

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B SOBRE A
MORFISIOLOGIA DE *Kappaphycus alvarezii* (DOTY) DOTY
EX P. SILVA (GIGARTINALES) VARIANTES
PIGMENTARES VERDE E VERMELHA**

ÉDER CARLOS SCHMIDT

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Vegetal da Universidade Federal de
Santa Catarina, para obtenção do título
de Mestre em Biologia Vegetal, na Área
de Concentração Biologia celular e
Reprodução de Macroalgas Marinhas.

Florianópolis
2009

ÉDER CARLOS SCHMIDT

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B SOBRE A
MORFISIOLOGIA DE *Kappaphycus alvarezii* (DOTY) DOTY
EX P. SILVA (GIGARTINALES) VARIANTES
PIGMENTARES VERDE E VERMELHA**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Vegetal da Universidade Federal de
Santa Catarina, para obtenção do título
de Mestre em Biologia Vegetal, na Área
de Concentração Biologia celular e
Reprodução de Macroalgas Marinhas

Orientadora: Dra Zenilda Laurita Bouzon

Co-orientador: Dr Marcelo Maraschin

Florianópolis
2009

Comissão Julgadora:

Prof (a) Dr (a)

Prof (a) Dr (a)

Profa. Dra Zenilda Laurita Bouzon
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Co-orientador

A dinâmica da personalidade é drama, mas um drama é sempre um confronto de conexões (dever e afeto, paixão e controle, amor e ódio, confiança e ciúme, etc), não pode ser diferente, é um confronto de sistemas”.

Lev Seminovich Vygotsky

Aos meus pais, as minhas irmãs e a minha
amada Luciane.

Com amor, dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao criador de todo o nosso Universo “Deus”, por permitir que estudasse, tivesse saúde e que novas oportunidades fossem abertas a cada momento da minha vida. **OBRIGADO!** Aos meus pais Orlando Schmidt e Maria de Lourdes Schmidt, pela força e compreensão, por terem me dado à chance de estudar, crescer e ser digno de receber a sua atenção. **Amo vocês, Obrigadooooooooo!** As minhas irmãs Jucimar Maria Schmidt e Geovana Schmidt, irmãs queridas, companheiras que possibilitaram o meu crescimento, ensinando através dos conflitos, brigas e discussões (**Thank You, I Love you My dear sisters!**). Agradeço a minha amada namorada Luciane Lombardi pela compreensão e incentivo ao longo destes dois anos.

Este trabalho nunca poderia ter sido realizado sem a persistência da minha professora, mestre, orientadora Dra. Zenilda Laurita Bouzon, que juntos desenvolvemos este projeto. Obrigado pela oportunidade de trabalhar com você, **obrigado por tudo**. Não posso me esquecer do meu co-orientador professor Dr. Marcelo Maraschin; seu esforço e atenção concentrada nos detalhes, foram cruciais no desenvolvimento da parte teórica e principalmente da parte prática desta pesquisa. **Muito obrigado!**

Agradeço aos meus colegas do mestrado: Dávia, Bianca, Carol, Débora, Juliana, Morgana, Roberta, Adriano, Beatriz e a Fernanda Ramlov que me acompanharam nestes dois anos, pela ajuda nos estudos, trabalhos e companheirismo.

Ao professor Dr. Paulo Horta pelas grandiosas contribuições e sugestões para o enriquecimento do projeto. Aos meus companheiros do LAMAR, pelos diversos momentos de diversão e auxílio nos experimentos. A professora Dra. Luciane C. Ouriques pela ajuda e carinho nestes dois anos de convívio.

A todos muito obrigado pela ajuda!

RESUMO

Os efeitos da radiação ultravioleta nos organismos biológicos são relevantes nos comprimentos de onda UV-A (315-400 nm) e UV-B (280-315 nm). Nas algas tornaram-se uma questão importante como um efeito da depleção a camada de ozônio. No entanto, modelos experimentais para investigar esse problema são múltiplos e os organismos estudados são extremamente diversificados. Os organismos estudados incluem desde cianobactérias, diatomáceas, algas marrons, algas verdes e algas vermelhas. Estes estudos envolvem organismos de diferentes habitats: litoral marinho, mar aberto, lagoas, lagos e campos com neve. *Kappaphycus alvarezii* é uma macroalga vermelha que apresenta várias cores (vermelho, marrom, amarelo e verde). É natural de ambientes recifais do Indo-Pacífico, China, Japão ilhas do sudeste da Ásia, África e Oriente região até Guam. No Brasil foi introduzida na última década na região sudeste e recentemente na região sul. Apresenta interesse econômico, devido principalmente à produção de *kappa* carragenana. Esta carragenana apresenta grande importância econômica para a alimentação (leite e produtos derivados, sobremesas e produtos enlatados), farmacêutica, têxtil, cosméticos e indústrias por causa de suas propriedades como espessante, emulsificante, estabilizador e gelificante. A presente investigação foi realizada para ampliar o conhecimento dos possíveis efeitos biológicos da radiação UVB, na fisiologia, na bioquímica, na morfologia e na organização celular de *K. alvarezii* linhagens verde e vermelha. Foram cultivadas duas variantes pigmentares (verde e vermelha) a 24 ° C (± 2 °C), fotoperíodo de 12h, irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) ao dia foi de 704 kJ/m⁻², água do mar enriquecida com 4% de meio von Stosch e salinidade de 34 ups. Para os tratamentos estas variantes foram expostas a RUVB 3h diárias, irradiância de 1,2 kJ/m⁻² por 28 dias. Observou-se a diminuição das taxas de crescimento nos dois segmentos apicais das duas variantes expostos a RUVB. A morfologia também foi alterada, com um enrolamento nas porções distais do talo. Os segmentos apicais da variante vermelha apresentaram processo de necrose e despigmentação nas extremidades dos ramos. Os pigmentos fotossintetizantes sofreram alterações nas concentrações após exposição à RUVB, especialmente nas ficobiliproteínas (FE, FC e AFC) onde as mesmas apresentaram diminuições, enquanto a concentração de Cl a aumentou após a exposição à RUVB. As variantes pigmentares, em corte transversal, apresentaram a região cortical com uma camada de células pequenas, a subcortical possuiu células maiores. Estas células grandes apresentaram paredes celulares espessas. A metacromasia com AT-O, nas paredes de todos os tipos celulares indicaram a presença de carboidratos ácidos. Com PAS a reação foi intensa no citoplasma das células corticais e das células subcorticais, marcando os grãos de amido. Entretanto nas células dos segmentos expostos à RUVB foi observada a diminuição no número de grãos de amido. As paredes celulares PAS positivas indicaram a presença de celulose, que tornaram mais evidente nos segmentos expostos à RUVB. Com azul brilhante de Coomassie reagiu com as células corticais marcando o citoplasma e as conexões intercelulares. Com SB-B a reação foi mais intensa na cutícula. A RUVB provocou alterações também na ultra-estrutura nas células corticais, com o aumento da espessura da parede celular e alteração do contorno celular. A desestruturação da organização interna dos cloroplastos das células corticais e das células subcorticais, juntamente com o aumento no número de ribossomos livres e de plastoglobulos foi observada. Houve redução dos espaços intracelulares e formação de corpos membranosos com vesículas concêntricas no citoplasma e no cloroplasto. Entretanto, as mitocôndrias, os dictiossomos e núcleos das células corticais e das células subcorticais não apresentaram alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

The effects of ultraviolet radiation in the biological relevant wavebands of UV-A (315–400 nm) and UV-B (280–315 nm) on algae have become an important issue as a man-made depletion of the protecting ozone layer has been reported. However, experimental designs to investigate this issue are manifold and the target organisms are extremely diverse. Data are included from the prokaryotic cyanobacteria, diatoms, brown algae, green algae and red algae. Including different habitats from marine littoral and open ocean to freshwater ponds, lakes and snow fields. A broad overview on UV effects on algae is given, with a focus on structurally visible changes. *Kappaphycus alvarezii* is a red macroalgae that presents several colors (red, brown, yellowish and green). It is natural from reef environments of the Indo-Pacific, China, Japan Islands of South East Asia, and East Africa region until Guam. This species was introduced in Brazil in the last decade, in São Paulo and Rio de Janeiro. This specie also currently being cultivated in the southern region of Brazil. It is of economical interest mainly due to the production of kappa carrageenans. This phycocolloids presents a great economical importance for food (milk and derived products, desserts and canned products), pharmaceutical, textile, and cosmetic industries because of its properties as thickener, emulsifier, stabilizer and gelling agent. The present investigation was undertaken to expand the knowledge of possible biological effects of UVB-radiation in physiology, morphology and cellular organization of *K. alvarezii* green and red strains. Two strains (green and red) were grown to 24 °C (± 2 ° C), photoperiod of 12h, photosynthetically active irradiance (PAR) was the day of 704 kJ/m⁻², sea water enriched with medium with 4 % of medium von Stosch and salinity of 34 ups. For the treatments were exposed to these variants RUVB for 3 h daily, irradiance of 1.2 kJ/m⁻² for 28 days. There was a decrease in growth rates in the two apical segments of the two strains exposed to RUVB. The morphology was also changed, with a winding in the distal portions of the stalk. The apical segment of the red variant showed necrosis and depigmentation of the process ends of the branches. The pigments change in concentrations after exposure to RUVB especially phycobiliproteins (FE, FC and AFC) where they showed decreases, while the concentration of *Cl_a* increased after exposure to RUVB. The strains in cross section, show the cortical region with a layer of small cells, the cells have more subcortical. These large cells have thick cell walls. The metachromatic with AT-O, on the walls of all cell types indicates the presence of carbohydrates acids. With the PAS reaction was intense in the cytoplasm of the cells of cortical and subcortical cells, marking the grains of starch. Meanwhile in cells exposed to the segments RUVB was a decrease in the number of grains of starch. The PAS positive cell walls indicate the presence of cellulose, which became more evident in the segments exposed to RUVB. CBB reacted cortical cells marking the cytoplasm and intercellular connections. SB with the reaction was more intense in the cuticle. The RUVB also caused changes in ultrastructure in cortical cells, with increasing thickness of the cell wall and change the contour cell. The destruction of the internal organization of the chloroplasts of the cells and cortical cells subcortical, along with the increase in the number of free ribosomes and plastoglobuli was observed. There was a reduction of intracellular spaces and formation of vesicles with concentric membranous bodies in the cytoplasm. However, the mitochondria, the cell nuclei and dictyosomes cortical and subcortical cells showed no ultrastructural alterations.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....	40
Tabela 2: Análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....	40
Tabela 3: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....	41
Tabela 4: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....	41
Tabela 5: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial comparação das quatro semanas de cultivo das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch.....	41
Tabela 6: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial comparação das quatro semanas de cultivo das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch.	42
Tabela 7: Médias da concentração e erro padrão de Cl. <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.....	43
Tabela 8: Médias da concentração e erro padrão de Cl. <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ massa fresca) da variante pigmentar vermelha de <i>K. alvarezii</i> exposta a RUVB.	43
Tabela 9: Análise da variância unifatorial da concentração de Cl. <i>a</i> dos tratamentos controle e de exposição à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....	43
Tabela 10: Análise da variância unifatorial da concentração de Cl. <i>a</i> dos tratamentos controle e de exposição à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	43
Tabela 11: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referente à análise da variância unifatorial da concentração de Cl. <i>a</i> dos indivíduos controle e expostos à RUVB, da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	44
Tabela 12: Médias da concentração e erro padrão de AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	44
Tabela 13: Médias da concentração e erro padrão de FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	44
Tabela 14: Médias da concentração e erro padrão de FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	44
Tabela 15: Médias da concentração e erro padrão de AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	45
Tabela 16: Médias da concentração e erro padrão FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	45
Tabela 17: Médias da concentração e erro padrão de FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB.	45
Tabela 18: Análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	46
Tabela 19: Análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	46

Tabela 20: Análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	46
Tabela 21: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	46
Tabela 22: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	46
Tabela 23: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	47
Tabela 24: Análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	47
Tabela 25: Análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	47
Tabela 26: Análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	48
Tabela 27: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	48
Tabela 28: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	48
Tabela 29: Teste <i>a posteriori</i> do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de <i>K. alvarezii</i> , cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.	48
Tabela 30: Razões entre os pigmentos (fotossintetizantes) da variante pigmentar verde de <i>K. alvarezii</i> exposta à RUVB comparação com o controle.	50
Tabela 31: Razões entre os pigmentos (fotossintetizantes) da variante pigmentar vermelha de <i>K. alvarezii</i> exposta a RUVB comparação com o controle.....	50

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: *K. alvarezii* (variante verde e vermelha).....5

Capítulo 2

Figura 1: Câmara de cultura de *K. alvarezii*.....31

Figura 2: Aspectos dos segmentos apicais de *K. alvarezii* variante verde.35

Figura 3: Aspectos dos segmentos apicais de *K. alvarezii* variante vermelha.....36

Figura 4: Aspectos dos segmentos apicais das duas variantes (verde e vermelha) de *K. alvarezii*.....37

Figura 5: Aspectos dos segmentos apicais da variante vermelha *K. alvarezii* exposta à RUVB....
.....38

Figura 6: Taxas de crescimento dos segmentos apicais do controle e dos segmentos apicais expostos a RUVB da variante verde de *K. alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....38

Figura 7: Taxas de crescimento dos segmentos apicais do controle e dos segmentos apicais expostos a RUVB da variante vermelha de *K. alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....39

Figura 8: Médias da concentração dos pigmentos fotossintetizantes (Cl.a , AFC, FC e FE - µg/g massa fresca) da variante verde de *K. alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....49

Figura 9: Médias da concentração dos pigmentos fotossintetizantes (Cl.a , AFC, FC e FE- µg/g massa fresca) da variante vermelha de *K. alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas.....49

Capítulo 3

Figuras 1-10: Secções transversais do controle das variantes pigmentares verde e vermelha de *K. alvarezii*.79

Figuras 11-18: Secções transversais dos expostos à RUVB da variante pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii*.....81

Figuras 19-27: Plantas controle das variantes pigmentares verde e vermelha de *K. alvarezii* analisadas no MET.....84

Figuras 28-33: Plantas controle das variantes pigmentares verde e vermelha de *K. alvarezii* analisadas no MET.86

Figuras 34-40: Células subcorticais dos controles das variantes pigmentares vermelha e verde de *K. alvarezii* analisadas no MET.....88

Figuras 41- 48: Plantas controle da variante pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii* analisadas no MET após o teste de Thiéry.90

Figuras 49-57: Plantas expostas a RUVB das variantes pigmentares verde e vermelha de *K. alvarezii* analisadas no MET.....92

Figuras. 58-65: Plantas expostas a RUVB das variantes pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii* analisadas no MET.94

Figuras 66-73: Detalhe de estruturas celulares da variante pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii* expostas a RUVB analisadas no MET.96

Figuras 74-77: Detalhe de estruturas celulares da variante pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii* expostas a RUVB analisadas no MET, após o teste de Thiéry.97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amido das florídeas (A)
Amido das florídeas jovem (Aj)
Azul de toluidina (AT-O)
Azul Brillhante de Coomassie (CBB)
Ácido periódico de Schiff (PAS)
Aloficocianina (AFC)
Célula cortical (CC)
Célula subcortical (CS)
Clorofila *a* (Cl. *a*)
Cloroplasto (C)
Conexões intercelulares (CI)
Corpos membranosos com membranas concêntricas (CM)
Dictiossomo (D)
Ficocianina (FC)
Ficoeretrina (FE)
Genóforo (G)
Microscopia de luz (ML)
Microscópio eletrônico de transmissão (MET)
Mitocôndria (M)
Núcleo (N)
Nucléolo (Nu)
Parede celular (PC)
Plastoglobuli (P)
Retículo endoplasmático rugoso (Rer)
Radiação fotossinteticamente ativa (PAR)
Radiação ultravioleta (RUV)
Radiação ultravioleta-B (RUVB)
Ribossomos livres (R)
Sudan Black-B (SB-B)
Thiosemicarbazida (TSC)
Vacúolo (V)

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
SUMÁRIO.....	XIV

Capítulo 1

I INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Introdução.....	1
1.1 Visão geral das algas.....	1
1.1.1 Relevância das macroalgas.....	2
1.2 A Divisão Rhodophyta.....	2
1.2.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i>	4
2. Diminuição da camada de ozônio (O ₃) e aumento da radiação ultravioleta (UV).....	7
II OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
III-REFERÊNCIAS.....	12

Capítulo 2

I INTRODUÇÃO.....	28
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Coleta e processamento do material biológico.....	30
2.2 Condições de cultivo.....	31
2.3 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais dos controles e dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K.alvarezii</i>	32
2.4 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes	33
2.4.1 Extração e Dosagem de Clorofila <i>a</i>	33
2.4.2 Extração e Dosagem das Ficobiliproteínas.....	33
2.4.3 Análise e interpretação dos dados.....	34

III. RESULTADOS	35
3.1 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K.alvarezii</i>	35
3.2 Efeito da radiação nos pigmentos fotossintetizantes nos segmentos apicais dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K.alvarezii</i>	42
IV. DISCUSSÃO	51
4.1 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K. alvarezii</i>	51
4.2 Efeito da radiação nos pigmentos fotossintetizantes nos segmentos apicais dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K.alvarezii</i> ...54	
V. REFERÊNCIAS	57

Capítulo 3

I INTRODUÇÃO	69
II. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Coleta e processamento do material biológico.....	72
2.2 Condições de cultivo.....	72
2.3 Análise em microscópio de luz.....	73
2.3.1 Fixação.....	73
2.3.2 Desidratação.....	73
2.3.3 Pré-infiltração e infiltração.....	74
2.3.4 Inclusão.....	74
2.3.5 Preparo das secções.....	74
2.4 Histoquímica.....	74
2.4.1 Azul de toluidina (AT-O).	74
2.4.2 Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	75
2.4.3 Azul brilhante de Coomassie (CBB).	75
2.4.4 Sudan Black- B (SB-B).	75
2.5 Análise em microscópio eletrônico.....	75
2.5.1 Preparação para observações citoquímicas no MET.....	76

III. RESULTADOS	77
3.1 Descrição da morfologia celular das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K. alvarezii</i>	77
3.2 Observações histoquímicas dos controles das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K. alvarezii</i>	77
3.2.1 Testes histoquímicos dos segmentos apicais expostos a RUVB das duas variantes pigmentares vermelha de <i>K. alvarezii</i>	80
3.3 Ultra-estrutura dos segmentos apicais dos controles e dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de <i>K. alvarezii</i>	82
3.3.1 Ultra-estrutura dos segmentos apicais do controle das duas variantes pigmentares de <i>K. alvarezii</i>	82
3.3.2 Ultra-estrutura dos segmentos apicais expostos a RUVB das duas variantes pigmentares de <i>K. alvarezii</i>	91
IV. DISCUSSÃO	98
V. REFERÊNCIAS	106
Capítulo 4	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	123

INTRODUÇÃO GERAL

I. INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral das algas

As algas constituem um grupo polifilético de organismos que apresentam um histórico evolutivo muito diverso (Lobban & Harrison, 1994), compreendem um grupo de organismos fotossintetizantes, não vasculares, dotados de estruturas reprodutivas sem proteção, produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (South & Whittick, 1987). Este grupo inclui organismos eucarióticos, unicelulares a pluricelulares, com grande variação morfológica (van den Hoek *et al.*, 1989). Tanta diversidade também é observada nas formas de reprodução onde são observados processos vegetativos, assexuais e sexuais e em muitas formas pode ocorrer alternância de gerações, ao ponto da reprodução sexual na divisão Rhodophyta ser considerada a mais complexa do reino vegetal (South & Whittick, 1987).

Bioquímica e fisiologicamente as algas são similares em muitos aspectos às plantas, possuindo as mesmas vias metabólicas básicas de síntese de clorofila *a* como principal pigmento fotossintético. Os polissacarídeos e proteínas biossintetizados podem ser comparados com os das plantas (South & Whittick, 1987).

As algas ocorrem em praticamente todos os ambientes, porém se mostram mais abundantes nos ambientes aquáticos, onde são os maiores produtores de compostos orgânicos com papel relevante na cadeia alimentar sendo também responsáveis por grande parte da liberação de oxigênio necessário para o metabolismo dos consumidores (Lee, 1989).

As algas são classificadas, utilizando-se critérios como: morfologia, a estrutura celular, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular,

biologia molecular, bioquímica, pigmentos fotossintéticos e ciclo de vida (Graham & Wilcox, 2000).

1.1.1 Relevância das Macroalgas

As algas são de grande importância nos ambientes marinhos por serem os produtores primários dos oceanos e, desta maneira, compõem a biomassa e determinam a produtividade primária para os demais elos da cadeia trófica (Dawes, 1981; Norton *et al.*, 1996). São alimentos para os herbívoros e os detritívoros, como também constituem uma área de berçário e habitat para peixes e invertebrados (Lippert *et al.*, 2001). As macroalgas representam também um importante recurso para a obtenção de diferentes compostos naturais (Lüning, 1990). Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída as macroalgas marinhas devido aos seus compostos de parede: alginatos, agaranas, carragenanas. Além destes, são conhecidos também os compostos com ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Anggadiredja *et al.*, 1997; Hudson *et al.*, 1999).

Algumas algas são utilizadas como fonte de alimento humano ou de extratos químicos que são amplamente utilizados na manufatura de alimentos e muitos outros produtos (South & Whittick, 1987). Apesar de seus carboidratos não serem digeridos pelo homem, as algas representam excelentes fontes de vitaminas C (equivalente aos frutos cítricos), A, D, B1, B12 e E e ainda fornecem aminoácidos livres, carotenóides e diversos elementos traços requeridos para a nutrição humana (South & Whittick, 1987; Graham & Wilcox, 2000).

1.2 A Divisão Rhodophyta

Na Divisão Rhodophyta são reconhecidas quatro classes: Classe Rhodellophyceae, Classe Compsopogonophyceae, Classe Bangiophyceae e a Classe Florideophyceae (Wynne, 2005), representam o grupo com maior diversidade de espécies (Usov, 1992). Englobam cerca de 4000 a 6000 espécies (Woelkerling, 1990) distribuídas em aproximadamente 700 gêneros (Kraft, 1981), destes, 20 compreendem representantes de água doce e 10 contêm algas unicelulares. Os demais gêneros contêm

unicamente organismos pluricelulares de ambiente marinho (Lee, 1989; van den Hoek *et al.*, 1989). A coloração é variada, podendo ser vermelho-clara, roxa, vermelho-escura, amarelada, esverdeada, azulada, amarronzada e mesmo enegrecida (Oliveira, 2003).

Ocorrem em todas as latitudes, sendo mais abundantes na região equatorial. Predominam nas regiões entremarés, podendo também ser encontradas em profundidades de aproximadamente 200 m (Lee, 1989). As algas vivem presas a rochas, substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (van den Hoek *et al.*, 1989). São mais abundantemente encontradas em regiões quentes próximas ao Equador onde apresentam tamanho reduzido, porém podem ser encontradas também em regiões de águas frias, atingindo nestas localidades maiores proporções (van den Hoek *et al.*, 1989; Lee, 1989). Poucas espécies de algas vermelhas são encontradas em regiões polares e sub-polares, onde as algas pardas e verdes são mais abundantes (van den Hoek *et al.*, 1989; Lee, 1989). São comuns ao longo da costa brasileira, sendo mais abundantes e diversificadas na costa nordeste do país. Outras áreas de alta biodiversidade são os costões rochosos do norte do estado do Espírito Santo até a Ilha de Santa Catarina (Saito & Oliveira, 1990).

