a alga tem a possibilidade de fazer fotossíntese e crescer (BARUFI et al., 2012).

Em relação à viabilidade mitocondrial, os fatores de estresse praticamente não alteraram esta viabilidade, sendo observado os maiores resultados nas amostras expostas à PAR, especialmente nas [25], [50] e [100]. Segundo Berridge et al. (2005) quanto mais enzimas oxidoreductase dependentes de NAD(P)H presentes no compartimento mitocondrial, maior será a viabilidade mitocondrial (BERRIDGE et al., 2005). Assim, ao deixar *P. acanthophora* var. *brasiliensis* exposta a concentrações de NO_3^- e somente a PAR, percebemos a formação de células férteis nas bordas da alga. Quanto mais regiões férteis, maior a quantidade de células e conseqüentemente maior quantidade de mitocôndrias, aumentando assim a viabilidade mitocondrial, corroborando os resultados deste estudo. Por outro lado, os talos expostos à RUV desencadeiam um grande estresse, inviabilizando, em partes, a formação de grandes quantidades de estruturas reprodutivas, gerando menores viabilidades celulares. O espessamento da parede celular, como

verificado em microscopia de luz, pode ter agido como uma proteção contra a RUV, impedindo que grandes quantidades de radiação chegassem às mitocôndrias e as degradassem.

A presença de NO_3^- resultou em aumento dos pigmentos fotossintetizantes, mas com a exposição à RUV, esses pigmentos diminuíram. Em geral, os pigmentos fotossintetizantes estão positivamente correlacionados com a disponibilidade de nitrogênio presente no meio ambiente e respondem rapidamente a diferentes níveis de nitrogênio (DAVISON et al. 2007). As algas vermelhas possuem ficobilissomos que auxiliam no processo de fotoproteção (WATANABE; IKEUCHI 2013; KAŇA et al. 2014), e estão organizadas em um complexo antena na membrana dos tilacoides onde a aloficocianina (AFC) está no centro acima da clorofila, seguida pela ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) como terminal (PARMAR et al. 2013). O aparato fotossintetizante é uma das primeiras partes da planta que mais sofre com algum estresse, principalmente luminoso ou por RUV (TAKAHASHI; BADGER, 2011). As ficobiliproteínas, pigmentos acessórios da fotossíntese, são as principais fontes de absorção de radiação nas algas vermelhas marinhas (MUNIER et al., 2014), servindo também como um protetor da clorofila *a*, o principal pigmento relacionado à fotossíntese, e como agentes antioxidantes (ROMAY et al., 2003). A presença de RUVB provocou a perda de pigmentos, proteínas e danos no DNA, enquanto a exposição ao RUVA estimulou a produção da enzima RuBisCo, que capta CO_2 para o ciclo de Calvin, estimulando a fotossíntese (BISCHOF et al. 2002). Portanto, enquanto a RUVB degrada os pigmentos fotossintéticos, a RUVA tenta restaurar este dano. A clorofila *a*, um metabólito primário, é o pigmento mais importante e mais protegido presente nas algas vermelhas (PARMAR et al. 2013); portanto, não foram observadas grandes perdas desse pigmento quando expostas ao estressor RUV. No entanto, os pigmentos acessórios mais expostos (AFC, FC e FE) sofreram reduções significativas quando expostos à RUV e ausência de NO_3^- . Como a base molecular das ficobiliproteínas é nitrogênio (GLAZER, 1994), maiores concentrações de NO_3^- levaram a maiores concentrações de AFC, FC e FE, como verificado pelas concentrações de FE em *Rhodomonas* sp. (CHALOUB et al. 2015). A baixa concentração de pigmentos fotossintéticos em amostras tratadas sem NO_3^- explica porque os talos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* ficaram despigmentados com coloração esverdeada.

Como consequência do decréscimo de pigmentos nas amostras tratadas com ausência de NO_3^- , um decréscimo da autofluorescência do cloroplasto também foi

verificado quando analisado na microscopia confocal, principalmente quando estas amostras tratadas sem NO_3^- passaram pela exposição à RUV. Schmidt et al. (2012) com *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux e Bouzon et al. (2012) com *Porphyra acanthophora* E.C. Oliveira & Coll também observaram uma diminuição da autofluorescência nas algas expostas à RUV. A coloração esverdeada das células nas amostras sem NO_3^- contra a coloração amarronzada nas amostras tratadas com NO_3^- também está diretamente relacionada com a quantidade de ficobiliproteínas, formadas por moléculas de nitrogênio (GLAZER, 1994).

Em todas as amostras, e com mais frequência naquelas expostas à RUV, foram observadas regiões com células transparentes que não apresentaram autofluorescência quando excitadas a 405 nm, indicando, portanto, que estas últimas células não apresentavam atividade fotossintética. Kim et al. (2016) observaram um vírus em uma *Pyropia* sp. da Coreia e identificaram o mesmo padrão de células transparentes que o observado no presente trabalho. Por conta da similaridade encontrada na observação por microscopia de luz, sugere-se que essas células representem a presença de algum patógeno. O talo frágil, principalmente das amostras expostas à PAB, apresentou maior suscetibilidade a contaminações.

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a estrutura dos tilacóides dos cloroplastos não foi muito afetada pelos tratamentos, porém, percebeu-se uma grande quantidade de plastoglóbulos (gotas lipídicas) nas amostras tratadas sem NO_3^- . Sabe-se que em período de senescência ou estresse os tilacóides dos cloroplastos são degradados e substituídos por plastoglóbulos (TEVINE; STEINMULLER, 1985; BREHELIN et al., 2007), e a presença destas gotas lipídicas são acompanhadas pelo decréscimo de pigmentos fotossintetizantes (TEVINE; STEINMULLER, 1985), o que corrobora com o observado nas amostras expostas à ausência do nutriente.

Em condições de estresse a alga pode formar grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) (NASCIMENTO et al., 2014; ZUBIA et al., 2014), as quais são tóxicas para a célula e podem causar danos oxidativos, como o aumento da permeabilidade de membrana, a peroxidação lipídica, dano ou redução da enzima fotossintética, podendo até ser letal para a célula (ZUBIA et al., 2014). A fim de sequestrar estas ERO, as algas podem promover a formação de metabólitos antioxidantes (RAMLOV, 2010).

Os principais metabólitos secundários, com ação antioxidante, presentes em macroalgas vermelhas são os carotenoides, os fenólicos, os flavonoides e os aminoácidos

tipo micosporinas (MAA) (ZENG et al., 2001; APLE; HIRT, 2004; GANESAN et al., 2008; DE LA COBA et al., 2009; BORGES et al., 2011; CARRETO; CARIGNAN, 2011; KOTTUPARAMBIL et al., 2012).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não possuem função direta sobre o crescimento e desenvolvimento dos organismos, mas possuem papel fundamental na sua interação com o meio ambiente (VERPOORTE, 2000). Durante o período de experimentos, notou-se que as melhores respostas antioxidantes, com maiores concentrações de metabólitos secundários com atividade antioxidante, foram verificadas na alga exposta à RUV. No ambiente, *P. acanthophora* var. *brasiliensis* ocorre no supra litoral, ficando submersa somente em marés altas. Portanto, esta alga fica muito tempo totalmente exposta à RUV. Porém, mesmo com esta característica, a RUV continua sendo um agente abiótico que causa danos à alga, sendo um agente estressor em condições experimentais. Quanto mais estresse, mais a alga desencadeia mecanismos de proteção como a produção de metabólitos secundários que possam amenizar esta condição. Por este motivo, encontramos maiores concentrações de carotenoides, fenólicos e flavonoides nas algas expostas à RUV.

Em relação aos carotenoides, percebeu-se maiores concentrações nas amostras expostas à PAB quando comparadas com as expostas à PAR. Este resultado pode ser devido a intensa formação de ERO produzidas pelo estresse da RUV. Os carotenoides são pigmentos acessórios e, além disso, podem contribuir como agentes antioxidantes, eliminando ERO (APPLE; HIRT, 2004; KOTTUPARAMBIL et al., 2012). Portanto, os carotenoides agem a favor da fotossíntese e da fotoproteção (QUINLAN et al., 2012). Estas maiores concentrações de carotenoides em plantas e algas que sofreram algum tipo de estresse já foram verificadas em diferentes estudos (POLO et al., 2014; SIMIONI et al., 2014; SHEN et al., 2017). Além do estresse da RUV, a presença de NO_3^- também favoreceu a formação de carotenoides. As moléculas dos carotenoides são formadas por cadeias longas de carbono sempre com uma ou duas estruturas cíclicas (CARDOZO et al., 2007). A partir do licopeno podem ocorrer processos de ciclização para formação de outros carotenoides, como por exemplo para a formação da luteína deve acontecer a hidroxilação do α -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 nas maiores concentrações de NO_3^- , maiores as chances da formação de carotenoides na alga. Em estudos com as macroalgas *Gracilaria*

tenuistipitata (BARUFI et al., 2011) e *Heterocapsa* sp. (KORBEE et al., 2010), a presença de NO_3^- também favoreceu a formação de carotenoides.

Os compostos fenólicos, assim como os flavonoides, uma classe de fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2006), têm grande importância na proteção contra a RUV, defesa antiherbivoria, resistência a patógenos e defesa contra o crescimento de epífitas (AMSLER; FAIRHEAD, 2006; DAI; MUMPER, 2010). Percebeu-se que as maiores quantidades de fenólicos e flavonoides foram, principalmente, nas amostras expostas à RUV, onde a alga sofre um estresse e o metabólito antioxidante tenta reverter esta situação. Em *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) quando expostas à RUV também houve um aumento na concentração de fenólicos totais. Além disso, notou-se que a quantidade de fenólicos é diretamente proporcional à quantidade de NO_3^- colocado na água da cultura. A base molecular destes compostos são anéis aromáticos com grupos hidroxila (DAI; MUMPER, 2010). Portanto, quanto mais íons NO_3^- , maior presença e disponibilidade de átomos de nitrogênio e de oxigênio, os quais favorecem a formação de grupos hidroxilas formadoras destes metabólitos.

A ação antioxidante na alga foi medida pelo sequestro do radical livre DPPH, e a inibição de radicais livres seguiu o mesmo padrão de resposta que os carotenoides, fenólicos e flavonoides. Quanto maior concentração daqueles metabólitos, maior foi o sequestro de radicais livres. Novamente, as amostras expostas à RUV apresentaram maior inibição do DPPH, indicando que o sistema antioxidante estava mais ativado. O mesmo resultado foi verificado nas algas expostas à RUV: *S. cymosum* (POLO et al., 2014), *Ecklonia cava* Kjellman (KIM et al., 2014) e *Tetraspora* sp. (RASTOGI; INCHAROENSAKD, 2014). Como citado, a base molecular da maioria dos metabólitos antioxidantes são grupos hidroxilas ou precisam que ocorra uma hidroxilação, portanto quanto mais nutrientes disponíveis, mais fácil é a formação destes metabólitos.

Os açúcares solúveis totais são os primeiros produtos formados pela fotossíntese, no Ciclo de Calvin (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, se a alga estiver fazendo fotossíntese, a quantidade de açúcares solúveis encontrada deve ser alta. As menores concentrações de açúcares foram encontradas nas amostras expostas à RUV. Notou-se que as maiores quantidades de açúcar e amido foram verificadas na amostra sem NO_3^- e exposta à PAB, ou seja, condições de ausência de nutrientes, com muito estresse e presença de RUV, o que pode causar um grande desequilíbrio no metabolismo celular.

O amido das florídeas é o material de reserva das algas vermelhas (LANG, 2006). Com a ausência de NO_3^- e exposição à PAB a concentração desta reserva aumentou, verificada também com o teste citoquímico PAS. Este aumento, quando comparado com os outros tratamentos, pode ser devido à não quebra do amido em açúcar, justificando também a ausência de crescimento do talo neste tratamento. Por outro lado, a baixa quantidade de amido nas outras amostras pode estar relacionada com uma alteração na via de biossíntese de amido, no ciclo de Calvin, possivelmente através da ativação da via de degradação. A degradação do amido em glicose libera moléculas energéticas para o metabolismo normal da célula, como para a produção de componentes da parede celular, espessando-a (SCHMIDT et al., 2012), como visto em ML com AT-O, principalmente nas amostras expostas à RUV. O espessamento da parede celular é uma defesa mecânica contra algum agente estressor externo. Esta mesma resposta foi verificada em *Laurencia catarinensis* e *Palisada flagellifera* (PEREIRA et al., 2014), *Sargassum cymosum* (POLO et al., 2014) e *Pterocladia capillacea* (SCHMIDT et al., 2015).

Os PCAs e HCAs gerados evidenciaram que a ausência de NO_3^- é o fator determinante para as respostas metabólicas e fisiológicas da alga. Além disso, com base nos resultados do presente trabalho, os espécimes de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à diferentes concentrações de NO_3^- e à PAB mostraram alterações importantes, como negativas alterações na morfologia, organização celular e respostas fisiológicas primárias, assim como o aumento nas concentrações de compostos do metabolismo secundário e no espessamento de parede celular, quando comparadas com as amostras cultivadas com diferentes concentrações de NO_3^- e PAR. Estes resultados indicam que concentrações de NO_3^- atenuam alguns efeitos causados pela RUV e auxiliam na resposta antioxidante quando expostas àquela radiação.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a quantidade de NO_3^- na água influenciou respostas fisiológicas, entre as quais os mecanismos de defesa antioxidante da macroalga *P. acanthophora* var. *brasiliensis* exposta à RUV. Quando exposta à PAB, a macroalga teve reduzidas taxas de crescimento e viabilidade celular, demonstrada também pela redução da autofluorescência do cloroplasto, principalmente nos tratamentos sem adição de NO_3^- . Além de um aumento na produção de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, principalmente com presença de NO_3^- , obtendo assim uma maior eficiência na inibição do radical livre DPPH. Outra resposta ao estresse gerado foi o espessamento da parede celular. Portanto, a presença de NO_3^- é um fator que contribui para mitigar os efeitos da RUV e é determinante para as respostas antioxidantes. Por outro lado, a ausência deste nutriente não contribui para mitigação dos efeitos gerados pela RUV.

CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO DE CARPÓSPOROS DA MACROALGA VERMELHA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* (RHODOPHYTA, BANGIALES): EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UVA+UVB) E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO

**Artigo publicado na revista Photochemistry and Photobiology
(Fator de Impacto: 2,214; Qualis Ciências Biológicas 1: B2)**

Photochemistry and Photobiology, 2019, 95: 803–811

Effects of Ultraviolet Radiation (UVA + UVB) on Germination of Carpospores of the Red Macroalga *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* (Rhodophyta, Bangiales): Morphological Changes

Débora Tomazi Pereira*, Deonir Batista, Elisa Poltronieri Filipin, Zenilda Laurita Bouzon and Carmen Simioni

Plant Cell Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Received 2 October 2018, accepted 14 November 2018, DOI: 10.1111/php.13055

Resumo

Carpósporos de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll são unidades de dispersão e reprodução responsáveis por dar origem à estrutura filamentosa diploide do ciclo de vida desta alga. O presente trabalho forneceu informações do impacto da ação antrópica, analisando a influência da radiação ultravioleta (RUV) e do nitrato (NO_3^-) na morfologia, na viabilidade dos esporos e na autofluorescência dos cloroplastos durante a germinação de carpósporos de *P. acanthophora*. Carpósporos foram cultivados a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 h, e expostos à 0, 25, 50 e 100 mM de NO_3^- , e à PAR+RUVA+RUVB (PAB) por 3 h por dia, durante 2 dias, com dose diária de $5,05 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVA e de $0,095 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVB. Após o período experimental, amostras expostas à [50] foram cultivadas sem os tratamentos por mais 5 dias, somente expostas à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) com o objetivo de verificar sua viabilidade após o período de exposição inicial. Carpósporos de *P. acanthophora* mostraram significativa sensibilidade à exposição à RUV, em apenas 48 h, com alterações negativas na taxa de desenvolvimento, na morfologia geral, na organização celular e autofluorescência do cloroplasto. A RUV inibiu e impediu a formação do tubo germinativo nos carpósporos, que em sua maioria estavam inviáveis e/ou alterados, com retração do citoplasma e conteúdo citoplasmático desorganizado. A radiação também afetou a distribuição dos polissacarídeos ácidos e neutros, bem como a diminuição da intensidade de fluorescência dos cloroplastos. Ultraestruturalmente, a RUV reduziu a divisão celular e a formação de parede celular. Além disso, o estresse causado pela RUV fez com que aumentasse a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos carpósporos. Mesmo após a ausência da RUV os esporos permaneceram colapsados, indicando um dano irreversível. Já em relação ao NO_3^- , este interferiu na autofluorescência do cloroplasto, onde a ausência deste nutriente fez com que a autofluorescência diminuísse, por outro lado nas concentrações de [50] e [100] observou-se maiores comprimentos de tubo germinativo. Conclui-se que a RUV foi, na dose utilizada, um fator limitante para o desenvolvimento de carpósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, enquanto que o NO_3^- influenciou, mas não limitou, este desenvolvimento.

Palavras-chave: desenvolvimento; espécies reativas de oxigênio; esporo; microscopia confocal; microscopia eletrônica de transmissão

Abstract

Carospores of *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll are dispersion and reproduction units responsible for giving rise to the diploid filamentous structure of this alga's life cycle. The present study assesses the anthropogenic impact, analyzing the influence of ultraviolet radiation (UVR) and nitrate (NO_3^-) on morphology, spore viability and autofluorescence of chloroplasts during *P. acanthophora* carospores germination. Carospores were cultivated at $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ with photoperiod of 12 h, exposed to 0, 25, 50 and 100 mM of NO_3^- and to PAR+UVRA+UVRB (PAB) for 3 h per day for 2 days with a daily dose of $5.05 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ for UVAR and $0.095 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ for UVBR. After the experimental period, samples exposed to [50] were cultivated without treatments for another 5 days, only exposed to PAR with the objective of verifying their viability after the initial exposure period. *P. acanthophora* carospores showed significant sensitivity to UVR exposure after only 48 hours, with negative changes in development rate, overall morphology, cell organization and chloroplast autofluorescence. UVR exposure inhibited germ tube formation in carospores, which were mostly nonviable and/or altered, showing retracted cytoplasm and disorganized cytoplasmic content. Radiation also affected the distribution of acid and neutral polysaccharides, as well as decreased chloroplast fluorescence intensity. Ultrastructurally, UVR reduced the cell division and cell wall formation. In addition, the stress of UVR increased the amount of reactive oxygen species (ROS) in carospores. Even in the absence of UVR exposure, carospores remained collapsed, indicating irreversible damage. As for NO_3^- , this interfered with the autofluorescence of the chloroplast, where the absence of this nutrient induced decrease in autofluorescence, on the other hand in the concentrations of [50] and [100] larger germination lengths were observed. It can be concluded that UVR was a limiting factor for the development of *P. acanthophora*, whereas NO_3^- influenced, but does not limit, this development.

Keywords: confocal microscopy; development; oxygen-reactive species; spore; transmission electronic microscopy

1. INTRODUÇÃO

Porphyra é um gênero de macroalga vermelha pertencente à ordem Bangiales (BLOUIN et al., 2011), encontrado na zona intertidal e com tolerância ao estresse ambiental (CHAN et al., 2012). Recentemente, estudos moleculares dos genes da subunidade maior da proteína RuBisCo e da subunidade menor ribossomal, concluíram que todas as espécies do gênero *Porphyra*, encontradas no Brasil, tratam-se de espécies do gênero *Pyropia* (MILSTEIN et al., 2015). Ambos os gêneros pertencem à ordem Bangiales e possuem as mesmas características morfológicas e de desenvolvimento, apenas com pequenas alterações genéticas. O gênero *Pyropia* também já foi encontrado no Japão, Austrália, México e Mar Mediterrâneo (MILSTEIN et al., 2015).

Pyropia é considerado o gênero de macroalga marinha mais domesticada no mundo (SCHWEIKERT et al., 2011) e é conhecida como Nori, a alga utilizada no sushi (ZHANG et al., 2003; ZHOU et al., 2012). Este gênero é caracterizado pela alternância de gerações entre gametófitos (n) macroscópicos, os quais são utilizados para o consumo alimentício, e esporófitos (2n) microscópicos (BLOUIN et al., 2011). Cada geração libera um tipo de esporo diferente, onde gametófitos liberam carpósporos, os quais formarão a fase 2n, enquanto os esporófitos liberam conchósporos, que formarão a fase n (BLOUIN et al., 2011). Dependendo das condições, geralmente estresse, as duas fases também podem liberar monósporos, esporos que regeneram a sua própria fase (BLOUIN et al., 2011).

Observa-se que, com o passar do tempo, o impacto da ação humana sobre o meio ambiente vem aumentando. As liberações de poluentes atmosféricos e aquáticos são as que mais chamam a atenção por causarem a destruição da camada de ozônio e da qualidade da água dos oceanos, respectivamente. A destruição da camada de ozônio leva a um aumento da incidência da radiação ultravioleta (RUV) sobre a superfície da Terra (KERR; MCELROY, 1993), e em doses altas, esta radiação pode causar fotoinibição e alterações em proteínas, DNA, tecidos e metabólitos primários e secundários dos organismos atingidos (BISCHOF et al., 2000; WIENCKE et al., 2000; POPPE et al., 2003; HEO et al., 2010, ROLEDA et al., 2010; FREITAS, 2012; FIGUEROA et al., 2014; PEREIRA et al., 2014). A degradação da qualidade da água dos oceanos leva a um aumento, principalmente, da quantidade de nitrato (NO_3^-) solúvel em água. O NO_3^- é um íon que ocorre naturalmente no ambiente como um nutriente, proveniente de decomposição aeróbia (VESILIND; MORGAN, 2013), porém sua origem pode estar relacionada à ação antrópica, como a aplicação de fertilizantes orgânicos e inorgânicos, e

o uso de sistemas de saneamento *in situ* (BARBOSA, 2005; BAIRD; CANN, 2011). Concentrações de NO_3^- podem gerar produção de aminoácidos tipo micosporina (MAA) (ZHENG; GAO, 2009; BARUFI et al., 2011) e de pigmentos fotossintetizantes (BARUFI et al., 2011), aumentar a taxa de crescimento (JEANFILS et al., 1993; LI et al., 2008) e a viabilidade celular (DO; CORMIER, 1991). Além disso, o favorecimento da produção destas moléculas pela presença de nitrogênio pode mitigar os efeitos da RUV (BARUFI et al. 2011).

