

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E DO DESENVOLVIMENTO**

**RESPOSTAS BIOLÓGICAS DE MACROALGAS
VERMELHAS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA-B: ANÁLISES BIOQUÍMICAS,
CELULARES E FISIOLÓGICAS.**

ÉDER CARLOS SCHMIDT

Florianópolis

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E DO DESENVOLVIMENTO**

**RESPOSTAS BIOLÓGICAS DE MACROALGAS
VERMELHAS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA-B: ANÁLISES BIOQUÍMICAS,
CELULARES E FISIOLÓGICAS.**

ÉDER CARLOS SCHMIDT

Orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Co-orientador: Dr. Marcelo Maraschin

Tese apresentada ao Pós-graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina, para
obtenção de Título de Doutor em Biologia Celular e
do Desenvolvimento

Florianópolis

2011

Ficha Catalográfica

Schmidt, Eder Carlos.

Respostas biológicas de macroalgas vermelhas submetidas à radiação ultravioleta-B: Análises bioquímicas, celulares e fisiológicas. 2011. 180 f.

Orientadora: Dra. Zenilda Laurita Bouzon

Co-orientador: Dr. Marcelo Maraschin

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia celular e do desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho

Profa. Dra. Luciane Cristine Ouriques

Profa. Dra. Neusa Steiner

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon (Orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Maraschin (Co-orientador)

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!** A todos os “**Anjos e Santos**” que protegeram nos momentos difíceis.

Aos meus pais Orlando e Maria de Lourdes, e as minhas irmãs Jucimar Maria e Geovana, pela força e compreensão, por terem me dado a chance de estudar, crescer e ser digno de receber a sua atenção. **Amo vocês, Obrigadooooooooo!**

Agradeço a minha amada noiva Luciane Lombardi e sua família, pela compreensão e incentivo ao longo destes anos de estudo e ausência. **Amo vocês, Obrigadooooooooo!**

Agradeço aos meus colegas do **LAMAR**, Andressa, Beatriz, Carime, Carol, Claudiane, Carmen, Débora, Francine, Gabriel, Gladys, Jenny, Marianne, Marthiellen, Ticiane, Sérgio, pelos diversos momentos de diversão e auxílio nos experimentos.

A minha amiga Dra. Fernanda Ramlov que me acompanha desde a graduação, pelo auxílio nas extrações e determinações dos carotenóides e compostos fenólicos, e diversas discussões sobre os experimentos, pela ajuda nos estudos, trabalhos e companheirismo. **Muito, Obrigado!**

Ao meu grande amigo Rodrigo WILLAMIL dos Santos pela parceria, ajuda no laboratório, nos experimentos e pela amizade. **Muito, Obrigado!**

Ao professor Dr. Paulo Horta pelas grandiosas contribuições e sugestões para o enriquecimento do trabalho. A professora Dra. Alexandra Latini e Roberta de Paula Martins pela ajuda nas análises bioquímicas e interpretações dos resultados. **Muito, Obrigado!**

A professora Dra. Luciane C. Ouriques pela ajuda e carinho nestes anos de convívio e diversas parcerias. **Muito, Obrigado!**

Agradeço aos funcionários do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela ajuda nas análises das amostras de microscopia. A CAPES pela bolsa de pesquisa, ao CNPq e FAPESC por ajudarem no aporte financeiro.

Agradeço do fundo do meu coração a minha professora, mestre e orientadora Dra. Zenilda Laurita Bouzon, que ao longo de cinco anos me ensinou tudo sobre pesquisa e a paixão pelo maravilhoso mundo microscópico. Obrigado pelo carinho, pela atenção, e pela oportunidade de trabalhar com você. **Muito Obrigado!**

Não posso me esquecer do meu co-orientador professor Dr. Marcelo Maraschin, pelo seu esforço e atenção concentrada nos detalhes, por ensinar ser crítico na forma de pensar e executar uma pesquisa. Muito obrigado por ensinar admiração pelo mundo bioquímico. **Muito obrigado!**

A todos muito obrigado pela ajuda!

“We have both seen many things but we still want to see more...”