Estas algas são caracterizadas por apresentar clorofila *a*, ficobiliproteínas, ausência completa de flagelos em todos os seus representantes e fases do ciclo de vida, amido das florídeas como produto de reserva e tilacóides livres nos cloroplastos (Bold & Wynne, 1985; Lee, 1989; Woelkerling, 1990). Os pigmentos fotossintetizantes das algas vermelhas são clorofilas (clorofila *a* e clorofila *d*) sendo esta última típica deste grupo taxonômico e ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas estão organizadas em estruturas denominadas ficobilissomos (Gantt, 1981; Zuber, 1986), existe três tipos de ficobiliproteínas: a ficoeretrina (pigmento vermelho), a ficocianina e a aloficocianina (pigmentos azuis). Esses pigmentos têm como função absorver energia transferindo-a em seqüência a partir da ficoeretrina, à ficocianina e à aloficocianina, para o centro de reação do PSII (fotossistema II), onde a clorofila *a* é excitada, possibilitando assim o estabelecimento de um fluxo de elétrons (Gantt, 1981; Talarico, 1996).

Das suas paredes celulares são extraídos polissacarídeos sulfatados (carragenanas e agaranas) que ocorrem em muitos gêneros da ordem Gigartinales (Gordon-Mills & Mc-Candless, 1975), estes compostos possuem inúmeras aplicações, podendo ser utilizados na indústria de laticínios, em estamparias, em cosméticos, em

cervejarias, pasta de dentes, dando consistência e como função suspensora de produtos abrasivos em líquidos e ceras (Oliveira *et al.*, 1992). Há também espécies que depositam em suas paredes carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (Oliveira, 2003).

As algas pertencentes à divisão Rhodophyta são, do ponto de vista econômico, as mais exploradas, pois, biossintetizam uma vasta variedade de polissacarídeos sulfatados como principais componentes da matriz intracelular (Usov, 1992). Esses polissacarídeos são utilizados em setores economicamente importantes, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas apresentando alto potencial biotecnológico, despertando interesse mundial, devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter & Rudolph, 1997).

Além da importância industrial, estes polissacarídeos têm despertado interesses na área biomédica, pois são promissores como compostos biologicamente ativos desempenhando atividade antiviral (Duarte *et al.*, 2001; Talarico *et al.*, 2004, 2005; Damonte *et al.*, 1996; Cáceres *et al.*, 2000) anticoagulante (Carlucci *et al.*, 1997; Farias *et al.*, 2000), antitrombótica (Sen *et al.*, 2002), antiangiogênica (Satoru *et al.*, 2003) e antitumoral (Fernandez *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 2004).

O principal produto de reserva das algas vermelhas é o amido das florídeas (rodamilo), que está armazenado no citoplasma. O amido das florídeas é uma molécula peculiar, que se assemelha à porção amilopectina do amido (Raven, 1990). É um polímero constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) e pontos de ramificação no carbono-6 similar à amilopectina (Painter, 1983).

1.2.1 *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva

Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex P. Silva (Figs. 1A e 1B) foi separada do gênero *Eucheuma* por Doty em 1987, pelas seguintes características: presença de carragenana *kappa*, cistocarpos hemisféricos inseridos diretamente nos eixos principais do talo e formação do eixo central a partir de células medulares organizadas em feixes (Areces, 1995). Possui colorido variado, são comuns as colorações vermelho escuro (Fig. 1B), marrons, amareladas ou diferentes tonalidades de verde (Fig. 1A).

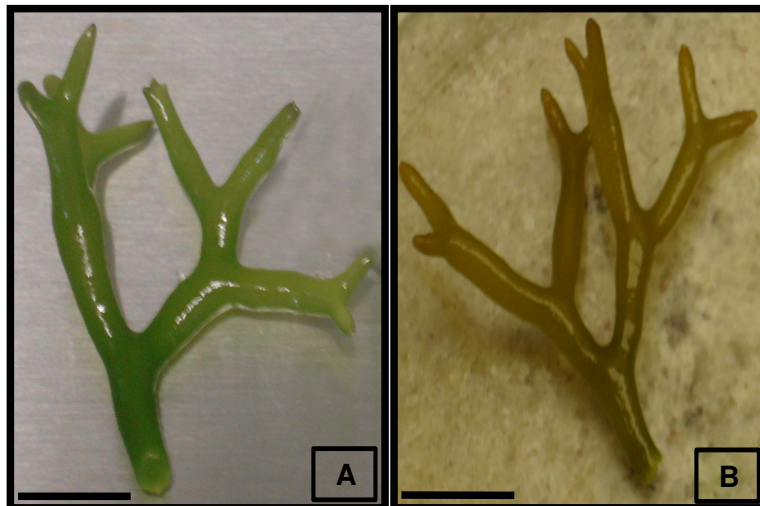


Figura 1: *Kappaphycus alvarezii* variante verde (1 A) e vermelha (1B). Escala: 3cm.

Possui grande interesse econômico devido à produção principalmente de carragenana *kappa*, um ficocolóide de ampla diversidade de aplicações na indústria alimentícia (laticínios, gelatinas, espessantes) (Paula & Pereira, 1998a), na preparação de rações para animais domésticos e peixes (De Mario & Ballester, 2004), e como agentes inibidores do vírus HPV (Human Papilloma Virus) (Buck *et al.*, 2006).

Os resíduos do processo de extração de carragenana de *K. alvarezii* possuem concentrações altas de potássio, e concentrações menores de sódio e fósforo, podendo ser utilizado como fonte adicional de minerais para a agricultura (De Mario & Ballester, 2004).

Kappaphycus alvarezii, foi descrita como *Eucheuma alvarezii* Doty, comercialmente é conhecida como “cotonii”. Apresenta uma grande relevância alimentícia em alguns países, principalmente em saladas e bioindicadores de poluentes ambientais como metais pesados (chumbo e cádmio) (Trono, 1998). É uma espécie perene, com alternância de três gerações no seu ciclo de vida: esporofítica, gametofítica e carposporofítica, sendo as duas primeiras isomórficas e a última parasita do gametófito feminino. Em meio natural, os órgãos de reprodução masculina são difíceis de serem reconhecidos (Areces, 1995).

É encontrada principalmente em ambientes recifais da região Indo-Pacífico, do Leste da África até Guam, China, Japão e ilhas do Sudeste Asiático (Doty, 1987; Areces, 1995).

No Brasil esta espécie foi introduzida em 1995 a partir de um ramo proveniente do USA Marine Institute University of Kochi, Japan. A linhagem é proveniente do cultivo experimental na Ilha de Shikohu, Japão e originária de cultivos comerciais das Filipinas. Foi propagada em cultura unialgal durante 10 meses no Laboratório de Algas Marinhas (USP) antes da transferência para o mar (Paula & Pereira, 1998; Paula *et al.*, 1998a).

Do tetrasporófito original, tetrasporófitos de colorações verde e vermelha surgiram espontaneamente e foram cultivados simultaneamente por propagação vegetativa (Paula *et al.*, 1998b).

A espécie *K. alvarezii* possui diversos estudos no Brasil, destacando os que estão sendo realizados no estado de São Paulo, no estado do Rio de Janeiro e iniciando em Santa Catarina (Florianópolis).

No estado de São Paulo já foram realizados os seguintes estudos no litoral de Ubatuba: a) macrofauna fital e influência na taxa de crescimento (Lopes, 2007, b) teor e propriedades de carragenanas (Hayashi, 2001; Hayashi *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2007), c) cultivo *in vitro* e taxas fotossintéticas (Erbert, 2001; Paula *et al.*, 2001), d) aspectos reprodutivos e biológicos (Contador, 2001; Bulboa & Paula, 2005), e) introdução no mar e maricultura (Paula, 2001; Paula & Pereira, 1998; Paula *et al.*, 1998a; 2002; Paula & Pereira, 2003), f) cultivo integrado com camarões e mexilhões (Lombardi *et al.*, 2001a; 2001b), g) seleção de linhagens (Paula *et al.*, 1999).

Enquanto no estado do Rio de Janeiro, na Baía de Sepetiba, foram realizados os seguintes trabalhos: a) epibiontes nas estruturas de cultivo de *K. alvarezii* na Baía da Sepetiba (Marroig, 2007), b) cultivo de *K. alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro: subsídios ao monitoramento ambiental da produção em escala industrial (Reis *et al.*, 2007), c) *K. alvarezii*: cultivo de algas no Rio de Janeiro permite a produção de carragena 100% nacional (Carvalho-Filho, 2007) e d) estudo sobre a dispersão da macroalga exótica *K. alvarezii*, em Cultivo Comercial na Baía da Sepetiba (Castelar, 2006).

Já em Santa Catarina, os trabalhos estão sendo realizados no LAMAR e cultivados em balsas flutuantes na Praia de Sambaqui-Florianópolis. Sendo orientados pela professora Dra. Zenilda Laurita Bouzon, pela Dra. Leila Hayashi e pelo professor Dr. Eurico Cabral de Oliveira (Comunicação pessoal).

A escolha de espécie *K. alvarezii* como modelo a ser estudado deve-se ao fato da espécie ser exótica e de grande relevância econômica. Esta espécie junto com *E. denticulatum* (N.L. Burman) F.S. Collins & Hervey correspondem por cerca de 70 % de toda a carragenana produzida mundialmente (Areces, 1995). A carragenana é amplamente utilizada na indústria alimentícia, como agente estabilizante e espessante em produtos derivados do leite e carne, entre outros. Também é largamente empregada em cosméticos e na indústria farmacêutica (Dawes *et al.*, 1974; Oliveira, 1997; Paula & Pereira, 1998).

A produção de brasileira de carragenana é esporádica e pequena a exploração limita-se a espécie *H. musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux no nordeste do país (Paula & Pereira, 1998). Oliveira (1990) propôs a introdução das espécies exóticas *Eucheuma* J. Agardh e *Kappaphycus* pela dificuldade na produção brasileira de carragenana e necessidade do mercado.

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

A distribuição do gás ozônio é contante na troposfera e aumenta com a altura na estratosfera, até uma região de concentração máxima, que pode variar pela latitude e estação do ano (London, 1985).

A concentração do ozônio na estratosfera é essencialmente gerada por processos físico-químicos e transporte meridional (Dobson, 1968; Godin *et al.*, 2000; e Basset & Gahein, 2000). Assim, a concentração deste gás é distinta conforme a latitude, altitude e sazonalidade e depende da variabilidade da circulação estratosférica.

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

em $O_2 + O$ por um fóton de radiação UV com comprimento de onda inferior a 320 nm. Desta forma, a camada de ozônio funciona como um filtro de parte da radiação ultravioleta (Okuno *et al.*, 1996).

Até o início da década de 70 não se pensava que a atividade humana poderia, de alguma forma, levar à destruição da camada de ozônio. Somente em 1974 foi proposto que uma classe de gases quimicamente inertes, largamente utilizada, conhecida como clorofluorcarbonetos (CFCs), era transportada para a estratosfera. Uma vez na estratosfera esses gases poderiam ser dissociados por fótons solares energéticos e liberar o cloro, o qual participaria da destruição do ozônio estratosférico (Molina & Rowland, 1974; Stolarski & Cicerone, 1975).

A descoberta do buraco de ozônio na Antártida, em meados dos anos 80, causou surpresa à comunidade científica que, até então, pensava compreender os processos físicos e fotoquímicos que controlam a produção e extinção de ozônio na atmosfera (Farman *et al.*, 1985). As primeiras observações da diminuição da camada de ozônio na Antártida indicam uma redução de 40 % a 50 % desse elemento na estação primaveril (Farman *et al.*, 1985; Stolarski *et al.*, 1986; Smith, 1992). Como essa redução foi restrita à região da Antártida, foi denominada de buraco na camada de ozônio. Essa diminuição apresentou curta duração e foi seguida por um rápido reestabelecimento. No entanto, a partir da década de 90, o aumento do buraco de ozônio e conseqüentemente da quantidade de radiação UV na superfície da Terra alcançou níveis incomuns, atingindo não apenas o continente antártico, mas também o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (Bianciotto *et al.*, 2003). O sul do Brasil, de forma semelhante a outros locais em latitudes médias e altas nos hemisférios norte e sul (Santee *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1996, 2000; Rousseaux *et al.*, 1999), têm sido exposto a um gradual incremento nos níveis de radiação ultravioleta (UV) que chega à superfície terrestre, resultante da diminuição da camada de Ozônio estratosférico que absorve toda a radiação solar ultravioleta C (UVC <280 nm) e parte das emissões de UVB (280-320 nm).

Com as observações realizadas nas últimas duas décadas, sobre a tendência global de redução do ozônio atmosférico e o fenômeno do buraco de ozônio antártico (Farman *et al.*, 1985; Solomon *et al.*, 1986) surgiu uma preocupação na comunidade científica quanto à possibilidade de haver um aumento na intensidade de radiação

ultravioleta (UV) solar na superfície terrestre. Atualmente há evidências de que efeitos do buraco de ozônio podem propagar-se a latitudes mais baixas e densamente povoadas (Kirchhoff, 1997). Conseqüentemente o interesse por mensurar a radiação UV solar, que incide na superfície terrestre, vem crescendo e muitas observações têm sido feitas nas comunidades possivelmente mais afetadas (Kirchhoff, 1997).

A diminuição da camada de ozônio resultou em aumento nos níveis da radiação ultravioleta na superfície da Terra. Alguns estudos indicam ainda que a diminuição da camada de ozônio também ocorre no hemisfério Norte, sobre o Ártico (Pearce, 1996).

Em Santa Catarina foi constatado que no decorrer dos últimos anos, a incidência da radiação ultravioleta aumentou consideravelmente (Kirchhoff, 1997).

A radiação ultravioleta faz parte do espectro eletromagnético e compreende ondas eletromagnéticas com comprimentos de 100 a 400 nm. É classificada em três grupos pela Comissão Internacional de Iluminação e pelos Fotobiologistas ambientais: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (Okuno *et al.*, 1996).

A redução de 1 % na camada de ozônio pode causar um aumento de 1,3 % a 1,8 % dos níveis de radiação UVB que atingem a superfície terrestre (Hollósy, 2001). Porém, os níveis de radiação fotossinteticamente ativa e UVA são relativamente insensíveis às variações na concentração de ozônio, enquanto que a radiação UVC é eficientemente absorvida pelas moléculas de oxigênio e ozônio antes de chegar à superfície terrestre (Okuno *et al.*, 1996).

Os efeitos da radiação UV podem ser perceptíveis em células ou até em ecossistemas, afetando ainda ciclos biogeoquímicos importantes. Muitos processos vitais dos produtores primários marinhos são afetados pela radiação ultravioleta, desde nível de moléculas até de comunidades (Zepp *et al.*, 1998). A faixa dos raios ultravioleta da radiação solar pode penetrar em profundidades consideráveis em regiões marinhas pelágicas e ecossistemas bentônicos (Franklin & Forster 1997; Häder *et al.*, 1998; Boelen *et al.*, 1999).

Conseqüentemente, no momento há uma grande preocupação sobre o possível impacto que a crescente radiação ultravioleta pode ter em ecossistemas naturais, especialmente nos sistemas marinhos (Worrest, 1982; Smith *et al.*, 1992; Prézelin *et al.*, 1994).

Pouco se conhece atualmente sobre os efeitos dessa radiação em algas marinhas. Alguns estudos (Talarico, 1996; Talarico & Maranzana 2000) sugerem que o espessamento da parede celular seja um mecanismo de defesa à exposição de radiação UV. Outros estudos apontam alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias (Poppe *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2006). Entretanto, não foi observado nenhum estudo com radiação UV na espécie *K. alvarezii*.

II-OBJETIVOS

2.1. Geral

- Conhecer os possíveis efeitos biológicos da radiação ultravioleta-B na fisiologia, bioquímica, morfologia e organização celular das variantes pigmentares verde e vermelha da macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

2.2. Específicos

- Avaliar as variações nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes ocasionados pela radiação ultravioleta-B;
- Analisar as alterações ultraestruturais causadas pela radiação ultravioleta-B;
- Comparar os efeitos biológicos da radiação ultravioleta-B entre as variantes verde e vermelha de *K. alvarezii*.

III. REFERÊNCIAS

ANGGADIREDJA, J.; ANDYANI, R.; HAYATI & MUAWANAH. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Journal of Applied Phycology**, **9**: 477-479.

ARECES A.J. 1995. Cultivo comercial de carragenófitas del género *Kappaphycus* Doty. *In*: ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (eds). **Manual de Metodos ficológicos**. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 529-549.

BASSET, H. A. & GAHEIN, A. 2000. "Diagnostic study on the relation between ozone and potencial vorticity". *In*: **Atmospheric Ozone, Proceeding of the Quadrennial Ozone Symposium**. Sapporo, Hokkaido University, Nasda, Japan, 305-306.

BIANCIOTTO, O. A.; PINEDO, L.B.; SAN ROMAM, N.A.; BLESSIO, A.Y & COLLANTES, M.B. 2003. The effects of natural UV-B radiation on a perennial *Salicornia* salt-mash in Bahia San Sebastián, Tierra del Fuego, Argentina:a 3-year field study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **70**: 177-185.

BOELEN, P.; OBERNOSTERER, A, I.; VINK, A. & BUMA, A. G. J. 1999. Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical Atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **69**: 34-40.

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

BULBOA, C.R. & PAULA, E.J. 2005. Introduction of non-native species of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in subtropical waters: comparative analysis of growth rates of *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* *in vitro* and in the sea in south-eastern Brazil. **Phycological Research**, **53**: 183-188.

BUCK, C.B.; THOMPSON, C.D.; ROBERTS, J.N.; MÜLLER, M. & LOWY, D.R. 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **PLoS Pathogness**, **2**:671-680.

CÁCERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUHIRO, B. & ZUÑIGA, E.A. 2000. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, **53**: 81-86.

CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B. & CERESO, A.S. 1997. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, **20**: 97-105.

CARVALHO- FILHO, J. 2007. *Kappaphycus alvarezii*. Cultivo de algas no Rio de Janeiro permite a produção de carragena 100% nacional. **Panorama da Aquicultura**, **1**:37-41.

CASTELAR, B, M. 2006. Estudo sobre a dispersão da macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva, em cultivo comercial na Baía da Sepetiba, RJ, Brasil. Monografia, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 45 pp.

CONTADOR, C.R.B. 2001. Aspectos reprodutivos e biológicos de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva e *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty (Gigartinales, Rhodophyta). Bases para introdução e cultivo de espécies exóticas no litoral brasileiro. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 84 pp.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S. & COTO, C.E. 1996. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemotherapy**, **42**: 57-64.

DAWES, C. J.1981. **Marine Botany**. New York, John Wiley & Sons. 628 pp.

DAWES, C.J.; MATHIESON, A.C. & CHENEY, D.P. 1974. Ecological studies of floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). I. Seasonal growth and reproduction. **Bulletin Marine Science**, **24**: 235-273.

DE MARIO, M. & BALLESTERO, S.D. 2004. Aplicação de resíduo do processamento industrial de alga marinha ao solo. **Revista Biociências de Taubaté**, **10**: 177-188.

DE RUITER, G. A. & RUDOLPH, B. 1997. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science Technology**, **8**: 389-395.

DOBSON, G.M.B. 1968. Ozone in the Atmosphere. *In*: DOBSON, G.M.B. **Exploring the Atmosphere**. Oxford: University Press. 111-136.

DOTY, M.S. 1987. The production and use of *Eucheuma*. *In*: DOTY, M.S.; CADDY, J.F. & SANTELICES, B. (eds). **Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources**. FAO Fisheries Technical Paper. 281: 123-161.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D; TULIO, S.; PUJOL, C.A.P. & DAMONTE, E.B. 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, **8**: 53-58.

ERBERT, C. 2001. Crescimento e taxas fotossintéticas da espécie de alga exótica produtora de carragenanas *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Rhodophyta, Gigartinales). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 79 pp.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S. & MOURÃO, P.A.S. 2000. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, **275**: 29299-29307.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G. & SHANKLIN, J. D. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. **Nature**, **315**: 207- 210.

FERNÁNDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V. & BELLO, J.L. 1989. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. **Carbohydrate Research**, **190**: 77-83.

FRANKLIN, L.A. & FORSTER, R.M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal of Phycology**, **323**: 207-232.

GANTT, E. 1981. Phycobilisomes. **Annual Review Plant Physiology**, **32**: 327-347.

GRAHAM, L.E. & WILCOX, L.W. 2000. **Algae**. First edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. 640 pp.

GODIN, S.; BERGERET, V.; BEKKI, S. & MÉGIE, G. 2000. "Study of the Antarctic ozone seasonal variation as a function of equivalent latitude". *In*: **Atmospheric Ozone, Proceeding of the Quadrennial Ozone Symposium**. Sapporo, Hokkaido University, Nasda, Japan, 119-120.

GORDO-MILLS, E.M. & Mc-CANDLESS, E.L. 1975. Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Stack (Rodophyta, Gigartinales). **Journal of Applied Phycology**, **4**: 275-281.

HÄDER, D.P.; KUMAR, H.D.; SMITH, R.C. & R. SMITH, R.C. 1998. Effects on aquatic ecosystems. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **46**: 53–58.

HAYASHI L. 2001. Extração, teor e propriedades de carragenana de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva, em cultivo experimental em Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 83 pp.

HAYASHI, L.; PAULA, E.J. & CHOW, F. 2007. Growth rates and carrageenan analysis of four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, **19**: 393-399.

HAYASHI, L.; OLIVEIRA, E.C.; BLEICHER-LHONNEUR, G.; BOULENGUER, P.; PEREIRA, R.T.L., von SECKENDORFF, R.; SHIMODA, V.T.; LEFLAMAND, A.; VALLÉE, P. & CRITCHLEY, A.T. 2006. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba Bay. **Journal of Applied Phycology**, **19**: 505-511.

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

HOLZINGER, A. & LÜTZ, C. 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Mícron**, **37**: 190–207

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

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; SCHUCH, N.J.; PINHEIRO, D.K. & HARRIS, J.M. 1996. Evidence for ozone hole perturbation at 30° South. **Atmospheric Environmental**, **30**: 1481-1488.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. 1997. **Ozônio e Radiação UV-B**. Transtec Editorial. São José dos Campos. 149 pp.

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

KRAFT, G.T. 1981. Rhodophyta: Morphology and classification. *In*: LOBBAN, C.S. & WYNNE, M. J. (eds.). **The Biology of Seaweeds**. Botanical Monographs 17, Oxford. Blackwell Scientific Publications. 6-51.

LEE, R.E. 1989. **Phycology**. 2 nd ed. New York: Cambridge University Press. 715 pp.

LIPPERT, H.; IKEN K.; RACHOR, E. & WIENCKE, C. 2001. Epifauna associated with macroalgae in the Kongsfjord. **Polar Biology**, **24**: 512-522.

LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1994. **Seaweed ecology and physiology**. First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 366 pp.

LOMBARDI, J.V.; MARQUES, H.L.A. & BARRETO, O.J.S. 2001a. Floating cages in open sea water: an alternative for promoting integrated aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, **32**: 47-50.

LOMBARDI, J.V.; MARQUES, H.L.A.; BARRETO, O.J.S.; GELLI, V.C.; PEREIRA, R.T.L. & PAULA, E.J. 2001b. Floating cages an alternative for growing the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in open sea water. **World Aquaculture Society**. Book of Abstracts. Florida. USA. 384 pp.

LONDON, J. 1985. The observed distribution of atmospheric ozone and its variations. *In*: WHITTEN, R. & PRASAD, S. (eds). **Ozone in the free atmosphere**. Van Nostrand Reinhold Co. Inc, New York. 11-80.

LOPES, E. S.F. 2007. A macrofauna fital de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva e sua influência na taxa de crescimento da alga em cultivo em Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 78 pp.