Pyropia acanthophora var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll é uma alga com grande interesse comercial, porém existem poucas informações sobre os primeiros momentos do desenvolvimento de seus esporos, bem como o quanto a RUV e o NO_3^- podem influenciar neste momento decisivo para propagação da espécie. Alguns estudos relatam que a influência da RUV na fase inicial do desenvolvimento causa um decréscimo da taxa de germinação (DRING et al., 1996; WIENCKE et al., 2000; SIMIONI et al., 2014), de ficobiliproteínas e da fluorescência da clorofila (DRING et al., 1996; SIMIONI et al., 2014), e um aumento de carotenoides (SIMIONI et al., 2014) em algas vermelhas e pardas; porém o efeito do NO_3^- em esporos jovens de algas não é relatado na literatura. Assim, pretendemos fornecer informações sobre o desenvolvimento de carpósporos da macroalga *P. acanthophora* sob influência da PAR+RUVA+RUVB (PAB) e do NO_3^- , verificando se estes agentes causam alterações na morfologia, na viabilidade dos esporos e na autofluorescência dos cloroplastos, visto que a liberação de carpósporos é crucial para a manutenção do ciclo de vida da alga em estudo. Além disso, verificar se o NO_3^- minimiza os efeitos causados pela RUV, e se mesmo após a ação da RUV os carpósporos conseguem se desenvolver gerando uma nova plântula, favorecendo a produção desta alga de grande importância econômica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Processamento do Material Biológico

Os gametófitos de *P. acanthophora* foram coletados no costão rochoso da Praia de Sambaqui, Florianópolis-SC, Brasil, (27°29'S e 48°32'O), nos meses de julho a setembro de 2016. Os talos das algas foram transportados até o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) em recipientes plásticos contendo água do mar. No laboratório, os talos foram lavados com água do mar filtrada e triados para remoção dos contaminantes.

Logo após a coleta, porções férteis de *P. acanthophora* com aproximadamente $1.0 \pm 0,05$ cm foram selecionadas, através de microscopia de luz em aumento de 100 vezes, cultivadas em placas de Petri forradas com papel toalha úmido contendo lâminas de vidro com gotas de água do mar filtrada, acrescida de meio von Stosch 50 % modificado sem NO_3^- (EDWARDS, 1970), por uma noite (12 h), no escuro e temperatura do ar de $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, para liberação de carpósporos (cada lâmina continha 3 porções férteis).

2.2 Condições de Cultivo

Após a liberação, os carpósporos obtidos foram cultivados em temperatura do ar de $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, irradiância de $40 \pm 10 \text{ } \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil) com fotoperíodo de 12 h. As RUVA e RUVB artificiais foram fornecidas pela lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée - France, que emite picos nos comprimentos de onda de 312 nm (RUVB) e de 365 nm (RUVA). A dose diária foi de $5,05 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVA e de $0,095 \text{ J.cm}^{-2}$ para RUVB (Light Radiometer Model PMA 2100, usando PMA 2107B-UW (underwater) UV sensor (UVA+UVB) e PMA 2102 (UVB) (Solar Light, USA). As doses de RUVA e RUVB ocorreram simultaneamente, e foram baseadas nas intensidades que estas radiações ocorrem durante o inverno de Florianópolis (PEREIRA et al., 2019b), já que esta fase do ciclo de vida desta alga ocorre no inverno.

Foram realizados experimentos com RUV e diferentes concentrações de NO_3^- , totalizando oito grupos experimentais:

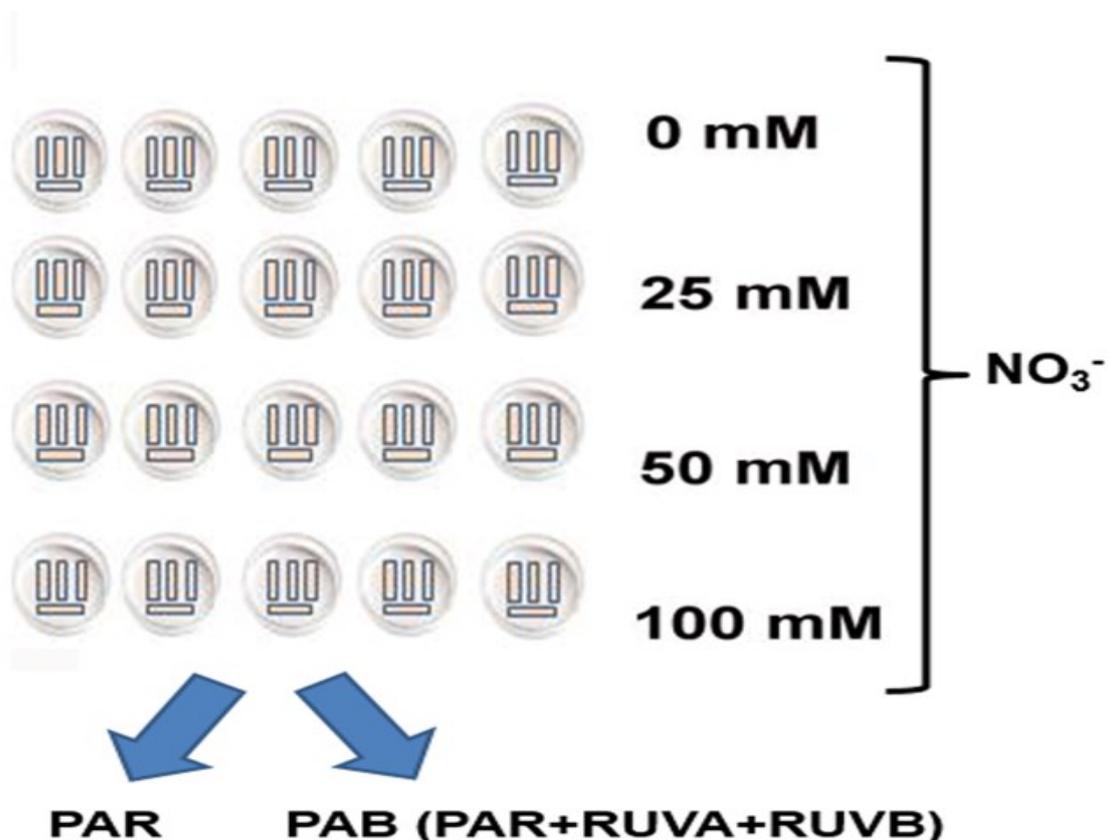
- 1) PAR 0 mM de NO_3^- (PAR [0]);
- 2) PAR 25 mM de NO_3^- (PAR [25]);
- 3) PAR 50 mM de NO_3^- (PAR [50]);

- 4) PAR 100 mM de NO_3^- (PAR [100]);
- 5) PAR+RUVA+RUVB 0 mM de NO_3^- (PAB [0]);
- 6) PAR+RUVA+RUVB 25 mM de NO_3^- (PAB [25]);
- 7) PAR+RUVA+RUVB 50 mM de NO_3^- (PAB [50]);
- 8) PAR+RUVA+RUVB 100 mM de NO_3^- (PAB [100]) (Fig. 12).

Foram feitas cinco réplicas para cada grupo experimental, cada réplica era formada por 4 lâminas. Os carpósporos foram expostos à PAB durante 3 h por dia (das 12:00 às 15:00 h, horários com maior pico de RUV no ambiente). Foi realizado um rodízio das lâminas aleatoriamente, a cada 1 h de exposição, para que todas as lâminas recebessem intensidade luminosa similar. O período experimental teve duração de 2 dias. Após este período, amostras de PAR [50] e PAB [50] foram cultivadas durante mais 5 dias, somente expostos à PAR e meio von Stosch 50 % modificado sem NO_3^- acrescido de 50 mM de NO_3^- , com o objetivo de verificar sua viabilidade após o período de exposição inicial. Estas amostras foram selecionadas, pois verificamos, visualmente, que as lâminas do PAR [50] eram as melhores.

No término do experimento as amostras da PAR e da PAB foram processadas para as análises citológicas. Todas as análises foram realizadas 24 e 48 h após a liberação de carpósporos.

Figura 12. Desenho experimental do experimento com carpósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* com oito grupos experimentais: quatro concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) e expostos à PAR e PAB. Cada grupo experimental tinha 5 réplicas composta por placa de Petri com 4 lâminas de vidro para liberação dos carpósporos.



2.3 Análise da Morfologia e Processos de Germinação

As características morfológicas foram analisadas e fotografadas com um microscópio epifluorescente (Leica DM500, Suíça) equipado com sistema de captura de imagens OPTHD 3.7 Software (Estados Unidos da América) do LABCEV. A análise foi realizada através da avaliação das seguintes características: esporos viáveis, viáveis com formação de tubo germinativo, alterados e inviáveis. As características morfológicas foram analisadas em quintuplicata ($n = 5$ lâminas, 1 foto por lâmina). As contagens foram apresentadas como porcentagem, sendo calculadas através da proporção entre o número de carpósporos de cada classe e o número total de carpósporos para cada tratamento.

2.4 Microscopia de Luz (ML)

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 3 %, tampão cacodilato de sódio a 0,1 M com pH 7,2 e sacarose a 2 %. A pré-fixação foi realizada durante uma noite (12 h) a 4 °C e seguida por uma lavagem no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH

7,2 (SCHMIDT et al., 2009). Foram feitas quintuplicatas (n = 5 lâminas) para cada grupo experimental, e duas delas foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis. As imagens foram adquiridas no sistema de captura OPTHD 3.7 Software do microscópio epifluorescente do LABCEV. Após foram realizados os seguintes testes citoquímicos:

2.4.1 Citoquímica

O material foi submetido as seguintes reações citoquímicas:

Azul de Toluidina (AT-O): Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo os carpósporos foram tratadas com solução aquosa de AT-O a 0,5 %, acidificada com HCl 1 N para pH 3,0, por 5 seg, lavadas em água destilada e secas ao ar (MCCULLY, 1970; GORDON; MCCANDLESS, 1973).

Ácido Periódico Schiff (PAS): Este corante foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As lâminas contendo os carpósporos foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1 % durante 3 minutos no escuro, lavados com água destilada e reagidos com reativo Schiff por 3 minutos. Foram, então, lavadas com água destilada e secas ao ar (GAHAN, 1984).

2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras com 48 h 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 por uma noite (12 h) a 4 °C, seguida por três lavagens no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 (PUESCHEL, 1979). Posteriormente, o material foi lavado três vezes no mesmo tampão cacodilato e em seguida desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 %). Após a desidratação, o material foi raspado para dentro de um *ependorf* e infiltrado em resina LR White (Sigma). O material foi polimerizado em *ependorfs* em estufa a 55 °C por 24 h. As secções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila (o qual se liga ao OsO₄, contrastando estas regiões) e citrato de chumbo (com objetivo de preservar a amostra), 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). Foram feitas quintuplicatas ($n = 5$ blocos provenientes de 5 lâminas) para cada grupo experimental, e as duas melhores foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.6 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC)

As amostras, na lâmina, foram fixadas em paraformaldeído a 3,7 % em tampão fosfato salino (PBS). O material em lâmina e lamínula foi observado em microscópio confocal (Leica TCS SP-5; Wetzlar, Germany) no LCME da UFSC. Autofluorescência do cloroplasto foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida de 510 a 750 nm (vermelho) (ZITTA et al., 2013). Para analisar a presença de parede celular, as amostras foram incubadas com 10 mg.mL^{-1} de Calcofluor White M2R (18909 Calcofluor White Stain - Sigma) por 15 min (KIM; FRITZ, 1993). A fluorescência da parede celular foi observada através da excitação no comprimento de onda de 405 nm e emissão de 410 a 490 nm (ciano). O programa LAS-AF Lite (Leica) foi utilizado para o processamento final das imagens. Foram feitas quintuplicatas ($n = 5$ lâminas) para cada grupo experimental, e as duas melhores foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.7 Medida do Esporo e do Tubo Germinativo após 7 Dias de Desenvolvimento

Os carpósporos previamente expostos à PAR [50] e PAB [50] foram mantidos em cultivo, apenas com PAR, durante mais 5 dias após o experimento. No quinto dia de desenvolvimento o comprimento (μm) dos carpósporos foram medidos pelo software ImageJ (versão 1.43) ($n = 50$ carpósporos de 5 lâminas diferentes), com o objetivo de verificar se a RUV influencia, a longo prazo, no desenvolvimento destes carpósporos.

Paralelamente, após 7 dias de desenvolvimento o comprimento (μm) do tubo germinativo dos carpósporos tratados apenas com NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM de NO_3^-) foram medidos pelo software ImageJ (versão 1.43) ($n = 50$ carpósporos de 5 lâminas diferentes), com o objetivo de verificar se o NO_3^- influencia, a longo prazo, no desenvolvimento destes carpósporos.

2.8 Detecção de ERO por DCFH-DA

Após as 48 h, as amostras vivas expostas a PAR [50] e PAB [50] foram raspadas das lâminas com 1 mL de água do mar esterilizada, colocadas em microplaca de 24 poços e lidas por espectrofotometria de fluorescência (excitação em 488 nm e emissão em 525 nm) em multileitora SpectraMax Paradigm Molecular Devices do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), sendo esta medida considerada o branco, para desconsiderar a autofluorescência de metabólitos da alga. Após a leitura, as amostras, foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro, com 1,5 mL por poço da molécula não fluorescente DCFH-DA 50 μ M (2',7'-diclorodihidro fluoresceína diacetato) (HE; HADER, 2002a). Quando esta molécula entra em contato com ERO, ocorre uma clivagem e oxidação, gerando a molécula fluorescente DCF (2'-7'-diclorofluoresceína fluorescente). O composto gerado (DCF) fica retido no ambiente intracelular e emite fluorescência verde, a qual pode ser mensurada. A quantidade de fluorescência de DCF foi determinada por espectrofotometria de fluorescência, uma vez que este é proporcional à quantidade de ERO intracelular. Para tanto, utilizou-se a multileitora SpectraMax com excitação em 488 nm e emissão em 525 nm. As análises foram realizadas com $n = 5$ (lâminas por grupo) e a quantificação de ERO foi calculada em porcentagem, considerando o PAR [50] como 100 %, de acordo com Saison et al. (2010).

O material incubado com DCFH-DA também foi colocado entre lâmina e lamínula e observado em microscópio confocal (Leica TCS SP-5; Wetzlar, Germany) no LCME. A fluorescência do DCF foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida em 525 a 550 nm (verde), enquanto a autofluorescência do cloroplasto foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida de 600 a 750 nm (vermelho). O programa LAS-AF Lite (Leica) foi utilizado para o processamento final das imagens. Foram feitas quintuplicatas ($n = 5$ lâminas grupo) para cada grupo experimental, e três delas foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.9 Análise e Interpretação dos Dados

Os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, e em alguns grupos os dados não estavam dentro da curva normal. Todos os dados foram transformados através do \log_{10} . Após a transformação, os dados passaram pelo teste de normalidade

Shapiro-Wilk e foram aprovados. Assim, os dados foram submetidos à Análise de Variância Bifatorial (MANOVA), sendo os fatores independentes a radiação (PAR e PAB) e a concentração de NO_3^- , 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 10.0). Além disso, os dados foram testados para análise de componentes principais (PCA) a fim de inspecionar o conjunto de variáveis analisadas e procurar padrões relacionados aos tratamentos testados. Todos os desenhos gráficos foram realizados utilizando-se scripts escritos em linguagem R (versão 3.1.1). Os dados e os relatórios HTML gerados a partir da análise (utilizando recursos de R Markdown) para determinar semelhanças de variáveis fisiológicas foram analisadas no presente trabalho.

3. RESULTADOS

3.1 Desenvolvimentos dos Carpósporos

Nas primeiras 24 h de desenvolvimento, os carpósporos foram distribuídos em 3 grupos: viáveis, viáveis com presença do tubo germinativo e inviáveis. Os esporos de todos os tratamentos foram visualizados com coloração amarronzada e em torno de 10 µm de diâmetro (Fig. 13a-h), porém percebeu-se uma polarização desorganizada nos carpósporos tratados com RUV (Fig. 13e-h). Com o tratamento PAR as células alongaram-se para formação de uma protuberância em um dos pólos, para formação de tubo germinativo (Fig. 13a-d-setas). Esta tentativa de formação de tubo também foi verificada nas amostras PAB [50] e [100], porém de uma forma desorganizada (Fig. 13g,h-setas). Todos os tratamentos apresentaram esporos viáveis, porém sem diferenças estatísticas entre eles (Tab. 6). Por outro lado, somente as amostras expostas à PAR e à PAB [50] e [100] apresentaram carpósporos viáveis com presença do tubo germinativo. Dentre eles, PAR [25] e [100] apresentaram as maiores quantidades destes esporos, aproximadamente 36 % e 30 %, respectivamente (Tab. 7). Com exceção de PAR [25], PAB [0] e [50], todos apresentaram esporos inviáveis, sendo PAB [25] o que apresentou a maior taxa de mortalidade, 17 % (Tab. 6).

Em relação à morfologia dos esporos após 48 h, percebeu-se que aqueles expostos à PAR apresentaram-se bem desenvolvidos, formando tubos germinativo maiores que 20 µm de comprimento (Fig. 13i-l). Todos os expostos à RUV estavam bem alterados e com um retardo do desenvolvimento, sem formação de tubo germinativo, com retração e conteúdo citoplasmático desorganizado (Fig. 13m-p), além da presença de carpósporos com coloração esverdeada indicando inviabilidade (Fig. 13o-p setas). Para as primeiras 48 h de desenvolvimento, os carpósporos foram classificados em 4 grupos: viáveis, viáveis com presença do tubo germinativo, alterados e inviáveis. Nos tratamentos com PAR observou-se esporos viáveis ainda sem tubo, porém sem diferenças estatísticas entre eles (Tab. 7), como também esporos viáveis com presença do tubo germinativo, novamente sem diferenças estatísticas entre os grupos (Tab. 7). Por outro lado, as amostras expostas à PAB não apresentaram carpósporos viáveis e carpósporos com tubo germinativo. Os carpósporos em sua maioria estavam alterados, sendo que a amostra PAB [100] apresentou aproximadamente 40 %, contra 81 %, 91 % e 89 % dos expostos à PAB [0], [25] e [50], respectivamente (Tab. 7). Todos os tratamentos apresentaram esporos inviáveis, porém as porcentagens destes esporos foram menores, estatisticamente, nas

amostras expostas à PAR, quando comparadas com as amostras expostas à RUV (Tab. 8). O tratamento com PAB [100] foi o que mais apresentou carpósporos inviáveis, com aproximadamente 59 % (Tab. 7). Todas as amostras expostas à PAR se equivaleram nas porcentagens de esporos de cada classe, portanto todas as amostras expostas à PAR foram estatisticamente iguais (Tab. 7).

Para 24 h de desenvolvimento, a junção do fator NO_3^- e tratamento com radiação (PAR ou PAB) é o que possui um efeito maior na taxa de esporos inviáveis [$\eta^2 = 43,9$ %, $F_{(3,32)} = 16,02$, $p < 0,001$], enquanto o fator radiação foi o que mais influenciou na taxa de esporos viáveis com presença do tubo germinativo [$\eta^2 = 61,6$ %, $F_{(1,32)} = 97,51$, $p \leq 0,001$], para os carpósporos viáveis sem tubo não foi observado um p significativo para nenhum fator. Para 48 h de desenvolvimento, o fator radiação (PAR ou PAB) foi o que possui um efeito maior no atraso do desenvolvimento, bloqueando a formação de tubo germinativo e mantendo os esporos viáveis sem tubo [$\eta^2 = 94,2$ %, $F_{(1,32)} = 560,30$, $p < 0,001$], viáveis com presença do tubo germinativo [$\eta^2 = 94,9$ %, $F_{(1,32)} = 611,56$, $p \leq 0,001$], alterados [$\eta^2 = 34,5$ %, $F_{(1,32)} = 1674,15$, $p \leq 0,001$] e inviáveis [$\eta^2 = 23,1$ %, $F_{(1,32)} = 13,08$, $p \leq 0,001$].

Figura 13. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 μ m) expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-h.** Esporos com 24 h de desenvolvimento, de todos os tratamentos, foram visualizados com coloração amarronzada e em torno de 10 μ m de diâmetro. **a-d.** Células do PAR com uma protuberância em um dos pólos da célula, para formação de tubo germinativo (setas). **e-h.** Células do PAB com uma polarização desorganizada nos pólos (setas). **i-l.** Esporos com 48 h de desenvolvimento e expostos à PAR apresentaram-se bem desenvolvidos, com tubo germinativo maiores que 20 μ m de comprimento. **m-p.** Células expostas à PAB e 48 h de desenvolvimento apresentaram-se bem alterados e com um retardo do desenvolvimento, sem formação de tubo germinativo, com retração do citoplasma e com o conteúdo citoplasmático desorganizado, além da presença de carpósporos com coloração esverdeada indicando sua inviabilidade (setas).