Mercanti di Liquore

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Comparação das diferentes análises realizadas em *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* e na variante marrom de *K. alvarezii*.....165

SÚMARIO

AGRADECIMENTO	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELA	VIII
SUMÁRIO	IX

I. INTRODUÇÃO GERAL.....1

1.1 VISÃO GERAL DAS ALGAS.....	1
1.2 RELEVÂNCIA DAS MACROALGAS.....	1
1.3 A DIVISÃO RHODOPHYTA.....	2
1.3.1 <i>Gracilaria domingensis</i> (Kützing) Sonder ex Dickie.....	2
1.3.2 <i>Gelidium floridanum</i> W. R. Taylor.....	3
1.3.3 <i>Chondracanthus teedei</i> (Mertens ex Roth) Kützing.....	3
1.3.4 <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamouroux.....	4
1.3.5 <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty ex P. Silva variante marrom.....	4
1.4 DIMINUIÇÃO DA CAMADA DE OZÔNIO (O ₃) E AUMENTO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	5

II. JUSTIFICATIVA.....9

III. OBJETIVOS.....10

3.1 Objetivos Gerais.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	11

IV. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Área de Estudo.....	12
4.2 Coleta e processamento do material biológico.....	12
4.3 Condições de cultivo.....	13
4.4 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais de tratamentos controle e expostos à Radiação UVB.....	14
4.5 Análise em microscopia de luz (ML).....	15
4.5.1 Testes citoquímicos.....	15
4.6 Análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET).....	16
4.7 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	16
4.8 Análise em microscópio confocal (MC)	17
4.9 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes.....	17
4.9.1 Extração e dosagem de clorofila <i>a</i> (Cl. <i>a</i>).....	17
4.9.2 Extração e dosagem das ficobiliproteínas.....	18
4.10 Extração e identificação de carotenóides.....	18
4.11 Extração e identificação de compostos fenólicos.....	19
4.12 Análises bioquímicas.....	20
4.12.1 Atividade da glutathione peroxidase (GPx).....	21
4.12.2 Atividade da glutathione redutase (GR).....	21
4.12.3 Preparação das amostras para avaliação da atividade do complexo da cadeia respiratória.....	21
4.12.4 Determinação da atividade da enzima NADH desidrogenase.....	22
4.12.5 Determinação de proteínas totais.....	22
4.13 Medidas da atividade fotossintética.....	22
4.14 Análise e interpretação dos dados.....	23

CAPÍTULO 1

Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain.....	24
--	----

CAPÍTULO 2

Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance.....40

CAPÍTULO 3

Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales).....56

CAPÍTULO 4

Morphological, physiological and biochemical responses of the carragenophyte *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B.....75

CAPÍTULO 5

Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B: changes in ultrastructure, pigments and antioxidant systems.....115

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....147

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....166

I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 VISÃO GERAL DAS ALGAS

As algas constituem um grupo polifilético de organismos que apresentam um histórico evolutivo muito diverso (Lobban & Harrison, 1994), compreendendo 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).

Bioquímica e fisiologicamente as algas são similares em muitos aspectos às plantas vasculares, possuindo as mesmas vias metabólicas básicas de síntese de clorofila *a* como principal pigmento fotossintético, pigmentos acessórios clorofilas *b*, *c*, os carotenóides (β -caroteno, luteína, xantofila e fucoxantina) e as ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina).

1.2 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 (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). Nas últimas décadas, grande importância econômica foi atribuída às macroalgas marinhas devido aos seus compostos de parede celular: alginatos, agaranas e caragenanas. Além destes, são conhecidos também os compostos com ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Hudson *et al.*, 1999).

1.3 A DIVISÃO RHODOPHYTA

As Rhodophyta ou algas vermelhas são caracterizadas por apresentarem clorofila *a*, ficobiliproteínas, ausência completa de flagelos em todos os seus representantes e fases do ciclo de vida, amido das florídeas como principal produto de reserva e tilacóides livres nos cloroplastos (Woelkerling, 1990). As ficobiliproteínas estão organizadas em estruturas denominadas ficobilissomos distribuídos nos tilacoídes dos cloroplastos (Zuber, 1986), havendo três tipos de ficobiliproteínas: a ficoeritrina (pigmento vermelho), a ficocianina e a aloficocianina (pigmentos azuis).