LUNING, K.1990. Seaweeds their environment, biogeography and ecophysiology. **Limnology and Oceanography**, **36**: 1066-1066.

MARROIG, R. G. 2007. Epibiontes nas estruturas de cultivo de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. Monografia, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 23 pp.

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

NORTON, T.A.; MELKONIAN, M. & ANDERSEN, R.A. 1996. Algal biodiversity. **Journal of Applied Phycology**, **35**: 308-326.

OKUNO, E.; NAKAJIMA, T.; YOSHIMURA, E. M.; HODO, F.; FAUSTO, A. M. F.; PAES, W. S.; UMISED, N. K. & OTSUBO, E S. 1996. Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Páscoa. **RBE. Caderno de Engenharia Biomédica**, **12**: 143-153.

OLIVEIRA, E.C. 1990. The rationale for seaweed cultivation in South América. *In*: OLIVEIRA, E.C. & KAUTSKY, N. (eds). **Cultivation of seaweeds in Latin America**. Universidade de São Paulo. Brazil. 135-141.

OLIVEIRA, E.C.; OLIVEIRA, M.C. & SAITO, R.M. 1992. Carragenanas: Algas polivalentes. **Revista Ciência Hoje**, **14**: 73.

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

OLIVEIRA, E.C. 2003. **Introdução a Biologia Vegetal**. 2. Ed. São Paulo: EDUSP- Editora da Universidade de São Paulo. 266 pp.

PAINTER, T.J. 1983. Algal Polysaccharides. *In*: ASPINALL, G. O (ed). **The polysaccharides**, 2: 195-285.

PAULA, E.J. & PEREIRA, R.T.L. 1998. Da "marinomia" maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, 8: 10-15.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L. & OSTINI, S. 1998a. Introdução de espécies exóticas de *Euclima* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica e experimental. *In*: PAULA, E.J.; CORDEIRO-MARINO, M.; SANTOS, D.P.; FUJII, M.T.; PLASTINO, E.M. & YOKOYA, N.S (eds.). **Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero-Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia**. Caxambú, MG. 340-357.

PAULA, E.J.; PLASTINO, E.M. & GUIMARÃES, M. 1998b. Pigment characterization of tetrasporophyte phase and tetraspore progeny of *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva (Rhodophyta, Solieriaceae). **XVIst International Seaweed Symposium**, Cebu, Phillipines. Abstract, programs & directory. 85 pp.

PAULA, E.J., PEREIRA, R.T.L. & OHNO, M. 1999. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal of Applied Phycology**, **11**: 111-121.

PAULA, E.J. 2001. Marinomia da alga exótica, *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta), para produção de carragenanas no Brasil. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo. 39 pp.

PAULA, E.J.; ERBERT, C. & PEREIRA, R.T.L. 2001. Growth rate of the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. **Phycological Research**, **49**: 155-161.

PAULA, E.J., PEREIRA, R.T.L. & OHNO, M. 2002. Growth rate of carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, **50**: 1-9.

PAULA, E.J. & PEREIRA, R.T.L. 2003 Factors affecting growth rates of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva (Rhodophyta, Solieriaceae) in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *In*: CHAPMAN, A.R.O.; ANDERSON, R.J.; VREEDLAND, V.J. & DAVISON, I.R. (eds). **Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium**. Cape Town. Oxford. Oxford University Press. 381-388.

PEARCE, F. 1996. Big freeze digs a deeper hole in ozone layer. **New Scientist**, **149**:7.

PREZELIN, B.B.; BOUCHER, N.P. & SMITH, R.C. 1994. Marine primary production under the influence of Antarctic ozone hole: Icecolors 90. *In*: WEILER, S.C. & PENHALE, P.A. Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. **Antarctic Research Series**, 159- 186.

POPPE, F.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. **Botanica Marina**, **45**: 253–61.

POPPE, F.; SCHMIDT, R. A. M.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. **Phycological Research**, **51**:11–19.

RAVEN, J.A. Carbon metabolism. 1990. *In*: COLE, K.M. & SHEATH, R.G. **Biology of the red algae**. 1ª Ed. New York: British Library. 171-201pp.

REIS, R. P.; BASTOS, M. & GOES, H. G. 2007. Cultivo de *Kappaphycus alvarezii* no litoral do Rio de Janeiro: subsídios ao monitoramento ambiental da produção em escala industrial. **Panorama da Aqüicultura**, **1**: 42 – 47.

ROUSSEAU, M.C.; BALLARÉ, CL.; GIORDANO, C.V.; SCOPEL, A.L.; ZIMA, A.M.; SWARCBERG-BRACCHITTA, M.; SEARLES, P.S.; CALDWELL, M.M. & DÍAZ, S.B. 1999. Ozone depletion and UVB radiation: impact on plant DNA damage in southern South America. **Proceedings of National Academic Sciences-United States America**, **96**: 15310-15315.

SANTEE, M.L.; READ, W.G.; WATERS, J.W.; FROIDEVAUX, G.L.; MANNEY, G.L.; FLOWER, D.A.; JARNOT, R.F.; HARWOOD, R.S. & PECKHAM, G.E. 1995. Interhemispheric differences in polar stratospheric HNO₃, H₂O, ClO, and O₃. **Science**, **267**: 849-852.

SATORU, K.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S. & SHIMENO, H. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemist Pharmaceutical**, **65**:173-179.

SEN, S.A.K.; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SIDDHANTA, A. K.; TAKANO, R.; KAMA, K. & HANA, R. 2002. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). **Botanica Marina**, **45**: 331-338.

SMITH, R. C.; PREZELIN, B. B.; BAKER, K. S.; BIDIGARE, R. R.; BOUCHER, N. P.; COLEY, T.; KARENTZ, D.; MACINTYRE, S.; MATLICK, H. A.; MENZIES, D.; ONDRUSEK, M.; WAN, Z. & WATERS, K. J. 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. **Science**, **255**: 952-959.

SOLOMON, S.; GARCIA, R. R.; ROWLAND, F. S. & WUIBBLES, D.J. 1986. On the depletion of Antarctic ozone. **Nature**, **321**: 755-758.

SOUTH, G.R. & WHITTICK, A. 1987. **Introduction to Phycology**, First publication. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 341 pp.

STOLARSKI, R. S. & CICERONE, R. J. 1974. Stratospheric Chlorine: a Possible Sink for Ozone. **Canadian Journal Chemistry**, **52**: 1610–1615.

STOLARSKI, R.S.; KRUEGER, A.J.; SCHOEBERL, M.R.; MCPETERS, R.D.; NEWMAN, P.A. & ALPERR, J.C. 1986. "Nimbus-7 satellite measurements of the springtime Antarctic ozone decrease". **Nature**, **322**: 808-811,

TALARICO, L. 1996. Phycobiliproteins and Phycobilissomes in red algae: adaptative respostes to light. **Science Marine**, **60**: 205-222.

TALARICO, L. & MARANZANA, G. 2000. Light and adaptative responses in red macroalgae: an overview. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **56**:1-11.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A. & DAMONTE, E.B. 2004. Anti-herpes simplex vírus activity of sulfated galactns from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, **34**: 63-71.

TALARICO L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R. & DAMONTE, E.B. 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, **66**: 103-110.

TRONO, G.C. 1998. The seaweed resources of the Philippines. *In*: OHNO, M. & CRITCHLEY, A.T. (eds). **Seaweed Cultivation and Marine Ranching**. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan. 47-60.

USOV, A.I. 1992. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloid**, **6**: 9-23.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G. & JAHNS, H. M. 1989. **ALGAE: An introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press. 627 pp.

WOELKERLING, W. 1990. An Introduction. *In*: COLE, K.M.; SHEATH, R.G. **Biology of the red algae**. Cambridge: Cambridge University Press. 1-6.

WORREST, R.C. 1982. Review of Literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. *In*: CALKINS, J. (ed). **The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems**. Plenum Press, New York. 429-457.

WYNNE, M. J. 2005. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision**. Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia. 152 pp.

ZEPP, R.G.; CALLAGHAN, T.V. & ERICKSON, D.J. 1998. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **46**: 69-82.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y. & XU, Z. 2004. In vivo antitumoral and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, **50**: 47-53.

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

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NA FISIOLOGIA DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES E NA TAXA DE CRESCIMENTO DA VARIANTE PIGMENTAR VERDE E VERMELHA DE *Kappaphycus alvarezii* (DOTY) DOTY EX P. SILVA (GIGARTINALES)

I. INTRODUÇÃO

A diminuição da camada de ozônio atmosférico têm ocasionado aumento no fluxo da radiação ultravioleta - B (RUVB) sobre a superfície terrestre (Kerr & McElroy, 1993) e nos sistemas aquáticos (Villafañe *et al.*, 2003). Porém, conhecimentos sobre a adaptação, a proteção e mecanismo de reparo, e mais importantes estudos de campo, sugerem que os efeitos, em longo prazo, da RUVB, na produtividade primária, possam ser menos prejudiciais que anteriormente pensado (Vincent & Roy, 1993; Searles *et al.*, 2001).

Muitas macroalgas marinhas crescem em águas rasas das zonas costeiras, onde as mudanças ambientais podem ocorrer rapidamente. Especialmente as algas intermareais que são expostas a fatores de estresse, tais como: mudança na irradiância, salinidade, temperatura e dessecação (Frank & Cogdell, 1993).

Os pigmentos fotossintetizantes são essenciais na captação da radiação solar, a qual será convertida à energia química para a formação de carboidratos a partir do dióxido de carbono. Nas algas vermelhas, os principais pigmentos são: a clorofila *a* (Cl. *a*) e clorofila *d* (Cl. *d*) e as ficobiliproteínas (Gantt, 1990; Sinha *et al.*, 1995). As ficobiliproteínas são pigmentos acessórios que auxiliam na absorção dos comprimentos de onda entre 450 a 660 nm (Sinha *et al.*, 1995).

Mudanças induzidas pelos raios ultravioleta na química ou na quantidade de pigmentos nas algas podem alterar as relações entre alga-herbívoros (Cronin & Hay, 1996; Pavia *et al.*, 1997; Rozema *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstram fortes

reduções nas atividades primárias em ecossistemas terrestres e ecossistemas aquáticos de baixo de elevadas concentrações de RUVB (Searles *et al.*, 2001). Esta redução pode mudar a composição de espécies num determinado ecossistema (Häder *et al.*, 1998).

Muitos processos bioquímicos e fisiológicos tais como o crescimento, a sobrevivência, a síntese de pigmentos, substâncias fotoprotetoras, a produção de oxigênio, mobilidade, metabolismo de nitrogênio e captação e assimilação de gás carbônico, são relatados como alvos suscetíveis da RUVB (Häder *et al.*, 1998; Bischof *et al.*, 2002).

Avaliar o efeito da RUVB nas algas fotossintetizantes é crucial para entender o fluxo de carbono nos oceanos em um contexto de mudança climática global (Häder & Worrest, 1991). A diminuição na produtividade do fitoplâncton pelo aumento da RUVB pode ser devido à efeito direto do sistema de assimilação de carbono (Lesser *et al.*, 1994), assimilação de nitrogênio (Buma *et al.*, 1993; Häder & Liu, 1990), dano no DNA (Buma *et al.*, 1993) ou ainda por inibição da mobilidade (Häder & Liu, 1990).

A radiação UVA pode exercer um efeito nocivo no processo fotossintético (Cullen *et al.*, 1992). No entanto, alguns pesquisadores observaram benefícios da radiação UVA na fisiologia da alga, induzindo processos fotobiológicos como a atividade fotoprotetora para reparar danos ao DNA (Buma *et al.*, 1997) ou estimulando a atividade da enzima nitrato redutase (Viñepla, 2000).

Por viverem em ambientes com intensas interações biológicas e condições abióticas extremas, as algas têm a capacidade de desenvolver estratégias de defesa que resultam na produção de um elevado número de compostos químicos, a partir de diferentes rotas metabólicas (Barros *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, a radiação ultravioleta atua evolutivamente como uma pressão seletiva de mecanismos de proteção e/ou reparo contra estes danos possibilitando que as algas sobrevivam e se reproduzam (Karsten *et al.*, 1998, Korbee Peinado *et al.*, 2004).

Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de radiação UV é a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micospolina e os carotenóides (Sommaruga, 2001, Sonntag *et al.* 2007).

A sensibilidade diante da RUVB varia segundo as espécies e as fases da vida afetadas (Dring *et al.*, 1996). No entanto, existem mecanismos de proteção e reparação da exposição à radiação ultravioleta. Contra os danos fotoquímicos, fotoreatividade do DNA, reparação da cisão nucleotídica e recombinação do DNA (van de Poll *et al.*, 2001), a acumulação de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis e atividade de enzimas antioxidantes.

Com a finalidade de ampliar o conhecimento dos possíveis efeitos biológicos da RUVB o presente estudo teve-se como objetivos: 1) avaliar as variações nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes ocasionados pela RUVB e 2) verificar a taxa de crescimento dos segmentos apicais expostos a RUVB.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e processamento do material biológico

Os segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii* utilizados nos diferentes experimentos foram obtidos do banco de germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), e não foi necessária a aclimatação.

2.2 Condições de cultivo

A irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) ao dia foi de 704 kJ/m^{-2} (Li-cor light meter 250, United States of America, USA). A temperatura foi de $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e o fotoperíodo de 12 horas, sendo que o período de luz iniciava às 8 horas da manhã, com aeração contínua. A água do mar utilizada foi esterilizada em banho Maria por 1 hora. Após seu completo resfriamento, essa água foi enriquecida com o meio von Stosch (Edwards, 1970).

Os segmentos apicais com peso de aproximadamente $0,50 \text{ g}$ ($\pm 0,05 \text{ g}$), das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii* foram cultivados em béqueres de 250 mL no laboratório, em câmara de cultivo (Fig.1) por um período de 4 semanas (28 dias), tanto o controle (sem radiação UVB, somente a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) quanto o tratamento (com radiação UVB +PAR). O meio de cultivo foi de 200mL água do mar esterilizada com 4% de meio von Stosch, salinidade de 34 ups (± 1 ups) (unidade padrão de salinidade).

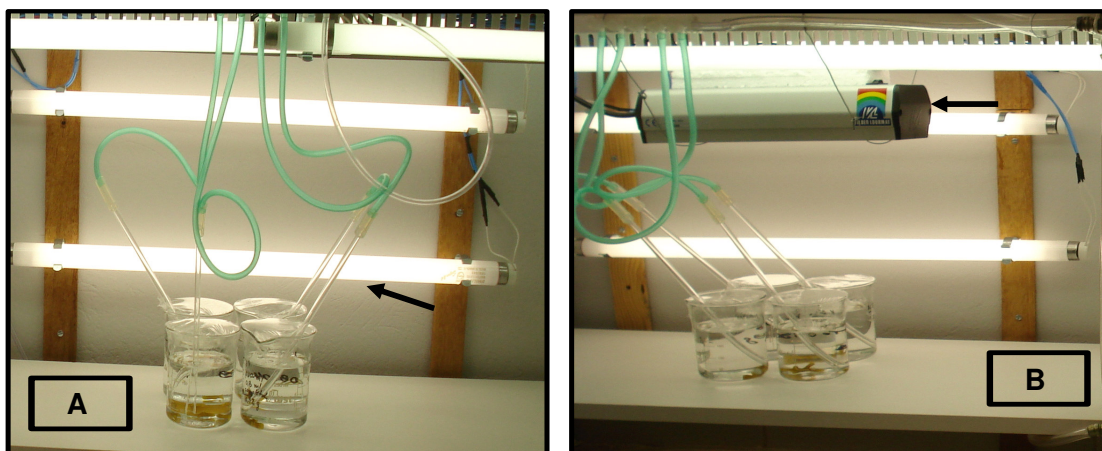


Figura 1: Câmara de cultura de *K. alvarezii*. Figura A é o controle com PAR (seta). E figura B é o tratamento com a RUVB + PAR lâmpada UVB (seta).

A radiação UVB artificial foi fornecida pela lâmpada (Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée, France), que emite o comprimento de onda de 312 nm e irradiância de $1,2 \text{ kJ/m}^{-2}$ e possui acoplado um filtro para os demais comprimentos de onda. A exposição à radiação UVB foi de três horas por dia (iniciando ao 12:00 h e terminando as 15:00 h). Durante a exposição, a aeração foi aumentada no tratamento e no controle

para que os fragmentos movimentam-se de forma constante, de forma a expor todos os ramos. Sendo assim, todos os fragmentos receberam a mesma intensidade de radiação. Foi realizado um rodízio com béqueres aleatoriamente, para que todos os béqueres recebem a mesma intensidade luminosa. Concomitante a radiação UVB receberam a PAR, através das lâmpadas fluorescentes (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil). Estas lâmpadas fornecem a luz similar a natural.

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

Os meios de cultura foram renovados semanalmente. Foram utilizadas quatro repetições para cada espécime (n=4).

2.3 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento das variantes pigmentares dos controles e dos expostos a RUVB de *K. alvarezii* foi avaliado através de medidas de peso da matéria fresca semanalmente durante as 4 semanas de tratamento. As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculadas segundo a seguinte fórmula de Penniman *et al.*, 1986. Sendo a taxa de crescimento calculada através da fórmula:

$$Tcm = [(Mf / Mi)^{1/t} - 1] * 100$$

Taxa de crescimento (Tcm) % dia⁻¹

Massa final (Mf) em gramas

Massa inicial (Mi) em gramas

Tempo (t) em dias

2.4 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes

2.4.1 Extração e Dosagem de Clorofila *a*

A extração de clorofila *a* dos talos foi realizada utilizando o método de Hiscox & Israelstam (1979). A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 100 mg de massa fresca para cada repetição. Os talos foram acrescidos com 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a clorofila foi extraída na solução sem macerar a 65° C por 30 minutos. O extrato líquido foi completado o volume para 3mL da solução de DMSO. Todo o processo foi realizado no escuro, a 4° C.

A dosagem de clorofila *a* foi realizada com 3 mL das amostras e transferidas para cubetas de vidro de 10 mm, para leitura em espectrofotômetro Shimadzu 2301.

A calibragem do aparelho foi realizada com solução de DMSO. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se as absorbâncias no intervalo de 190 a 750 nm (UV-visível) com varredura de 1 segundo.

A determinação da concentração de clorofila *a* foi feita utilizando-se a equação descrita por Jeffrey & Humphrey (1975):

$$Cl-a = 11,85 A_{664} - 1,54 A_{647} - 0,08 A_{630}$$

Nas fórmulas descritas, a unidade foi µg/mL. Os valores obtidos foram convertidos em µg/g de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

2.4.2 Extração e Dosagem das Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 100 mg de massa fresca para cada repetição. Todo o processo foi realizado no escuro a 4° C.

Essas amostras foram maceradas até a formação de um pó fino em almofariz, com o auxílio de nitrogênio líquido. O pó diluído em um total de 4 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5. A solução foi centrifugada a 44000 xg por 20 minutos. O

sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi retirado e mantido em tubos de ensaio vedados, até a leitura em espectrofotômetro.

A calibragem do aparelho foi realizada com soluções de tampão fosfato. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se no intervalo de 190 a 750 nm (UV-visível) com varredura de 1 segundo.

A concentração de ficobiliproteínas foi determinada usando as equações descritas por Kusar *et al.*, (1983):

$$\text{AFC (aloficocianina)} = 181,3 A_{651} - 22,3 A_{614};$$

$$\text{FC (ficocianina)} = 151,1 A_{614} - 99,1 A_{651}$$

$$\text{FE (ficoeretrina)} = 155,8 A_{498,5} - 40,0 A_{614} - 10,5 A_{651}$$

Nas fórmulas descritas, a unidade foi $\mu\text{g/mL}$. Os valores obtidos foram convertidos em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividido pela biomassa fresca da amostra. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

2.5 Análise e interpretação dos dados

Os dados foram submetidos à análise da variância-bifatorial ANOVA, seguida do teste *a posteriori* de Tukey para verificar a significâncias das diferenças ($p < 0,05$) entre as médias das taxas de crescimento e concentrações de pigmentos entre os tratamentos com radiação UVB + PAR e seus respectivos controles. Todas as análises foram realizadas no Programa *Statistica* (versão 6.0).

III. RESULTADOS

3.1 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais de *K. alvarezii* expostos a RUVB

A RUVB provocou alterações nas taxas de crescimento e na morfologia dos segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii*. As alterações morfológicas ocorreram na região apical dos talos. Nos talos irradiados quando comparados com as amostras dos talos do controle, ocorreu a curvatura na região apical onde normalmente se dá o crescimento e a dicotomia (Figs. 2 e 3).

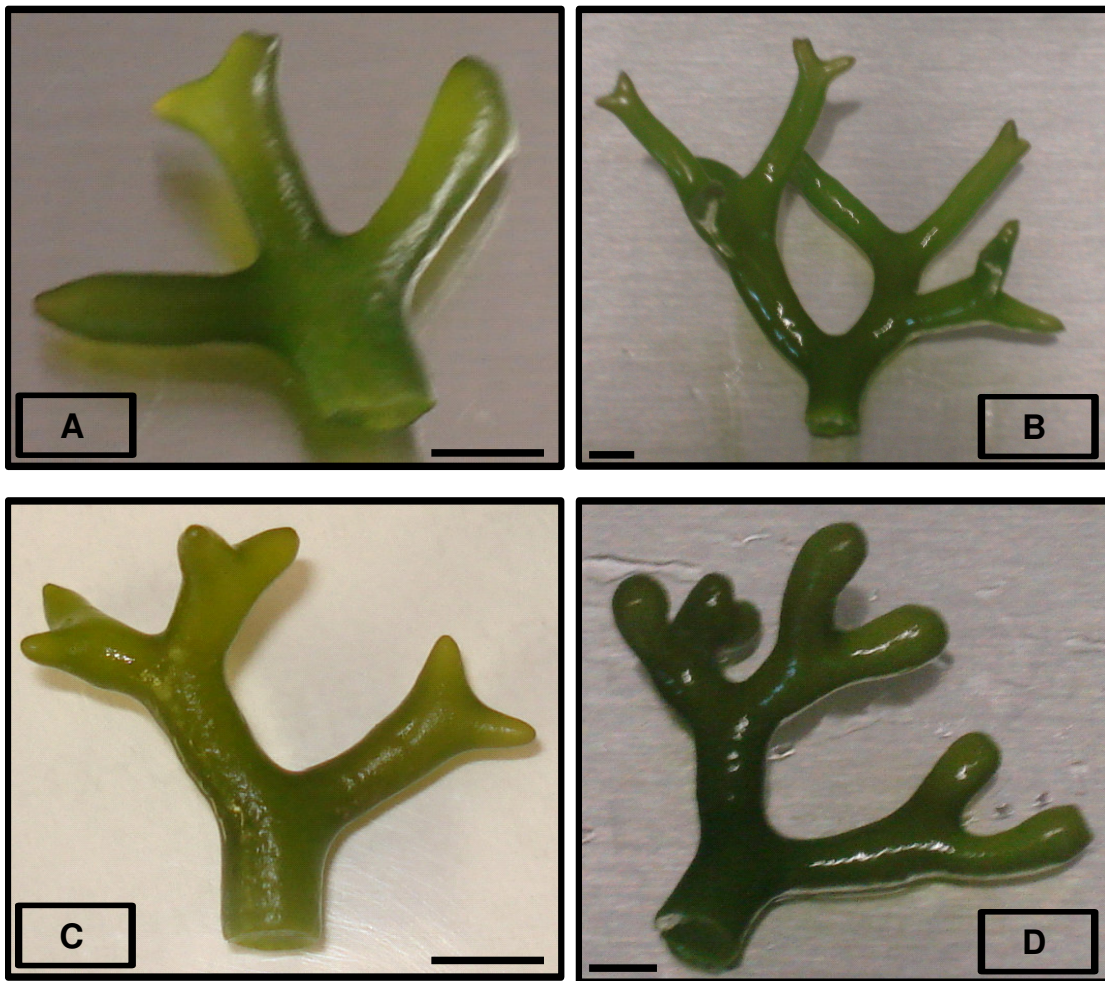


Figura 2: Aspectos dos segmentos apicais de *Kappaphycus alvarezii* variante verde. Sendo que **A** é o controle com PAR na primeira semana do experimento e **B** na quarta semana de experimento. E **C** é o tratamento com a RUVB + PAR na primeira semana do experimento e **D** na quarta semana de experimento. Escala: 5 cm.