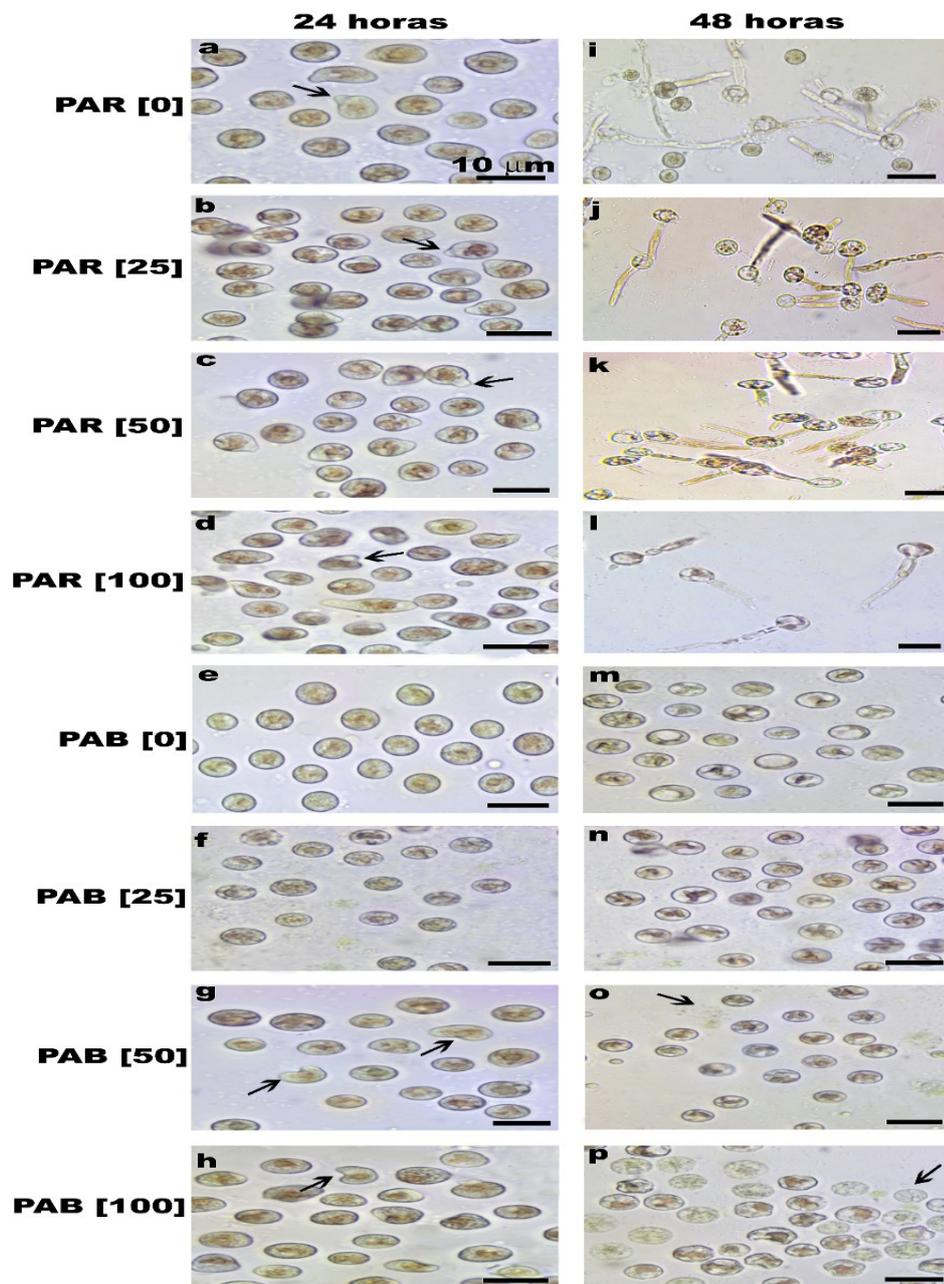


Tabela 6. Taxas de germinação expressas em % de esporos dos experimentos com carpósporos com 24 h após a liberação de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) por 24 h. Valores apresentados com média (n = 5; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

24 h				
Tratamento	Viáveis	Viáveis com Tubo	Alterados	Inviáveis
PAR [0]	74,6 \pm 3,9 ^a	24,4 \pm 2,6 ^{ab}	-	0,9 \pm 0,4 ^b
PAR [25]	63,5 \pm 9,0 ^a	36,4 \pm 4,0 ^a	-	-
PAR [50]	70,5 \pm 5,6 ^a	25,1 \pm 1,9 ^{ab}	-	4,2 \pm 1,1 ^b
PAR [100]	69,3 \pm 3,6 ^a	29,8 \pm 2,6 ^a	-	0,7 \pm 0,4 ^b
PAB [0]	100 \pm 9,7 ^a	-	-	-
PAB [25]	83,0 \pm 4,3 ^a	-	-	17,0 \pm 2,1 ^a
PAB [50]	93,0 \pm 2,6 ^a	7,0 \pm 0,5 ^b	-	-
PAB [100]	83,2 \pm 15,7 ^a	15,1 \pm 4,2 ^{ab}	-	1,6 \pm 0,4 ^b

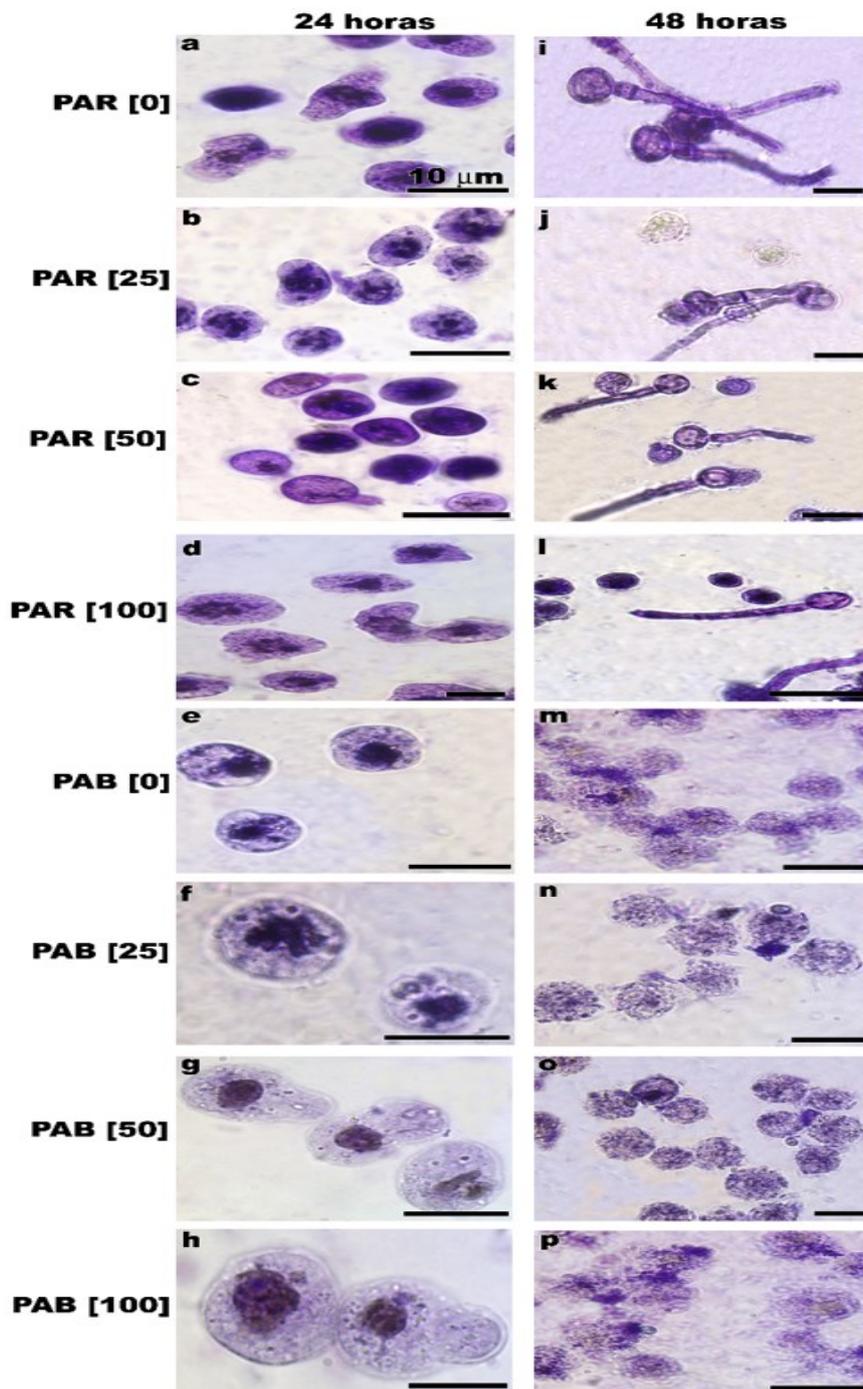
Tabela 7. Taxas de germinação expressas em % de esporos dos experimentos com carpósporos com 48 h após a liberação de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO₃⁻ (0, 25, 50 e 100 mM) por 48 h. Valores apresentados com média (n = 5; média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância bifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05).

48 h				
Tratamento	Viáveis	Viáveis com Tubo	Alterados	Inviáveis
PAR [0]	45,9±4,1 ^a	41,6±3,5 ^a	-	12,4±4,0 ^b
PAR [25]	44,9±9,7 ^a	50,7±6,3 ^a	-	4,3±0,8 ^b
PAR [50]	46,1±1,4 ^a	46,1±3,2 ^a	-	5,8±1,5 ^b
PAR [100]	42,6±6,0 ^a	49,4±7,6 ^a	-	8,0±1,7 ^b
PAB [0]	-	-	81,6±5,5 ^a	18,4±3,1 ^{ab}
PAB [25]	-	-	91,8±3,5 ^a	8,2±1,1 ^{ab}
PAB [50]	-	-	89,4±3,7 ^a	10,6±1,2 ^{ab}
PAB [100]	-	-	40,6±4,8 ^b	59,4±7,4 ^a

3.2 Citoquímica dos Carpósporos

Quando reagidas com o corante AT-O, amostras dos tratamentos PAR (Fig. 14a-d), após o período de 24 h, apresentaram uma reação metacromática para roxo na região central, com maior quantidade de polissacarídeos ácidos e ácidos nucleicos, e uma reação mais fraca na periferia do citoplasma. Neste mesmo período, as amostras expostas à PAB (Fig. 14e-h) também apresentaram este mesmo padrão. Já após as 48 h de desenvolvimento, as amostras PAR (Fig. 14i-l), que apresentaram esporos com tubo germinativo, foram visualizadas com reação metacromática para roxo na parede celular, visualizado tanto na célula do carpóspororo, como no tubo formado. Já as amostras tratadas com PAB (Fig. 14m-p), apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, com reduzida marcação na região central.

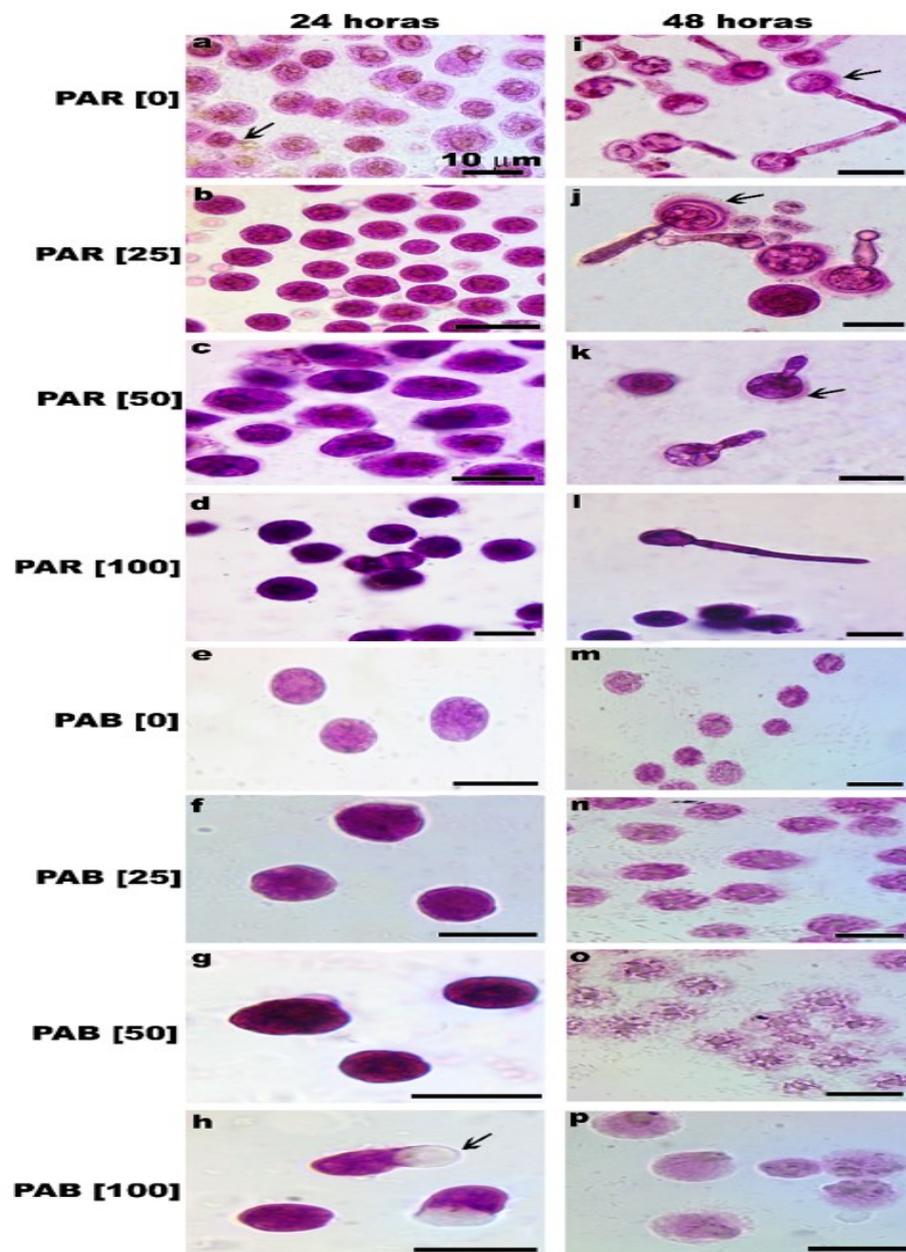
Figura 14. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 μm), corados com AT-O e expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-h.** Amostras expostas à PAR (a-d) e à PAB (e-h), após 24 h de desenvolvimento, apresentaram uma reação metacromática para roxo, com maior quantidade de polissacarídeos ácidos, e uma reação mais fraca na periferia do citoplasma. **i-l.** Amostras expostas à PAR e 48 h de desenvolvimento, apresentaram esporos com tubo germinativo, e com reação metacromática para roxo na parede celular e no tubo formado. **m-p.** Amostras expostas à PAB e 48 h de desenvolvimento, apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, não sendo evidenciada marcação na região central.



Na reação com o PAS, as amostras dos tratamentos PAR [0] e [25] (Fig. 15a-b), após o período de 24 h, apresentaram uma reação positiva na região central, e uma reação mais fraca pelo citoplasma, indicando a presença de polissacarídeos neutros. Neste mesmo período as amostras expostas à PAR [50] e [100] (Fig. 15c-d) também apresentaram este padrão de coloração, porém com maior intensidade quando comparado com as outras duas amostras. Para as amostras expostas à PAB (Fig. 15e-h), percebeu-se uma reação positiva do PAS, porém visualizou-se uma reação homogênea por todo o citoplasma. Em especial, a amostra PAB [100] apresenta uma polarização para formação de tubo germinativo, porém este aparece não corado, diferente da polarização verificada nas amostras expostas à PAR (Fig. 15a, h-seta).

Após as 48 h de desenvolvimento, as amostras PAR (Fig. 15i-l), que já apresentaram esporos com tubo germinativo, também apresentaram uma reação positiva por todo o esporo, especialmente na espessa parede celular (Fig. 15i,l-setas). As amostras PAR [50] e [100] apresentaram uma coloração mais intensa, como observado em 24 h, porém a parede celular não apresentou-se muito espessa, quando comparado com PAR [0] e [25] (Fig. 15m,n). Já as amostras tratadas com PAB (Fig. 15m-p), apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, sendo evidenciada uma leve marcação na região central e um citoplasma granuloso.

Figura 15. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 μ m), corados com PAS e expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-b.** Amostras PAR [0] e [25], com 24 h de desenvolvimento, coradas com PAS apresentaram uma reação positiva na região central, e uma reação mais fraca pelo citoplasma. Polarização para o tubo germinativo corado com o PAS (seta). **c-d.** Amostras expostas à PAR [50] e [100], com 24 h, também apresentaram o padrão anterior, porém com uma intensidade muito mais forte. **e-h.** Amostras expostas à PAB e 24 h de desenvolvimento, com uma reação positiva e homogênea do PAS. Polarização para o tubo germinativo não corado com o PAS (seta). **i-l.** Amostras PAR, com 48 h de desenvolvimento, apresentaram uma reação positiva do PAS por todo o esporo, especialmente na espessa parede celular (setas). **m-p.** Amostras tratadas com PAB e 48 h, apresentaram fraca reação por todo o citoplasma dos carpósporos, sendo evidenciada uma leve marcação na região central e um citoplasma granuloso.

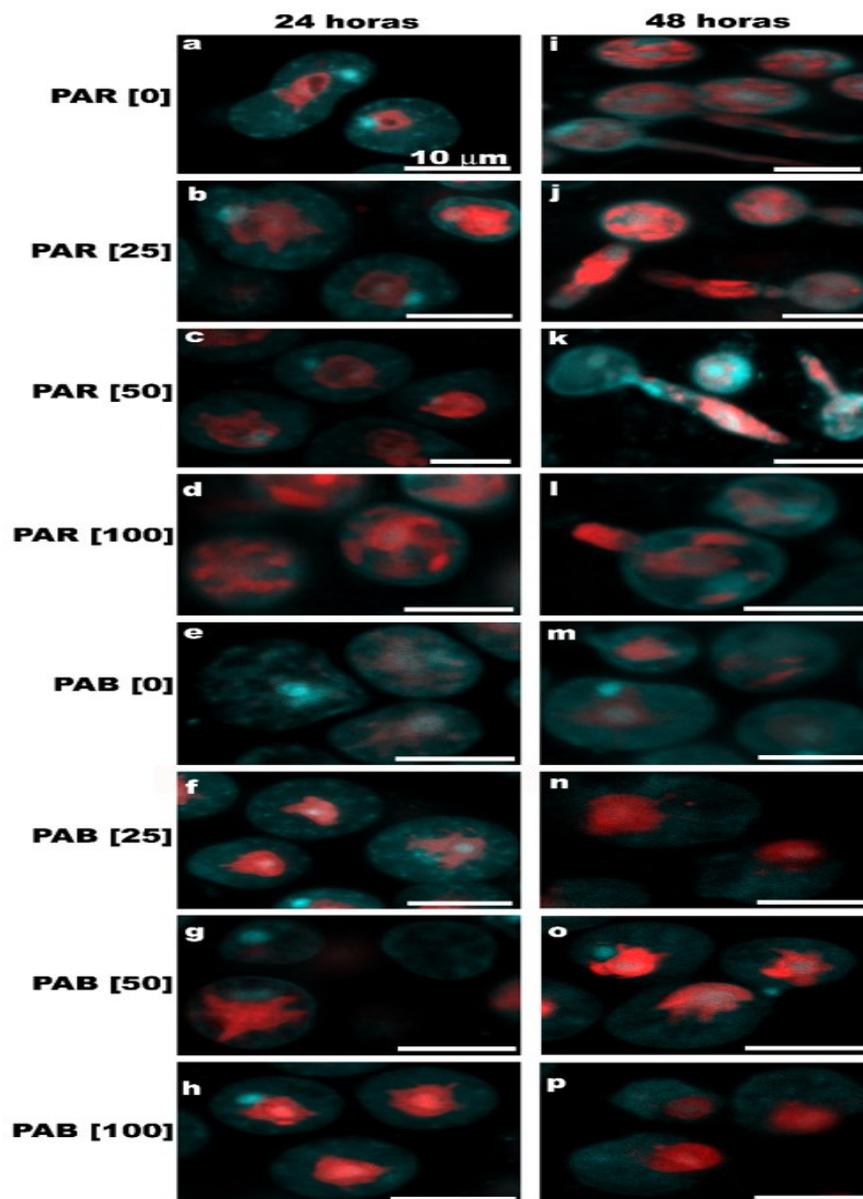


3.3 Autofluorescência dos Cloroplastos e Formação da Parede Celular

Quando analisadas em microscopia confocal, amostras de 24 h de desenvolvimento e tratadas com PAR apresentaram um cloroplasto central, único e estrelado, com autofluorescência (Fig. 16a-d). Observou-se que a intensidade de autofluorescência do cloroplasto foi a mesma para as quatro concentrações de NO_3^- , porém o tamanho dos braços do cloroplasto foi menor na PAR [0]. Após a exposição à PAB, foi visualizada uma fraca autofluorescência dos cloroplastos dos carpósporos com [0] (Fig. 16e), porém PAB [25], [50] e [100] apresentaram intensa autofluorescência (Fig. 16f-h). Uma reação positiva da parede celular foi evidenciada por todo o esporo e na mesma intensidade para todos os tratamentos (Fig. 16a-h).

Após 48 h de desenvolvimento, as amostras PAR (Fig. 16i-l), as quais já apresentavam esporos com tubo germinativo, possuíam uma autofluorescência do cloroplasto tanto na célula do esporo, como no tubo germinativo (Fig. 16i,l). Uma reação positiva da parede celular também foi evidenciada por toda a célula e no tubo germinativo do carpóspororo (Fig. 16i-l). Já as amostras tratadas com PAB (Fig. 16m-p), apresentaram fraca autofluorescência, principalmente na amostra PAB [0], entretanto, notou-se que cloroplastos das amostras PAB [25], [50] e [100] localizavam-se em um dos pólos da célula (Fig. 16n-p). Também foi observada uma reação positiva na parede celular (Fig. 16m-p).

Figura 16. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasilensis*, observados ao microscópio confocal (barras de escala = 10 μm), expostos à PAR e à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 24 e 48 h. **a-d.** Amostras expostas à PAR e com 24 h de desenvolvimento, apresentaram um cloroplasto central, único e estrelado, e com mesma intensidade de autofluorescência (vermelho). O tamanho dos braços do cloroplasto foi menor na PAR [0]. **e-h.** Amostras expostas à PAB e com 24 h, apresentaram uma fraca autofluorescência dos cloroplastos dos carpósporos com [0], porém PAB [25], [50] e [100] apresentaram intensa autofluorescência. **i-l.** Amostras expostas à PAB e com 48 h de desenvolvimento, apresentavam esporos com tubo germinativo, uma autofluorescência do cloroplasto tanto na célula do esporo, como no tubo germinativo. **m-p.** Amostras expostas à PAB e 48 h, apresentaram fraca autofluorescência, principalmente na amostra PAB [0]. **a-p.** Uma reação positiva da parede celular foi evidenciada por todo o esporo (azul) e na mesma intensidade para todos os tratamentos.