As algas vermelhas apresentam relevância econômica, pois biossintetizam uma vasta variedade de polissacarídeos sulfatados como principais componentes da matriz extracelular, tais como as agaranas e as carragenanas (Usov, 1992). Esses polissacarídeos são utilizados em setores economicamente importantes, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, apresentando alto potencial biotecnológico e despertando interesse mundial devido ao seu alto valor econômico (De Ruiter & Rudolph, 1997).

1.3.1 *Gracilaria domingensis* (Kützting) Sonder ex Dickie

Gracilaria domingensis é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Estado do Ceará até o litoral de Santa Catarina (Schmidt *et al.*, 2010). Esta espécie é produtora de agarana, mas sua importância deve-se a sua utilização na dieta humana (comida *in natura*), sendo exportada principalmente para o Japão (Guimarães *et al.*, 1999).

Atualmente, as espécies do gênero *Gracilaria* Greville são responsáveis por cerca de 60% da produção mundial de agarana (Tseng, 2001). Isto se deve

principalmente às altas taxas de crescimento e fácil propagação vegetativa das espécies deste gênero, que favorecem o seu cultivo (Kain & Destombe, 1995). Além disso, a descoberta de tratamentos alcalinos que possibilitam o melhoramento da qualidade de seu gel também torna atrativa a sua utilização (Murano, 1995).

1.3.2 *Gelidium floridanum* W. R. Taylor

Gelidium floridanum é amplamente distribuída no litoral brasileiro, ocorrendo desde o Estado do Espírito Santo até o litoral de Rio Grande do Sul (Oliveira *et al.*, 2010). A agarana extraída de *Ge. floridanum* é um ficocolóide que possui muitas utilizações, principalmente na indústria alimentícia e na área de pesquisa, por suas aplicações biotecnológicas (Matulewicz, 1996). Praticamente toda a matéria-prima utilizada para a extração comercial de agarana do gênero *Gelidium* J.V.Lamouroux provém de bancos naturais, principalmente da França, México, Chile, Portugal, Indonésia e Espanha (Kaas, 1998).

1.3.3 *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützing

Chondracanthus teedei apresenta uma ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro e ocorre desde o litoral do Maranhão até o litoral de Rio Grande do Sul (Oliveira *et al.*, 2010). Em Santa Catarina é amplamente distribuída em todo o litoral, ocorrendo no limite inferior da região intermareal (Nunes, 2005). *C. teedei* apresenta *kappa*-carragenana na suas paredes celulares. No entanto, esta espécie não é explorada comercialmente por dificuldades em estabelecer seu cultivo.

1.3.4 *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamouroux

Hypnea musciformis apresenta uma ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro e ocorre desde o Estado do Ceará até o litoral do Rio Grande do Sul (Oliveira *et al.*, 2010). *H. musciformis* é muito importante economicamente por ser a maior fonte brasileira de *kappa*-carragenana (Oliveira, 1998), um polissacarídeo sulfatado utilizado na indústria alimentícia, como agente espessante, estabilizante e gelificante, e na indústria farmacêutica, como agente espessante e estabilizante.

1.3.5 *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva variante marrom

Kappaphycus alvarezii é uma alga exótica, oriunda de ambientes recifais da região Indo-Pacífico, do Leste da África até Guam, China, Japão e ilhas do Sudeste Asiático (Doty, 1987; Areces, 1995). Apresenta uma grande relevância econômica devida à produção de carragenana *kappa*, um ficocolóide de ampla diversidade de aplicações na indústria alimentícia (laticínios, gelatinas e por exemplo espessantes) (Paula & Pereira, 1998), na preparação de rações para animais domésticos e peixes (De Mario & Ballesterro, 2004) e como agentes inibidores do vírus HPV (Human Papilloma Virus) (Buck *et al.*, 2006).

A espécie *K. alvarezii* possui diversos estudos no Brasil, destacando os que estão sendo realizados nos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro e iniciando em Santa Catarina (Florianópolis). No estado catarinense, os trabalhos estão sendo realizados no LAMAR e cultivados em balsas flutuantes na Praia de Sambaqui-Florianópolis.

1.4 DIMINUIÇÃO DA CAMADA DE OZÔNIO (O₃) E AUMENTO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B (RUVB)

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 ozonoesfera, 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 (Okuno *et al.*, 1996).

Até o início da década de 1970, 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 e 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 elemento cloro, o qual participaria da destruição do ozônio estratosférico (Molina & Rowland, 1974; Stolarki & Cicerone, 1974).