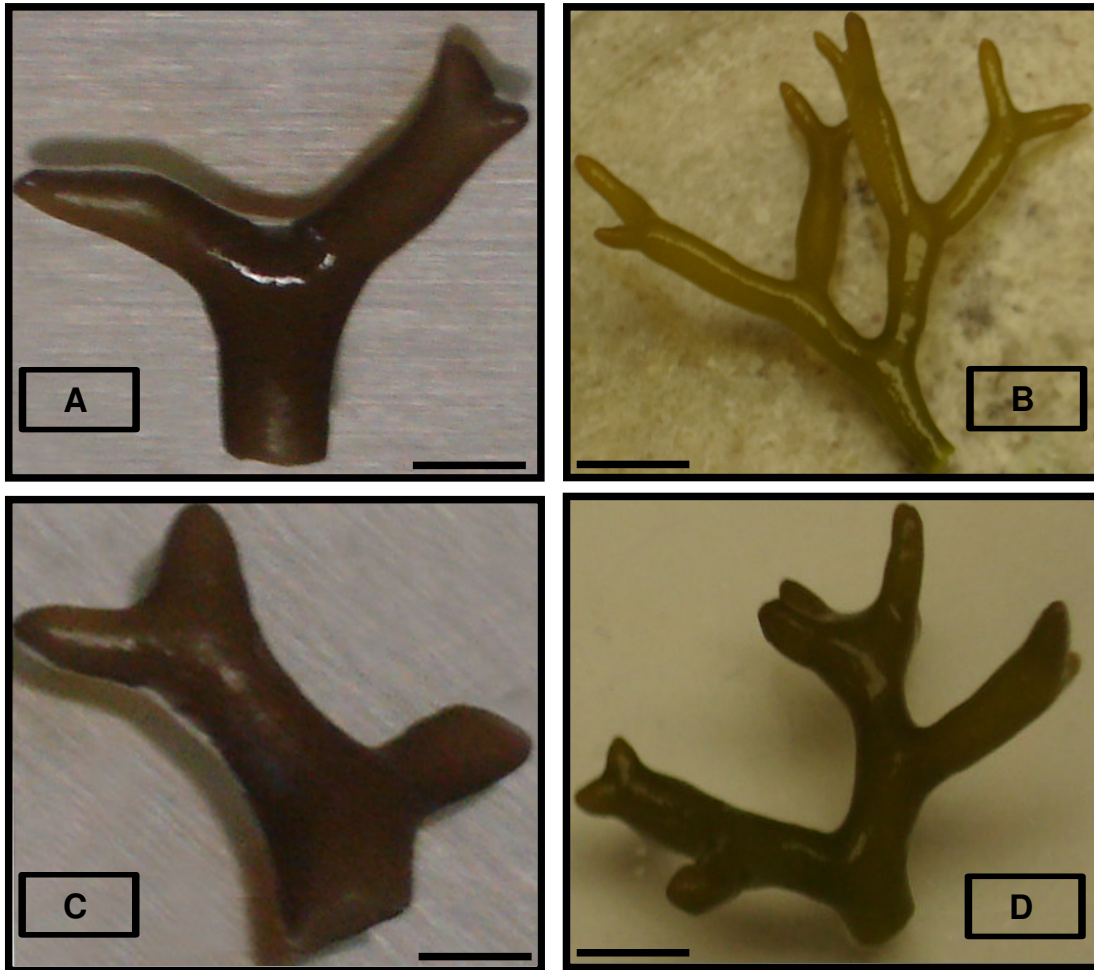


Figura 3: Aspectos dos segmentos apicais de *Kappaphycus alvarezii* variante vermelha. Sendo que **A** é o controle com PAR na primeira semana do experimento e **B** na quarta semana de experimento. E **C** é o tratamento com a RUVB + PAR na primeira semana do experimento e **D** na quarta semana de experimento. Escala: 5 cm.

Estas alterações morfológicas nos segmentos apicais expostos a RUVB, são visíveis nas duas variantes a partir do término da segunda semana de cultivo e início da terceira semana de cultivo quando se verificou o encurvamento (Fig. 4).

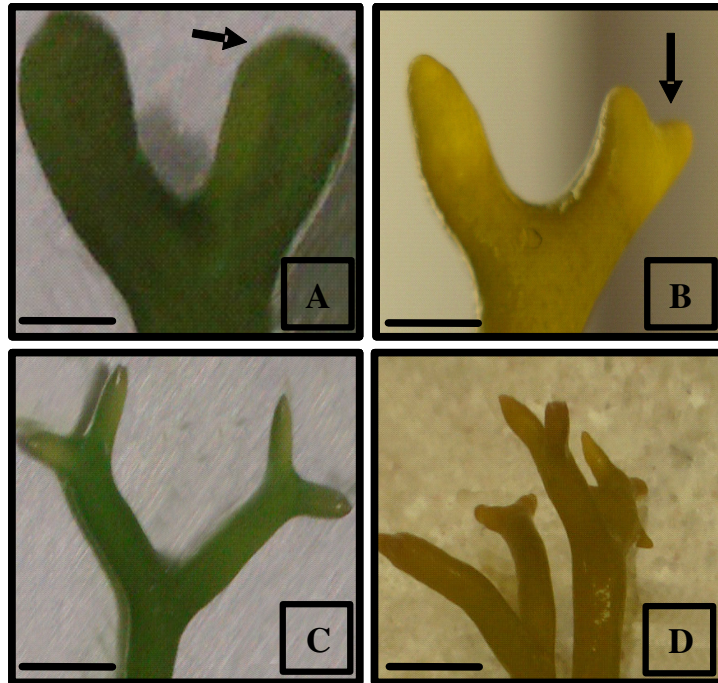


Figura 4: Aspectos dos segmentos apicais das duas variantes (verde e vermelha) de *Kappaphycus alvarezii*. Sendo que **A** e **B** são os tratamentos com a RUVB + PAR. Observe a curvatura dos ápices (setas) das variantes (verde e vermelha). Enquanto **C** e **D** são os controles com a PAR. Observe a dicotomia dos segmentos apicais das duas variantes (verde e vermelha) do controle. Escala: 2 cm.

Os segmentos apicais da variante vermelha exposta a RUVB, além da curvatura, apresentam um processo de despigmentação e necrose parcial de alguns ápices (Fig. 5). A despigmentação ocorreu no término da terceira semana de cultivo e início da quarta semana de cultivo. Como consequência da necrose ocorreu declínio na taxa de crescimento por perda de massa fresca.

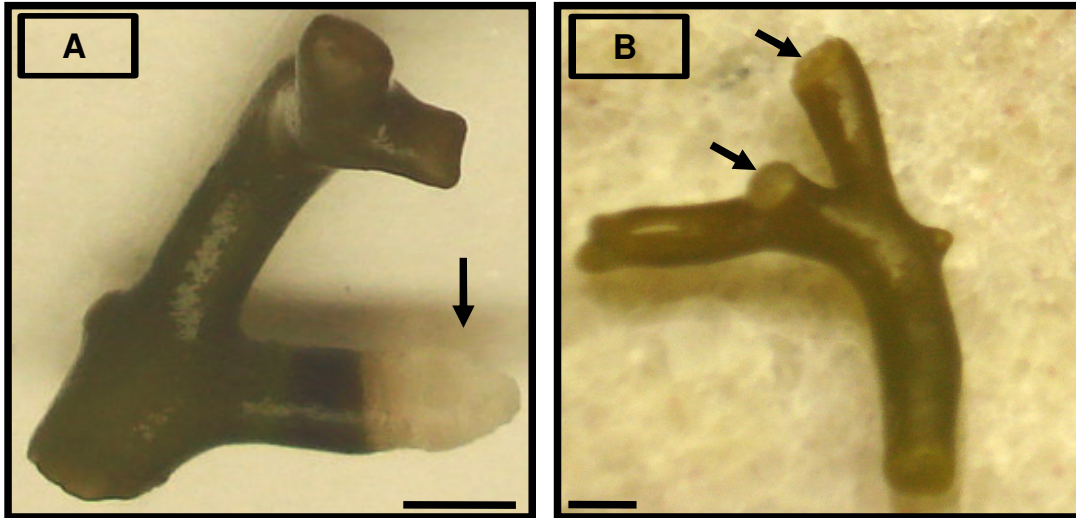


Figura 5: Aspectos dos segmentos apicais da variante vermelha *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Sendo que **A** o segmento que apresentou o branqueamento do ápice (seta) e **B** o segmento que apresentou a necrose (setas). Escala: 2 cm.

As taxas de crescimento dos segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) do controle e dos expostos a RUVB são apresentadas nas figuras 6 e 7.

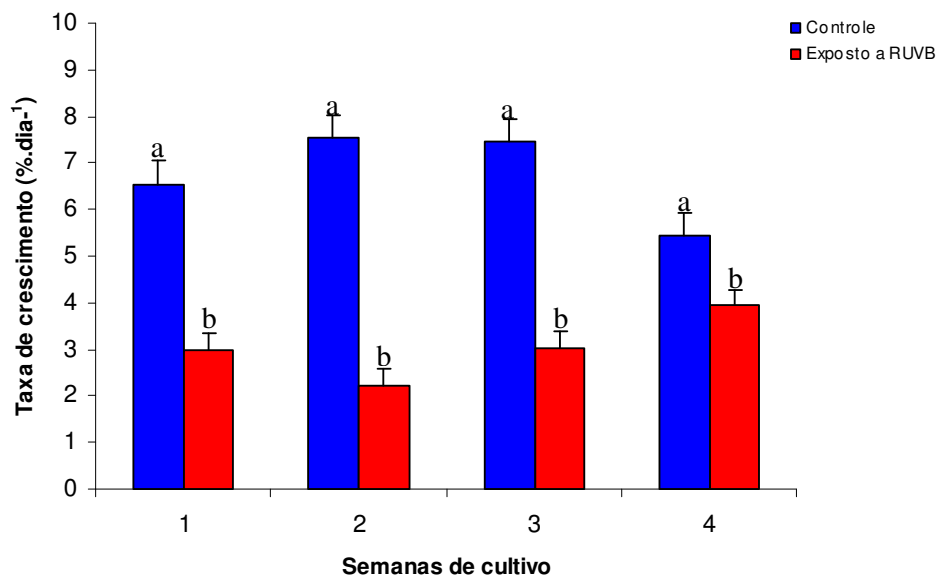


Figura 6: Taxas de crescimento dos segmentos apicais do controle e dos segmentos apicais expostos a RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). As barras verticais representam o cálculo do erro padrão. As letras distintas e minúsculas significam as diferenças entre o controle e exposto a RUVB, segundo o teste *a posteriori* de Tukey.

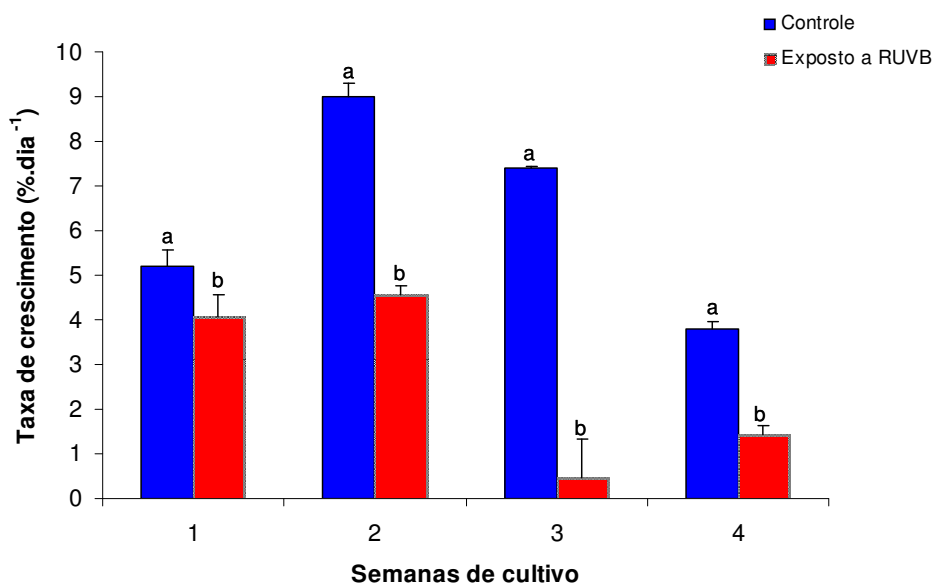


Figura 7: Taxas de crescimento dos segmentos apicais do controle e dos segmentos apicais expostos a RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). As barras verticais representam o cálculo do erro padrão. As letras distintas e minúsculas significam as diferenças entre o controle e exposto a RUVB, segundo o teste *a posteriori* de Tukey.

Na primeira semana do experimento, as duas variantes do controle apresentaram uma taxa diária de crescimento superior quando comparado com as variantes expostas à RUVB. A variante verde cresceu 6,55 % dia⁻¹ enquanto que o exposto cresceu 2,99 % dia⁻¹, já os controles da variante vermelha cresceram 5,21 % dia⁻¹ e o exposto cresceram 4,05 % dia⁻¹ (n=4).

Na segunda semana de cultivo os segmentos apicais do controle das duas variantes apresentam a maior taxa de crescimento (a variante verde cresceu 7,54 % dia⁻¹ e a variante vermelha cresceu 8,99 % dia⁻¹). Os segmentos apicais expostos à RUVB da variante vermelha apresentaram um aumento na taxa de crescimento em relação à primeira semana (4,56 % dia⁻¹). Enquanto a variante verde exposta à RUVB apresentou um decréscimo na taxa de crescimento (2,22 % dia⁻¹).

A partir da terceira e quarta semana houve um decréscimo na taxa de crescimento dos segmentos apicais do controle nas duas variantes (variante verde 7,45 % dia⁻¹ para 5,45 % dia⁻¹ na quarta semana e a variante vermelha 7,38 % dia⁻¹ para 3,81 % dia⁻¹).

A variante verde exposta à RUVB na terceira semana apresentou crescimento de 2,22 % dia⁻¹ para 3,01 % dia⁻¹. Contudo, a variante vermelha exposta à RUVB na segunda semana apresentou uma alta de taxa de crescimento (4,56 % dia⁻¹) comparado com a variante verde. Na terceira semana esta variante apresentou uma despigmentação e uma necrose parcial dos ápices. Estes processos levaram a perda de massa fresca e uma diminuição da taxa de crescimento de 4,56 % dia⁻¹ para 0,45 % dia⁻¹.

Na quarta e última semana de cultivo, os segmentos expostos à RUVB apresentaram um aumento na taxa de crescimento diário (variante verde 3,94 % dia⁻¹ e variante vermelha 1,42 % dia⁻¹).

A análise de variância-bifatorial das taxas de crescimento diário dos segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) *K. alvarezii*, calculadas a partir das massas frescas, apresentou diferenças significativas quando comparadas às taxas de crescimento do controle e os segmentos apicais expostos a RUVB (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=32). Variáveis: (1) taxa de crescimento e (2) controle/tratamento e semanas. **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância (p< 0,05).

Efeito	Graus liberdade	F	p
(1)	24	234,51	0,0000
(2)	24	0,955	0,429
(1) / (2)	24	11,29	0,000082

Tabela 2: Análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=32). Variáveis: (1) taxa de crescimento e (2) controle/tratamento e semanas. **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância (p< 0,05).

Efeito	Graus liberdade	F	p
(1)	24	158,42	0,0000
(2)	24	36,49	0,0000
(1) / (2)	24	15,98	0,000006

Quando detectadas diferenças significativas o teste *a posteriori* de Tukey foi utilizado para determinar as médias significativas com valores menores que 0,05. (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=32). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Controle/tratamento	0,000152

Tabela 4: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=32). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Controle/tratamento	0,000152

O teste *a posteriori* de Tukey aplicado para determinar as diferenças significativas das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) *K. alvarezii* do controle e do tratamento foram a 0,000152 ao nível de significância.

Entretanto, quando realizado o teste *a posteriori* de Tukey para comparar as quatro semanas de cultivo do controle e do tratamento, não há diferenças significativas para a variante verde. (Tabela 5).

Tabela 5: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial comparação das quatro semanas de cultivo das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch. Valores apresentados em médias (n=32). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Semanas	1	2	3	4
1		0,988	0,546	0,996
2	0,988		0,739	0,947
3	0,546	0,739		0,417
4	0,996	0,947	0,417	

Por outro lado, na variante vermelha há diferenças significativas ao longo das quatro semanas de cultivo (Tabela 6).

Tabela 6: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância-bifatorial comparação das quatro semanas de cultivo das taxas de crescimento do controle e do tratamento da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch. Valores apresentados em médias (n=32). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Semanas	1	2	3	4
1		0,000246	0,75334	0,000359
2	0,000246		0,000174	0,000161
3	0,75334	0,000174		0,000270
4	0,000359	0,000161	0,000270	

3.2 Efeito da radiação nos pigmentos fotossintetizantes nos segmentos apicais dos expostos a RUVB das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K.alvarezii*

A RUVB promoveu diferenças nas concentrações de todos os pigmentos fotossintetizantes analisados (*Cl.a*, AFC, FC e FE) como também nas razões entre os pigmentos.

Os segmentos apicais dos indivíduos controle e dos expostos à RUVB das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* apresentaram alterações na concentração de *Cl.a*. Nas duas variantes foi observada maior concentração de *Cl.a* nos segmentos apicais expostos à RUVB, em comparação com os segmentos apicais do controle que foram cultivados somente com PAR.

As amostras dos indivíduos da variante verde do controle apresentaram concentração de *Cl.a* de 0,094 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca, enquanto os expostos à RUVB evidenciaram um teor médio superior de *Cl.a*, i.e., 0,102 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca. Entretanto, a variante vermelha apresentou a menor concentração de *Cl.a* comparada à variante verde. O controle evidenciou a concentração de 0,071 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca e os segmentos expostos à RUVB 0,085 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Médias da concentração e erro padrão de Cl. *a* ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	Cl. <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,093 \pm 0,006
Exposto a RUVB	0,102 \pm 0,001

Tabela 8: Médias da concentração e erro padrão de Cl. *a* ($\mu\text{g/g}$ massa fresca) da variante pigmentar vermelha de *Kappaphycus alvarezii* exposta a RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	Cl. <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,071 \pm 0,003
Exposto a RUVB	0,085 \pm 0,002

A análise de variância unifatorial da concentração de Cl. *a* da variante verde de *K. alvarezii* não indicou diferenças significativas para os valores de concentração de Cl.*a* do controle e segmentos apicais expostos à RUVB (Tabela 9). Entretanto, a variante vermelha apresentou diferenças significativas quando comparada à concentração de Cl. *a* do controle e dos segmentos apicais expostos à RUVB (Tabela 10). A partir das diferenças significativas detectadas (ANOVA), foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey para determinar as médias significativamente discrepantes ($p < 0,05$, Tabela 11).

Tabela 9: Análise da variância unifatorial da concentração de Cl. *a* dos tratamentos controle e de exposição à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Clorofila <i>a</i>	6	1,75	0,233

Tabela 10: Análise da variância unifatorial da concentração de Cl. *a* dos tratamentos controle e de exposição à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Clorofila <i>a</i>	6	10,04	0,019

Tabela 11: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referente à análise da variância unifatorial da concentração de Cl. *a* dos indivíduos controle e expostos à RUVB, da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii* cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Clorofila <i>a</i>	0,0195

Para a variante verde de *K. alvarezii* os segmentos do controle apresentaram concentrações de ficobiliproteínas superiores (0,111 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca) ao observado para as amostras de segmentos expostos à RUVB (0,034 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca). A FC apresentou uma grande redução na sua concentração, i.e., 0,060 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca no controle, para 0,006 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca nos expostos à RUVB. No entanto, a FE foi a ficobiliproteína em maior concentração no controle da variante verde (0,126 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca), enquanto os indivíduos exposto à RUVB apresentaram teores inferiores (0,047 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca - Tabelas 12, 13 e 14).

Tabela 12: Médias da concentração e erro padrão de AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,111 \pm 0,0004
Exposto a RUVB	0,034 \pm 0,0002

Tabela 13: Médias da concentração e erro padrão de FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,060 \pm 0,0004
Exposto a RUVB	0,006 \pm 0,0002

Tabela 14: Médias da concentração e erro padrão de FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar verde de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Exposto a RUVB	0,047 \pm 0,0002
Tratamento	FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,126 \pm 0,0004

A variante vermelha também apresentou concentrações superiores de ficobiliproteínas nos segmentos do controle, quando comparados às amostras expostas à RUVB. As concentrações de AFC foram 0,226 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca no controle e de 0,180 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca do exposto à RUVB. Já a concentração de FC foi de 0,090 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca no controle e de 0,040 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca no tratamento exposto à RUVB. Por sua vez, a FE mostrou ser a fração de maior concentração dentre as três ficobiliproteínas em análise, alcançando valores médios de 0,262 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca do controle e 0,192 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca nos exposto a RUVB, (Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 15: Médias da concentração e erro padrão de AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	AFC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,226 \pm 0,0004
Exposto a RUVB	0,180 \pm 0,002

Tabela 16: Médias da concentração e erro padrão FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	FC ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,090 \pm 0,0002
Exposto a RUVB	0,040 \pm 0,0002

Tabela 17: Médias da concentração e erro padrão de FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP) da variante pigmentar vermelha de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB. Valores apresentados em médias. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	FE ($\mu\text{g/g}$ massa fresca \pm EP)
Controle	0,262 \pm 0,0005
Exposto a RUVB	0,192 \pm 0,0005

As três ficobiliproteínas da variante verde apresentaram diferenças significativas quando comparadas à concentração do controle e dos segmentos apicais expostos à RUVB (Tabelas 18, 19 e 20).

Tabela 18: Análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Aloficocianina	6	19.096	0,0000

Tabela 19: Análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Ficocianina	6	17.496	0,0000

Tabela 20: Análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Ficoeretrina	6	43.611	0,0000

A partir das diferenças significativas detectadas (ANOVA) foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey para determinar as médias significativas ($p < 0,05$, Tabelas 19, 21 e 23).

Tabela 21: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Aloficocianina	0,000235

Tabela 22: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Ficocianina	0,000235

Tabela 23: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Ficoeretrina	0,000235

Na variante vermelha de *K. alvarezii* a concentração de ficobiliproteína foi superior à concentração encontrada na variante verde. Entretanto, a variante verde apresentou uma concentração de Cl. *a* superior à concentração encontrada na variante vermelha. Esta diferença na concentração dos pigmentos fotossintetizantes pode justificar as duas diferentes tonalidades entre as duas variantes pigmentares de *K. alvarezii*.

A análise de variância unifatorial da concentração das ficobiliproteínas da variante vermelha revelou diferenças significativas para os tratamentos controle e de exposição à RUVB (Tabelas 24, 25 e 26).