3.4 Alterações na Ultraestrutura dos Carpósporos

Quando analisadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras do tratamento PAR [0], após 48 h de desenvolvimento, apresentaram um carpósporo esférico, sem polarização para formação de tubo germinativo e, em secção transversal, muitas mitocôndrias (M) e braços dos cloroplastos (C), e parede celular (PC) pouco desenvolvida (Fig. 17a-c). Já na amostra tratada com PAR [25], pode-se observar mais de uma célula, indicando que houve divisões celulares (Fig. 17d-seta), cloroplasto com um pirenoide (Pi) bem desenvolvido, tilacoides bem organizados (Fig. 5e, f-seta) e parede celular formada (Fig. 17f). O tratamento [50] apresentou carpósporo com polarização, a fim de desenvolver o tubo germinativo (Fig. 17g-seta). Há presença de plastoglóbulos (P) (Fig. 17h), tilacoides organizados e desenvolvimento de PC (Fig. 17i). Para o tratamento [100] também se observa polarização do carpósporo (Fig. 17j-seta), presença de Pi, de vesículas com material para formação de parede celular (V), presença da parede celular e de tilacoides organizados (Fig. 17j-l).

Já as amostras de 48 h de desenvolvimento e tratadas com PAB apresentaram células individuais, sem divisões celulares, com formato alterado, sem presença de parede celular (PC), e com presença de grande quantidade de grãos de amido (A) e vesículas com conteúdo elétron denso no seu interior (V) (Fig. 18a,b). Nota-se também a presença de grãos de amido já utilizados (Fig. 18c, setas). O cloroplasto apresentou-se com tilacoides organizados, porém sem formação de pirenoide e com presença de plastoglóbulos (P) (Fig. 18d). Mitocôndrias também foram observadas (M) (Fig. 18d).

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 48 h. **a-c.** Carpósporos tratados com [0] com formato esférico, com cloroplastos (C) e mitocôndrias (M) e com parede celular (PC) pouco desenvolvida. **d-f.** Carpósporos tratados com [25], com divisão celular (seta), pirenoide (Pi), tilacoides organizados (setas) e presença de PC. **g-i.** Carpósporos tratados com [50] com polarização (seta), plastoglóbulos (P) e PC. **j-l.** Carpósporos tratados com [100] com polarização (seta), Pi, vesículas (V) com material para formação de PC, e uma PC desenvolvida.

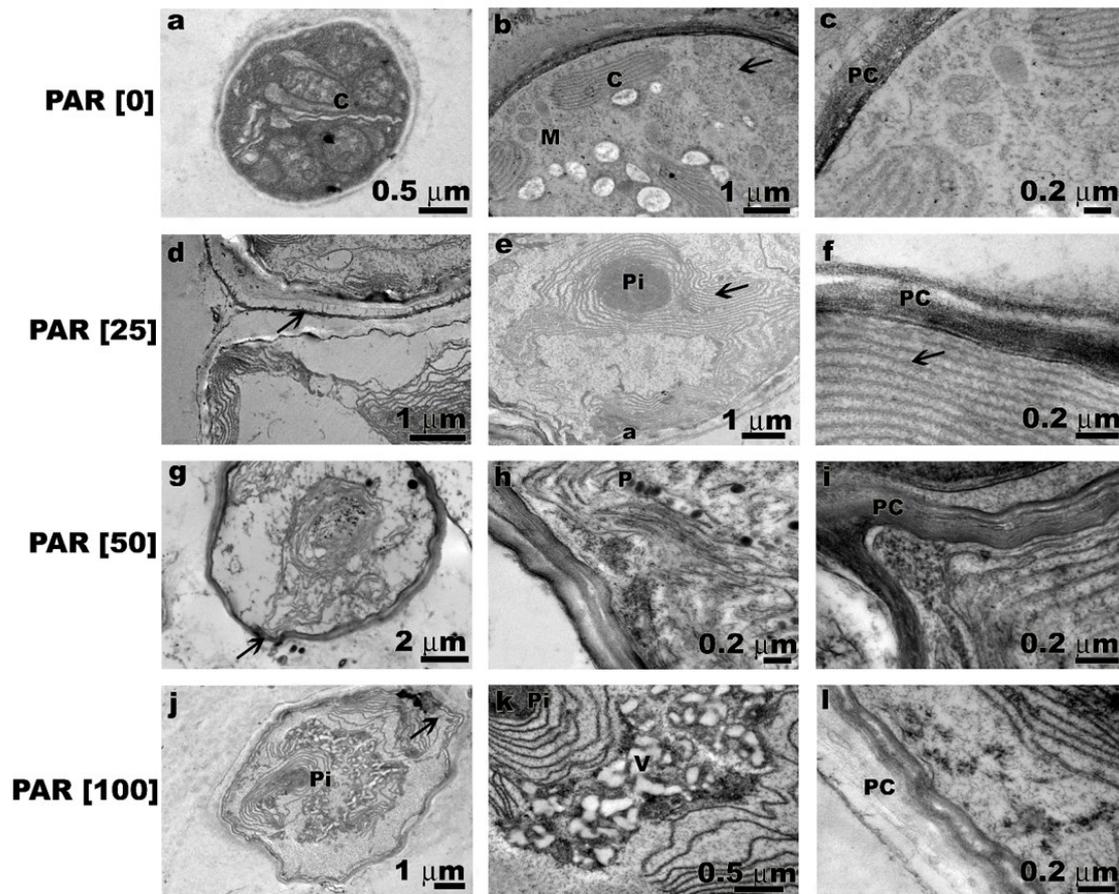
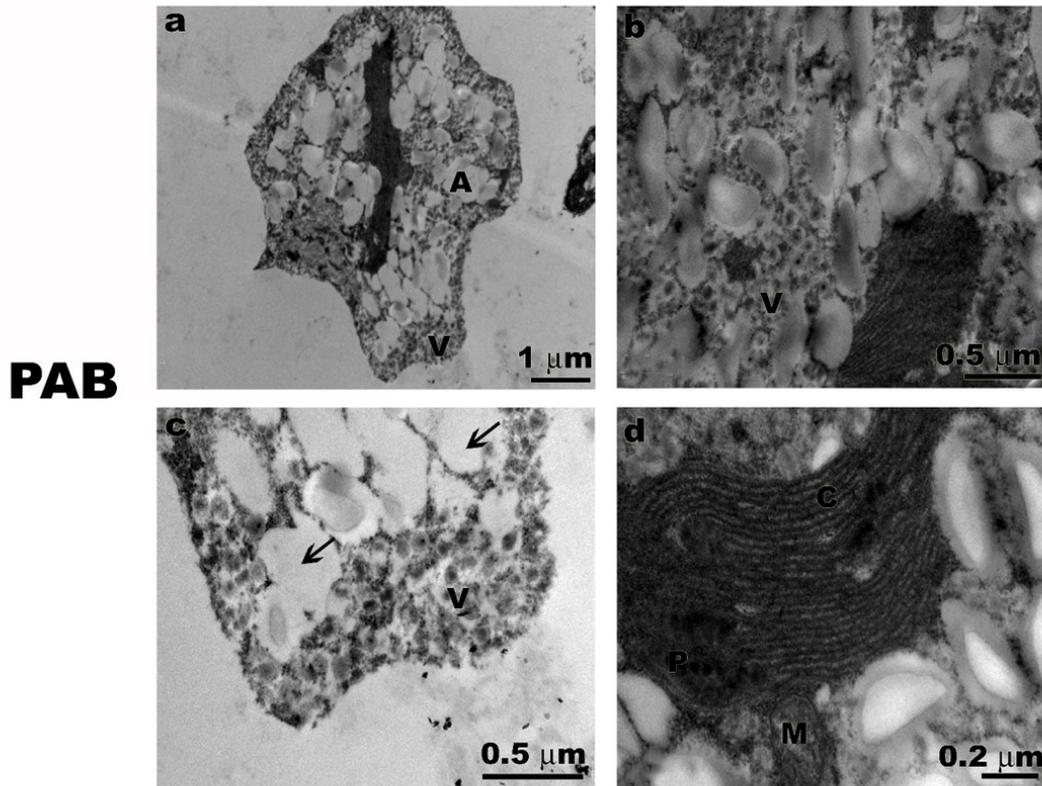


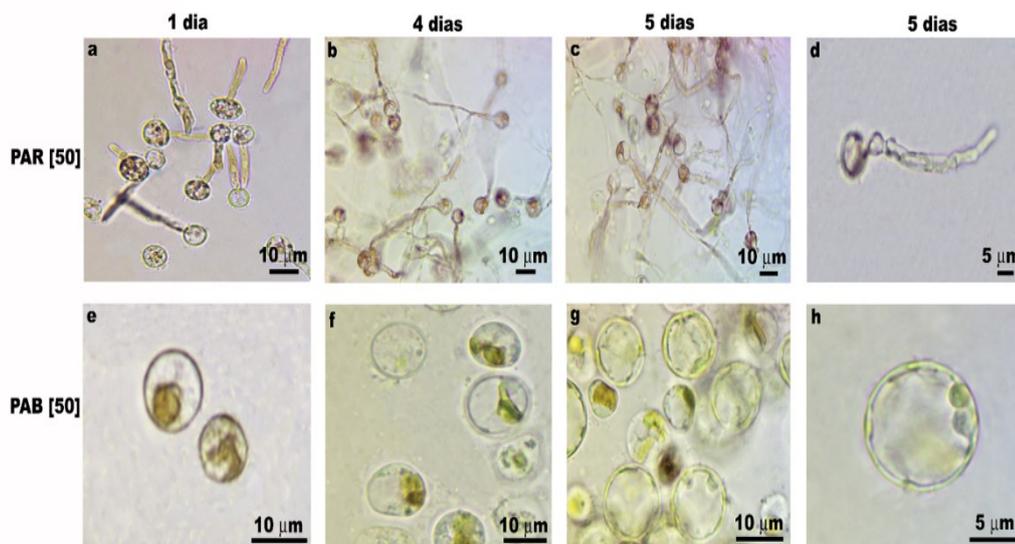
Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAB e à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 48 h. **a-b.** Carpósporo sem divisões celulares e parede celular, com formato irregular e presença de grãos de amido (A) e vesículas eletrón desnsas (V). **c.** Presença de grãos de amido já utilizados (setas). **d.** Cloroplasto (C) com tilacoides organizados, porém com presença de plastoglóbulos (P). Mitocôndrias também foram observadas (M).



3.5 Morfologia dos Carpósporos Após 5 Dias sem Exposição à RUV

Os carpósporos previamente expostos à PAR [50] e PAB [50] foram mantidos em cultivo, apenas com PAR, durante mais 5 dias após o experimento. Os carpósporos com 1 dia de desenvolvimento na PAR [50] apresentaram estrutura filamentosa típica de *Pyropia* (Fig. 19a) e, no quarto e quinto dias de desenvolvimento, continuaram o desenvolvimento normalmente (Fig. 19b-d) tendo uma média de comprimento de $75,65 \pm 10,76 \mu\text{m}$. Já para a amostra PAB [50], no primeiro dia de desenvolvimento observou-se uma célula com citoplasma desorganizado e colapsado, de coloração marrom claro (Fig. 19e), e no quarto e quinto dias do desenvolvimento, os carpósporos continuaram a se colapsar, tornando-se esverdeados e uma célula vazia (Fig. 19f-h), o comprimento desta célula vazia foi bem menor, estatisticamente, quando comparado com a célula em pleno desenvolvimento da amostra do PAR, em torno de $8,79 \pm 2,05 \mu\text{m}$.

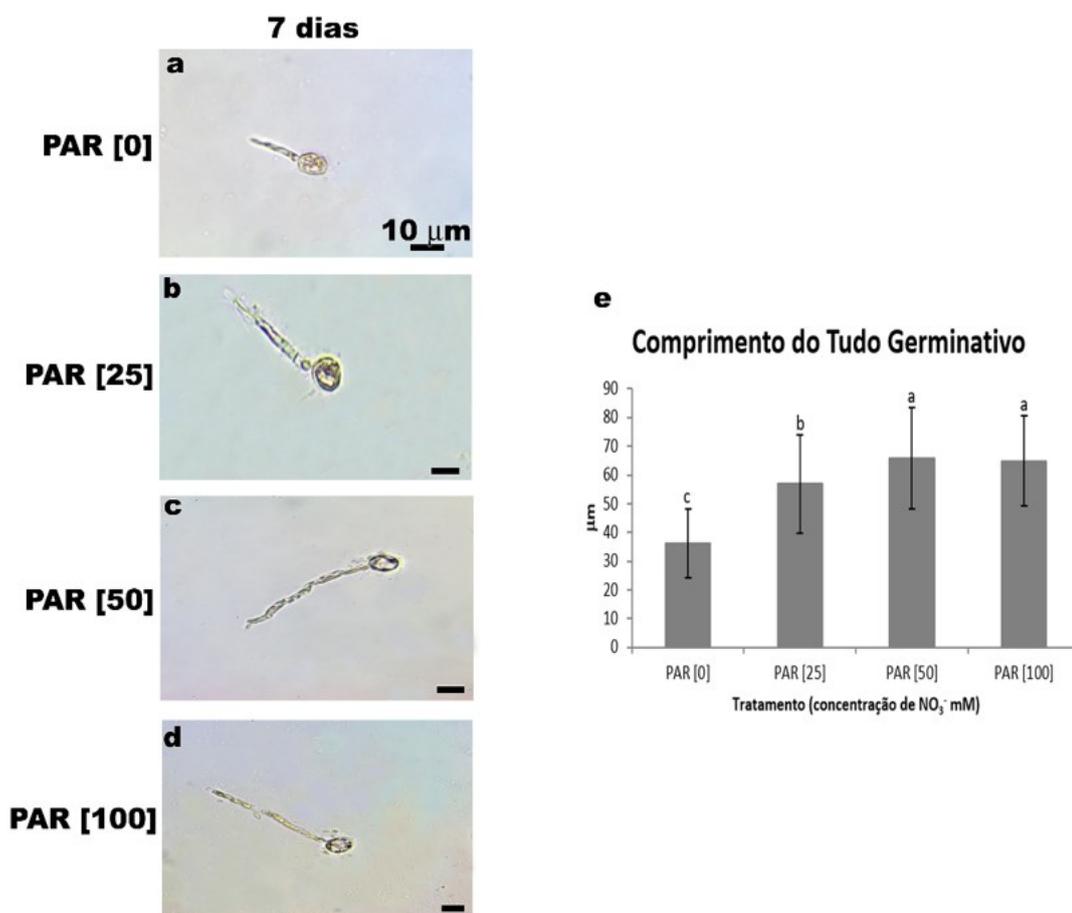
Figura 19. Microscopia de luz dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR [50] e à PAB [50] tratados por mais 5 dias somente com PAR. **a-d.** Os carpósporos da PAR [50] apresentaram estrutura filamentosa típica de *Pyropia*. **e.** No primeiro dia de desenvolvimento do carpósporo exposto à PAB [50] apresentou uma célula com citoplasma desorganizado e colapsado, de coloração marrom claro. **f-h.** No quarto e quinto dias do desenvolvimento, os carpósporos continuaram a se colapsar, tornando-se esverdeados e uma célula vazia.



3.6 Medida do Tubo Germinativo após 7 dias de Desenvolvimento

Após 7 dias de desenvolvimento, os carpósporos expostos à PAR [50] e [100] foram os que apresentaram maior comprimento do tubo germinativo, com uma média de 65,88 e 64,85 μm , respectivamente; e os carpósporos do tratamento [0] foram os que apresentaram menor comprimento do tubo germinativo, com média de 36,15 μm (Fig. 20a-e).

Figura 20. Carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à diferentes concentrações de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) em laboratório por 7 dias e observados ao microscópio de luz (barras de escala = 10 μm) (a-d) e média dos comprimentos dos tubos germinativos das mesmas amostras (e). Valores apresentados com média (n = 5; média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância unifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

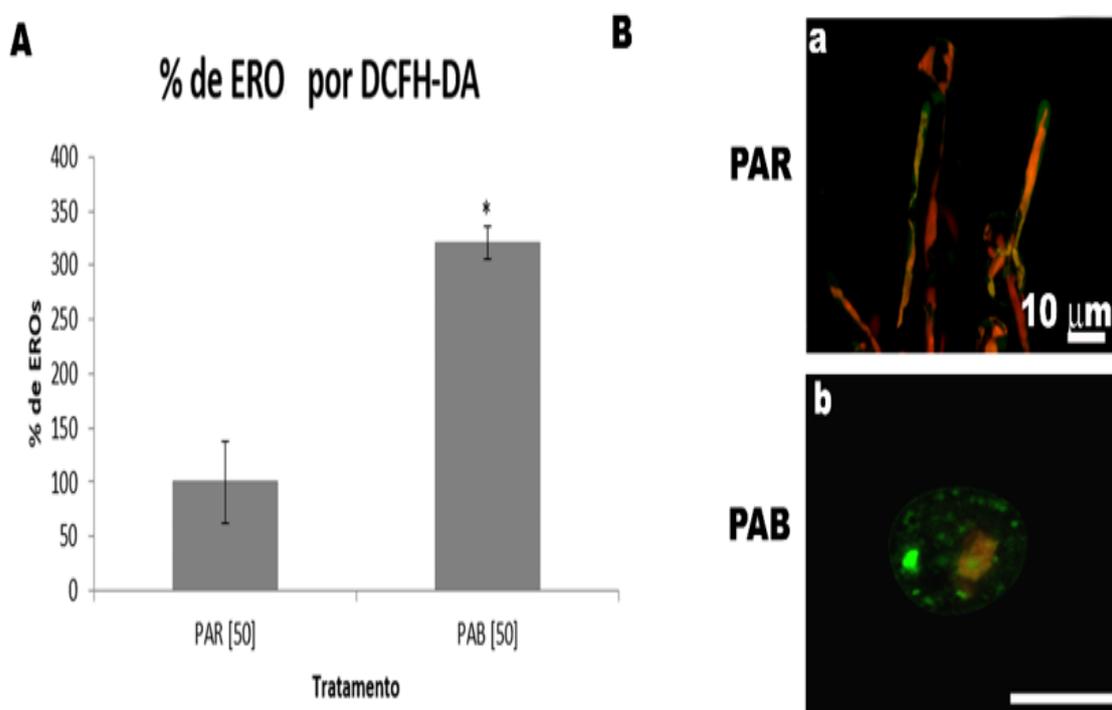


3.7 Formação de ERO nos Carpósporos

Após 48 h de exposição à PAB [50], os carpósporos apresentaram um aumento de 220 % na quantidade de ERO, detectada por espectrofotometria de fluorescência, quando comparado com a amostra exposta à PAR [50] (Fig. 21A). Quando observados em microscopia confocal, os carpósporos do tratamento PAR apresentaram-se com formação de tubo germinativo, autofluorescência do cloroplasto (vermelho) e alguma fluorescência do DCF (verde), indicando a presença de ERO (Fig. 21B-a). Já para os carpósporos expostos à PAB apresentaram ausência de tubo germinativo, baixa autofluorescência do

cloroplasto e intensa e pontuada fluorescência do DCF, indicando existência de ERO (Fig. 21B-b).

Figura 21. A) Taxas de ERO expressas em % dos experimentos com carpósporos com 48 h após a liberação de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR [50] e à PAB [50] por 48 h. Valores apresentados com média (n = 5; média ± DP). Asterisco indica diferença significativa de acordo com o teste T independente ($p \leq 0,05$). **B)** Microscopia confocal (barras de escala = 10 μm) dos carpósporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* expostos à PAR (**a**) e à PAB (**b**) em laboratório por 48 h e incubados com DCFH-DA. Fluorescência verde indica presença de ERO e fluorescência vermelha indica autofluorescência do cloroplasto.



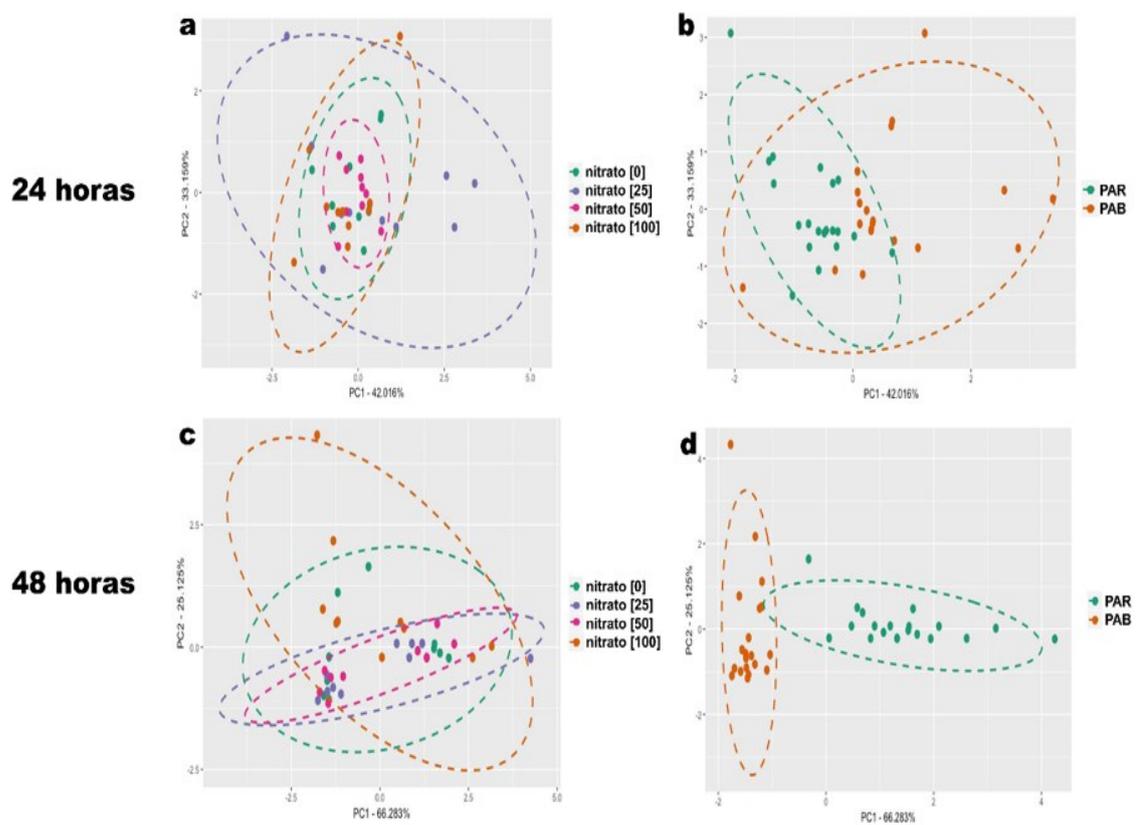
3.8 Análise de Componentes Principais de Variáveis Fisiológicas dos Carpósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* Expostos à Altas Concentrações de NO_3^- e de RUV

Levando em conta a concentração de NO_3^- (0, 25, 50 e 100 mM) (Fig. 14a,c), não se percebe a formação de grupamentos distintos, tanto para 24 h como para 48 h de desenvolvimento. Porém, esta técnica apresentou bom poder de discriminação dos grupos ao se considerar o tratamento com radiação (PAR ou PAB) como fator discriminante (Fig.