A radiação ultravioleta faz parte do espectro da luz solar 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).

O impacto do aumento da RUVB na superfície da Terra tem sido investigado por vários grupos de pesquisadores, avaliando-se o efeito natural e artificial dessa radiação no crescimento e 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 RUVB, contribuiria para processos de reparo dos danos causados pela UVB (Britt, 1995).

O processo relacionado aos efeitos biológicos da RUVB 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 nucleicos, lipídios, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (Diffey, 1991; Franklin & Forster 1997).

Existem muitos efeitos negativos da RUVB nos organismos, particularmente quando absorvidos pelos ácidos nucleicos e proteínas, os quais podem ocasionar foto-oxidação e mudanças conformacionais que resultam em várias alterações metabólicas vitais associadas aos processos de transcrição, duplicação de DNA e tradução (Lao & Glazer, 1996; Buma *et al.*, 2000). Além disso, a biologia e fisiologia celular também podem ser afetadas, conduzindo à crescente mortalidade de espécies vegetais (Franklin & Forster, 1997). A radiação ultravioleta no ambiente particularmente, a UVB, é a chave de muitos efeitos deletérios em processos biológicos (Worrest, 1982), como a fotossíntese e o crescimento de plantas

terrestres (Tevini & Teramura, 1989) e fitoplâncton (Lorenzen, 1979; Smith *et al.*, 1980; Jokiel & York, 1984; Bühlmann *et al.*, 1987; Smith, 1992), absorção de nitrato em diatomáceas (Döhler & Biermann, 1987), locomoção em protistas (Häder & Häder, 1988), crescimento e fotossíntese em culturas de zoo-xantelas (Jokiel & York, 1982; Lesser & Shick, 1989) e crescimento de macroalgas (Schmidt *et al.*, 2009).

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

Alguns estudos (Talarico, 1996; Talarico & Maranzana, 2000; Schmidt *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010a; Schmidt *et al.*, 2010b; Schmidt *et al.*, 2010c; Schmidt *et al.*, 2011) sugerem que o espessamento da parede celular seja um mecanismo de defesa à exposição de RUVB. Outros estudos apontam alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias (Pope *et al.*, 2002, 2003; Holzinger *et al.*, 2006).

Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição a altos níveis de RUVB 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 RUVB (Sommaruga, 2001; Sonntag *et al.*, 2007).

O litoral de Santa Catarina encontra-se localizado na região fitogeográfica Temperada Quente, compreendida entre o norte do Estado do Rio de Janeiro e o sul da região de Rio Grande no Rio Grande do Sul, estando compreendido em uma zona de reconhecida exposição elevada à RUVB. De fato, em Santa Catarina foi

constatado que no decorrer dos últimos anos a incidência da RUVB aumentou consideravelmente (Kirchhoff, 1997).

II. JUSTIFICATIVA

Os altos níveis de RUVB 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 RUVB nos meses de primavera-verão na Antártica e parte da América do Sul (Cabrera *et al.*, 1995).

O presente trabalho ampliará os conhecimentos nas possíveis alterações nas macroalgas vermelhas, *Gracilaria domingensis*, *Gelidium floridanum*, *Chondracanthus teedei*, *Hypnea musciformis* e variante marrom de *Kappaphycus alvarezii*, por serem macroalgas de importância econômica, fonte de um ficocolóide, todo estudo nesse sentido é considerado de grande relevância.

A hipótese que motivou o presente estudo é de que a RUVB interfere negativamente nos processos bioquímicos, celulares e fisiológicos das cinco macroalgas produtoras de ágar e carragenana.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar os efeitos da radiação RUVB na bioquímica, na fisiologia, na morfologia e na organização celular das macroalgas de interesse econômico tais como: *Gracilaria domingensis*, *Gelidium floridanum*, *Chondracanthus teedei*, *Hypnea musciformis* e a variante marrom de *Kappaphycus alvarezii*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as taxas de crescimento nas macroalgas, *G. domingensis* (21 dias de cultivo), *Ge. floridanum* (7 dias de cultivo), *C. teedei* (7 dias de cultivo), *H. musciformis* (7 dias de cultivo) e a variante marrom de *Kappaphycus alvarezii* (28 dias de cultivo) com a RUVB;
- Analisar possíveis alterações ultraestruturais causadas pela RUVB nas porções vegetativas;
- Avaliar a distribuição diferencial de substâncias de reserva (amido das florídeas) e a espessura da parede celular após a exposição à RUVB nas espécies analisadas;
- Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila a, ficobiliproteínas) após a exposição à RUVB;
- Definir o perfil carotenóidico e fenólico de *Ge. floridanum* e de *H. musciformis* após a exposição à RUVB;
- Determinar o conteúdo protéico total e as atividades da enzima glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e da enzima

mitocondrial NADH desidrogenase em *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* após a exposição à RUVB;