Tabela 24: Análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Aloficocianina	6	366.58	0,00001

Tabela 25: Análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Ficocianina	6	15.000	0,0000

Tabela 26: Análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	Graus liberdade	F	p
Ficoeretrina	6	7350	0,0000

A partir destas diferenças, foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey para determinar as médias significativas com valores menores que 0,05 (Tabelas 27, 28 e 29).

Tabela 27: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de AFC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Aloficocianina	0,000235

Tabela 28: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FC dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Ficocianina	0,000235

Tabela 29: Teste *a posteriori* do tipo Tukey referentes análise da variância unifatorial da concentração de FE dos indivíduos controle e expostos à RUVB da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). **Negrito**, efeito significativo ao nível de significância ($p < 0,05$).

Efeito	p
Ficoeretrina	0,000235

As concentrações das ficobiliproteínas decresceram com a exposição à RUVB, tanto para a variante verde quanto para a variante vermelha de *K. alvarezii*. A variante vermelha apresentou maiores concentrações destes pigmentos, comparativamente à variante verde. A FE foi a ficobiliproteína encontrada em maior concentração nas duas variantes de *K. alvarezii*, independente do tratamento de radiação utilizado.

Nas figuras 8 e 9 estão representadas as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes da variante verde e da variante vermelha de *K. alvarezii*.

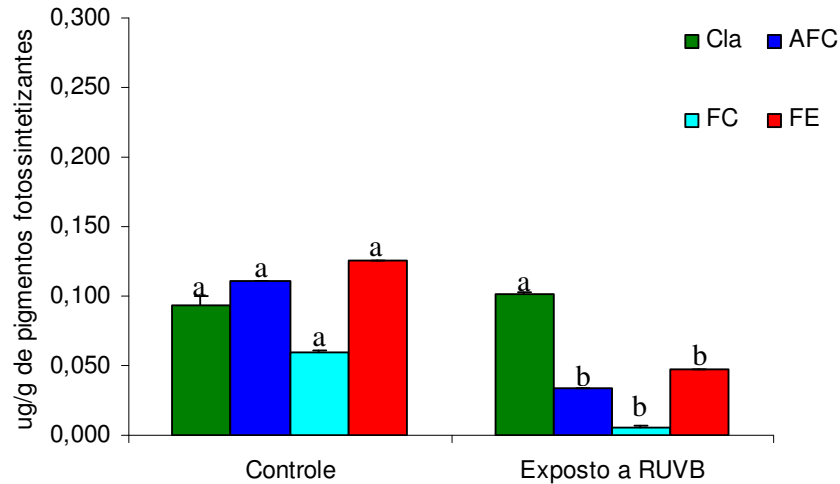


Figura 8: Médias das concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (Cl.a , AFC, FC e FE - µg/g massa fresca) da variante verde de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). As barras verticais representam o cálculo do erro padrão. As letras distintas e minúsculas significam as diferenças entre o controle e exposto a RUVB, segundo o teste *a posteriori* de Tukey.

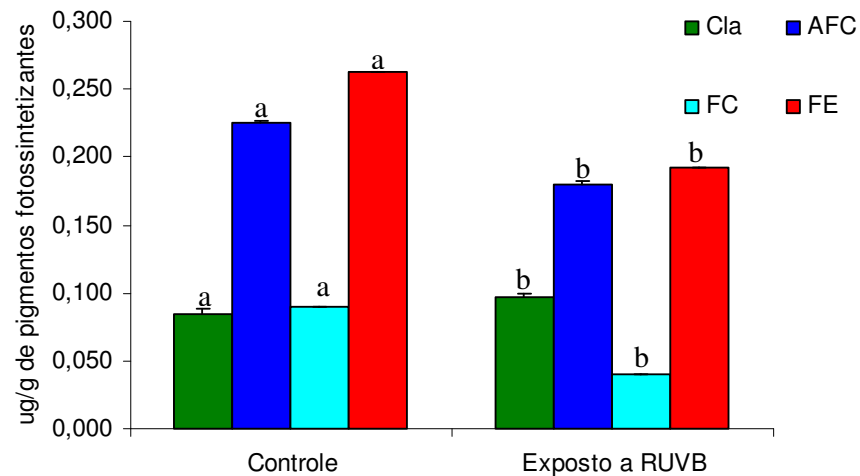


Figura 9: Médias das concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (Cl.a , AFC, FC e FE- µg/g massa fresca) da variante vermelha de *Kappaphycus alvarezii*, cultivada em meio von Stosch por quatro semanas. Valores apresentados em médias (n=4). As barras verticais representam o cálculo do erro padrão. As letras distintas e minúsculas significam as diferenças entre o controle e exposto a RUVB, segundo o teste *a posteriori* de Tukey.

Para a variante verde de *K. alvarezii*, a razão entre os pigmentos (FE/Cl.a , AFC/Cl.a , FC/Cl.a e FC/AFC) do controle e dos expostos à RUVB diminui. Entretanto, para a razão entre FE/AFC observou-se um aumento sutil. No entanto, a razão FE/FC aumentou significativamente (Tabela 30).

Tabela 30: Razões entre os pigmentos (fotossintetizantes) da variante pigmentar verde de *Kappaphycus alvarezii* exposta à RUVB comparação com o controle. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	FE/ Cl. a	AFC/ Cl. a	FC/ Cl. a	FE/ AFC	FE/ FC	FC/ AFC
Controle	3,69	3,18	1,27	1,16	2,9	0,40
Exposto a RUVB	2,26	2,11	0,47	1,06	4,8	0,22

Na variante vermelha de *K. alvarezii* a razão entre os pigmentos do controle e dos expostos à RUVB diminuiu (FE/Cl.a , AFC/Cl.a , FC/Cl.a, FE/AFC e FC/AFC). Quanto à razão entre o pigmento FE/FC, houve também um aumento significativo (Tabelas 31).

Tabela 31: Razões entre os pigmentos (fotossintetizantes) da variante pigmentar vermelha de *Kappaphycus alvarezii* exposta a RUVB comparação com o controle. Valores apresentados em médias (n=4).

Tratamento	FE/ Cl. a	AFC/ Cl. a	FC/ Cl. a	FE/ AFC	FE/ FC	FC/ AFC
Controle	1,36	1,20	0,64	1,14	2,1	0,54
Exposto a RUVB	0,46	0,33	0,06	1,38	7,8	0,17

IV. DISCUSSÃO

4.1 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais expostos a RUVB de *K. alvarezii*

A primeira semana de cultivo das duas variantes de *K. alvarezii* é um período de aclimação dos segmentos apicais expostos à RUVB, onde apresentaram uma baixa taxa de crescimento quando comparada com o controle. Estudos com *Ulva expansa* (Setchell) Setchell & N.L. Gardner e *U. rigida* C. Agardh mostraram que as taxas de crescimento também diminuem na primeira semana de exposição à RUVB. Entretanto, quando o tratamento se prolonga por algumas semanas, estas diferenças são reduzidas ao longo do tempo (Grobe & Murphy, 1998; Altamiro *et al.*, 2000).

A redução na taxa de crescimento, das duas variantes de *K. alvarezii*, observada nas primeiras semanas quando submetidas à RUVB pode ser o fator limitante do crescimento. Neste período as algas normalmente passam por um processo de aclimação ao estresse sofrido pela incidência da radiação diária que tem como resultado a redução no crescimento e possivelmente podem estar desenvolvendo resistência à RUVB. Altos índices diários de RUVB ocasionam inibição da taxa de crescimento das algas (van de Poll *et al.*, 2001). As algas desenvolvem a capacidade de tolerar a RUVB, com o aumento da idade e histórico de cada espécie, conforme foi observado nas espécies *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux, *L. hyperborea* (Gunnerus) Foslie e *L. saccharina* (Linnaeus) J.V. Lamouroux (Dring *et al.*, 1996) e por Haneld *et al.*, 1997 na espécie *L. saccharina*.

Cada organismo apresenta uma sensibilidade e tolerância à radiação UVB, desenvolvendo a capacidade de prevenir e reparar danos induzidos (van de Poll *et al.*, 2001). Com o aumento da RUVB, as falhas dos mecanismos de proteção podem provocar alterações e desequilíbrios celulares (Bowler *et al.*, 1992). Estes desequilíbrios levam a mudanças conformacionais nas moléculas de DNA, nos processos de transcrição, duplicação e tradução (Lao & Glazer, 1996; Buma *et al.*, 2000), conduzindo a uma crescente mortalidade (Franklin & Forster 1997) e afetar o crescimento das macroalgas (Wood, 1987).

A diminuição na taxa de crescimento observado nas variantes de *K. alvarezii* pode estar relacionada à utilização de energia para ativação de mecanismos de aclimação e reparos de danos induzidos pela radiação UVB como o observado em *Emiliania huxleyi* (Lohmann) W.H. Hay & H. Mohler (van de Poll *et al.*, 2001).

A radiação ultravioleta atua evolutivamente como uma pressão seletiva de mecanismos de proteção e/ou reparo contra estes danos possibilitando que as algas sobrevivam e se reproduzam (Karsten *et al.*, 1998, Korbee-Peinado *et al.*, 2004).

A variante vermelha conseguiu recuperar e aclimatar-se ao efeito que a RUVB ocasionou a diminuição na taxa de crescimento, por causa da despigmentação e necrose parcial na terceira semana, já que na quarta semana voltou a crescer.

Os resultados da taxa de crescimento das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii*, as quais mostram diminuição no crescimento quando submetidas à RUVB, corroboram com os estudos desenvolvidos com outras espécies de algas como o observado em *Gracilaria conferta* (Schousboe ex Montagne) Montagne (Freedlander & Bem-Amotz, 1991), com *U. expansa* (Grobe & Murphy, 1998) e com *Delesseria sanguinea* (Hudson) J.V. Lamouroux (Pang *et al.*, 2001). Nas espécies *Phyllophora pseudoceranooides* (S.G. Gmelin) Newroth & A.R.A. Taylor, *Rhodymenia pseudopalmata* (J.V. Lamouroux) P.C. Silva, *Phycodryis rubens* (Linnaeus) Batters e *Polyneura hilliae* (Greville) Kylin também expostas a RUVB durante três horas diárias, como foram os experimentos com *K. alvarezii*, porém por 13 dias, também demonstraram uma redução na taxa de crescimento (van de Poll *et al.*, 2001).

Esta redução do crescimento observado nas variantes verde e vermelha pode estar relacionada ao atraso no processo de divisão celular. Este atraso na divisão se deve a formação de dímeros de pirimidina como consequência tem-se a diminuição nas taxas de crescimento quando foram expostas à RUVB (Buma *et al.*, 1995; van de Poll *et al.*, 2001).

Os efeitos danosos ocasionados pela RUVB diminuem nos organismos com o aumento do número de camada de células. As camadas mais externas seriam capazes de absorver uma maior parte de RUVB e com isto as camadas internas estariam protegidas (Sutherland, 1997).

As duas variantes do controle apresentaram decréscimo na taxa de crescimento no final do experimento. Esta redução deve estar relacionada à competição pelo espaço

e por nutrientes. Os segmentos apicais apresentam um aumento da primeira semana de cultivo para a segunda, mas este aumento da taxa de crescimento da terceira e quarta semana diminuí provavelmente porque os ápices apresentaram um tamanho maior e conseqüentemente necessidade nutricional superior.

A variante verde do controle apresentou a maior taxa de crescimento $6,75\% \text{ dia}^{-1}$, quando comparado com a variante vermelha que cresceu $6,35\% \text{ dia}^{-1}$ a partir da média dos 28 dias de cultivo. A variante verde dos segmentos expostos à RUVB também apresentou a maior taxa de crescimento $3,0\% \text{ dia}^{-1}$ enquanto que a variante vermelha cresceu $2,60\% \text{ dia}^{-1}$.

A variante verde de *K. alvarezii* apresentou a maior taxa de crescimento do controle e do exposto a RUVB, demonstrado uma melhor adaptação aos efeitos da RUVB, enquanto a variante vermelha de *K. alvarezii* apresentou a menor taxa de crescimento do controle e do exposto a RUVB, demonstrado uma maior sensibilidade aos efeitos da RUVB. Esta variante apresentou despigmentação e necrose parcial dos segmentos apicais expostos à RUVB.

Paula *et al.*, (2001) cultivando as duas variantes *K. alvarezii in vitro* obteve uma taxa de crescimento baixa, em torno $2-5\% \text{ dia}^{-1}$. A variante verde cresceu $5,1\% \text{ dia}^{-1}$, a e a variante vermelha cresceu $4,0\% \text{ dia}^{-1}$ cultivadas durante 28 dias (Erbert, 2001).

As alterações morfológicas que ocorreram nos segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii* podem ser decorrentes da sensibilidade das algas a RUVB induzindo as alterações morfológicas dos talos (Halldal, 1964). Efeitos na taxa de crescimento e alterações morfológicas produzidas pela RUVB, indicam alterações promovidas pela exposição à RUVB (Navarro, 2004). Apesar das alterações morfológicas terem sido observadas nas duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii*. Franklin & Forster (1997) as alterações morfológicas não são utilizadas com freqüência para determinar efeitos da RUVB em macroalgas.

4.2 Efeito da radiação nos pigmentos fotossintetizantes nos segmentos apicais dos expostos a RUVB de *K.alvarezii*

A RUVB estimulou à síntese de clorofila *a* observada nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii*, comparativamente ao controle cultivado somente com PAR. Aguilera *et al.*, (1999) propôs que a Cl. *a* é mais resistente a exposição à RUVB.

As duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* apresentaram um aumento da concentração de Cl.*a* quando expostas à RUVB deferindo dos resultados observados em *Chondrus crispus* Stackhouse, onde a radiação UV diminuiu a concentração de Cl.*a* (Aguirre-von Wobeser *et al.*, 2000; Yakovleva & Titlyanov, 2001). Bischof *et al.*, (2000) obtiveram o resultado semelhante em macroalgas vermelhas *Palmaria palmata* (Linnaeus) Kuntze e *Phycodrys rubens* (Linnaeus) Batters.

Com a macroalga vermelha *Eucheuma strictum* F. Schmitz, exposta a RUVB, cultivada *in vitro*, detectou-se a diminuição na concentração de Cl. *a*, acompanhada pelo aumento na concentração de micosporinas (Wood, 1987).

Um mecanismo físico-químico contra danos induzidos pela radiação UV é a biossíntese e acumulação de moléculas de proteção. Entre as substâncias com potencial de proteção contra a radiação UV nos organismos aquáticos, estão os carotenóides, as ficobiliproteínas, os fenóis, as cumarinas e os aminoácidos tipo micosporina (MAAs) (Korbee-Peinado, *et al.*, 2006). Entretanto, no material estudado, ocorreu uma redução das ficolibiproteínas quando as plantas foram expostas a RUVB.

Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de radiação UV é a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporina e os carotenóides, que direta ou indiretamente absorvem a energia da radiação UV (Sommaruga, 2001; Sonntag *et al.*, 2007).

As concentrações das ficobiliproteínas diminuíram nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* expostas à RUVB. As ficobiliproteínas estão situadas na parte externa dos tilacóides na estrutura denominada de ficobilissomos e desempenham uma fundamental função na transmissão da energia de excitação dos pigmentos mais externos para as moléculas de Cl. *a* do fotossistema II (Zuber, 1986).

Os três tipos de ficobiliproteínas a FE, a FC e AFC absorvem a energia solar transferindo em seqüência a partir FE, FC e AFC para o centro de reação do

fotossistema II, onde a Cl. *a* é excitada, estabelecendo o fluxo de elétrons (Gantt, 1981; Talarico, 1996).

Nas algas vermelhas, a FE é relevante no processo de aclimação, pois, está localizada mais externamente nos ficobilissomos (Talarico, 1996). Segundo Falkowski & La Roche (1991), o processo de aclimação considera a capacidade de alteração na composição dos pigmentos que está relacionada com a quantidade e qualidade da luz disponível. Esta capacidade já foi observada nas cianobactérias e nas macroalgas (Nultsch & Agel, 1986; Grossman, 1990; Häder & Häder, 1991).

Nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* a FE foi à ficobiliproteína que sofreu maiores reduções de concentração, onde foi observado redução de 27% na variante vermelha e 68% na variante verde. A concentração de FE foi bem maior na variante vermelha onde se observou no controle 0,262 µg/g no material fresco quando comparada a variante verde que apresentou nos controle somente 0,126 µg/g material fresco. Esta concentração está diretamente relacionada com a coloração observada nas variantes. Por outro lado, a redução na concentração FE nas plantas sob RUVB foi bem maior na variante verde revelando uma maior sensibilidade destes pigmentos nesta variante. A FE é o primeiro pigmento a ser afetado pela radiação UV, seguido pela FC, a AFC, os carotenóides e, por último, a Cl. *a*, que seria a mais resistente (Gerber & Hader, 1993; Sinha *et al.*, 1995). Este padrão de destruição dos pigmentos nos cloroplastos foi observado em macroalgas vermelhas *Porphyra umbilicalis* (Linnaeus) Kützinger e *Ahnfeltiopsis concinna* (J. Agardh) P.C. Silva & DeCew (Aguilera *et al.*, 1999; Beach *et al.*, 2000). A estrutura química da FE possui a capacidade de estocar nitrogênio, níveis baixos deste pigmento podem significar menor disponibilidade desse elemento. Resultados semelhantes foram observados nos gêneros de cianobactérias *Anabaena* Bory de Saint-Vincent e *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, onde a concentração de FE diminuiu quando exposta à RUV (Sinha *et al.*, 1995).

Em resposta à radiação solar elevada a degradação dos pigmentos ocorre naturalmente nas algas e está relacionada à diminuição nas taxas fotossintéticas (Figuerola *et al.*, 1997). Porém, estes pigmentos podem ser re-sintetizados no mesmo dia, como um processo auxiliar na fotoproteção de sistemas fotossintetizantes sob condições de alterações de irradiância de curta duração (Talarico, 1996).

Modificações nas concentrações de pigmentos foram também descritas para a macroalga *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis, onde a FE, a FC e a Cl. *a* mostraram-se reduzidas sob condições de exposição à radiação solar, podendo ser re-sintetizadas ao longo do dia. A concentração de FE e de FC diminuiu no período de 12:00h à 13:30h, quando os níveis de radiação são maiores. O processo de fotodestruição dos pigmentos ocorre naturalmente, afetando as taxa de crescimento (Figueroa *et al.*, 1997).

Estudos de Beach *et al.*, (2000) com a macroalga vermelha *Ahnfeltiopsis concinna* exposta à radiação PAR+ UVA+ UVB, apontam que a FE é o pigmento mais rapidamente degradado, e o mais rapidamente re-sintetizado, quando comparado às demais ficobiliproteínas. Este mesmo processo poderia ter ocorrido nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii*, onde a FE foi degradada quando exposta à RUVB se ocorresse uma aclimação pós exposição.

As diferenças de concentrações das três ficobiliproteínas (AFC, FC e FE) observadas no presente estudo indicam uma expressão fenotípica clássica de adaptação ao estímulo do ambiente, i.e., radiação luminosa (Guimarães *et al.*, 2003). Segundo Doty *et al.*, (1987), a coloração verde da variante verde de *K. alvarezii* é resultado da baixa concentração de FE. Em estudo similar, Paula *et al.*, (1998) demonstraram que a variante verde daquela espécie apresentou maior concentração de FC e AFC, enquanto a variante vermelha apresenta maior concentração de FE, em cultivo *in vitro*. Contudo, em relação à Cl.*a*, as concentrações foram semelhantes entre as variantes de *K. alvarezii*. A alta concentração de FC e AFC na variante verde mascara a expressão da cor vermelha característica das algas vermelhas.

Em outro contexto, ressalta-se que as proteínas são importantes reservas de nitrogênio, de modo que a baixa concentração de FE e outras ficobiliproteínas têm sido apontadas como causa da baixa capacidade da variante verde estocar N₂, comparativamente à variante vermelha (Dawes, 1992). O aumento na concentração de proteínas na variante verde foi avaliado pelo aumento na concentração de FC e AFC (Dawes, 1992). A redução na concentração das ficobiliproteínas nas duas variantes pode estar relacionada com a diminuição da absorção de nitrogênio, ou utilização das ficobiliproteínas para síntese de outras proteínas necessárias para metabolismo das algas.

O efeito da RUVB observado nas variantes pigmentares pode ser ocasionado pelo excesso de estimulação do fotossistema II. O excesso de energia absorvida pelos fotossistemas pode provocar alterações no aparato fotossintético (Holzinger *et al.*, 2004). Após 3h de exposição à RUVB, por 28 dias, esta exposição pode ter provocado uma fotooxidação e fotoinibição dos pigmentos fotossintetizantes e, conseqüentemente, uma diminuição da eficiência fotossintética e um decréscimo na taxa de crescimento. Entretanto, o estresse sofrido pelas plantas expostas à RUVB não levou a degradação da clorofila *a*, neste caso, pode-se sugerir que o aumento deste pigmento seja uma forma de adaptação a esta radiação. A variante verde do controle e dos expostos a RUVB apresentou maiores taxas de crescimento em relação a variante vermelha.

V. REFERÊNCIAS

AGUILERA, J.; JIMÉNEZ, C.; FIGUEROA, F.L.; LEBERT, M. & HADER, D. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in red alga *Porphyra umbilicalis*. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **48**: 75-82.

AGUIRRE-VON-WOBESER, E.; FIGUEROA, F.L. & CABELLO-PASINI. 2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. **Journal of Applied Phycology**, **12**: 159-168.

ALTAMIRANO, M.; FLORES-MOYA, A. & FIGUEROA, F.L. 2000. Long-term effects of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultivated *in situ*. **Botanica Marina**, **43**:119-126.

BARROS, M.P.; PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; CARDOZO, K.H.M. & COLEPICOLO, P. 2005. Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. **Biological Rhythm Research**, **36**: 67-82.

BEACH, K.S.; SMITH, CM. & OKANO, R. 2000. Experimental analysis of rhodophyte photoacclimation to PAR and UV-radiation using in vivo absorbance spectroscopy. **Botanica Marina**, **43**: 525-536.

BISCHOF, K.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. **Planta**, **211**: 555-562.

BISCHOF, K.; HANELT, D.; AGUILERA, J.; KARSTEN, U.; VOEGELE, B.; SAWALL, T. & WIENCKE, C. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord: Sensitivity of photosynthesis to ultraviolet radiation. **Botanica Marina**, **140**: 1097-1106.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M. INZÉ, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, **43**. 83-116.

BUMA, A.G.J.; NOORDELOOS, A.A.M & LARSEN, J. 1993 Strategies and kinetics of photoacclimation in three antarctic nanophytoflagellates. **Journal of Applied Phycology**, **29**:407-417

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

BUMA, A.G.J.; ENGELEN, A.H. & GIESKES, W.W.C. 1997. Wavelength dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. **Marine Ecology Progress**, **153**: 91-97.

BUMA, A.G.J.; VAN OIJEN, W.H. & VAN DE POLL, M.J.W. 2000. On the high sensitivity of the marine prymnessiophyte *Emiliania huxleyi* to ultraviolet-B. **Journal of Applied Phycology**, **131**: 296-303.

CRONIN, G. & HAY, M.E. 1996. Effects of Light and Nutrient Availability on the Growth, Secondary Chemistry, and Resistance to Herbivory of Two Brown Seaweeds. **Oikos**, **77**: 93-106.

CULLEN, J. J.; NEALE, P. J. & LESSER, M. P. 1992. Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. **Science**, **258**: 646-650.

DAWES, C.J. 1992. Irradiance acclimation of the cultured Philippine seaweeds, *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. **Botanica Marina**, **35**:189-195.