22b,d). Percebeu-se a formação de dois grupos distintos, principalmente nas amostras com 48 h de desenvolvimento.

Portanto, observou-se que o tratamento com radiação é o fator que mais diferencia as amostras entre si, quando comparadas com a concentração de NO_3^- , e não se percebe uma tendência das amostras tratadas com diferentes concentrações de NO_3^- se distinguirem das demais concentrações.

Figura 22. Análise de componentes principais (PCA) de *P. acanthophora var. brasiliensis* (esporos viáveis, viáveis com tubo, alterados e inviáveis) levando em consideração a concentração de NO_3^- (a,c) e o tratamento (b,d) após 24 e 48 h de desenvolvimento.



4. DISCUSSÃO

Carpósporos jovens de *P. acanthophora* mostraram significativa sensibilidade a exposição à RUV, em apenas 48 h, com alterações na taxa de desenvolvimento, na morfologia geral, na organização celular e autofluorescência do cloroplasto.

Em relação ao desenvolvimento dos carpósporos de *P. acanthophora* percebeu-se que a RUV inibiu e impediu o desenvolvimento inicial da espécie. Estes dados corroboram com o estudo de Scariot et al. (2013), com tetrásporos de *Gelidium floridanum* W.R. Taylor expostos à RUV, que demonstraram uma baixa taxa de crescimento, perda de pigmentação e uma diferenciação alterada na região apical. Estes autores apontaram que a RUV é crucial para o desenvolvimento da espécie. Os efeitos da RUV também foram observados em esporos de *Grateloupia filicina* (J.V.Lamouroux) C.Agardh que apresentaram uma taxa de crescimento baixa (ZHAO; LIXIA, 2014), e na germinação de conchósporos de *Porphyra haitanensis* T.J.Chang & B.F.Zheng, onde a RUVB causou efeitos negativos no crescimento e na divisão celular, atrasando a formação de novas plântulas (JIANG et al. 2007).

O padrão de distribuição dos componentes citoplasmáticos, tanto os polissacarídeos neutros como os ácidos, visualizados através do PAS e AT-O, respectivamente, foram alterados após a exposição à RUV. Os principais polissacarídeos neutros de algas vermelhas são a celulose, manose e xilose, na parede celular, e os grãos de amido, no citoplasma, tendo a função de ser uma substância de reserva (LANG, 2006). Com a inviabilidade dos esporos expostos à RUV, a parede celular e os grãos de amido tendem a se degradar, visualizados com aspecto granular e menos intenso no PAS. Normalmente, estudos com RUV em talos de macroalgas apontam aumento de grãos de amido, onde a energia proveniente da fotossíntese é armazenada e não utilizada para produzir novas células (SIMIONI et al., 2014). Em nosso estudo, não ocorreu nem a formação de novas células, nem o acúmulo de grãos de amido no citoplasma, sugerindo um dano no sistema fotossintetizante, já que a RUVB tem um grande potencial de causar danos, principalmente, ao DNA e ao processo fotossintetizante (WIENCKE et al., 2000, HEO et al., 2010, GÓMEZ; HUOVINEN 2011, FIGUEROA et al., 2014). Segundo Takahasi e Bagder, (2011) quando a taxa de danos excede a taxa de fotorreparo ocorre a fotoinibição, isto acontece quando o dano às proteínas no centro de reação excede a capacidade do Fotossistema II em ativar mecanismos de fotorreparação, corroborando ao observado neste estudo, onde o cloroplasto teve diminuição de sua autofluorescência, como também diminuição de componentes ácidos.

Com apenas 48 h de desenvolvimento, os carpósporos jovens de *P. acanthophora* não apresentaram significativa sensibilidade a exposição às concentrações de NO_3^- , apresentando mesmos resultados na taxa de desenvolvimento, na morfologia geral, na organização celular e autofluorescência do cloroplasto. Porém, com um aumento no tempo de observação para 7 dias, notou-se que quanto maior a concentração de NO_3^- , maior o tamanho do tubo germinativo, evidenciando o auxílio no desenvolvimento dos carpósporos.

A ausência de NO_3^- fez com que o carpósporo atrasasse seu desenvolvimento, retardando a polarização da célula para formação de tubo germinativo e, conseqüentemente, formação de parede celular. Já os carpósporos em concentrações de NO_3^- e os expostos à PAR, apresentaram polarização celular, parede celular bem desenvolvida e presença de pirenoides, região onde ocorre o acúmulo da enzima RuBisCo, evidenciando um bom e rápido desenvolvimento dos carpósporos. Foi possível notar presença de plastoglóbulos, acúmulo de lipídeo, indicando um pequeno estresse celular (TEVINI; STEINMULLER, 1985), talvez pelo rápido desenvolvimento, mas que não interferiu no desenvolvimento pleno da alga. Presença de vesículas vazias também foram observadas, evidenciando produção e utilização de material para construção de parede celular, como observado em Bouzon et al. (2005). A ultraestrutura dos esporos também foi muito afetada com a exposição à RUV. A parede celular não foi formada, indicando uma inviabilidade celular. Porém, observou-se grande presença de vesículas com material para formação de parede celular (BOUZON et al., 2005), mas com o estresse e degradação de partes da célula, estas vesículas não conseguem seguir para seu destino final, ficando acumuladas no citoplasma, como observado em *G. floridanum* tratado com baixa salinidade (FILIPIN et al., 2016). Além da parede celular ausente, o pirenoide também não foi formado. A proteína RuBisCO, responsável por assimilar CO_2 para o ciclo de Calvin (RECUENCO-MUÑOZ et al., 2015), é uma das proteínas que mais sofre com a presença da RUVB (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).

Organelas como cloroplasto e mitocôndrias, que trabalham com cadeia transportadora de elétrons e oxigênio, produzem ERO. Portanto, estas moléculas tóxicas para a célula estão presentes durante o metabolismo aeróbio celular normal das células vegetais, sendo produzidas em taxas controladas (MITTLER, 2002). Geralmente, em condições de estresse a homeostase celular é quebrada ocorrendo a produção excessiva

de ERO, como é o caso do estresse salino (LESHEM et al., 2007; LIU; PANG., 2010), de metais pesados (TSUJI et al., 2003; KNAUERT; KNAUER, 2008; LIU; PANG, 2010; SAISON et al., 2010), de alterações na temperatura (LIU; PANG, 2010), e presença da RUV (HE; HADER, 2002b). Elevadas quantidades de ERO podem oxidar proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e polissacarídeos, levando a uma morte celular (MITTLER, 2002), que pode ser observado no presente trabalho.

Mesmo após a ausência da RUV os esporos permaneceram colapsados, indicando um dano irreversível. Os esporos não conseguiram se desenvolver, o citoplasma continuou se colapsando e a coloração passou de marrom para verde, indicando que a presença de RUV nos primeiros dois dias de desenvolvimento dos carpósporos foi deletéria para a alga. A compreensão da sensibilidade da espécie ao RUVB durante o desenvolvimento precoce é crucial, uma vez que os estágios microscópicos podem produzir um efeito gargalo no processo de adaptação das comunidades de macroalgas num cenário de incidência crescente de RUVB (ALTAMIRANO et al., 2003).

Mesmo não tendo uma diferença estatística, nas concentrações 0 e 100 mM de NO_3^- , observamos uma tendência a terem uma maior quantidade de esporos inviáveis, sugerindo que estas são concentrações limitantes deste nutriente para o desenvolvimento dos esporos da espécie em questão. Segundo Barufi et al. (2011), concentrações de NO_3^- favorecem o aumento de conteúdo de MAA, aumentando a atividade antioxidante, eliminando as ERO decorrentes da fotoinibição causada por estressores, porém altas concentrações de NO_3^- levam a saturação da produção de moléculas fotoprotetoras, corroborando a saturação observada em nosso estudo.

Vivemos em um planeta coberto por grandes extensões de águas, doces e salgadas, o que favorece a produção em grande escala de algas, seres aquáticos que necessitam de água, luz e nutrientes para sobreviver (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). O gênero *Pyropia* é famoso por ser utilizado no sushi e gerar bilhões de dólares por ano, portanto conhecer como agilizar o desenvolvimento dos seus esporos pode ampliar a obtenção de renda obtida com esta alga. Ao mesmo tempo que buscamos maior produção, sofremos com a poluição dos oceanos, influenciando diretamente o ciclo de vida desses organismos. As alterações climáticas, naturais e antrópicas, são um fenômeno global que pode ser considerado uma ameaça a ecossistemas. De acordo com os últimos relatórios do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), a concentração dos gases de efeito estufa na atmosfera é a mais alta desde os últimos 800 mil anos, e se nenhuma providência for tomada, a temperatura média global deve aumentar 5 °C, os níveis dos

oceanos devem aumentar 0,7 metros até 2100 (IPCC, 2013) e, como consequência, terão altos índices de RUV. Aliado a isto, a poluição dos oceanos vem crescendo, afetando ainda mais este rico ecossistema. Portanto, compreender as respostas que os carpósporos apresentam frente às alterações em concentrações de NO_3^- e elevadas doses de RUV, nos leva a entender o que poderá ocorrer com esta alga no ambiente. Assim como, a compreensão destas respostas pode favorecer o cultivo desta alga.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que diferentes concentrações de NO_3^- não influenciam no desenvolvimento, na morfologia, na viabilidade e ultraestrutura dos esporos, como também não interferiram na morfologia e autofluorescência dos cloroplastos nos primeiros dois dias de desenvolvimento. Mas a ausência deste nutriente atrasa o desenvolvimento do carpósporo, diminuindo a autofluorescência do cloroplasto, e um retardo na formação da parede celular e do pirenóide. Porém, com um período de sete dias, quanto maior a concentração do nutriente, maior o tamanho do tubo germinativo, indicando um auxílio no desenvolvimento dos carpósporos de *P. acanthophora*. Além disso, a RUV impediu a formação de tubo germinativo, afetando a organização dos componentes ácidos e neutros da célula, resultando no bloqueio do seu desenvolvimento mesmo após a eliminação do agente estressor. Assim, concluiu-se que a RUV é um fator limitante para o desenvolvimento de carpósporos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, enquanto o NO_3^- influencia, mas não limita, este desenvolvimento, como não contribuiu para mitigar os efeitos da RUV. Estes efeitos tornaram-se evidentes após pouco tempo de desenvolvimento.

CAPÍTULO III

EFEITOS DE FATORES ABIÓTICOS NAS RESPOSTAS OXIDATIVAS E NA PRODUÇÃO DE MONÓSPOROS NA MACROALGA VERMELHA *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*

Resumo

Conhecida pela grande importância econômica, *Pyropia* é o gênero de alga mais domesticado no mundo. Este gênero é caracterizado pela alternância de gerações entre gametófitos (n) macroscópicos, os quais são utilizados para o consumo alimentício, e esporófitos (2n) microscópicos. Esta alga é encontrada na zona de supra litoral e com tolerância ao estresse ambiental, como alta luminosidade, estresse osmótico e dessecação, porém estes fatores podem estar alterados e causar um grande estresse celular, afetando vias metabólicas, induzindo a liberação de monósporos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar quais alterações de fatores abióticos, isoladamente, são os mais estressores para a alga, e se estes estresses são capazes de fazer com que a alga *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll libere monósporos. Para tanto, porções saudáveis e não férteis de *P. acanthophora* foram selecionadas e cultivadas em aquários com água do mar esterilizada nos seguintes tratamentos: salinidade (15, 35 e 55 ups), temperatura (15, 25 e 30 °C), fotoperíodo (16:8, 12:12 e 8:16 h), dessecação (24 h seco e 24 h molhado, 48 h seco e 24 h molhado, e sem dessecação), von Stoch (0, 50 e 100 %), e radiação (PAR, PAR+RUVA+RUVB [PAB] e PAR+RUVB) durante 14 dias. Após o tempo experimental foram observados em microscopia de luz a morfologia dos talos, o tipo de esporo liberado, a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) através do DCFH-DA, e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POX). O tratamento com radiação ultravioleta (RUV) foi que causou o maior dano ao talo, apresentando um maior estresse oxidativo. Os talos expostos à RUV e 30 °C foram os mais alterados ficando amolecidos e fragmentados. Em relação à atividade das enzimas antioxidativas, não houve alteração em relação ao controle, porém a maior quantidade de ERO foi verificada nos talos expostos à RUV. Justamente nestes únicos tratamentos (PAB e PAR+RUVB) que se encontrou a liberação de monósporos, indicando que quanto maior o estresse oxidativo,

maior o desequilíbrio metabólico e como forma de sobrevivência rápida da espécie ocorre a reprodução assexuada.

Palavras-chave: estresse oxidativo; radiação ultravioleta; salinidade; temperatura

Abstract

Known for its great economic importance, *Pyropia* is the most domesticated genus of alga in the world. This genus is characterized by the alternation of generations between macroscopic gametophytes (n), which are used for food consumption, and microscopic sporophytes (2n). This algae is found in the supra-littoral zone and is tolerant to environmental stress, such as high luminosity, osmotic stress and desiccation, but these factors may be altered and cause a cellular stress, affecting metabolic pathways, inducing the release of monospores. Therefore, the objective of this work is to assess which changes in abiotic factors are the most stressors to the algae, and whether these stresses are capable of causing the algae *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll release archeospores. For this purpose, healthy and non-fertile portions of *P. acanthophora* were selected and cultured in aquaria with sterilized seawater in the following treatments: salinity (15, 35 and 55 psu), temperature (15, 25 and 30 °C), photoperiod (16:8, 12:12 and 8:16), desiccation (24 hours dry and 24 hours wet, 48 hours dry and 24 hours wet, and without desiccation), von Stoch (0, 50 and 100%), and radiation (PAR, PAR+UVRA+UVRB [PAB] and PAR+UVRB) for 14 days. After the experimental time, the morphology of the thalli, the type of spore released were observed under light microscopy, the detection of reactive oxygen species (ROS) through DCFH-DA, and quantification of the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (POX). The treatment with ultravioleta radiation (UVR) is that it caused the greater damage to the thalli, presenting a higher oxidative stress. The thalli exposed to the UVR and 30 °C were the most affected and became soft and fragmented. In relation to the activity of the antioxidative enzymes, there was no change in relation to the control, however, the higher amount of ROS was verified in the thalli exposed to the UVR. It is precisely in these unique treatments (PAB and PAR+UVRB) that we find the release of archeospores, indicating that the higher the oxidative stress, the higher the metabolic imbalance and as a way of rapid survival of the species asexual reproduction occurs.

Keywords: oxidative stress; salinity; temperature; ultraviolet radiation

1. INTRODUÇÃO

Pyropia é um gênero de macroalga vermelha pertencente à ordem Bangiales (BLOUIN et al., 2011), com grande importância econômica, girando bilhões de dólares todo ano por conta da produção do sushi. Esta alga é encontrada na zona de supra litoral e com tolerância ao estresse ambiental, como alta luminosidade, estresse osmótico e dessecação (CHAN et al., 2012). Este gênero é caracterizado pela alternância de gerações entre gametófitos (n) macroscópicos, os quais são utilizados para o consumo alimentício, e esporófitos (2n) microscópicos (BLOUIN et al., 2011). Cada geração libera um tipo de esporo diferente, onde gametófitos liberam carpósporos, os quais formarão a fase 2n, enquanto os esporófitos liberam conchósporos, que formarão a fase n (BLOUIN et al., 2011; PEREIRA et al., 2019c). Dependendo das condições, geralmente estresse, as duas fases também podem liberar monósporos, anteriormente conhecidos por monósporos, esporos que regeneram a sua própria fase (BLOUIN et al., 2011).

As algas, por serem sésseis, sofrem com as alterações dos vários fatores abióticos presentes no seu ecossistema, como por exemplo alterações na salinidade, temperatura, fotoperíodo nutrientes, dessecação e radiação ultravioleta (RUV). Estas alterações podem causar um grande estresse celular e afetar vias metabólicas (MALLICK; MOHN, 2000; KALBINA; STRID 2006), como a liberação de monósporos, como visto por Takahashi e Mikami, (2017) onde o estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) causa a liberação de monósporos (monósporos da fase foliácea). Porém, quais outros estressores geram esta produção de monósporos não estão descritos na literatura.

Os organismos aeróbicos apresentam vantagens energéticas usando oxigênio (O_2) como oxidante terminal na respiração, pois é desta forma que se geram moléculas de adenosina trifosfato (ATP), complexo orgânico que fornece energia celular. Embora o O_2 seja uma molécula totalmente inofensiva, ele tem o potencial de ser parcialmente reduzido e formar espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o H_2O_2 , que são tóxicos para o metabolismo celular. Nos vegetais, as ERO são constantemente formadas pelo inevitável vazamento de elétrons para o O_2 das atividades de transporte de elétrons dos cloroplastos, mitocôndrias e membrana plasmática (MALLICK; MOHN, 2000), por outro lado a formação das ERO pode aumentar significativamente com o estresse que a célula está passando.

Para resolver a existência e os problemas causados pelas ERO, a célula possui enzimas antioxidantes que sequestram estas moléculas e as transformam em moléculas

inofensivas (VALKO et al., 2007; MAIA et al., 2012; BATISTA et al., 2015). As principais enzimas antioxidantes encontradas em algas são: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POX). A SOD sequestra O_2^- transformando em $O_2 + H_2O_2$ (GIANNOPOLITIS; RIES 1977); enquanto a CAT e POX são capazes de transformar H_2O_2 em $H_2O + O_2$ (HAMMERSCHMIDT et al., 1982; AEBI, 1984).

Sabe-se que alterações em fatores abióticos causam grande desregulação celular, gerando estresse oxidativo através das ERO. Discute-se também que estresse celular favorece a liberação de monósporos na alga *P. acanthophora* var. *brasiliensis* E.C. Oliveira & Coll, assim como observado em *Pyropia yezoensis* esposta à H_2O_2 (TAKAHASHI; MIKAMI, 2017). Porém, não existem informações na literatura sobre quais outros fatores abióticos são os mais estressores para a alga em questão, e se eles são capazes de liberar monósporos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi responder a seguinte pergunta: quais alterações de fatores abióticos geram maior quantidade de ERO e influenciam na atividade das enzimas antioxidantes da macroalga *P. acanthophora* var. *brasiliensis*? Estes estresses são capazes de fazer com que a alga libere monósporos?

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ponto de Coleta

Localizada no canal da Ilha de Santa Catarina com o Continente, a Praia de Sambaqui possui águas calmas. Encontra-se no norte de Florianópolis, nas coordenadas: 27°29'S e 48°32'O. A praia possui 14,17 hectares e um volume de água de 425.100 m³, apresentando uma circulação intermediária, com vento norte predominante, sedimento areno-lodoso e uma profundidade de 2,5 a 3,5 metros (NUNES, 2010). A salinidade varia pouco, com uma média de 33,8 ± 0,8 psu (SANTOS, 2009). A temperatura da água do mar possui uma média mínima de 16,8 ± 0,8 °C e máxima de 25,4 ± 1,1 °C (SANTOS, 2009), e a concentração de nitrato (NO₃⁻) é de 3,73 ± 0,01 μM (PEREIRA et al., 2019a).

2.2 Coleta e Processamento do Material Biológico

Os gametófitos de *P. acanthophora* var. *brasiliensis* foram coletados na porção mais alta da zona intertidal do costão rochoso da Praia de Sambaqui, Florianópolis-SC, Brasil, nos meses de agosto e setembro de 2017. Os talos das algas foram transportados até o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), em recipientes plásticos contendo água do mar. No laboratório, os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada, e triados para remoção dos contaminantes.

2.3 Condições de Cultivo

As porções saudáveis e não férteis de *P. acanthophora* (4,0 g) foram selecionadas através de microscopia de luz com aumento de 100 vezes, e cultivadas em aquários com capacidade para 8 L de água do mar esterilizada (n = 3 aquários por tratamento) nos seguintes tratamentos: salinidade (15, 35 e 55 ups) (HAYASHI et al., 2011), temperatura (15, 25 e 30 °C) (PEREIRA et al., 2006; SHI et al., 2017), fotoperíodo (16:8, 12:12 e 8:16 h) (PEREIRA et al., 2006; SHI et al., 2017), dessecação (24 h seco e 24 h molhado, 48 h seco e 24 h molhado, e sem dessecação) (ZOU; GAO, 2002), von Stoch (0, 50 e 100 %), e radiação (PAR, PAR+RUVA+RUVB [PAB] e PAR+RUVB) (PEREIRA et al., 2019b). Os experimentos tiveram duração de 14 dias em condições controladas.