- Avaliar o efeito da RUVB na eficiência fotossintética de *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis*;
- Comparar os efeitos biológicos da RUVB entre as macroalgas analisadas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

Os espécimes de *G. domingensis*, *C. teedei* e *H. musciformis* foram coletados nos costões rochosos da Praia de Ponta das Canas (27°23'34"S e 48°26'11"W), Florianópolis-SC, Brasil durante os meses de verão enquanto os espécimes de *G. domingensis* e *C. teedei* foram coletadas nos meses de Fevereiro e Março de 2009. Os espécimes de *H. musciformis* foram coletados nos meses de Fevereiro e Março de 2011 e as amostras de *Ge. floridanum* foram coletados nos costões rochosos nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2011, na Praia de Sambaqui (27° 29'18.8" S e 48° 32'12.9" W), Florianópolis-SC, Brasil. Os espécimes da variante marrom de *K. alvarezii* foram obtidos a partir do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) e Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Trindade- Florianópolis.

4.2 Coleta e processamento do material biológico

Amostras de algas coletadas no ambiente foram transportadas em recipientes plásticos contendo água do mar e posteriormente transferidas a embalagens plásticas pretas e recipientes contendo gelo para evitar que ocorresse foto-oxidação. No LAMAR, os talos foram lavados com água do mar filtrada e esterilizada e removidos os contaminantes. As amostras foram aclimatadas durante quatorze dias as condições de laboratório.

4.3 Condições de cultivo

Os segmentos apicais com peso de aproximadamente 1.00g (± 0.05 g), das algas *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* foram cultivados em béqueres de 600 mL em câmara de cultivo, tanto o controle (PAR) quanto os tratamentos (PAR + RUVB). Os segmentos foram cultivados em 500 mL de água do mar esterilizada com 50% von Stosch (VSES), salinidade de 34 ups (± 1 ups) (unidade padrão de salinidade). A variante marrom de *K. alvarezii* e *G. domingensis* foram cultivadas por 28 dias e 21 dias, por apresentarem talos mais espessos e suportarem longos períodos de exposição à RUVB. Enquanto, que as algas *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* foram cultivadas durante 7 dias, por apresentarem talos mais delicados e ao final do experimento foi possível obter biomassa suficiente para as análises.

A irradiância fotossinteticamente ativa (PAR) diária foi de 80 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Li-cor light meter 250, Estados Unidos da América) fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” (Philips C-5 Super 84 16W/840, Brasil). A temperatura foi de 24 °C (± 2 °C) e o fotoperíodo de 12 horas, com início às 8 horas da manhã e com aeração contínua.

A radiação UVB artificial foi fornecida por lâmpada Vilber Lourmat VL-6LM, (Marne La Vallée, França), que emite o comprimento de onda de 312 nm (RUVB) e irradiância de 1.6 W m^{-2} (Radiometer Model IL 1400A (International Light, Newburyport, MA, Estados Unidos da América)), possuindo ainda um filtro acoplado para os demais comprimentos de onda. O período de exposição à radiação UVB foi de três horas por dia (iniciando ao 12: 00 h e terminando as

15:00 h). Para evitar a exposição à radiação UVC, foram utilizados filtros de diacetato de celulose com uma espessura de 0.075 mm.

Durante a exposição à radiação UVB a aeração dos cultivos foi aumentada no tratamento e no controle para que os fragmentos movimentassem de forma constante, de maneira a expor todos os ramos à mesma intensidade de radiação. Foi realizado um rodízio diário e aleatório dos béqueres, de modo a garantir o tratamento homogêneo de intensidade luminosa às plantas.

Para os espécimes de *G. domingensis* e da variante marrom de *K. alvarezii*, os meios de cultura foram renovados semanalmente. Foram utilizadas quatro repetições para cada espécime (n=4).