DRING, M.J.; WAGNER, A.; BOESKOV, J. & LÜNING, K. 1996. Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: influence of collection depth and season, and length of irradiation. **European Journal of Phycology**, **31**: 293-302.

DOTY, M.S. 1987. The production and use of *Eucheuma*. In: DOTY, M.S.; CADDY, J.F. & SANTELICES, B. (eds). **Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources**. FAO Fisheries Technical Paper. 123-161.

EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions in Marine Science, 15: 1-228. In: ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. **Manual de Métodos Ficológicos**. Universidad de Concepción, Chile. 863 pp.

ERBERT, C. 2001. Crescimento e taxas fotossintéticas da espécie de alga exótica produtora de carragenanas *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Rhodophyta, Gigartinales). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 79 pp.

FALKOWSKI, P.G & LA ROCHE, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. **Journal of Applied Phycology**, **27**: 8-14.

FIGUEROA, F.L.; SALLES, S.; AGUILERA, J.; JIRNENEZ, C.; MERCADO, J.; VILIEGLA, B.; FLORES, A. & ALTAMIRANO, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. **Marine Ecology Progress**, **151**: 81-90

FRANK, H. A. & COGDELL, R. J. 1993. The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. *In*: YOUNG, A. & BRITTON, G. (eds), **Carotenoids in photosynthesis**. Chapman and Hall, 252–326.

FRANKLIN, L.A. & FORSTER, R.M.; 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal of Phycology**, **323**: 207-232.

FRIEDLANDER, M. & BEN-AMOTZ, A. 1991. The effect of outdoor culture conditions on growth and epiphytes of *Gracilaria conferta*. **Aquatic Botanic**, **39**: 315-333.

GANTT, E. 1981. Phycobilisomes. **Annual Review Plant Physiology**, **32**: 327-347.

GANTT, E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. *In*: COLE, K.M & SHEATH, R.G. (eds). **Biology of the Red Algae**. Cambridge- New York-Port Chester-Melbourne-Sydney: Cambridge University Press, 203-219.

GERBER, S. & HADER, D. 1993. Effect of solar irradiation on motility and pigmentation of three species of phytoplankton. **Environmental Experimental Botany**, **33**:515-521.

GROBE, C.W. & MURPHY, T.M. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. and G. (Chlorophyta). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **225**: 39-51.

GROSSMAN, A.R. 1990. Chromatic adaptation and the events involved in phycobilisome biosynthesis. **Plant Cell Environmental**, **13**: 651-666.

GUIMARÃES, M., PLASTINO, E.M. & DESTOMBE, C. 2003. Green mutant frequency in natural populations of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. **European Journal of Phycology**, **38**: 165-169.

HADER, D.P. & LIU, S.M. 1990. Motility and gravitate orientation on the flagellate *Euglena gracilis*, impaired by artificial and solar UV-B radiation. **Current Microbiology**, **211**: 161-168.

HADER D.P. & WORREST R.C. 1991. Effects of enhanced solar-ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **53**: 717-725.

HADER D.P. & HADER, M.A. 1991. Effects of solar radiation on motility in *Stentor coeruleus*. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **54**: 423-428.

HÄDER, D.; KUMAR, R.; SMITH & R. SMITH. 1998. Effects on aquatic ecosystems. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**. **52**: 51-58.

HALLDALL, P. 1964. Ultraviolet action spectra of photosynthesis and photosynthetic inhibition in green and red alga. **Plant Physiology**, **17**: 414-421.

HANELT, D.; WIENCKE, C.; KARSTEN, U. & NULTSCH, W. 1997c. Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**, **33**:387-395.

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

HOLZINGER, A.; LÜTZ, C.; KARSTEN, U & WIENCKE, C. 2004. The effect of ultraviolet radiation on ultrastructure and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic waters. **Plant Biology**, **6**: 568-577.

JEFFREY, S. W. & HUMPHREY, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemical Physiology Pflanzen**, **167**: 191 – 194.

KARSTEN, U.; FRANKLIN, L.A.; LÜNING, K. & WIENCKE, C. 1998. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). **Planta**, **205**: 257-262.

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

KORBEE PEINADO, N.; ABDALA DÍAZ, R.T.; FIGUEROA, F.L. & HELBLING, E.W. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. **Journal of Applied Phycology**, **40**: 248-259.

KORBEE PEINADO, N.; FIGUEROA, F.L. & AGUILERA, J. 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. **Revista Chilena de Historia Natural**, **79**: 119-132.

KURSAR, T.A.; VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R. S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. **Plant Physiology**, **73**: 361-369.

LÃÃO, K. & GLASER, A.N. 1996. Ultraviolet-B photodestruction of light-harvesting complex. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **93**: 5258-5263.

LESSER, M.P & SHICK, J.M. 1994. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Marine Biology**, **102**: 243-255.

NAVARRO, N.M. 2004. Efeitos da radiação UV-B em *Iridea cordata* (Gigartinales-Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 87 pp.

NULTSCH, W. & AGEL, G. 1986. Fluence rate and wavelength dependence of photobleaching in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal Archives Microbiololy**, **144**: 268-271.

PANG, S.; GÓMEZ, I. & LÜNING, K. 2001. The red macroalga *Delesseria sanguinea* as a UVB-sensitive model organism: selective growth reduction by UVB in outdoor experiments and rapid recording of growth rate during and after UV pulses. **European Journal of Phycology**, **36**: 207-216.

PAULA, E.J. & PEREIRA, R.T.L. 1998. Da "marinomia" maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, **8**: 10-15.

PAULA, E.J.; ERBERT, C. & PEREIRA, R.T.L. 2001. Growth rate of the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) *in vitro*. **Phycological Research**, **49**: 155-161.

PAVIA, H. & ABERG, P.1997. Spatial variation in polyphenolic content of *Ascoplyllum nodosuin* (Fucales, Phacophyta). **Hydrobiologia**, **326/327**:199-203

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

ROZEMA, J.; VAN DE STAAIJ, J.; BJORN, L.O. & CALDWELL, M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Trends in Ecology and Evolution**, **12**: 22–28.

SEARLES, P.S.; FLINT, S.D & CALDWELL, M.M. 2001. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. **Oecologia**. **127**: 1-10.

SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry** **215**: 213-219.

SINHA, R.P.; LEBERT, M.; KUMAR, A.; KUMAR H.D. & HADER, D.P. 1995. Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobiliproteins of *Anabaena* sp and *Nostoc carmium*. **Acta Botanica**, **108**: 87-92.

SOMMARUGA, R. 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **62**: 35-42.

SONNTAG, B.; SUMMERER, M. & SOMMARUGA, R. 2007. Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic *Chlorella*-bearing ciliates (Ciliophora). **Freshwater Biology**, **52**: 1476-1485.

SUTHERLAND, B.M. 1997. UV effects in “the real world”: problems of UV dosimetry in complex organisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **40**: 8-13.

TALARICO, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. **Scientia Marina**, **60**: 205–22.

VAN DE POLL, W.H.; EGGERT, A.; BUMA, A.G.J. & BREEMAN, A.M. 2001. Effects of UV-B induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-related differences in UV-B tolerance. **Journal of Applied Phycology**, **37**: 30.37.

VIÑEGLA, B. 2000. Efecto de la radiacion UV sobre actividades enzimaticas relacionadas ccon el metabolismo del carbono y nitrogenio en macroalgas y fanerogamas marinas. **Tese de Doutorado**, Universidade de Málaga, Espanha, 180 pp.

VILLAFañE, V.E.; SUNDBACK, K.; FIGUEROA, F.L. & HELBLING, E.W. 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. *In*: HELBLING, E.W. & ZAGARESE, H. E. (eds). **UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosytems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences**. The Royal Society of Chemistry, UK. 357-397.

WOOD, W. F.1987. Effect of solar ultraviolet radiation on the kelp *Ecklonia radiata*. **Marine Biology**, **96**:143-150.

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

YAKOVLEVA, IM. & TITLYANOV, E.A. 2001. Effects of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanism. **Aquatic Botany**, **71**: 47-61.

.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B NA MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO CÉLULAR DAS VARIANTES PIGMENTARES VERDE E VERMELHA DE *KAPPAPHYCUS ALVAREZII* (DOTY) DOTY EX P. SILVA (GIGARTINALES)

I. INTRODUÇÃO

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

O impacto do aumento da radiação ultravioleta na superfície da Terra tendo sido investigado por vários grupos de pesquisadores, avaliando-se o efeito natural e artificial dessa radiação no crescimento nos demais aspectos fisiológicos dos organismos fotossintetizantes. Os efeitos danosos da radiação ultravioleta seriam causados principalmente pelos raios UVB. A radiação UVA, que atinge a superfície da Terra em quantidade comparativamente maior do que a UVB contribuiria para processos de reparo dos danos causados pela UVB (Britt, 1995).

O processo relacionado aos efeitos biológicos da radiação ultravioleta é iniciado com a absorção fotoquímica por parte de biomoléculas importantes. A energia contida num fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda, podendo ser suficiente para quebrar ligações químicas. Fótons altamente energéticos da faixa da radiação ultravioleta podem ser absorvidos por ácidos nucléicos, lipídios, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (Diffey, 1991; Franklin & Forster 1997).

Existem muitos efeitos negativos da radiação ultravioleta nos organismos, particularmente quando absorvidos pelos ácidos nucléicos e proteínas, os quais podem ocasionar fotooxidação e mudanças conformacionais que resultam em várias alterações metabólicas vitais como a transcrição, duplicação de DNA e tradução (Lão & Glazer, 1996; Buma *et al.*, 2000). Além disso, a biologia e fisiologia celular também podem ser afetadas, conduzindo a crescente mortalidade (Franklin & Forster, 1997). A radiação ultravioleta no meio ambiente particularmente UVB, é a chave de muitos efeitos deletérios em processos biológicos (Worrest, 1982), como a fotossíntese e crescimento de plantas terrestres (Tevini & Teramura, 1989) e fitoplâncton (Lorenzen, 1979; Smith *et al.*, 1980; Smith, 1992; Jokiel & York, 1984; Bühlmann *et al.*, 1987), absorção de nitrato em diatomáceas (Döhler & Biermann, 1987), locomoção em protistas (Häder & Häder, 1988), crescimento e fotossíntese em culturas de zooxantelas (Jokiel & York, 1982; Lesser & Shick, 1989), e crescimento de macroalgas (Wood, 1987).

As proteínas que compõem o citoesqueleto das células de plantas são possíveis alvos da radiação ultravioleta. Dentre essas, a tubulina pode ser particularmente sensível, se apresentar um alto conteúdo de aminoácidos com cadeias aromáticas (Zaremba *et al.*, 1984). Essas cadeias possuem uma forte absorção na banda dessa radiação (Hollósy, 2002).

A fotossíntese é um dos processos potencialmente prejudicados depois da exposição à radiação ultravioleta UVB devido ao dano à proteína D1 (Vass, 1997) ou para a Rubisco (ribulose 1,5-bifostato carboxilase), ou perda de pigmentos (Bischof *et al.*, 2000), como também a redução na expressão dos genes (Meindl & Lütz 1996; Lütz *et al.*, 1997; Holzinger *et al.*, 2004).

Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de radiação UV é a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporina e os carotenóides, que direta ou indiretamente absorvem a energia da radiação UV (Sommaruga, 2001, Sonntag *et al.*, 2007).

Kappaphycus alvarezii possui grande interesse econômico devido à produção principalmente de carragenana *kappa*, um ficocolóide de grande diversidade de aplicações na indústria alimentícia (laticínios, gelatinas, espessantes) (Paula & Pereira, 1998), na preparação de rações para animais domésticos e peixes (De Mario e

Ballestero, 2004), e como agentes inibidores do vírus HPV (Human Papillomavirus) (Buck *et al.*, 2006).

As carragenanas são polissacarídeos sulfatados lineares de alto peso molecular, extraídos das paredes celulares de várias espécies de Rhodophyta. A estrutura molecular está baseada nas seqüências dissacarídicas, repetições de β -D-galactopiranosose ligados nas posições 1 e 3, e resíduos de α -D-galactopiranosose nas posições 1 e 4 (Piculell, 1995). As carragenanas são extraídas abundantemente de algas pertencentes aos gêneros *Gigartina* Stackhouse, *Eucheuma* J. Agardh, *Kappaphycus* e *Hypnea*, entre outros, as quais recebem, por este motivo à denominação carregenófitas (Lee, 1989). É encontrada principalmente em ambientes recifais da região Indo-Pacífico, do Leste da África até Guam, China, Japão e ilhas do Sudeste Asiático (Doty, 1987; Areces, 1995).

No Brasil esta espécie foi introduzida em 1995 a partir de um ramo proveniente do USA Marine Institute University of Kochi, Japan. A linhagem é proveniente do cultivo experimental na Ilha de Shikohu, Japão e originária de cultivos comerciais das Filipinas. Foi propagada em cultura unialgal durante 10 meses no Laboratório de Algas Marinhas (USP) antes da transferência para o mar (Paula & Pereira, 1998).

A espécie *K. alvarezii* possui diversos estudos no Brasil, destacando os que estão sendo realizados no estado de São Paulo, no estado do Rio de Janeiro e iniciando em Santa Catarina (Florianópolis).

O presente trabalho teve como objetivo, conhecer os possíveis efeitos biológicos da RUVB na morfologia celular e ultraestrutural das variantes pigmentares (verde e vermelha) *K. alvarezii*.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e processamento do material biológico

Os segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *Kappaphycus alvarezii* utilizados nos diferentes experimentos foram obtidos do banco de germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), e não foi necessária a aclimação.

2.2 Condições de cultivo

A irradiância fotossinteticamente ativa ao dia foi de 704 kJ/m^{-2} (Li-cor light meter 250, United States of America, USA). A temperatura foi de 24°C ($\pm 2^\circ \text{C}$) e o fotoperíodo de 12 horas, sendo que o período de luz iniciava às 8 horas da manhã, com aeração contínua. A água do mar utilizada foi esterilizada em banho Maria por 1 hora. Após seu completo resfriamento, essa água foi enriquecida com o meio von Stosch (Edwards, 1970).

Os segmentos apicais com peso de aproximadamente $0,50\text{g}$ ($\pm 0,05\text{g}$), das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii* foram cultivados em béqueres de 250 mL no laboratório em câmara de cultivo por um período de 4 semanas (28 dias), tanto o controle (sem radiação UVB, somente a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) quanto o tratamento (com radiação UVB +PAR). O meio de cultivo foi de 200mL água do mar esterilizada com 4% de meio von Stosch, salinidade de 34 ups (± 1 ups) (unidade padrão de salinidade).

A RUVB artificial foi fornecida pela lâmpada (Vilber Lourmat VL-6LM, Marne La Vallée, France), que emite o comprimento de onda de 312 nm e irradiância de $1,2 \text{ kJ/m}^{-2}$ e possui acoplado um filtro para os demais comprimentos de onda. A exposição à radiação UVB foi de três horas por dia (iniciando ao 12:00 h e terminando as 15:00 h). Durante a exposição à aeração foi aumentada no tratamento e no controle para que os fragmentos movimentam-se de forma constante, de forma a expor todos os ramos. Sendo assim, todos os fragmentos receberam a mesma intensidade de radiação. Foi realizado um rodízio com béqueres aleatoriamente, para que todos os béqueres recebam

a mesma intensidade luminosa. Concomitante a RUVB receberam a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), através das lâmpadas fluorescentes (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil). Estas lâmpadas fornecem a luz similar a natural.

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

Os meios de cultura foram renovados semanalmente. Foram utilizadas quatro repetições para cada espécime (n=4).

2.3 Análise em microscópio de luz

Os materiais expostos a RUVB e os controles das duas variantes (verde e vermelha) pigmentares de *K.alvarezii* foram processados para análises histoquímica e morfológica em microscopia de luz.

2.3.1 Fixação

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,2M, pH 7.2, durante 6 a 8 h, à temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca (Bouzon, 1993).

2.3.2 Desidratação

A desidratação foi feita em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (50%, 70%, 90% e 100%), com duas trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente.

2.3.3 Pré-infiltração e infiltração

A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante 4 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 24 h.

2.3.4 Inclusão

A inclusão foi realizada na mesma resina em histo-moldes com adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 h (Arnold *et al.*, 1975, modificado).

2.3.5 Preparo das secções

As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 4 μm foram distendidos em placa de Petri com água à temperatura ambiente, coletados com lâminas de vidro ou coletados nas lâminas sobre gotas de água destilada e secos a 37°C em placa quente por 30 minutos.

2.4 Histoquímica

Os materiais foram analisados e fotografados em microscópio Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América Ind.). Os materiais foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos:

2.4.1 Azul de toluidina (AT-O). Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (Gordon & McCandless, 1973; McCully, 1970). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

2.4.2 Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 30 minutos. Foram, então, lavados em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá. Como controle da reação de PAS foi realizado a acetilação, passando-se as lâminas contendo os cortes em piridina pura e solução de piridina 60% mais anidrido acético 40% ou omitindo a oxidação pelo ácido periódico, e submetendo-as a coloração descrita acima (Gahan, 1984).

2.4.3 Azul brilhante de Coomassie (CBB). Este teste foi utilizado para identificar a presença de proteínas totais. As lâminas contendo as secções foram coradas por 24 h em CBB 0,02 % diluído em solução etanólica acidificada de Clark, posteriormente foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada e secas ao ar (Gahan, 1984). Para controle as lâminas contendo as secções foram encubadas a 37° C numa solução de proteases e coradas como descrito acima. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

2.4.4 Sudan Black- B (SB-B). Foi utilizado para identificar a presença de lipídios. As lâminas contendo as secções foram corados por 15 minutos em SB-B, posteriormente lavados em etanol 70 %, seguido de água destilada e secos a ar (Gahan, 1984). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

2.5 Análise em microscópio eletrônico

As amostras provenientes dos expostos a RUVB e os controles das duas variantes foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 %, sacarose 2%, tamponada com cacodilato 0,1 M (pH 7,2). A pré-fixação foi realizada em overnight na geladeira. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens (30 minutos cada lavagem) no mesmo tampão e sacarose. Depois das lavagens os espécimes foram pós-fixados em OsO₄ (tetróxido de ósmio) a 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 (1:1), durante 4 h à

temperatura ambiente (Pueschel, 1979; Bouzon *et al.*, 2000).

Posteriormente, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 (30 minutos cada lavagem) em seguida lavado em água destilada (30 minutos) e desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo 30 minutos em cada etapa; na última série de acetona 100% trocada três vezes. Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). A infiltração foi realizada em 7 etapas, durante 4 dias em resina Spurr diluída em acetona nas seguintes proporções 1:3 por uma noite, 1:2 por 12 horas, 1:1 por 12 horas, 1:2 por uma noite, 1:3 por 12 horas, seguida de resina pura por 12 horas e por último resina pura por uma noite. O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70° C por 24 h. As secções ultrafinas foram feitos com navalha de diamante e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM)1011.

2.5.1 Preparação para observações citoquímicas no MET

O teste do ácido periódico-thiosemicarbazide-proteinato (TSC) de prata (teste de Thiéry) foi empregado para visualizar os polissacarídeos neutros. Será preparado de acordo com Hayat (1986, 1993). As secções ultrafinas foram realizadas com ultramicrotomo Power Tome XL, montadas sobre grades de ouro, oxidadas com ácido periódico a 1% em água destilada durante 20 minutos, lavadas com água destilada (três lavagens) e tratadas com thiosemicarbazide 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. As secções foram lavadas em solução aquosa de ácido acético a 10% por 10 minutos, ácido acético a 5% por 5 minutos, ácido acético a 1% por 5 minutos e por último lavados duas vezes em água destilada por 5 minutos e finalmente incubados com proteinato de prata aquosa 1% por 30 minutos, no escuro, a 50° C. Os controles foram feitos substituindo a oxidação pelo ácido periódico por tratamento com H₂O₂ (Tripodi & De Masi, 1975). Ambos os expostos a RUVB e os controles foram observados no MET sem contrastação.

III. RESULTADOS

3.1 Morfologia celular dos segmentos apicais de *K. alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

Em secções transversais a região cortical das duas variantes, apresentam de duas a três camadas de células corticais. Na primeira camada as células são alongadas, e apresentam a forma de taça, na segunda e terceira camadas as células tornam-se esférica (Figs. 1 e 2).

As células corticais são as menores células, medindo 4,3 μm a 8,6 μm de diâmetro e 5,2 μm a 8,6 μm de comprimento, sendo envolvidas por uma parede celular espessa. As células corticais podem ser uninucleadas, binucleadas ou multinucleadas (Fig.2).

A comunicação entre as células corticais e entre estas e as células subcorticais se dá através das conexões intercelulares.

As células subcorticais estão localizadas entre a região cortical e a região medular. Estas células são mais vacuolizadas quando comparadas com as células corticais. Seu tamanho aumenta em direção a região medular. Apresentam morfologia e tamanhos diferentes (10,5 μm a 13,4 μm de diâmetro e 9,6 μm a 20 μm de comprimento) quando comparadas células corticais. As paredes celulares são espessas com aspecto lenticulado (Fig. 3).

3.2 Histoquímica

3.2.1 Histoquímica dos segmentos apicais de *K. alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

As células das duas variantes reagiram metacromaticamente, de maneira semelhante, quando tratadas com AT-O especialmente nas paredes celulares indicando a presença de polissacarídeos ácidos (Figs. 1 e 2). O citoplasma reagiu levemente ortocromático. Nas células subcorticais com parede metacromáticas foi possível

observar as fibrilas distribuídas de forma concêntrica. O vacúolo apresentou granulações ácidas fortemente metacromáticas (Figs 3 e 4).

Quando as secções foram submetidas à reação com o PAS, o citoplasma das células corticais, células subcorticais e parede celular reagiram positivamente. A reação ocorreu com os polissacarídeos neutros, especialmente nos numerosos grãos de amido das florídeas, a principal substância de reserva das algas vermelhas. A quantidade de grânulos de amido aumentou em direção das células subcorticais, uma distribuição heterogênea. Quando corados com PAS foi possível observar os pontos de conexão intercelular. Tanto nas células corticais quanto nas células subcorticais a parede celular mostrou uma reação levemente positiva ao PAS (Figs 5 e 6).

As células corticais e subcorticais reagem com o CBB marcando levemente todo o citoplasma onde está a maior concentração de material protéico, a reação foi mais intensa nos núcleos. Com esta coloração foi melhor observado as conexões intercelulares entre as células corticais e as células subcorticais (Figs. 7 e 8).

Com a utilização do corante SB-B ocorreu uma reação mais intensa na cutícula, indicando a presença de lipídios e mais leve na parede celular e no citoplasma. Foi também possível observar granulações positivas no vacúolo (Figs. 9 e 10).

3.2.1 Histoquímica dos segmentos apicais expostos a RUVB de *K. alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

As secções transversais das duas variantes de *K. alvarezii* exposta a RUVB quando coradas com AT-O mostraram as paredes celulares das células corticais e das células subcorticais metacromáticas e o citoplasma com reação foi ortocromática de forma semelhante ao observados nos controles (Figs. 11 e 12). Entretanto, quanto à morfologia, na região superior das células corticais mais periféricas da variante vermelha foi observada uma deposição em forma de um domo de parede celular (Fig. 11). Por outro lado, na região cuticular da variante verde foi observado um espessamento semelhante à deposição de camadas de parede celular (Fig. 12). O citoplasma das células corticais e subcorticais é mais denso quando comparado às células do controle, onde também foram observadas granulações metacromáticas (Figs. 11 e 12).

Com a reação de PAS foi possível detectar uma redução na densidade de grãos de amido nas células corticais e nas células subcorticais das duas variantes quando comparadas com o observado nos controles. Porém, a reação PAS positiva foi mais intensa na parede celular das plantas tratadas com UVB (Figs. 13 e 14).