Havia uma rede de *nylon* presa em cima do aquário, onde a alga era colocada (com esta rede a alga recebia respingos de água, simulando o que ocorre no ambiente), e 10 lâminas de vidro dispostas no fundo do aquário para a coleta dos esporos liberados. As

condições gerais da sala de cultura foram: temperatura do ar de 25 ± 2 °C, aeração constante, irradiância de 80 ± 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 quinto e nono dias de tratamento, 50 % das águas foram renovadas. Ao final do experimento, todas as lâminas foram observadas em microscópio de luz para a análise do tipo de esporo liberado.

Para o tratamento com salinidades (15, 35 e 55 ups), baixas salinidades foram obtidas com a adição de água destilada, enquanto altas salinidades foram obtidas através do congelamento e descongelamento gradual da água do mar até a concentração final ser alcançada (HAYASHI et al., 2011). Para o tratamento com temperatura (15, 25 e 30 °C) e fotoperíodo (16:8, 12:12 e 8:16), câmaras de BOD foram utilizadas.

Para o tratamento com dessecação (24 h seco e 24 h molhado, 48 h seco e 24 h molhado, e sem dessecação), as algas eram retiradas dos aquários manualmente e colocadas em um papel absorvente do lado do seu aquário, mantendo todas as condições abióticas. Após os períodos molhados e secos as algas eram pesadas. As taxas de dessecação foram apresentadas em porcentagem de perda de água (PA), sendo calculadas segundo a fórmula de Zou e Gao, (2002): $PA, \% = (Mm-Md)/(Mm-Ms)*100$; onde perda de água é PA; massa molhada (Mm) em gramas, ou seja, alga totalmente hidratada; massa dessecada (Md) em gramas, alga após o período de secagem; e massa seca (Ms). As análises foram realizadas com $n = 3$ (aquários). A taxa de dessecação, tanto nos talos secos por 24 h e por 48 h foi muito semelhante, em torno de 88 a 86 %, sem diferenças estatísticas (Tab. 8). O mesmo nota-se em relação aos dias de experimento, onde não foi observada diferença estatística entre os primeiros e últimos dias de pesagem.

Tabela 8. Taxa de dessecação em % de perda de água nos talos de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 24 h secos e 24 h molhados, e 48 h secos e 24 h molhados. Valores apresentados com média (n = 3, média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey (p ≤ 0,05).

	24 h seco e 24 h molhado	48 h seco e 24 h molhado
1ª pesagem	88,76±1,36 ^a	88,97±1,55 ^a
2ª pesagem	86,05±1,31 ^a	88,01±0,24 ^a
3ª pesagem	86,25±1,39 ^a	86,05±1,31 ^a
4ª pesagem	85,89±0,15 ^a	86,44±0,62 ^a
5ª pesagem	84,48±0,47 ^a	-
6ª pesagem	84,09±0,17 ^a	-
7ª pesagem	82,74±4,82 ^a	-

Para o experimento com von Stoch (0, 50 e 100 %), a quantidade de nutrientes adicionados foi alterada, seguindo o meio de cultivo composto por NaNO₃, MnCl₂, EDTA, NaHPO₄, FeSO₄, biotina, cianocobalina e tiamina (EDWARDS, 1970). E para o experimento com radiação (PAR, PAB e PAR+RUVB), as RUVA e RUVB artificiais foram fornecidas pela lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée - France, que emite picos nos comprimentos de onda de 312 nm (RUVB) e de 365 nm (RUVA). A dose diária foi de 5,05 J.cm⁻² para RUVA e de 0,095J.cm⁻² para RUVB (Light Radiometer Model PMA 2100, usando PMA 2107B-UW underwater UV sensor (UVA+UVB) e PMA 2102 (UVB) (Solar Light, USA)). 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.

O controle foi considerado: 35 ups, 25 °C, fotoperíodo 12:12, sem dessecação, von Stoch 100 % e PAR.

Parte das amostras frescas foram utilizadas para análises morfológicas e citológicas, e parte armazenadas em nitrogênio líquido para extração das enzimas antioxidantes.

2.4 Observação de Monósporos

Após os 14 dias de experimento, as lâminas (n = 10 lâminas por tratamento) dispostas no fundo dos aquários foram observadas em microscópio epifluorescente (Leica DM500, Suíça) equipado com sistema de captura de imagens OPTHD 3.7 Software (Estados Unidos da América) do LABCEV com objetivo de analisar o tipo de esporo liberado por cada tratamento.

2.5 Detecção de ERO *in vivo* usando DCFH-DA

Após 14 dias de experimento, as amostras frescas foram cortadas em quadrados de 1 cm, colocadas em microplaca de 24 poços e lidas por espectrofotometria de fluorescência (excitação em 488 nm e emissão em 525 nm) em multileitora SpectraMax Paradigm Molecular Devices do Laboratório Multiusuário em Estudos de Biologia (LAMEB), sendo esta medida considerada o branco, para desconsiderar a autofluorescência de metabólitos da alga. Após a leitura, as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro, com 1,0 mL por poço da molécula não fluorescente DCFH-DA 50 μ M (2',7'-diclorodiidro fluoresceína diacetato) (HE; HADER 2002a). Quando esta molécula entra em contato com ERO, ocorre uma clivagem e oxidação, gerando a molécula fluorescente DCF (2'-7'-diclorofluoresceína fluorescente). O composto gerado (DCF) fica retido no ambiente intracelular e emite fluorescência verde, a qual pode ser mensurada. A quantidade de fluorescência de DCF foi determinada por espectrofotometria de fluorescência, uma vez que este é proporcional à quantidade de ERO intracelular. Para tanto, utilizou-se a multileitora SpectraMax com excitação em 488 nm e emissão em 525 nm. As análises foram realizadas com n = 3 (fragmentos de alga provenientes de aquários diferentes) e a quantificação de ERO foi calculada em porcentagem, considerando o controle como 100 %, de acordo com Saison et al. (2010).

O material incubado com DCFH-DA também foi colocado entre lâmina e lamínula e observado em microscópio confocal (Leica TCS SP-5; Wetzlar, Germany) no LCME. A fluorescência do DCF foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida em 525 nm (verde), enquanto a autofluorescência do cloroplasto foi excitada no comprimento de onda de 488 nm e emitida de 600 a 750 nm (vermelho). O programa LAS-AF Lite (Leica) foi utilizado para o processamento final das imagens. Foram feitas triplicatas para cada grupo experimental, e duas delas foram examinadas. Semelhanças baseadas na comparação entre as réplicas sugeriram que as análises foram confiáveis.

2.6 Enzimas Antioxidantes

As proteínas solúveis totais foram extraídas de acordo com o método de Choo et al. (2004) e Barros et al. (2006), a partir de amostras congeladas de 0,150 g de massa fresca (n = 3 fragmentos de alga provenientes de aquários diferentes) utilizando um tampão de extração (tampão de fosfato 50 mM, pH 7, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, PVP a 1 %, Triton X-100) na proporção de 0,150 g de massa fresca para 0,300 mL de tampão. A solução foi misturada com ULTRA-TURRAX® e centrifugada a 2000 x g, por 10 min a 4 °C.

2.6.1 Precipitação e Quantificação de Proteínas

Após a centrifugação das amostras (descrito acima), foram retirados 200 µL do sobrenadante e armazenado em um *ependorf*. A este sobrenadante foi acrescentado 1 mL de álcool isoamílico gelado (-20 °C) e mantido em -20 °C por 15 min. Após, a amostra foi centrifugada a 2000 x g, por 15 min a 0 °C. Retirou-se todo o sobrenadante e no *pellet* formado foram adicionados 100 µL de solução salina (NaCl a 3 %) a 4 °C. Em uma microplaca foram adicionados 10 µL da precipitação de proteínas e 290 µL de Bradford. Após 15 min de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax) do LAMEB a 595 nm (BRADFORD, 1976).

2.6.2 Catalase (CAT)

Em uma microplaca Greiner UV-Star® foram adicionados 20 µL de extrato de proteínas precipitadas e 280 µL de tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e H₂O₂). O tampão de reação foi preparado para ter uma absorbância entre 0,38 e 0,40 a 240 nm. A atividade de catalase foi medida em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax) do LAMEB a 240 nm durante 10 min a 20 °C, com leitura a cada 30 s (AEBI, 1984).

2.6.3 Superóxido Dismutase (SOD)

Em uma microplaca foram adicionados 20 µL de extrato de proteínas precipitadas e 280 µL de tampão de trabalho (tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8). Para cada 120 mL de solução de trabalho, foram adicionados: 0,2328 g de L-metionina, 0,0072 NBT (azul de tetrazólio), 10 mg de EDTA em 500 mL de água destilada (apenas 228 µL colocados na solução de trabalho), 10 mg de riboflavina em 500 mL de água destilada

(apenas 4,48 mL colocados na solução de trabalho protegida da luz). Após a amostra e tampão de trabalho plaqueados, uma placa foi exposta à luz e uma placa idêntica foi exposta à escuridão por 10 min. Ambas as placas foram prontamente lidas em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax) do LAMEB a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

2.6.4 Guaiacol Peroxidase (POX)

Em uma microplaca foram adicionados 20 µL de extrato de proteínas precipitadas e 280 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0, contendo 24 µL de guaiacol e 29 µL de H₂O₂ em tampão fosfato). A mistura foi incubada a 30 °C e lida em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax) do LAMEB a 470 nm durante 2 min, com leituras a cada 30 s (HAMMERSCHMIDT et al., 1982).

2.7 Análises Estatísticas

Os dados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e todas as amostras estavam dentro do intervalo normal. Posteriormente, os dados foram submetidos à Análise de Variância Unifatorial (ANOVA), sendo o fator independente o tratamento, seguido 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 10.0).

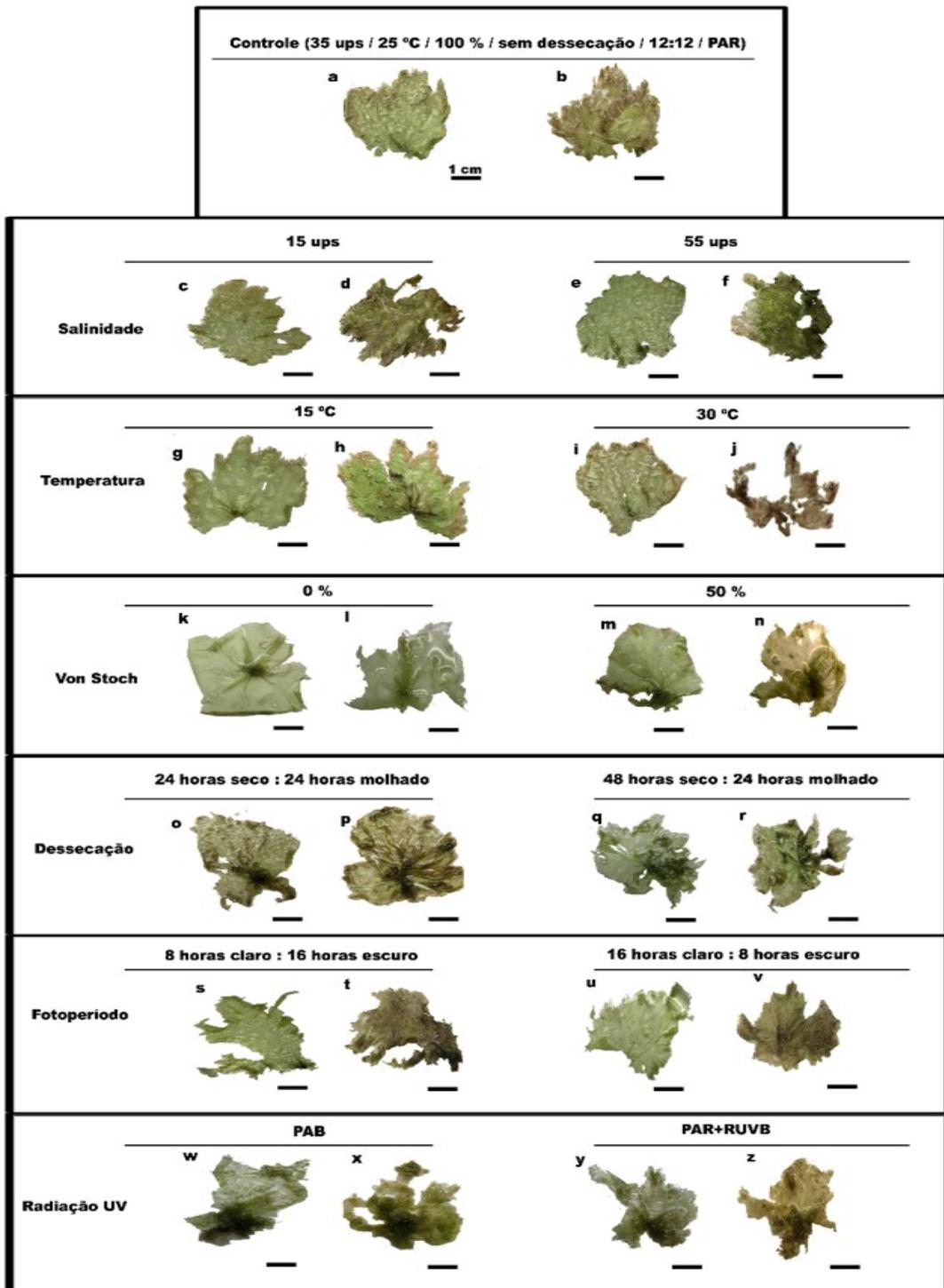
3. RESULTADOS

3.1 Morfologia Externa

O talo inicial presente em todos os tratamentos (Fig. 23a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, u, w, y) era formado somente por células vegetativas, com coloração típica da espécie, verde amarronzada, sem porções férteis, e talo com textura firme.

Após o período experimental de 14 dias, o controle (Fig. 23b) apresentou bordas avermelhadas indicando a presença de células reprodutivas e manteve a mesma textura firme inicial. Estes resultados também foram observados nos tratamentos 15 ups (Fig. 23d), 15 °C (Fig. 23h), von Stoch 50 % (Fig. 23n) e nos experimentos com dessecação (Fig. 23p, r). Por outro lado, as amostras expostas a 55 ups (Fig. 23f), von Stoch 0 % (Fig. 23l), e fotoperíodos (Fig. 23t, v) não apresentaram alterações entre o talo inicial e após os 14 dias de experimento. Já os talos da temperatura 30 °C (Fig. 23j) e das RUV (Fig. 23x, z) apresentaram fragmentação e alteração em sua textura, ficando amolecidos e delgados, confirmando uma degradação.

Figura 23. Morfologia externa de talos de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* no início do experimento (a, c, e, g, i, k, m, o, q, s, u, w, y) e após 14 dias de exposição aos tratamentos (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t, v, x, z) (n = 3, média ± DP). Detalhe para a presença de bordas avermelhadas, indicando a presença de células reprodutivas, no controle (b), 15 ups (d), 15 °C (h), von Stoch 50 % (n) e nos experimentos com dessecação (p, r). Amostras expostas a 55 ups (f), von Stoch 0 % (l), e fotoperíodos (t, v) não apresentaram alterações entre o talo inicial e após os 14 dias de experimento. Enquanto amostras expostas a 30 °C (j) e das RUV (x, z) apresentaram fragmentação e alteração em sua textura do talo.



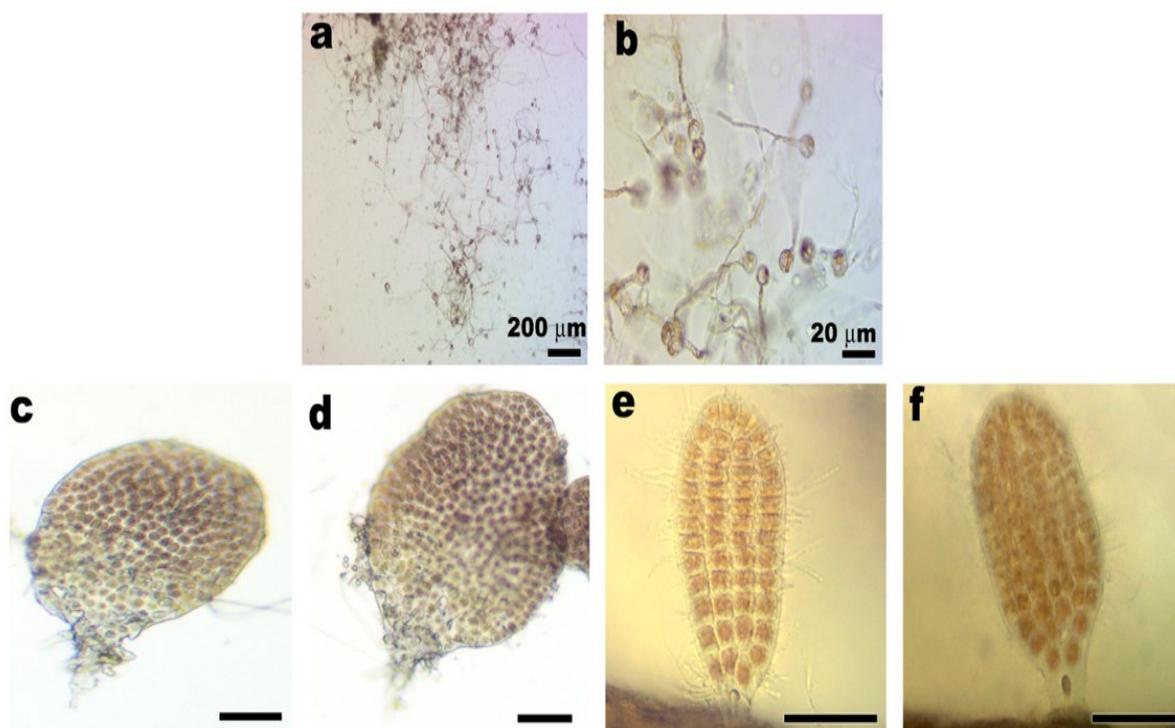
3.2 Presença de Monósporos Observados sob Microscopia de Luz (ML)

A presença de monósporos, após o período experimental de 14 dias, somente foi observada nos tratamentos com RUV (Tab. 9) (Fig. 24), e em praticamente todas as lâminas.

Tabela 9. Ausência ou presença de carpósporos e de monósporos de acordo com os tratamentos com diferentes fatores abióticos. E proporção de aquários que apresentavam os esporos.

Tratamentos	Carpósporos	Monósporos
Salinidade (15 e 55 ups)	Presença (3/3)	Ausência (0/3)
Temperatura (15 e 30 °C)	Presença (3/3)	Ausência (0/3)
Von Stoch (0 e 50 %)	Presença (3/3)	Ausência (0/3)
Dessecação (24 e 48 h)	Presença (3/3)	Ausência (0/3)
Fotoperíodo (16:8 e 8:16)	Presença (3/3)	Ausência (0/3)
Radiação UV (PAB e PAR+RUVB)	Presença (3/3)	Presença (3/3)

Figura 24. Esporos da macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* liberados após 14 dias de tratamentos. **a,b.** Carpósporos liberados em todos os tratamentos. **c-f.** Monósporos liberados quando expostos por 14 dias à PAB e PAR+RUVB (barras de escala = 20 µm).



3.3 Detecção de ERO *in vivo* usando DCFH-DA

Quando incubadas com DCFH-DA, para detecção de % de ERO (Fig. 25), as amostras tratadas com PAR+RUVB foram as que mais apresentaram presença de ERO, 557,45 %, seguida do tratamento PAB, com 339 % a mais que o controle. Os talos tratados com 30 °C e com fotoperíodo 16:8 (escuro) apresentaram um aumento de 91,25 e 172,17 % de ERO em relação ao controle, respectivamente. Todos os outros tratamentos não apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle.

Na microscopia confocal é possível observar a presença de ERO, através da intensidade de fluorescência de DCF (verde), em todos os tratamentos (Fig. 26), porém em maior quantidade de fluorescência nas amostras expostas à RUV (Fig. 26l, m), seguido da amostra exposta à dessecação por 48 h (Fig. 26i). Nestes três tratamentos observou-se uma fluorescência do DCF em todas as células do talo, diferentemente do restante dos tratamentos onde não se observa esta uniformidade.