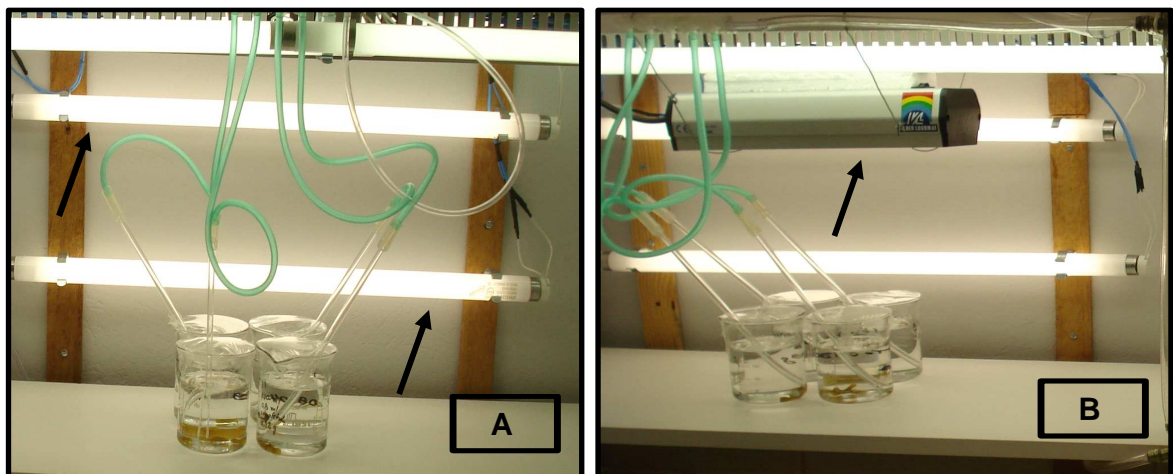


Figura 1: Câmara de cultura utilizada com as cinco macroalgas. Figura **A** é o controle com PAR (seta). E figura **B** é o tratamento com a RUVB + PAR, lâmpada UVB (seta).

4.4 Efeito da radiação no crescimento dos segmentos apicais de tratamentos controle e expostos à Radiação UVB

O efeito da RUVB no crescimento dos segmentos apicais das cinco espécies de macroalgas foi avaliado através de medidas de peso da matéria

fresca no final dos tratamentos. As taxas de crescimento foram obtidas a partir do aumento da massa fresca e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, sendo calculadas segundo a fórmula de Penniman *et al.*, 1986.

4.5 Análise em microscopia de luz (ML)

Os materiais tratados e os controles das cinco espécies de macroalgas foram processados para análises citoquímica e morfológica em microscopia de luz e histoquímica. Fragmentos do talo das amostras com aproximadamente 5mm foram fixados em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, *overnight* (Schmidt *et al.*, 2009). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Secções com 5 µm de espessura foram corados com diferentes testes citoquímicos e fotografados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

4.5.1 Testes citoquímicos

As secções dos controles e dos tratamentos das cinco espécies de macroalgas foram coradas com os seguintes citoquímicos: Ácido Periódico de Schiff (PAS) utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (Gahan, 1984), Azul de Toluidina (AT-O) para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (Gordon & McCandless, 1973; McCully, 1970) e Azul brilhante de Coomassie (CBB) para identificar a presença de proteínas totais

(Gahan, 1984).

4.6 Análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Para observação em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras com aproximadamente 5mm provenientes dos controles e dos tratamentos das macroalgas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 %, sacarose 2.0%, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós-fixadas em 1 % tetróxido de ósmio por 4 horas, desidratadas em série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (Schmidt *et al.*, 2009). Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). As secções ultrafinas foram contrastadas 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 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-(LCME) da UFSC. Foram analisadas 10 telinhas “*grids*” para cada espécie e para cada tratamento.

4.7 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras para análise ao MEV das macroalgas *C. teedei* e *H. musciformis* foram fixadas e processadas com a mesma metodologia utilizada para MET descrita acima até a etapa de desidratação. As amostras foram desidratadas em séries etanólicas e secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Subseqüentemente, as amostras foram aderidas a suportes metálicos e metalizadas (Metalizador Blatec, CED 030)

com ouro. Posteriormente, os espécimes foram visualizados e fotografados em MEV Jeol 6390 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, a 20 kV) no LCME-UFSC.