O citoplasma das células corticais e das células subcorticais das duas variantes foi marcado uniformemente com o CBB, indicando uma distribuição homogênea de organelas ou estruturas ricas em proteínas (Fig. 15 e 16). Entretanto, a coloração foi mais intensa do que o observado com citoplasma das células dos controles. Com esta reação os núcleos tornaram-se também evidentes e é possível verificar as conexões intercelulares (Figs. 15 e 16).

Utilizando o SB-B ocorre uma leve reação na cutícula, na parede celular e no citoplasma. É visível uma leve reação no vacúolo (Figs. 17 e 18).

3.3 Ultra-estrutura dos segmentos apicais dos controles e dos expostos a RUVB de *K. alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

3.3.1 Ultra-estrutura dos segmentos apicais do controle de *K. alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

A região cortical das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* é formada por duas a três camadas de células que apresentam forma alongada perpendicularmente a superfície. As células mais periféricas, quando observadas no microscópio eletrônico de transmissão, mostraram formato de taça, com uma espessa parede celular circundante (Figs. 19 - 21). Esta parede celular é constituída por microfibrilas concêntricas de celulose, com diferentes elétrons-densidades, e estão embebidas em uma matriz amorfa elétron-transparente (Fig. 19). Esta matriz amorfa é constituída por polissacarídeos sulfatados, a carragenana. Este resultado corrobora com o observado na ML com a utilização do AT-O.

As células corticais apresentam muitos cloroplastos, os quais ocupam grande parte do volume celular. Desta forma, poucas outras organelas estão presentes. Entretanto, também foi possível observar nestas células alguns dictiosomos, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e numerosos ribossomos livres.

Os cloroplastos são alongados, capazes de ajustar-se a morfologia celular. Possuem dupla membrana, internamente ocorre um tilacóide periférico que envolve os demais tilacóides distribuídos de forma paralela, individualizados, não formam pilhas. Esta organização é típica das algas vermelhas. Entre os tilacóides dos cloroplastos das células corticais foram observados numerosos glóbulos elétron-densos, os plastoglóbulos, osmiofílicos. Também foi observada uma região fibrilar entre os tilacóides que corresponde ao genóforo. O estroma plastidial é denso com alguns ribossomos livres (Figs. 22 e 23).

O principal composto de reserva das algas vermelhas é o amido das florídeas armazenado no citoplasma e não nos cloroplastos. As células corticais possuem numerosos grãos de amido com tamanhos variáveis, distribuídos por todo o citoplasma (Figs. 19 e 20). Alguns grãos de amido estão dispostos na região perinuclear. Os grãos

perinucleares podem apresentar tamanhos variados. Foi observado grãos de amido jovens com tamanho entre 0,2 a 2,0 μm de diâmetro. Quando jovens estes apresentam a região central granular elétron-densa (Figs. 24 e 25).

As células corticais são binucleadas, porém em secções longitudinais destas, quando observadas no MET, somente um núcleo foi visualizado por célula. Os núcleos são grandes com 1,5-3,0 μm de diâmetro, cromatina difusa e nucléolo bem desenvolvido (Figs. 25 e 26).

As mitocôndrias foram observadas em associação com cloroplastos, próximas ao Rer e a dictiosomos. São esféricas a alongadas com 0,2-0,6 μm diâmetro, com cristas tubulares e podem apresentar grânulos elétron-densos na matriz mitocondrial (Figs. 27 e 28).

Nas células corticais foram observados alguns dictiossomas próximos a mitocôndrias. Estes são formados por 4 a 6 cisternas que apresentavam as regiões distais dilatadas, aparentemente produzindo vesículas de secreção (Figs. 29 e 30).

Os ribossomos são numerosos e aparecem livres no citosol ou associados às membranas do RE. O Rer ocorre principalmente na região periférica da célula, próximo a grãos de amidos, mitocôndrias e a cloroplastos. Os retículos endoplasmáticos granulosos são constituídos de um sistema de membranas, onde estão aderidos os ribossomos. São visíveis também os grânulos de polirribossomos no citoplasma (Figs. 30 e 31).

As células corticais encontram-se interligadas entre si e entre as células subcorticais através das conexões intercelulares. Estas conexões são preenchidas por material elétron-denso, levemente granular. Este tampão é revestido por duas membranas circundantes (Figs. 32 e 33). O tampão é constituído por proteínas que preenchem o canal existente entre as células filhas, resultante da citocinese parcial, conhecido na literatura inglesa como "*pit plug*".

Como o observado na ML as células subcorticais das duas variantes pigmentares, quando cortadas transversalmente, são arredondadas, circundadas por uma espessa parede celular. Estas são mais vacuolizadas quando comparadas com as células corticais, possuindo grandes vacúolos de tamanhos variados (Figs. 34 e 35). Porém, em cortes longitudinais são alongadas, ricas em grãos de amido (Fig. 36). As células subcorticais possuem grandes e numerosos grãos de amido distribuídos por todo o citoplasma. Alguns grãos de amido estão localizados próximos ao núcleo (Fig. 37). Os núcleos destas células são grandes com tamanhos com 1,5-2,0 μm de diâmetro e, cromatina difusa.

O citoplasma parietal é preenchido por grandes e alongados cloroplastos, que se adaptam a morfologia celular. Entre os tilacóides dos cloroplastos foram observados numerosos glóbulos elétron-densos, os plastoglóbulos, osmiofílicos (Figs. 34 e 35). Alguns ribossomos livres foram observados no estroma plastidial (Figs. 39 e 40) Também foi observada uma região fibrilar entre os tilacóides que corresponde ao genóforo (Fig. 40).

Quando tratadas com TSC, as células corticais e as células subcorticiais mostraram sítios citoplasmáticos de reações positivas. Esta reação ocorreu principalmente nos grãos de amido, onde observou-se um intenso depósito de prata, com grânulos elétron-densos espalhados no citoplasma (Figs. 41- 46).

Também foi observada uma reação fracamente positiva nas microfibrilas concêntricas da parede celular. Nos cloroplastos esta reação foi visualizada com uma fina granulação no estroma plastidial e nos grânulos elétron-densos nos plastoglóbulos (Figs.47 e 48). Estes depósitos indicam a presença de grupos 1,2 glicol típico de polissacarídeos neutros.

3.3.2 Ultra-estrutura dos segmentos apicais expostos a RUVB de *K.alvarezii* variantes pigmentares verde e vermelha

No MET foi possível observar alterações ultraestruturais nas duas variantes pigmentares exposta a RUVB. Ocorreu o aumento da espessura da parede celular das primeiras células corticais, com o aumento no número de microfibrilas concêntricas. As microfibrilas de parede celular aparecem menos evidentes (Figs. 49 -51). As primeiras células corticais perdem o formato de taça e adquirindo um contorno irregular (Figs. 50 e 51). Como observado na ML, com a coloração de CBB, o citoplasma tanto das células corticais quanto das células subcorticais tornou-se mais elétron-denso devido a há uma compactação das estruturas celulares (Figs. 50 -52).

Na maioria das células superficiais ocorreu a uma expansão em forma de domo da região apical, esta elevação é constituída por camadas sucessivas de microfibrilas embebidas em uma matriz elétron transparente (Fig. 53).

Nas duas variantes foi possível verificar a presença de corpos membranosos, onde as membranas estão distribuídas de forma concêntrica. Estas estruturas foram observadas espalhadas no citoplasma das células corticais e nas células subcorticais (Figs. 54 -57).

Quando submetidas à RUVB, nas células corticais e nas células subcorticais das duas variantes pigmentares, as organelas que mais sofreram alterações morfológicas foram os cloroplastos. Estes são numerosos, porém, com alterações caracterizadas principalmente por uma desorganização dos tilacóides. Os níveis de alterações são variáveis, alguns cloroplastos aparecem com poucos tilacóides (Figs. 58 -65) outros perdem totalmente os tilacóides (Figs. 60 e 61). A maioria mostrou uma morfologia irregular, perdendo o aspecto alongado observado nas células dos controles. Também foi possível observar corpos membranosos formados por membranas concêntricas no interior dos cloroplastos. (Figs. 62 e 63). Nos cloroplastos o número de plastoglóbulos aumenta, porém há uma diminuição no número de grãos de amido (Figs. 60 e 62).

Os núcleos das células corticais e subcorticais das duas variantes não aparentemente não sofreram alterações quando submetidos à RUVB (Fig. 66). Entretanto foi observado um aumento no número de ribossomos livres no citoplasma (Fig. 67). As mitocôndrias e os dictiossomos não também apresentaram alterações ultraestruturais após exposição à RUVB (Figs. 68-71). Porém, o número de mitocôndrias foi maior do que o observado nos controles e nas mesmas são visíveis grânulos elétron-densos na matriz mitocondrial (Fig. 69).

A associação entre Rer, mitocôndrias e dictiossomos também foi observado nas células submetidas à RUVB. Porém, os cloroplastos estavam ausentes aparecendo somente corpos membranosos (Fig. 71) As estruturas de conexões intercelulares característico das algas vermelhas apresentaram as membranas levemente mais espessas e onduladas quando comparadas às conexões entre as células das plantas controle (Figs. 72-73).

Quando as células foram submetidas ao TSC, onde se verifica um menor número de deposição de prata, evidenciando uma menor concentração de grãos de amido nas células expostas à RUVB. Nos cloroplastos os plastoglóbulos reagiram positivamente a esta reação (Fig. 74). Os grãos de amido reagiram de forma semelhante ao observados nos controles (Figs. 75 e 76) As paredes celulares também reagiram positivamente ao TSC mostrando uma leve marcação nas microfibrilas (Fig. 77).

IV. DISCUSSÃO

A parede celular das células das duas variantes pigmentares de *Kappaphycus alvarezii* do controle e dos expostos a RUVB reagiram metacromaticamente ao AT-O, indicando a de polissacarídeos ácidos, a carragenana. Estes resultados estão de acordo com os estudos em *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux que também é espécie que apresenta carragenana na parede celular (Ramarão, 1970; Saito & Oliveira, 1990 e Bouzon, 2006) em *Chondrus crispus* Stackhouse (Gordon & Mc Candless, 1973), *Chondria tenuissima* C. Agardh (Tsekos, 1985). A coloração violácea metacromática com AT-O é produzido por polissacarídeos com grupo carboxil e sulfatados se corados com pH 4,4; em pH com valor igual ou menor que 1,0 somente os grupos sulfatos têm carga elétrica e resultam em metacromasia (McCully, 1968). As carragenanas presentes na parede celular de *K. alvarezii* são ricas em grupamentos sulfatados que são ionizados, daí então pode se esperar uma reação mais intensa na parede celular das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* tanto do controle e como dos expostos a RUVB. Está interpretação baseia-se na suposição de que a configuração terciária de cada polímero expõe os poliânions sulfatados, formando uma grande quantidade de complexos com o AT-O (Gordon & Mc Candless, 1973). Com a exposição à RUVB não foi possível identificar diferenças nas reações metacromáticas das paredes celulares dos tratados quando comparadas aos controles.

Granulações metacromáticas foram observadas no citoplasma das células corticais e das células subcorticais das plantas controle e das tratadas. Os vacúolos apresentam reservas de polissacarídeos complexos, pois reagiram metacromaticamente com AT-O, indicando a presença de grupamentos sulfatados. Estas granulações poderiam ser locais de acúmulo de material que posteriormente seria incorporado à parede celular.

A parede celular das algas é formada por dois componentes: 1. o componente fibroso que forma o esqueleto da parede e 2. o componente amorfo que forma a matriz que embebe a porção fibrosa (Lee, 1989). Nas células das algas os polissacarídeos são os principais componentes estruturais da parede celular, também podendo desempenhar o importante papel de reserva citoplasmática na forma de grãos de amido (Bouzon, 2006). Nas células corticais e especialmente subcorticais dos controles foram

observados numerosos grãos de amido. A concentração destes grãos indicou que as reservas fotossintéticas são concentradas nas células subcorticais. Por outro lado, quando submetidas às RUVB ocorreu um redução na presença de grãos de amido. A reação de PAS é utilizada para identificar polissacarídeos neutros porque necessita da presença de grupos 1,2 glicol que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (Trick & Pueschel, 1990). Os grupos aldeídos ocorrem em abundância em polissacarídeos neutros como, por exemplo, os constituintes dos grãos de amido das florídeas, conforme estabelecido por Gordon & McCandless (1973) em *C. crispus*, La Claire & Dawes (1976) em *Eucheuma nudum* J. Agardh, Young (1979) em *Antithamnion defectum* Kylin, Pueschel (1979) em *Palmaria palmata* (L.) Kuntze, *H. musciformis* Bouzon, 2006. A intensa reação das células com o PAS dá um aspecto granular às células submetidas a esta reação.

Como a reação com PAS cora os grupamentos livres hidroxil vizinhos, a coloração da parede celular ocorreu provavelmente pela presença de celulose. A parede celular das células corticais e das células subcorticais das duas variantes de *K. alvarezii* do controle mostraram uma leve reação positiva, porém, a reação foi mais intensa nas paredes celulares das plantas expostos a RUVB, indicando uma maior deposição de polissacarídeos neutros, possivelmente a celulose.

O teste de Thiéry (1967) também é baseado na reação de PAS, onde os grupos 1,2 glicol são convertidos em dialdeídos por um agente oxidante, como o ácido periódico. O thiosemicarbazida (TSC) reage com estes grupos, e seus radicais thio são revelados no MET pelos depósitos de proteínato de prata (Tripodi & De Mais, 1975). A reação positiva observada no estroma plastidial dos cloroplastos submetidos a este teste, pode ser interpretada como sítios de produção de fotossintetizados que posteriormente seriam transferidos para o citoplasma e polimerizados na forma de grãos de amido das florídeas. Em todas as células analisadas das duas variantes de *K. alvarezii* os maiores depósitos de proteínato de prata foram observados nos grãos de amido.

A parede celular é definida como sendo constituída por um esqueleto fibrilar mergulhado numa matriz amorfa. As duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle quando analisadas no MET mostraram uma textura microfibrilar, com microfibrilas concêntricas estruturadas em camadas de diferentes graus de compactação. A produção dos componentes fibrilares da parede celular é similar em muitas algas

vermelhas, e parece ser originada dos grandes vacúolos fibrosos, retículo endoplasmático e, posteriormente, pela adição de vesículas derivadas dos dictiosomos (Bouzon, 1999).

O aumento na espessura da parede celular das duas variantes de *K. alvarezii* exposta a RUVB, pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra a exposição à radiação ultravioleta. Também foi observado nas células da macroalga vermelha *Audouinella savina* (F.S. Collins) Woelkerling exposta à radiação, onde ocorreu o aumento da espessura e do número de microfibrilas, estas alterações podem indicar um mecanismo de defesa contra a radiação onde as algas aumentariam a espessura das paredes celulares (Talarico, 1996).

As proteínas são os principais constituintes das organelas celulares e estão presentes no citoplasma, como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas (Bouzon, 1999). As proteínas são sintetizadas provavelmente no citoplasma, em ribossomos livres, ou provenientes de pequenas vesículas derivadas do Rer. O azul brilhante de Coomassie foi proposto como corante quantitativo para as proteínas totais em células de plantas (Cawood *et al.*, 1978; Gahan, 1984). Com este método as proteínas não foram detectadas na parede celular, entretanto, são encontradas no citoplasma das células corticais e subcorticais dos controles. Quando coradas com CBB, para detecção de proteínas, a maioria das células corticais e subcorticais das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle e dos expostos a RUVB exibiram uma forte reação no núcleo onde ficam concentradas as organelas celulares. O restante do citoplasma reagiu com uma menor intensidade, demonstrando uma menor concentração de organelas citoplasmáticas.

Com a utilização da histoquímica para proteínas CBB é observado um grande número de conexões intercelulares, relevando as rolhas das mesmas, que são de natureza protéica, como observado por Ramus (1971) em *Griffithsia pacifica* Kylin, por Tsekos (1983) em *Gigartina teedii* (Mertens ex Roth) J.V. Lamouroux e Bouzon (2006) em *H. musciformis*. A citocinese das células é incompleta na Classe Florideophyceae, devido à permanência de uma conexão intercelular (*pit connection*) entre elas. Durante a fase final da divisão celular um poro permanece entre as duas células-filhas, porém, logo é fechada pela deposição de uma substância de natureza proteínica, “a rolha” da conexão intercelular que constitui o chamado *pit plug* (Pueschel, 1980). Nas duas

variantes pigmentares de *K. alvarezii* as membranas das conexões intercelulares aparecem desestruturadas.

Estas conexões atuam na manutenção da integridade do talo. A quase totalidade das algas vermelhas é pseudoparenquimatosa. Por isso, as numerosas conexões intercelulares primárias e secundárias devem ajudar na manutenção da estrutura do talo, servindo para “amarrar” as células, mantendo-as unidas na ausência de lamela média, observada nas plantas multicelulares (Kugrens & West, 1974).

O núcleo das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle apresentou-se como uma cromatina difusa e um grande nucléolo, quando analisadas no MET. A presença de um grande núcleo pode estar relacionada com um aumento da atividade dos dictiossomos, ribossomos e cloroplastos. Nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* exposta a RUVB não apresentaram alterações ultraestruturais no núcleo. O mesmo resultado foi encontrado em *Palmaria palmata* e *P. decipiens* exposta à radiação UVA + UVB onde o núcleo permaneceu intacto (Poppe *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2003).

Nas variantes pigmentares de *K. alvarezii* exposta a RUVB o citoplasma quando analisados no MET apresentam uma grande quantidade de ribossomos livres. A observação de uma grande quantidade de ribossomos livres, sugere o aumento da produção de proteínas que seriam utilizadas, inicialmente na biossíntese das organelas membranosas ou estariam envolvidas na produção de cadeias enzimáticas necessárias para incrementar o metabolismo celular durante todo o processo de exposição à RUVB.

No citoplasma de *Ph. austrogeorgica* foram observados o aparecimento de cristais protéicos após a exposição à radiação UVA + UVB indicando danos a proteínas dos cloroplastos ou a remobilização de proteínas armazenadas para processos de reparo (Poppe *et al.*, 2003). Estes cristais protéicos são depósitos de proteínas que são mobilizadas quando há limitações de nitrogênio (Pueschel, 1992). As proteínas são conhecidas por serem eficientes na absorção da radiação UVB (Karentz, 1994). É um aumento da degradação protéica, seguido pela re-síntese para substituir proteínas sensíveis à exposição à radiação UVB (Cullen e Neale, 1994). Mecanismos de reparo a danos induzidos pela radiação UVB nas membranas ou nos componentes do transporte de elétrons aumentaria a demanda da atividade enzimática com o aumento na exigência de nitrogênio (Poppe *et al.*, 2003).

Por exemplo, proteínas importantes para o processo fotossintético como a enzima 1,5 di-fosfato carbolixase/oxigenase (Rubisco) ou proteína D1 mostra um aumento sobre a exposição à radiação UVB, levando a diminuição na atividade fotossintética (Aro *et al.*, 1993; Bornmann & Teramura 1993; Strid *et al.*, 1994).

Por isso, uma das funções dos cristais de proteínas pode ser proporcionar a neutralização contra a limitação do nitrogênio induzido pela à radiação UVB (Poppe *et al.*, 2003).

Na maioria das células dos vegetais o complexo golgiense consiste de numerosos dictiossomos compostos de cisternas achatadas, polarizadas com pequenas vesículas associadas à face de maturação. O papel do complexo golgiense no desenvolvimento das células vegetais tem sido discutido sobre vários aspectos. Vesículas derivadas dos dictiossomos estão envolvidas na concentração e transporte de material de parede celular, além de outros produtos subcelulares são processados nos dictiossomos e associados ao sistema de endomembranas (Schnepf, 1993).

Os dictiossomos e os retículos endoplasmáticos rugosos das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* exposta a RUVB não apresentaram alterações ultraestruturais. O mesmo resultado foi encontrado por (Poppe *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2003) em *Palmaria palmata* e *P. decipiens* exposta à radiação UVA + UVB.

Nas duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle, os dictiossomos foram observados em íntima associação com as mitocôndrias, tal associação sugere a transferência de energia para a alta atividade dictiossômica. Entretanto, a base metabólica desta associação física entre estas organelas não é muito clara como já observado em outras algas vermelhas (Duckett & Peel, 1978; Delivopoulos & Tsekos, 1986). Esta associação pode representar um acoplamento de sítios de produção de energia com um sítio de utilização de energia (Scott & Dixon, 1973).

Além da associação mitocôndria-dictiossomo, característica das algas vermelhas foi observada também uma associação cloroplasto-mitocôndria-dictiossomo. Este complexo de associação pode representar uma cadeia metabólica na quais os fotossintetizados produzidos pelos cloroplastos seriam utilizados na mitocôndria para produzir ATP, o qual seria consumido na atividade secretora dos dictiossomos (Bouzon, 1999).

Nas mitocôndrias das duas variantes expostas a RUVB não foram observadas modificações ultraestruturais. As alterações encontradas foram o aumento no número de mitocôndrias após a exposição à radiação. Este aumento no número de mitocôndrias poderia ocasionar um aumento no processo de respiração celular e conseqüentemente um aumento no metabolismo energético. Outros estudos relatam alterações ultraestruturais nas mitocôndrias de *P. palmata* e *P. decipiens*. As alterações ultraestruturais nas mitocôndrias de *P. palmata* estão relacionadas com modificações na forma tubular das cristas mitocondriais para a forma sacular após a exposição à radiação UVA + UVB (Poppe *et al.*, 2003). Na macroalga verde *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing exposta 24 h a radiação UVA + UVB apresentou leves alterações nas mitocôndrias (Holzinger *et al.*, 2006). Estudos com a planta *Zea mays* (Santos *et al.*, 1993) e *Allium cepa* (Lichlscheidl-Schultz, 1985) descrevem que a radiação UV induz a mudança na estrutura da mitocôndria. Esta mudança ultraestrutural pode resultar em um distúrbio no metabolismo do ATP (Vosjan *et al.*, 1990).

Nas células corticais e subcorticais das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle, o Rer e o envelope nuclear foram observados em íntima associação com grãos de amido. O retículo endoplasmático parece estar associado com o desenvolvimento dos grãos de amido, justamente na parte externa do envelope nuclear (Delivopoulos & Kugrens, 1984), o que também foi observado em *Polysiphonia novae-angliae* W. R. Taylor (Wetherbee & Wynne, 1973) e em *Pterocladia capillacea* (Tripodi, 1971). Estas observações implicam num possível envolvimento do retículo endoplasmático, do envelope nuclear, ou de ambos, na polimerização dos grãos de amido, porém a rota metabólica deste processo permanece desconhecida (Delivopoulos & Kugrens, 1984).

Como já observado em outras algas vermelhas (Peyrière, 1963; Tripodi, 1971) a atividade dos dictiossomos é intensa naquelas células onde a síntese dos grãos de amido é alta. Isto parece confirmar a hipótese de que uma das possíveis rotas metabólicas de polimerização dos grãos de amido nas algas vermelhas envolva as vesículas dictiossomais. Em contrapartida, a formação dos grãos de amido via RE ou vesículas derivadas dos dictiossomos mostra pouco provável já que os grãos de amido não apresentam envoltório membranar (Bouzon, 1999). Desta forma a rota de polimerização

mais provável envolveria enzimas produzidas em polissomos livres, justificando a grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma.

A ultra-estrutura dos cloroplastos é uma característica de grande valor taxonômico nas algas, sendo o arranjo dos tilacóides nos diferentes filos a característica mais importante, que corrobora com a taxonomia clássica (Dodge, 1973).