Figura 25. Detecção de ERO *in vivo* utilizando DCFH-DA em *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média ± DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

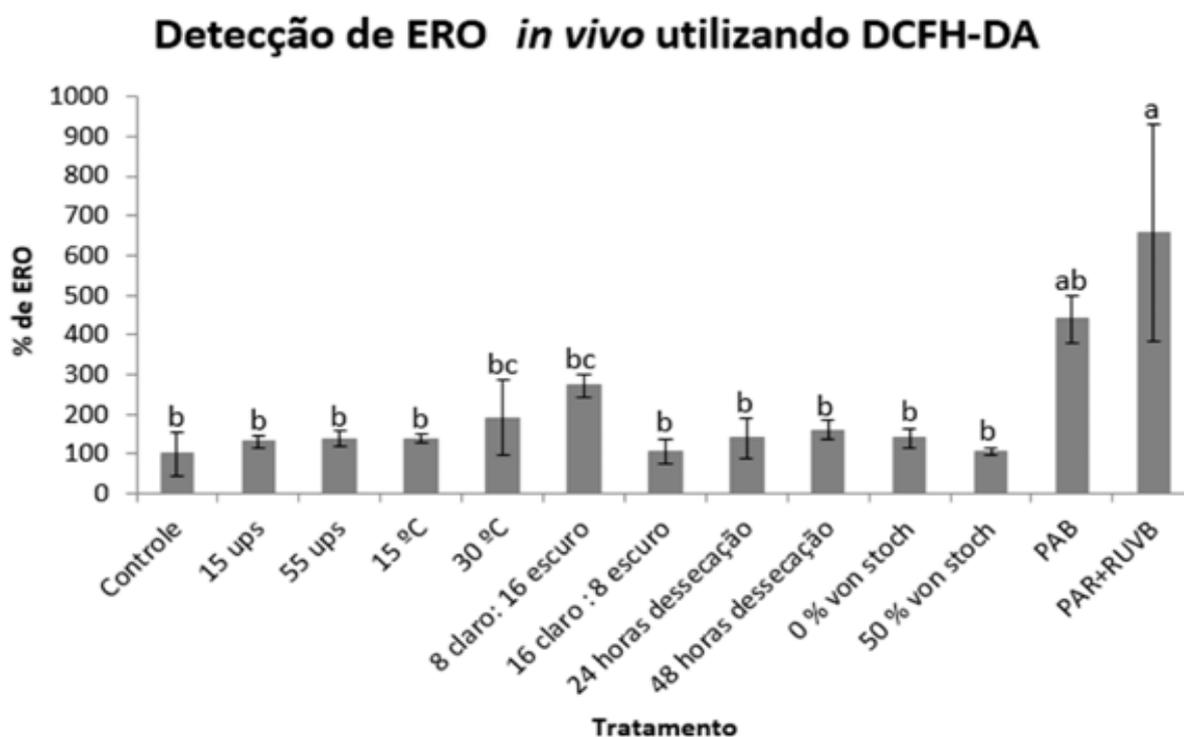
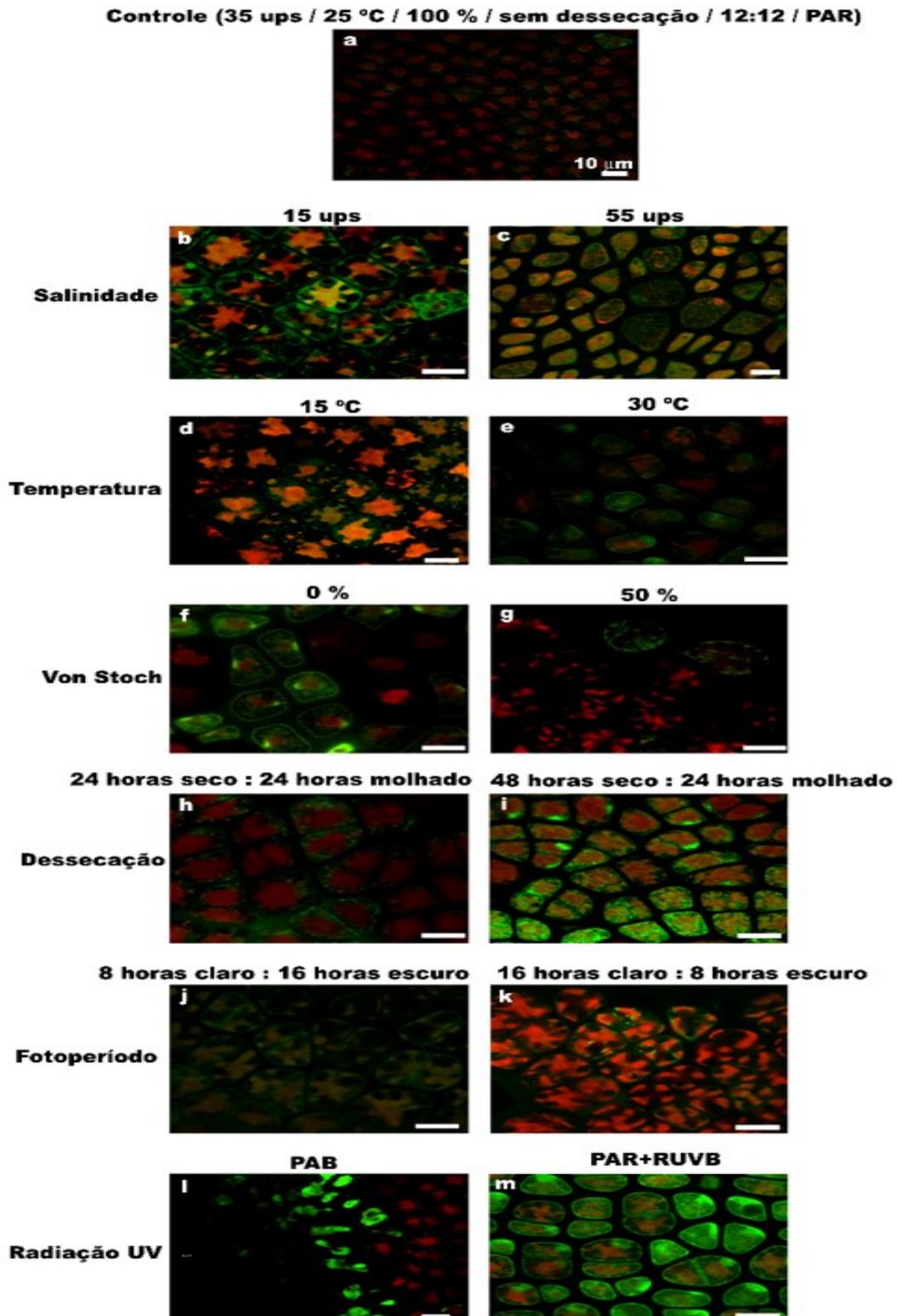


Figura 26. Microscopia confocal utilizando DCFH-DA em *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média ± DP). Em verde a fluorescência do DCF e em vermelho a autofluorescência do cloroplasto. Nota-se maior presença de fluorescência verde nos tratamentos com RUV e exposição a dessecação por 48 h.



3.4 Enzimas Antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT (U/mL/ μ g de proteína)), superóxido dismutase (SOD (U/ μ g de proteína)), e guaiacol peroxidase (POX (U/mL/ μ g de proteína)) são apresentadas na tabela 10. Para a CAT, a maior atividade foi verificada no controle, seguida do tratamento de fotoperíodo 16:8 enquanto as menores atividades foram verificadas nas amostras com 48 h de dessecação, von Stoch 0 % e 50 %, e exposto à PAR+RUVB. Para a SOD, a maior atividade foi encontrada no tratamento com 48 h de dessecação, seguida do von Stoch 50 %, enquanto o controle e o fotoperíodo 16:8 tiveram as menores atividades desta enzima. A POX mostrou-se com maior atividade nas amostras tratadas com 48 h de dessecação e exposto á PAR+RUVB, e as menores atividades em 30 °C, fotoperíodos, von Stoch 0 % e PAB.

Tabela 10. Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT (U/mL/ μ g de proteína)), superóxido dismutase (SOD (U/ μ g de proteína)), e guaiacol peroxidase (POX (U/mL/ μ g de proteína)) de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* após 14 dias de exposição aos tratamentos (n = 3, média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com a análise de variância multifatorial e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	CAT	SOD	POX
Controle (35 ups / 25 °C / 100 % / sem dessecação /			0,00042 \pm 0,00023 ^{bc}
12:12 / PAR)	8,78 \pm 1,03 ^a	0,42 \pm 0,02 ^g	
15 ups	2,83 \pm 0,93 ^c	1,50 \pm 0,04 ^{ef}	0,00020 \pm 0,000067 ^{bc}
55 ups	1,07 \pm 0,47 ^{de}	2,03 \pm 0,12 ^{de}	0,00029 \pm 0,00018 ^{bc}
15 °C	2,37 \pm 0,56 ^{cd}	1,28 \pm 0,06 ^{efg}	0,00055 \pm 0,00026 ^{bc}
30 °C	1,17 \pm 0,22 ^{de}	2,54 \pm 0,16 ^d	0,000032 \pm 0,000010 ^c
8 h claro: : 16 h escuro	1,44 \pm 0,31 ^{cde}	2,43 \pm 0,01 ^d	0,0000034 \pm 0,0000007 ^c
16 horas claro: 8 horas escuro	5,89 \pm 1,40 ^b	0,63 \pm 0,01 ^{fg}	0,0000156 \pm 0,0000034 ^c
24 horas seco : 24 horas molhado	1,22 \pm 0,29 ^{de}	3,99 \pm 0,29 ^c	0,0007718 \pm 0,0001824 ^{ab}
48 horas seco : 24 horas molhado	0,41 \pm 0,10 ^e	11,93 \pm 1,35 ^a	0,0013973 \pm 0,0006209 ^a
0 % von Stoch	0,41 \pm 0,13 ^e	1,40 \pm 0,02 ^{ef}	0,0000053 \pm 0,0000053 ^c
50 % von Stoch	0,43 \pm 0,09 ^e	5,75 \pm 0,25 ^b	*
PAB	0,96 \pm 0,08 ^{de}	2,65 \pm 0,11 ^d	0,0000055 \pm 0,0000023 ^c
PAR+RUVB	0,79 \pm 0,08 ^e	2,94 \pm 0,52 ^d	0,0006948 \pm 0,0001908 ^b

4. DISCUSSÃO

Pyropia é um gênero de macroalga com ciclo de vida bifásico, com fase gametofítica (macroscópica) e fase esporofítica (microscópica). Até agora, sabe-se que a temperatura e fotoperíodo são os fatores abióticos que regulam o ciclo de vida normal da alga. Normalmente, temperaturas mais baixas (5 a 20 °C) são as ideais para o gametófito de *Pyropia* sp. se diferenciar em estruturas femininas (carpogônios) e masculinas (espermatângios), a fim de ocorrer a fecundação e formação de carpósporos (IWASAKI 1961; CHEN et al., 1970; BIRD et al., 1972, AVILA et al., 1986); e um fotoperíodo de 8:16 também favorece essa maturação (CHEN et al., 1970). Esta diferenciação sexual ocorre nas bordas do talo, transformando-se de um talo marrom esverdeado para um talo avermelhado (BLOUIN et al., 2011). Já a fase conchocelis tem um bom crescimento e desenvolvimento com fotoperíodo 12:12 e temperatura de 15 °C (AVILA et al., 1985), sendo que temperaturas um pouco mais baixas (3 a 10 °C) e mais horas de escuro (8:16) são ideais para a formação e liberação dos conchósporos (IWASAKI 1961; BIRD et al., 1972; AVILA et al., 1985; NOTOYA et al., 1993). Os conchósporos germinam e desenvolvem-se em fase foliácea de 5 a 15 °C com fotoperíodo 12:12 ou 16:8 (IWASAKI 1961; BIRD et al., 1972, AVILA et al., 1985). Além da temperatura, o fotoperíodo também contribui para este ciclo de vida, por estes motivos que cada fase da espécie ocorre em estações bem definidas (CHEN et al., 1970). Salinidade e dessecação são fatores abióticos que não possuem tanto efeito sobre a *Pyropia*, visto que no habitat natural esta alga fica totalmente exposta ao ar durante a maré baixa, secando com a luz solar e acumulando sal da água do mar sob seus talos, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Alterações em fatores abióticos podem gerar estresse oxidativo e alterar as rotas metabólicas da alga (BIANCHINI; CUNHA-SANTINO 2008; AMORIM 2018), e no caso da macroalga *Pyropia* pode alterar o ciclo de vida, levando a produção de monósporos, esporos que regeneram a própria fase (BLOUIN et al., 2011). A temperatura é um fator abiótico de grande influência no desenvolvimento de algas. Temperaturas médias de 25 a 30 °C foram as ideais para liberação e desenvolvimento de tetrásporos nas macroalgas vermelhas *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *Pterocladia heteroplatus* (Boergesen) Umamaheswara Rao & Kaliaperumal e *Geltiopsis variabilis* (Greville) Schmitz (RAO et al., 1983). Porém, para *Pyropia* temperaturas mais baixas, de 5 a 20 °C são as ótimas para o seu desenvolvimento (IWASAKI 1961; CHEN et al., 1970; BIRD et al., 1972, AVILA et al., 1985, NOTOYA et al., 1993). Temperaturas elevadas, como a de

30 °C utilizada, não são encontradas no ciclo de vida normal para este gênero de alga, fator esse que gerou também uma grande degradação do talo da alga.

Outro importante fator abiótico é a radiação ultravioleta (RUV), sabe-se que a RUVB causa uma queda na taxa de desenvolvimento de jovens esporos na alga parda *Fucus serratus* L. (ALTAMIRANO et al., 2003), assim como uma inibição e retardo na germinação de conchósporos de *Porphyra haitanensis* T.J.Chang & B.F.Zheng, enquanto a RUVA aumentou a divisão transversal das células em esporos recém liberados (JIANG 2007). A RUVB também causa baixas taxas de crescimento no talo de *P. acanthophora* (BOUZON et al., 2012).

Dentre os fatores abióticos testados, somente a RUV foi o fator que apresentou as maiores alterações e o único a ter liberação de monósporos. Diferentemente, Xu e colaboradores (2019), verificaram a liberação de monósporos em diferentes temperaturas (5, 10, 15 e 20 °C), dessecação (1, 2, 3 e 4 h) e irradiância (0, 20, 60, 100 e 210 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), porém seu tempo experimental foi de apenas 5 dias e a sua observação era de algumas gotas da água do cultivo em lâminas. Ao fazer nossos experimentos, percebemos que o talo de *Pyropia* demora alguns dias para sofrer diferenciação e liberar monósporos, e estes monósporos são muito semelhantes ou até mesmo idênticos aos carpósporos, esporos também liberados pelo talo e que darão origem a fase conchocelis, tendo que esperar alguns dias para o pleno desenvolvimento e classificação do esporo. Esta mesma semelhança entre carpósporos e monósporos também foi visualizada por Takahashi e Mikami, (2017), portanto não concordamos com os resultados descritos em Xu e colaboradores (2019). Além disso, em todos os nossos tratamentos, até mesmo naqueles com RUV encontramos muitos carpósporos, então sugerimos que os esporos facilmente encontrados por Xu e colaboradores possam ser carpósporos e não monósporos como citado.

Como dito, a RUVB tem efeitos negativos na fisiologia, bioquímica e morfologia das plantas, incluindo danos no DNA, proteínas e membranas; alterações nas organelas, tais como cloroplastos e mitocôndrias; mudanças na respiração, reprodução, anatomia e crescimento das plantas; e aumento da produção de ERO (PESCHECK et al., 2014; ZHAO; LIXIA, 2014; RAUTENBERGER et al., 2015). Esse aumento de ERO foi verificado com a análise do DCFH-DA, porém as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e POX) não foram as mais expressivas nas amostras expostas à RUV. Este resultado, nos leva a pensar que o estresse oxidativo gerado pela RUV, não afetou o aparato de enzimas

antioxidantes e, pode ter afetado outras vias metabólicas, como por exemplo a via dos compostos voláteis.

Os compostos voláteis são compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e algas e atuam principalmente na reprodução destes organismos (GARCIA-JIMENEZ; ROBAINA, 2017). Como principais compostos voláteis descritos em algas, temos o etileno e o ácido jasmônico. Sabe-se que o etileno favorece e incrementa o desenvolvimento de tetrasporângios em *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand (GARCIA-JIMENEZ; ROBAINA, 2017), assim como na diferenciação de carpogônios e espermatângios e consequentemente na formação de carpósporos em *Pyropia yezoensis* Ueda (UJI et al., 2016). O ácido jasmônico tem suas concentrações aumentadas durante o desenvolvimento de cistocarpos em *Grateloupia imbricata* Holmes (GARCIA-JIMENEZ; ROBAINA, 2017), indicando que também está ligado diretamente com o amadurecimento reprodutivo de algas.

Além de auxiliar na reprodução de algas, a presença de compostos voláteis também está ligada à tolerância ao estresse oxidativo. Portanto quanto maior a concentração destes compostos, menor o estresse oxidativo e, assim, desencadeia-se o ciclo de vida normal da alga (UJI et al., 2016). Sendo assim, quanto maior o estresse oxidativo sofrido pelas células, menor a concentração dos compostos voláteis e assim o ciclo de vida é alterado, podendo justificar a liberação de monósporos.

As enzimas antioxidantes (CAT, SOD e POX) tiveram maiores atividades nas amostras do controle, fotoperíodo 16:8 e dessecação por 48 h. Em todo metabolismo celular encontramos ERO, moléculas constantemente formadas pelo inevitável vazamento de elétrons das organelas que possuem cadeia transportadora de elétrons (MALLICK; MOHN, 2000), portanto até mesmo nas condições ideais encontramos estas moléculas tóxicas e o seu sequestro acontece para não causar danos à célula. Por estar num ambiente com condições ótimas e ter energia suficiente para produção de enzimas antioxidantes encontramos alta atividade da CAT na amostra controle. Por outro lado, fotoperíodo com muitas horas de luz e dessecação por longo período (48 horas) são condições que esta alga não está acostumada, podendo gerar um estresse significativo. Mesmo estando num ambiente estressante, a alga ainda tem energia suficiente para construção de enzimas antioxidantes, justificando altas atividades destas enzimas nestes tratamentos e baixas quantidades de ERO.

Por fim, podemos sugerir que a formação de elevadas quantidades de ERO leva à uma alteração no metabolismo celular, favorecendo a liberação de monósporos.

5. CONCLUSÃO

A RUV foi o fator abiótico que mais afetou a morfologia de *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis*, tornando os talos frágeis, os quais apresentaram uma grande quantidade de ERO alterando seu desenvolvimento normal, que além da liberação de carpósporos liberou também monósporos. Isto indica que quanto maior o estresse oxidativo, maior o desequilíbrio metabólico e como forma de sobrevivência rápida da espécie ocorre a reprodução assexuada regenerando a forma foliácea, tornando-se uma alternativa para a rápida produção do Nori.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ficorremediação é o processo, também conhecido como tratamento verde, onde usam-se algas para remover o excesso de nutrientes das águas, impedindo que ocorra uma grande poluição (Sharma & Khan, 2013). Sabe-se que algas podem realizar ficorremediação de NO_3^- , algumas delas são: *Chlorella vulgaris* Beijerinck e *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Breb (Kshirsagar, 2013), *Chondrus crispus* Stackh. e *Palmaria palmata* (L.) Kuntze (Corey et al. 2013), e até mesmo uma alga do mesmo gênero em questão, a *Pyropia yezoensis* (Ueda) M.S.Hwang & H.G.Choi (Yu et al., 2017). Ao falar em ficorremediação de NO_3^- lembramos principalmente da limpeza de esgotos e de fertilizantes presentes no mar, mas além disso, a ficorremediação pode estar associada diretamente com outro ser vivo, são os chamados consórcios entre algas e frutos do mar. No consórcio os animais liberam seus dejetos (principalmente nitrato, nitrito e amônia) que são usados como nutrientes pelas algas, e as algas liberam oxigênio para a respiração e desenvolvimento dos animais. Sabe-se que a macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva in P.C.Silva, Basson & Moe desenvolve-se muito bem com os efluentes presentes no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone (Pires, 2014). Pires (2014) analisou a qualidade do efluente do camarão e constatou a presença de $1,91 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_3^- (aproximadamente $31 \text{ }\mu\text{M}$ de NO_3^-), ao usar este efluente no cultivo de *K. alvarezii*, onde desenvolveu muito bem sem a necessidade de meio von Stoch. Como vimos neste trabalho, *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, tanto a fase foliácea como os esporos, conseguiram desenvolver-se muito bem em altas concentrações de NO_3^- , indicando que pode ser cultivada em ambientes com altos índices deste nutriente e, possivelmente, realizando ficorremediação em locais com despejo intenso desta molécula, ou em grandes fazendas de frutos do mar. Além disso, a presença deste nutriente deixa a alga mais “resistente” à RUV, favorecendo também a produção em baixas colunas d’água. Por outro lado, se o objetivo for a produção de metabólicos secundários, muito utilizados em indústrias farmacêuticas, a presença de NO_3^- e de RUV é indicada, visto que a RUV causa um estresse celular e a disponibilidade de nitrogênio vinda do NO_3^- livre na água é suficiente para a produção dos metabólicos secundários, sem a necessidade de degradar estruturas celulares a fim de disponibilizar nitrogênio para a produção destas moléculas com importância econômica.

Por outro lado, observamos que a RUV é o fator abiótico que causa mais estresse oxidativo às células da *P. acanthophora* var. *brasiliensis*, levando a uma produção e liberação de monósporos, o que poderia agilizar a produção em massa desta espécie, que apresenta alternância de geração heteromórfica, favorecendo a regeneração da fase foliácea tão comercializada mundialmente para a produção do sushi.

Por fim, a macroalga vermelha *P. acanthophora* var. *brasiliensis* é muito versátil e resistente a vários fatores abióticos. Sua produção é de grande importância mundial, e conhecendo as respostas celulares frente aos fatores estudados neste presente trabalho esta produção poderá se tornar mais conhecida e facilitada.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALTAMIRANO, M.; et al. Stage-dependent sensitivity to ultraviolet radiation in zygotes of the brown alga *Fucus serratus*. *Zygote*, v. 11, p. 101–106, 2003.
- AMAN, R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolate spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 9512–9518, 2005.
- AMORIM, A. M. P. B. Estudo de antioxidantes, potencial bioativo e composição química de *Chnoospora mínima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) e *Codium isthmocladum* (Chlorophyta). Dissertação da Universidade de São Paulo, 2018.
- AMSLER, C. D., FAIRHEAD, V. A. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv. Bot. Res.*, v. 43, p. 1–91, 2006.
- APPLE, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species, metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Bio.*, v. 55, p. 373–399, 2004.
- AVILA, M.; SANTELICES, B.; MCLACHLAN, J. Photoperiod and temperature regulation of the life history of *Porphyra columbina* (Rhodophyta, Bangiales) from central Chile. *Can. J. Bot.*, v. 64, p. 1867–1872, 1986.
- BAIRD, C.; CANN, M. Química Ambiental. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BALOGH, T. S.; et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Ann. Bras. Dermatol.*, v. 86, p. 732–42, 2011.
- BARBOSA, C.F. Hidrogeoquímica e a contaminação por nitrato em água subterrânea no bairro Piranema, Seropédica–RJ. Dissertação da Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- BARROS, M. P.; et al. Kinetic study of the plastoquinone pool availability correlated with H₂O₂ release in seawater and antioxidant responses in the red alga *Kappaphycus alvarezii* exposed to single or combined high light, chilling and chemical stresses. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, v. 1757, p. 1520–1528, 2006.
- BARUFI, J. B.; et al. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. App. Phycol.*, v. 23, p. 457–466, 2011.