Nas algas vermelhas, os tilacóides não se associam, uns aos outros encontram-se livres nos cloroplastos. A posição filogenética destes organismos é controversa, sendo considerados eucariotos primitivos com base na ausência do flagelo e na presença de ficobilissomos como pigmentos acessórios (Tripodi & Gargiulo, 1984).

Nos cloroplastos, o estroma plastidial é preenchido por ribossomos. A presença destas organelas, em grande número, sugere uma alta taxa de replicação pela produção de proteínas endógenas, o qual também levaria a um aumento da atividade metabólica do próprio cloroplasto. A reatividade do estroma plastidial o teste de Thiéry, onde os fotossintetizados foram detectados como granulações finas, espalhadas no estroma, indicam que os carboidratos com grupos 1,2 glicol, sintetizados nos cloroplastos, são inicialmente acumulados no estroma, e posteriormente polimerizados em grãos de amido no citoplasma, onde se observa um intenso depósito de proteinato de prata.

Os cloroplastos das duas variantes pigmentares de *K. alvarezii* do controle mostram estrutura típica das algas vermelhas com um tilacóide periférico e tilacóides paralelos não formando pilhas. O número de tilacóides paralelos é variável e depende principalmente da localização da célula na alga.

Os cloroplastos das variantes expostos a RUVB apresentam alterações ultraestruturais (perda de tilacóides, desestruturações e formação de corpos membranosos com membranas concêntricas) significativas quando comparadas aos controles. Estudos com as macroalgas vermelhas *Palmaria palmata*, *P. decipiens*, *Phycodrys austrogeorgica* e *Bangia atropurpurea* expostas à radiação UVA + UVB apresentaram também alterações ultraestruturais nos cloroplastos como dilatação dos tilacóides, desorganização da forma, formação de vesículas translúcidas entre os tilacóides (Poppe *et al.*, 2003). Em *Ph. austrogeorgica* após 12 h de exposição à radiação UVA + UVB os ficobilissomos apresentam-se alterados (Poppe *et al.*, 2003). Em *P. palmata* após ser exposta durante 6 a 8 h a radiação UVA + UVB foram observadas alterações ultraestruturais nos cloroplastos. Os cloroplastos estavam

alterados e aparecem vesículas translúcidas (Poppe *et al.*, 2002). As alterações ultraestruturais ocorrem principalmente nos cloroplastos, modificando a quantidade, o tamanho dos mesmos e a organização quanto ao número de tilacóides (Talarico & Maranzana, 2000). As alterações nos cloroplastos ocorrem após um período mais longo de exposição, ocasionando variações na composição pigmentar. Estas alterações podem ser estratégias de aclimação em longo prazo (Talarico & Maranzana, 2000). Na planta *Pisum sativum* exposta à radiação UV ocorre à dilatação dos tilacóides dos cloroplastos e a formação de vesículas translúcidas (Brandle *et al.*, 1977). Em *Beta vulgaris* também foram observadas as dilatações dos tilacóides dos cloroplastos quando expostas a radiação UVB (Bornmann *et al.*, 1983). Entretanto, nas algas verdes como *Pr. crispata* exposta 24 h a radiação UVA + UVB os cloroplastos apresentaram leves alterações nos tilacóides, diminuição no número de plastoglóbulos e o aparecimento de numerosos glóbulos elétron densos (Holzinger *et al.*, 2006). A microalga verde *Micrasterias denticulata* C. Agardh também apresentou alterações ultraestruturais nas endomembranas, redistribuição dos cloroplastos e a formação de vacúolos (Meindl & Lütz, 1996; Lütz *et al.*, 1997). O fotossistema II é um importante alvo da radiação UVB em plantas e macroalgas (Post *et al.*, 1992; Neale *et al.*, 1993 e Vass, 1997).

A radiação UVB fisiologicamente pode dificultar o estabelecimento do gradiente de prótons através da membrana dos tilacóides e conseqüentemente as reações fotossintéticas serão prejudicadas (Poppe *et al.*, 2003). Outros relatos de mudanças induzidas pela radiação UVB incluem a despolarização do potencial da membrana liberando íons de Cl^- , Na^+ e K^+ e diferentes atividades da ATPase nas membranas celulares (Doughty & Hope 1973; Murphy 1983; Gallo *et al.*, 1989) e nos tilacóides (Iwanzik *et al.*, 1983; Chow *et al.*, 1992; Hideg & Vass 1996).

As gotas lipídicas elétron-densas descritas nos tilacóides de *K. alvarezii*, são os plastoglobuli, que também foram descritas por Wetherbee e Wynne (1973) em *Polysiphonia novae-angliae* W. R. Taylor, por Pueschel (1988a) em *Hildenbrandia rubra* (Sommerfelt) Meneghini e por Bouzon (2006) em *H. musciformis*. Os corpos elétron-densos os plastoglobuli encontrados nas células corticais e nas células subcorticais de *K. alvarezii* são interpretados como material lipídico com função de reserva. Nas mesmas células quando expostas a RUVB ocorre o aumento no número de corpos elétron-densos os plastoglóbulos, possivelmente este seja utilizado como

depósito de substâncias de reserva, pois, há diminuição no número de grãos de amido no citoplasma destas células.

A organização espacial entre os cloroplastos com as mitocôndrias numa freqüente associação observado nos diversos tipos de células de *K. alvarezii* indica um mecanismo que aumentaria a interação metabólica entre as organelas conforme observado em *H. musciformis* (Bouzon, 2006).

V. REFERÊNCIAS

ARECES A.J. 1995. Cultivo comercial de carragenófitas del género *Kappaphycus* Doty. *In: ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (eds). Manual de Metodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 529-549.

ARO, E. M.; VIRGIN, I. & ANDERSSON, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1143**: 113-34

ARNOLD, W.; MITRENGA, D. & MAYRESBACH, H. 1975. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA)- Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochemica**, **14**: 271-277.

BISCHOF, K.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. **Planta**, **211**: 555-562.

BORNMANN, J. F.; EVERT, R. F. & MIERZWA, R. J. 1983. The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. **Protoplasma**, **117**: 7–16.

BORNMANN, J. F. & TERAMURA, A. H. 1993. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. *In*: YOUNG, A. R. (Ed.) **Environmental UV Photobiology**. Plenum Press, New York, 427–71.

BOUZON, Z.L. 1993. Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 66 pp.

BOUZON, Z.L. 1999. Histoquímica e ultra-estrutura da espermatogênese e carposporogênese de algas Gracilarióides (Rhodophyta). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 116 pp.

BOUZON, Z.L.; MIGUENS, F. & OLIVEIRA, E.C. 2000. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). **Cryptogamic Algologie**, **21**: 33-47.

BOUZON, Z.L. 2006. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, **29**: 229-238.

BRANDLE, J.R.; CAMPBELL, W.F.; SISSON, W.B. & CALDWELL, M.M. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. **Plant Physiology**, **60**:165-169.

BRITT, A.B. 1995. DNA damage and repair in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, **47**: 75-100.

BUCK, C.B.; THOMPSON, C.D.; ROBERTS, J.N.; MÜLLER, M. & LOWY, D.R. 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **PLoS Pathogness**, **2**:671-680.

BÜHLMANN, B.; BOSSARD, P. & UEHLINGER, U. 1987. The influence of longwave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity (¹⁴C-assimilation) of phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, **9**: 935-943.

BUMA, A.G.J.; VAN OIJEN, W.H. & VAN DE POLL, M.J.W. 2000. On the high sensitivity of the marine prymnessiophyte *Emiliana huxleyi* to ultraviolet-B. **Journal of Applied Phycology**, **131**: 296-303.

CABRERA, S.; BOZZO, S. & FUENZALIDA, H. 1995. Variation in UV radiation in Chile. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **28** : 137-142.

CAWOOD, A.; POTTER, U. & DICKINSON, H.G. 1978. An evaluation of coomassie brilliant blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **76**: 645-650.

CHOW, W. S.; STRID, A. & ANDERSON, J. M. 1992. Short-term treatment of pea plants with supplementary Ultraviolet-B radiation: Recovery time-courses of some photosynthetic functions and components. *In*: MURATA, N. (Ed.) **Research in Photosynthesis**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 361–364.

CULLEN, J. J. & NEALE, P. J. 1994. Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. **Photosynthesis Research**, **39**: 303–20

DE MARIO, M. & BALLESTERO, S.D. 2004. Aplicação de resíduo do processamento industrial de alga marinha ao solo. **Revista Biociências de Taubaté**, **10**: 177-188.

DELIVOPOULOS, S.G. & KUGRENS, P. 1984. Ultrastructure of carposporogenesis in the parasitic red alga *Faucheocolax attenuata* Setch (Rhodymeniales, Rhododymeniaceae) **American Journal of Botany**, **71**:1245-1259.

DELIVOPOULOS, S.G. & TSEKOS, I. 1986. Ultrastructure of carposporogenesis in the red alga *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Gracilariaceae). **Botanica Marina**, **29**: 27-35.

DIFFEY, B.L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Physics Medicine Biology**, **36**: 299-328.

DODGE, J. D. 1973. **The fine structure of algal cells**. New York- London, Academic Press. 261 pp.

DÖHLER, G & BIERMANN, I. 1987. Effect of UV-B irradiance on the response of ¹⁵N-nitrate uptake of *Lauderia annulada* and *Synedra planctonica*. **Journal Plankton Research**, **9**: 881-890.

DOTY, M.S. 1987. The production and use of *Eucheuma*. In: DOTY, M.S.; CADDY, J.F. & SANTELICES, B. (eds). **Case Studies of Seven Commercial Seaweed Resources**. FAO Fisheries Technical Paper.123-161.

DOUGHTY, C. J. & HOPE, A. B. 1973. Effects of ultraviolet radiation on the membranes of *Chara corallina*. **Journal of Membrane Biology**, **13**: 185-98.

DUCKETT, J.G. & PELL, M.C. 1978. The role transmission electron microscopy in elucidating the taxonomy and phylogeny of the Rhodophyta. In: IRVINE, D.E & PRICE, J.H (eds). **Modern Approaches to the Taxonomy of Red and Brown Algae**. Academic Press, London. 157-204.

EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions in Marine Science. In: ALVEAL, K.; FERRARIO,

M.E.; OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. **Manual de Métodos Ficológicos**. Universidad de Concepción, Chile. 863 pp.

FRANKLIN, L.A. & FORSTER, R.M.; 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. **European Journal Phycology**, **323**: 207-232.

GALLO, R. L.; KOCHEVAR, I. E. & GRANSTEIN, R. D. 1989. Ultraviolet radiation induces a change in cell membrane potential in vitro: a possible signal for ultraviolet radiation induced alteration in cell activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **49**: 655-62

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

GANTT, E. 1981. Phycobilisomes. **Annual Review Plant Physiology**, **32**: 327-347.

GORDON, E.M. & McCANDLESS, E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J. (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian Institute of Science, Halifax. 111-133.

GORDON-MILLS E.M.; TAS, J. & MCCANDLESS, E.L. 1978. Carrageenans in the cell walls of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophyceae, Gigartinales). III. Metachromasia and the topological reaction. **Journal of Applied Phycology**, **17**: 95-104.

HÄDER, D.P. & HÄDER, M. 1988. Inhibition of motility and phototaxis in the green flagellate, *Euglena gracilis*, by UV-B radiation. **Archives Microbiology**, **150**: 20-25.

HIDEG, E. & VASS, I. 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. **Plant Science**, **115**: 251–60

HAYAT, M. A. 1986. **Basic techniques for transmisión electrón microscopy**. Academic Press Inc. London, 411 pp.

HAYAT, M. A. 1993. **Stains and Cytochemical methods**. Plenum Press, N.Y. 455 pp.

HOLZINGER, A.; LÜTZ, C.; KARSTEN, U & WIENCKE, C. 2004. The effect of ultraviolet radiation on ultrasctruture and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Artic waters. **Plant Biology**, **6**: 568-577.

HOLZINGER, A. & LÜTZ, C. 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Mícron**, **37**: 190–207

HOLLÓSY, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Microbiology**, **33**: 179-197.

IWANZIK, W.; TEVINI, M. & DOHNT, G. 1983. Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, **58**: 401–7.

KARENTZ, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. *In*: WEILER, C. S. & PENHALE, P. A. (Eds) **Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects**. American Geophysical Union, Washington, D.C., 93–110 pp.

KUGRENS, P. & WEST, J. 1974. The ultrastructure of carposporogenesis in the marine hemiparasitic red alga *Erythrocytis saccata*. **Journal of Applied Phycology**, **19**: 139-147.

JOKIEL, P.L. & YORK, R. H., Jr. 1982. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. **Bulletin Marine Science**, **32**: 301-315.

JOKIEL, P.L. & YORK, R. H., Jr. 1984. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. **Limnology Oceanography**, **29**: 192-199.

LÃO, K. & GLASER, A.N. 1996. Ultraviolet-B photodestruction of light-harvesting complex. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **93**: 5258-5263.

LEE, R.E. 1989. **Phycology**. 2 nd ed. New York: Cambridge University Press. 715 pp.

LESSER, M.P. & SHICK, J.M. 1989. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. **Marine Biology**, **102**: 243-255.

LICHTSCHEIDL-SCHULTZ, I. 1985. Effects of UV-C and UV-B on cytomorphology and water permeability of inner epidermal cells of *Allium cepa*. **Plant Physiology**, **63**: 269-76.

LORENZEN, C. J. 1979. Ultraviolet radiation and phytoplankton photosynthesis. **Limnology Oceanography**, **24**: 1117-1120.

LÜTZ, C.; SEIDLITZ, H.K. & MEINDL, U. 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. **Plant Ecology**, **128**: 54-64.

McCULLY, M.E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **175**: 702-711.

Mc CULLY, M.E. 1968. Histological studies on the genus *Fucus*. **Protoplasma**, **62**:20-40.

MEINDL, U. & LÜTZ, C. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of green alga *Micrasterias denticulate*. **Journal Photochemical Photobiology B: Biology**, **36**: 285-292.

MURPHY, T. M. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. **Plant Physiology**, **58**: 381-8.

NEALE, P. J.; CULLEN, J. C; LESSER, M. P. & MELIS, A. 1993. Physiological bases for detecting and predicting Photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV radiation. *In*: YAMAMOTO, H. Y. & SMITH, C. M. (eds) **Photosynthetic Responses to the Environment**. American Society of Plant Physiologists, Rockville. 61-77.

PAULA, E.J. & PEREIRA, R.T.L. 1998. Da "marinomia" maricultura da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* para produção de carragenanas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, **8**: 10-15.

PEYRIÈRE, M. 1963. Les plastes et l'amidon floridéen chez quelques Rhodophycées. **Compt. R. Acad. Sci.** **257**: 730:732.

PICULELL, L. 1995. Gelling carrageenans. *In*: STEPHEN, A.M. (ed). **Food polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker, New York. 205-244.

POPPE, F.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. **Botanica Marina**, **45**: 253–61.

POPPE, F.; SCHMIDT, R. A. M.; HANELT, D. & WIENCKE, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. **Phycological Research**, **51**: 11–19.

PREDIERI, S.; NORMAN, H.A.; KRIZEK, D.T.; PILLAI, P.; MIRECKI, R.M. & ZIMMERMAN, R.H. 1995. Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene evolution in doyenne d'hiver pear shoots grown *in vitro* under different photosynthetic photon fluxes. **Environmental and Experimental Botany**, **35**: 151-160.

POST, A.; GENTLE, S. & LARKUM, A.W.D. 1992. Algal photosynthesis: inhibition by UV-B radiation, recovery and UV-absorbing pigments. *In*: MURATA, N. (ed.) **Research in Photosynthesis, Vol. IV**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 847–850.

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

PUESCHEL, C. M. 1980. A reappraisal of the cytochemical properties of rhodophycean pit plugs. **Protoplasma**, **19**: 210-217.

PUESCHEL, C.M.1988a. Cell sloughing and chloroplast inclusions in *Hildenbrandia rubra* (Rhodophyta, Hildenbrandiales). **European Journal of Phycology**, **23**:17-23.

PUESCHEL, C. M. 1992. An ultrastructural survey of the diversity of crystalline, proteinaceous inclusions in red algal cells **Journal of Applied Phycology**, **31**: 489–99.

RAMARAO, K.R. 1970. Studies on growth cycle and phycocolloid content in *Hypnea musciformis* (Wulf) Lamouroux. **Botanica Marina**, **13**:163-165.

RAMUS, J. 1971. Properties of septal plugs from the red *Griffithsia pacifica*. **Journal of Applied Phycology**, **10**: 99-103.

REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, **17**: 208-212.

SAITO, R.M. & OLIVEIRA, E.C. 1990. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiology**, **204/205**: 585-588.

SANTOS, I.; ALMEIDA, J. M. & SALEMA, R. 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. **Journal Plant Physiology**, **141**: 450–6.

SCHNEPF, E. 1993. Golgi apparatus and slime secretion in plants: the early implications and recent models of membrane traffic. **Protoplasma**, **172**: 3-11.

SCOTT, J. & DIXON, P. 1973. Ultrastructure of spermatium liberation in the marine red alga *Ptilota densa* **Journal of Applied Phycology**, **9**: 85-91.

SMITH, R.C.; BAKER, K.S.; HOLM-HANSEN, O. & OLSON, R.S. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **31**:585-592.

SMITH, R. C.; PREZELIN, B. B.; BAKER, K. S.; BIDIGARE, R. R.; BOUCHER, N. P.; COLEY, T.; KARENTZ, D.; MACINTYRE, S.; MATLICK, H. A.; MENZIES, D.; ONDRUSEK, M.; WAN, Z. & WATERS, K. J. 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. **Science**, **255**: 952–959.

SOMMARUGA, R. 2001. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **62**: 35-42.

SOMOSY, Z. 2000. Radiation response of cell organelles. **Micron**, **31**. 165-181.

SONNTAG, B.; SUMMERER, M. & SOMMARUGA, R. 2007. Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic *Chlorella*-bearing ciliates (Ciliophora). **Freshwater Biology**, **52**: 1476-1485.

STRID, A.; CHOW, W. S. & ANDERSON, J. M. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. **Photosynthesis Research**, **39**: 475–89.

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

TALARICO, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. **Scientia Marina**, **60**: 205-22.

TALARICO, L. & MARANZANA, G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **56**:1-11.

THIÉRY J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. **Journal de Microscopie**, **6**: 987-1018.

TEVINI, M. & TERAMURA, A. H. 1989. UV-B effects on terrestrial plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **50**: 479-487.

TRICK, H.N. & PUESCHEL, C.M. 1990. Cytochemistry of pit plugs in *Bossiella californica* (Corallinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, **29**:403-409.

TRIPODI, G. 1971. Some observations of the ultrastructure of the red alga *Pteriocladia caapillacea* (Gme) Born. et Thur. **Journal Submicroscopy Cytology**, **3**:63-70.

TRIPODI, G. & DE MASI, F. 1975. Cytological localization of polysaccharidic molecules in some red algae. **Journal Submicroscopy Cytology**, **7**:197-209.

TRIPODI, G. & GARGIULO, G.M. 1984. Relationships among membranes in plastids of the red alga *Nitophyllum punctatum* (Stackh) Grev. **Protoplasma**, **119**: 55-61.

TSEKOS, I. 1983. The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae). Gonimoblast cells and carpospores. **Flora**, **174**: 191-211.

TSEKOS, I., SCHNEPF, E. & MAKRANTONAKIS, A. 1985. The ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Chondria tenuissima* (Good. Et Woodw.) (Ceramiales, Rhomelaceae). **Annals of Botany**, **55**: 607-619.

TSEKOS, I.; REISS, H.D.; ORFANIDIS, S. & OROLOGAS, N. 1996. Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New Phytologist*, **133**: 543-51.

VASS, I. 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *In*: PESSARAKLI M (ed). **Handbook of photosynthesis**. New York: Marcel Dekker. 931-949.

VOSJAN, J. H.; DÖHLER, G. & NIEUWLAND, G. 1990. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica). **Netherlands Journal of Sea Research**, **25**:391-394.

WETHERBEE, R & WYNNE, M.J.1973.The fine structure of the nucleus and nuclear associations of developing carposporangia in *Polysiphonia novae-angliae* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, **9**: 402-407.

WOOD, W. F.1987. Effect of solar ultraviolet radiation on the kelp *Ecklonia radiata*. **Marine Biology**, **96**:143-150.

WORREST, R.C .1982. Review of Literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. *In*: CALKINS, J. (ed) **The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems**. Plenum Press.429-457.

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

YOUNG, D.N. 1979. Ontogeny, histochemistry and fine structure of cellular inclusions in vegetative cells of *Anthithamnion defectum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, **15**:42-48.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho indicam que a RUVB ocasionou alterações na variante pigmentar verde e vermelha de *K. alvarezii*. Dentre esses, a RUVB provocou alterações nas taxas de crescimento e na morfologia dos segmentos apicais das duas variantes pigmentares (verde e vermelha) de *K. alvarezii*. As alterações morfológicas ocorrem na região apical dos talos, quando comparados com as amostras dos talos do controle, provocando curvatura na região apical onde normalmente se dá o crescimento e a dicotomia.

Também foram verificadas alterações nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes. Os segmentos apicais dos indivíduos controle das duas variantes apresentaram concentrações de *Cl.a* menores que as concentrações dos expostos à RUVB. Entretanto, as concentrações das três ficobiliproteínas (FE, AFC e FC) dos segmentos apicais expostos diminuíram em relação às concentrações do controle.

Alterações histoquímicas e ultra-estruturais foram observadas nas duas variantes pigmentares expostas a RUVB. As seções transversais das duas variantes de *K. alvarezii* exposta a RUVB quando coradas com AT-O evidenciaram um citoplasma das células corticais e sub-corticais mais denso quando comparado às células do controle. Com a reação de PAS foi possível detectar uma redução na densidade de grãos de amido nas células corticais e nas células subcorticais das duas variantes quando comparadas com o observado nos controles. Porém, a reação PAS positiva foi mais intensa na parede celular das plantas tratadas com UVB. A reação com CBB nas células corticais e das células subcorticais das duas variantes das plantas tratadas com UVB, a coloração foi mais intensa do que o observado com citoplasma das células dos controles.

No MET foi possível observar alterações ultra-estruturais nas duas variantes pigmentares exposta a RUVB. Ocorreu o aumento da espessura da parede celular das primeiras células corticais, com o aumento no número de microfibrilas concêntricas. As

primeiras células corticais perdem o formato de taça e adquirindo um contorno irregular. Como observado na ML, com a coloração de CBB, o citoplasma tanto das células corticais quanto das células subcorticais tornou-se mais elétron-denso devido a há uma compactação das estruturas celulares.

Nas duas variantes foi possível verificar a presença de corpos membranosos, onde as membranas estão distribuídas de forma concêntrica. Estas estruturas foram observadas espalhadas no citoplasma das células corticais e nas células subcorticais.

Quando submetidas à RUVB, nas células corticais e nas células subcorticais das duas variantes pigmentares, as organelas que mais sofreram alterações morfológicas foram os cloroplastos. Estes são numerosos, porém, com alterações caracterizadas principalmente por uma desorganização dos tilacóides. Nos cloroplastos o número de plastoglobulos aumenta, porém há uma diminuição no número de grãos de amido.

Os núcleos das células corticais e subcorticais das duas variantes não aparentemente não sofreram alterações quando submetidos à RUVB. Entretanto foi observado um aumento no número de ribossomos livres no citoplasma. As mitocôndrias e os dictiossomos não também apresentaram alterações ultra-estruturais após exposição à RUVB.

As estruturas de conexões intercelulares característico das algas vermelhas apresentaram as membranas levemente modificadas quando comparadas às conexões entre as células das plantas controle.