- BARUFI, J.; et al. Nitrate reduces the negative effect of UV radiation on photosynthesis and pigmentation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): the photoprotection role of mycosporine-like amino acids. *Phycologia*, v. 51, p. 636–648, 2012.
- BATISTA, R. D.; et al. Respostas antioxidativas em nódulos de caupi inoculado com *Bradyrhizobium*. *Ver. Interdisc. UFT*, v. 2, p. 76–88, 2015.
- BEISSERT, S.; GRANSTEIN, R.D. UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 31, p. 381–404, 1996.
- BERRIDGE, M. V.; et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Ann. Ver.*, v. 11, p. 127–152, 2005.
- BIANCHINI, I.; CUNHA-SANTINO, M. B. As rotas de liberação do carbono dos detritos de macrófitas aquáticas. *Oecol. Brasil.*, v. 12, p. 3, 2008.
- BIRD, C. J.; CHEN, L. M.; MCLACHLAN, J. The culture of *Porphyra linearis* (Bangiales, Rhodophyceae). *Can. J. Bot.*, v. 50, p. 1859–1863, 1972.
- BISCHOF, K.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions marine macroalgae. *Planta*, v. 211, p. 555–562, 2000.
- BISCHOF, K.; et al. 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*, v. 215, p. 502–509, 2002.
- BISSON, M. A. Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften*, v. 82, p. 461–471, 1995.
- BLOUIN, N.A.; et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress. *Trends Plant Sci.*, v. 16, p. 29–37, 2011.
- BORGES, J.C.; et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev. Bras. Reprodução Anim.*, v. 35, p. 303–314, 2011.
- BOUZON, Z. L. Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis-Gigartinales-Rhodophyta*. Tese da Universidade Federal do Paraná, 1993.
- BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; DE OLIVEIRA, E. C. Ultrastructure of tetraspore germination in the agar-producing seaweed *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia*, v. 44, p. 409–415, 2005.

- BOUZON, Z. L.; et al., 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.*, v. 18, p. 1467–1479, 2012.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, B. Introdução à engenharia ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável. 2ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.
- BRÉHÉLIN, C.; KESSLER, F.; VAN WIJK, K. J. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends Plant Sci.*, v. 12, p.260–266, 2007.
- CARDOZO, K. H. M. Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAA). Tese da Universidade de of São Paulo, 2007.
- CARRETO, J.I.; CARIGNAN, M.O. Mycosporine-Like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs.*, v. 9, p. 387–446, 2011.
- CHALOUB, R. M.; et al. Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Algal Res.*, v. 8, p. 89–94, 2015.
- CHAN, C.X.; et al. *Porphyra* (Bangioophyceae) transcriptomes provide insights into red algal development and metabolism. *J. Phycol.*, v. 48, p. 1328–1342, 2012.
- CHEN, L. C.; et al. The life history of *Porphyra miniata*. *Can. J. Bot.*, v. 48, p. 385–389, 1970.
- CHEN, J.; et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Biores. Technol.*, v. 102(2), p. 1649–1655, 2011.
- CHOO, K. S.; SNOEIJIS, P.; PEDERSÉN, M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnneriana*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, v. 298, p. 111–123, 2004.
- CHOW, F. Nitrate assimilation: the role of in vitro nitrate reductase assay as nutritional predictor. In: *Applied photosynthesis*. IntechOpen, 2012.
- CONAMA, Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no Diário Oficial da União n° 053 em 18/03/2005, Brasília, DF, p. 58–63.

- CRONIN, G.; LODGE, D. M. Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia*, v. 137, p. 32–41, 2003.
- CRUTZEN, P. J. Estimates of possible variation in total ozone due to natural causes and human activities. *Photochem Photobiol.*, v. 72, p. 652–659, 1974.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, p. 7313–7352, 2010.
- DAVISON, I. R.; et al. Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation. *J. Phycol.*, v. 43, p. 636–646, 2007.
- DE ALMEIDA, S. L.; et al. Effect of ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of *Oryza sativa* L. *Protoplasma*, v. 250, p. 1303–1313, 2013.
- DE LA COBA, F., AGUILERA, J., FIGUEROA, F.L., DE GÁLVEZ, M. V., HERRERA, E., 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.; et al. Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem. Photobiol.*, v. 63, p. 492–497, 1996.
- DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys. Med. Biol.*, v. 36, p. 299–328, 1991.
- DIFFEY, B. L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, v. 28, p. 4–13, 2002.
- DO, C. B., CORMIER, F. Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Rep.*, v. 9, p. 500–504, 1991.
- DRING, M. J. et al., Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of *Laminaria* (Phaeophyta). *Mar. Biol.*, v. 126, p. 183–191, 1996.
- DUVAL, B.; et al. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.*, v. 11, p. 559–566, 2000.
- EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contrib. Mar. Sci. Austin* v. 15, p. 1–228, 1970.

- FALKOWSKI, P. G.; LAROCHE, J. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.*, v. 27, p. 8–14, 1991.
- FIGUEROA, F. L.; et al. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticte*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 151, p. 81–90, 1997.
- FIGUEROA, F. L.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, B.; KORBEE, N. Vulnerability and acclimation to increased UVB radiation in three intertidal macroalgae of different morpho-functional groups. *Mar. Environ. Res.*, v. 101, p. 8–21, 2014.
- FILHO, J. G. S. Diversidade dos pigmentos e do gene codificador da capsantina-capsorubina sintase (via biossintética dos carotenóides) em quatro espécies do gênero *Capsicum* L. Dissertação da Universidade de Brasília, 2010.
- FILIPIN, E. P.; et al. Evaluation of salinity effects on the release, adhesion, and germination of the tetraspores of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). *J. Appl. Phycol.*, v. 28, p. 2925–2938, 2016.
- FLORES-MOYA, A.; et al. Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 49, p. 129–135, 1999.
- FREITAS, M. Influência de fatores exógenos na germinação de esporos e da radiação ultravioleta B (RUVB) no desenvolvimento de gametófitos de *Acrostichum danaeifolium* Langsd. & Fisch. (Polypodiopsida, Pteridaceae): uma pteridófito do manguezal. Dissertação da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- GAHAN, P. B. Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press., 1984.
- GALMÉS, J.; et al. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosyn. Res.*, v. 117, p. 73–90, 2013.
- GANESAN, P.; et al. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.*, v. 99, p. 2717–2723, 2008.
- GARCIA-JIMENEZ, P.; ROBAINA, R. R. Volatiles in the aquatic marine ecosystem: ethylene and related plant hormones and sporulation in red seaweeds. In: *Systems Biology of Marine Ecosystems*. Springer, Cham, p. 99–116, 2017.
- GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, v. 59, p. 309–314, 1977.
- GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.*, v. 6, p. 105–112, 1994.

- GODIN-BEEKMANN, S. Spatial observation of the ozone layer. *Comptes. Rendus. Geosci.*, v. 342, p. 339–348, 2010.
- GÓMEZ, I.; HUOVINEN, P. Morpho-functional patterns and zonation of South Chilean seaweeds: the importance of photosynthetic and bio-optical traits. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 422, p. 77–91, 2011.
- GORDON E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. *N. S. Inst. Sci.*, v. 27, p. 111–133, 1973.
- GRAHAM, L. E., GRAHAM, J., WILCOX, L. W. *Algae*, second ed. Hardcover Book, p. 616, 2009.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.*, v. 20, p. 73–82, 1982.
- HANISAK, M. D. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of culture seaweeds. *Hydrobiologia*, v. 204, p. 79–87, 1990.
- HAYASHI, L.; et al. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. *J. Appl. Phycol.*, v. 23, p. 439–447, 2011.
- HE, Y. Y.; HÄDER, D. P. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 66, p. 115–124, 2002a.
- HE, Y. Y.; HÄDER, D. P. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Scie.*, v. 1, p. 729–736, 2002b.
- HENRY, B. E.; VAN ALSTYNE, K. L. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.*, v. 40, p. 527–533, 2004.
- HEO, S. J.; et al. Inhibitory effect of diphenylmethanediol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food Chem. Toxicol.*, v. 48, p. 1355–1361, 2010.
- HOLLÓSY, F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, v. 33, p. 179–197, 2002.
- HOLZINGER, A.; LÜTZ, C. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, v. 37, p. 190–207, 2006.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2013: The Physical*

Science Basis. IPCC Working Group I Contribution to AR5. WHO and UNEP. p. 1535, 2013.

IWASAKI, H. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. The Biol. Bull., v. 121, p. 173–187, 1961.

JEANFILS, J.; CANISIUS, M. F.; BURLION, N. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. J. Appl. Phycol., v. 5, p. 369–374, 1993.

JEFFREY, S. T.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen, v. 167, p. 191–194, 1975.

JIANG, H.; GAO, K.; HELBLING, E. W. Effects of solar UV radiation on germination of conchospores and morphogenesis of sporelings in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). Mar. Biol., v. 151, p. 1751–1759, 2007.

JORMALAINEN, V.; et al. Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? Oikos, v. 103, p. 640–650, 2003.

KALBINA, I.; STRID, Å. Supplementary ultraviolet-B irradiation reveals differences in stress responses between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant, Cell & Environ., v. 29, p.754-763, 2006.

KAŇA, R.; et al. Phycobilisome mobility and its role in the regulation of light harvesting in red algae. Plant Physiol., v. 165, p. 1618–1631, 2014.

KERR, J. B.; MCELROY, C. T. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. Science, v. 262, p. 1032–1034, 1993.

KIM, D. O; et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. J. Agric. Food Chem., v. 50, p. 3713–3717, 2002.

KIM, K.C.; et al. Fucodiphloretol G purified from *Ecklonia cava* suppresses ultraviolet B radiation-induced oxidative stress and cellular damage. Biomol. Ther., v. 22, p. 301–307, 2014.

KIM, G. H.; et al. Chloroplast virus causes green-spot disease in cultivated *Pyropia* of Korea. Algal Res., v. 17, p. 293–299, 2016.

KNAUERT, S.; KNAUER, K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. J. Phycol., v. 44, p. 311–319, 2008.

KORBEE, N.; et al. Photoprotection mechanisms against ultraviolet radiation in *Heterocapsa* sp.(Dinophyceae) are influenced by nitrogen availability, mycosporine-like amino acids vs. xanthophyll cycle. Limnol. Oceanog., v. 55, p. 899–908, 2010.

- KOTTUPARAMBIL, S.; et al. UV-B affects photosynthesis, ROS production and motility of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. *Aquat. Toxicol.*, v. 123, p. 206–213, 2012.
- KUHLENKAMP, R.; FRANKLIN, L. A.; LÜNING, K. Effect of solar ultraviolet radiation on growth in the marine macroalga *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae) at Helgoland and its ecological consequences. *Helgol. Mar. Res.*, v. 55, p. 77–86, 2001.
- KURSAR, T. A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiol.*, v. 73, p. 353–360, 1983.
- LANG, K.L. Investigação química e biológica da alga vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. Dissertação da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- LESHEM, Y.; SERI, L.; LEVINE, A. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J.*, v. 51, p. 185–197, 2007.
- LI, Y.; et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, v. 81, p. 629–636, 2008.
- LIU, F.; PANG, S. J. Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 382, p. 82–87, 2010.
- MAIA, J. M.; et al. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. *Acta Bot. Bras.*, v. 26, p. 342–349, 2012.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.*, v. 157, p. 183–193, 2000.
- MCCREADY, R.M.; et al. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. *Anal. Chem.*, v. 22, p. 1156–1158, 1950.
- MCCULLY, M. E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 175, p. 702–711, 1970.
- MENDES, L. F.; et al., Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingenses* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. *J. Appl. Phycol.*, v. 25, p. 1939–1947, 2013.
- MERCURIO, D.G.; et al., In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 153, p. 121–126, 2015.

- MILSTEIN, D.; et al. Native or introduced? A re-evaluation of *Pyropia species* (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil based on molecular analyses. *Euro. J. Phycol.*, v. 50, p. 37–45, 2015.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, v. 7, p. 405–410, 2002.
- MOLINA, M. J.; ROWLAND, F. S. Chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, v. 249, p. 810–812, 1974.
- MOLINA, L. T., MOLINA, M. J. Production of Cl₂O₂ from self-reaction of the ClO radical. *Jour. Phys. Chem.*, v. 91, p. 433–436, 1987.
- MUNIER, M.; et al. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.*, v. 150, p. 400–407, 2014.
- NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel de enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrar. Acad.*, v. 1, p. 234–250, 2014.
- NAVARRO, N. P.; et al. Short-term effects of solar UV radiation and NO₃⁻ 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. Mar.*, v. 57, p. 9–20, 2014.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, v. 41, p. 1523–1542, 2006.
- NOTOYA, M. *Porphyra kinositae* (Yamada et Tanaka) Fukuhara (Bangiales, Rhodophyta) in culture. *Jpn. J. Phycol.*, v. 40, p. 273–278, 1992.
- NUNES, B. G. Monitoramento do ambiente do cultivo experimental da alga *Kappaphycus alvarezii* na praia de Sambaqui, Florianópolis/SC. Dissertação da Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- O'BRIEN, T. P.; THIMANN, K. V. Histological studies on the coleoptile. I. Tissue and cell types in the coleoptile tip. *Amer. J. Bot.*, v. 52, p. 910–918, 1965.
- PARMAR, A.; et al. Influence of light on phycobiliprotein production in three marine cyanobacterial cultures. *Acta Physiol. Plant*, v. 35, p. 1817–1826, 2013.
- PEREIRA, R.; et al. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, v. 252(1), p. 66–78, 2006.

- PEREIRA, D. T.; et al. 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.*, v. 26, p. 2443–2452, 2014.
- PEREIRA, D. T.; et al. Effects of ultraviolet radiation (UV -A+ UV -B) on the antioxidant metabolism of the red macroalga species *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta, Ceramiales) from different salinity and nutrient conditions. *Photochem. Photobiol.*, v. 95, p. 999–1009, 2019a.
- PEREIRA, D. T.; et al. Variação por um ano da radiação fotossinteticamente ativa, ultravioleta-A e ultravioleta-B no bairro Trindade, Florianópolis, Santa Catarina. *Geosul*, v. X, p. XX–XX, 2019b.
- PEREIRA, D. T.; et al. Effects of ultraviolet radiation (UVA + UVB) on germination of carpospores of the red macroalga *Pyropia acanthophora* var. *brasiliensis* (Rhodophyta, Bangiales): morphological changes. *Photochem. Photobiol.*, v. 95, p. 803–811, 2019c.
- PESCHECK, F.; et al. UVB-induced DNA and photosystem II damage in two intertidal green macroalgae: distinct survival strategies in UV-screening and non-screening Chlorophyta. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 132, p. 85–93, 2014.
- PICHRTOVÁ, M.; et al. 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. *Microb. Ecol.*, v. 65, p. 68–83, 2013.
- POLO, L. K.; et al. 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.*, v. 90, p. 560–573, 2014.
- POPPE, F.; et al. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.*, v. 51, p. 11–19, 2003.
- PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria Palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, v. 15, p. 409–424, 1979.
- QUINLAN, R. F.; et al. Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. *Plant Physiol.*, v. 160, p. 204–214, 2012.

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

RANDI, A. M.; et al. Acclimation and photoprotection of young gametophytes of *Acrostichum danaeifolium* to UV-B stress. *Photosynthetica*, v. 52, p. 50–56, 2014.

RAO, M. U.; KALIAPERUMAL, N. Effects of environmental factors on the liberation of spores from some red algae of *Visakhapatnam coast*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 70, p. 45–53, 1983.

RASTOGI, R. P.; INCHAROENSAKDI, A. UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAA) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, v. 130, p. 287–292, 2014.

RAUTENBERGER, R.; HUOVINEN, P.; GÓMEZ, I. Effects of increased seawater temperature on UV tolerance of Antarctic marine macroalgae. *Mar. Biol.*, v. 162, p. 1087–1097, 2015.

RECUENCO-MUÑOZ, L.; et al. Targeted quantitative analysis of a diurnal RuBisCO subunit expression and translation profile in *Chlamydomonas reinhardtii* introducing a novel Mass Western approach. *J. Prot.*, v. 113, p. 143–153, 2015.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 17, p. 208–212, 1963.

ROLEDA, M. Y.; et al. Morphology, growth, photosynthesis and pigments in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycology*, v. 43, p. 603–613, 2004.

ROLEDA, M. Y.; et al. Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Urospora penicilliformis* from Arctic Spitsbergen to UV radiation. *Protoplasma*, v. 243, p. 105–116, 2010.

ROMAY, C.; et al. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.*, v. 4, p. 207–216, 2003.

SAISON, C.; et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aqua. Toxicol.*, v. 96, p. 109–114, 2010.

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

SCARIOT, Lidiane Ângela et al. Effects of UV-B radiation on *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales): germination of tetraspores and early sporeling development. *J. Appl. Phycol.*, v. 25, p. 537–544, 2013.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.*, v. 378, p. 1247–1258, 1997.

SCHMIDT, E. C.; et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, v. 40, p. 860–869, 2009.

SCHMIDT, E. C.; et al. Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. *Photosynthetica (Praha)*, v. 48, p. 161–172, 2010.

SCHMIDT, E. C.; et al. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquat Bot.*, v. 100, p. 8–17, 2012.

SCHMIDT, E. C.; et al. Effects of ultraviolet radiation (UVA+UVB) and copper on the morphology, ultrastructural organization and physiological responses of the red alga *Pterocladia capillacea*. *Photochem. Photobiol.*, v. 91, p. 359–370, 2015.

SCHWEIKERT, K.; et al. UV-B radiation induces changes in polyamine metabolism in the red seaweed *Porphyra cinnamomea*. *Plant Growth Reg.*, v. 65, p. 389–399, 2011.

SHANNON, J. C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Res. Bull.*, v. 842, p. 1–8, 1968.

SHEN, J.; et al. Effect of increased UV-B radiation on carotenoid accumulation and total antioxidant capacity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Genet. Mol. Res.*, v. 16, p. 1–11, 2017.

SHI, J.; et al. Differential proteomic analysis by iTRAQ reveals the mechanism of *Pyropia haitanensis* responding to high temperature stress. *Scient. Repo.*, v. 7, p. 44734, 2017.

SIMIONI, C.; et al. Effects of ultraviolet radiation (UVA+UVB) on young gametophytes of *Gelidium floridanum*: growth rate, photosynthetic pigments, carotenoids, photosynthetic performance, and ultrastructure. *Photochem. Photobiol.*, v. 90, p. 1050–1060, 2014.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 26, p. 31–43, 1969.

STOLARSKI, R. S.; CICERONE, R. J. Stratospheric chlorine: a possible sink for ozone. *Can. J. Chem.*, v. 52, p. 1610–1615, 1974.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 5th edn., Artmed, Porto Alegre, 2013.

TAKAHASHI, M.; MIKAMI, K. Oxidative stress promotes asexual reproduction and apogamy in the red seaweed *Pyropia yezoensis*. *Front. Plant Sci.*, v. 8, p. 62–66, 2017.

TAKAHASHI, S.; BADGER, M. R. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.*, v. 16, p. 53–60, 2011.

TEVINI, M.; STEINMULLER, D. Composition and function of plastoglobuli. *Planta*, v. 163, p. 91–96, 1985.

TSAI, M. L.; et al. UVB radiation induces persistent activation of ribosome and oxidative phosphorylation pathways. *Rad. Res.*, v. 171, p. 716–724, 2009.

TSUJI, N.; et al. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry*, v. 62, p. 453–459, 2003.

UJI, T.; et al. Ethylene regulation of sexual reproduction in the marine red alga *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, v. 28, p. 3501–3509, 2016.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H. Method for glucose determination and other sugars. *Manometric techniques*. 1^a ed.: Burgess Publishing Co., 1964.

VALKO, M.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, p. 44–84, 2007.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.*, v. 9, p. 323–343, 2000.

VESILIND, P.A.; MORGAN, S.M. *Introdução à engenharia ambiental*. São Paulo: Cengage Learning., 2013.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quím. Nova.*, v. 27, p. 139–145, 2004.

WATANABE, M., IKEUCHI, M. Phycobilisome: Architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth. Res.*, v. 116, p. 265–276, 2013.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WIENCKE, C.; et al., Impact of UV radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA on algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 197, p. 217–219, 2000.

XU, D.; et al., Effects of desiccation, diurnal temperature changes and irradiance on archeospore production of *Pyropia yezoensis*. *Aquaculture*, v. 509, p. 167–170, 2019.

YONG, Y. S.; YONG, W. T. L.; ANTON, A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *J. Appl. Phycol.*, v. 25, p. 1831–1834, 2013.

- YU, F.; et al. Effects of cadmium on enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences of rice (*Oryza sativa* L.). *Inter. J. Phytoremediation*, v. 15, p. 513–521, 2013.
- ZACARIAS, A. A.; et al. Determinação do teor de fenólicos e flavonoides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999, 2007.
- ZHAO, J.; LIXIA, L. I. Effects of UV-B irradiation on isoforms of antioxidant enzymes and their activities in red alga *Grateloupia filicina* (Rhodophyta). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, v. 32, p. 1364–1372, 2014.
- ZENG, L. M.; et al. Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chin. J. Chem.*, v. 19, p. 1097–1100, 2001.
- ZOU, D.; GAO, K. Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emersed photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. *Eur. J. Phycol.*, v. 37, p. 587–592, 2002.
- ZHANG, Q.; et al. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol. Res.*, v. 48, p. 151–155, 2003.
- ZHENG, Y.; GAO, K. Impacts of solar UV radiation on the photosynthesis, growth and UV-absorbing compounds in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different nitrate concentrations. *J. Phycol.*, v. 45, p. 314–323, 2009.
- ZHOU, C.; et al. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. *Carbo. Pol.*, v. 87, p. 2046–2051, 2012.
- ZITTA, C.S.; et al. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. *J. App. Phycol.*, v. 25, p. 615–629, 2013.
- ZUBIA, M.; FREILE-PELEGRÜN, Y.; ROBLEDO, D. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defences in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) under environmental stress. *J. Appl. Phycol.*, v. 26, p. 2001–2010, 2014.