4.8 Análise em microscópio confocal (MC)

As amostras de *H. musciformis* foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Alemanha), utilizando laser de argônio com excitação nos comprimentos de onda 440, 488 e 514 nm. Para análise foi utilizada objetiva de óleo de imersão 63x/1.4-0.6 (HCX PLAPO lambda) e a autofluorescência da clorofila foi utilizada para a visualização da estrutura do cloroplasto. A intensidade da autofluorescência do controle e do tratamento das células corticais foi calculada por meio de medidas em 10 células (n=6), utilizando o programa LAS-AF Lite (Leica). O processamento final das imagens foi realizado no programa LAS-AF Lite (Leica).

4.9 Extração e dosagem dos pigmentos fotossintetizantes

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e as ficobiliproteínas), as amostras provenientes dos controles e dos tratamentos das macroalgas foram armazenadas em nitrogênio líquido e mantidas a -40°C até posterior análise. As extrações foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

4.9.1 Extração e dosagem de clorofila a (Cl. a)

A extração de clorofila a dos talos foi realizada utilizando o método de Hiscox & Israelstam (1979). A extração pigmentar foi feita a partir de amostras de aproximadamente 1g de massa fresca para cada repetição em 3 mL de dimetilsufóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) a 40 °C, durante 30 min . A determinação da concentração de clorofila a foi feita utilizando-se a equação descrita por Wellburn (1994).

4.9.2 Extração e dosagem das ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas [aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeretrina (FE)] foi realizada após a trituração de 1g de massa fresca para cada repetição em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão fosfato 0.1 M, pH 6.4, no escuro e à temperatura de 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 2.000 xg por 20 min. A concentração de ficobiliproteínas foi determinada usando as equações descritas por Kusar *et al.*, (1983).

4.10 Extração e identificação de carotenóides

Os carotenóides foram extraídos de amostras de *Ge. floridanum* e *H. musciformis* (aproximadamente 1.0 g de massa fresca, n = 4) hexano: acetona (1:1 v/v), contendo 100 mg L⁻¹ *terc*-butil-hidroxitolueno (BHT). As soluções foram filtradas em suporte de membrana de celulose para remover as partículas e solvente evaporado sob fluxo de N₂ gasoso. O extrato recuperado foi ressuspenso em 3 mL de hexano. O extrato organossolvente de carotenóides foi evaporado sob fluxo de N₂ gasoso e ressuspendido em 3 mL de hexano. A saponificação da fração carotenóidica de interesse foi realizada

através da adição de 100 µL de solução metanólica de hidróxido de potássio 10% (m/v) a 1 mL de extrato, durante três horas, a temperatura ambiente e na ausência de luz, de acordo com procedimento descrito por Kuhnen *et al.*, (2009). Após este período, as amostras foram lavadas em funil de separação (4x, água ultrapura). A fração remanescente foi transferida para frasco âmbar, seguido da remoção do solvente sob fluxo de N₂ gasoso e ressuspensão em 100 µL de hexano: acetona (50:50, v/v), contendo 100 mg/L de BHT para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 201TP54, 250mm x 4,6mm Ø, 5µm) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel e fluxo de 1 mL.min⁻¹. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (α-caroteno, β-caroteno, luteína, zeaxantina e criptoxantina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), bem como por analogia com outros relatórios de análise de carotenóides por RP-HPLC-UV-visível em condições semelhantes (Scott & Eldridge, 2005; Hulshof *et al.*, 2007). Para a quantificação dos carotenóides utilizou-se curva padrão de luteína (0.5 - 45 µg mL⁻¹; y= 7044x; r² = 0.999) para luteína zeaxantina e β criptoxantina e a curva padrão de β-caroteno (01-12 µg mL⁻¹; y = 1019x; r² = 0.998) para α e β-caroteno e considerou-se a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra e a concentração de carotenóides foi expressa em µg por g de massa seca.

4.11 Extração e identificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos de amostras de *Ge. floridanum* e *H. musciformis* (aproximadamente 1.0 g de massa fresca, n = 4) com 3 mL de metanol 80% acidificado pela adição de ácido clorídrico 1%. As soluções foram filtradas em suporte de membrana de celulose para remoção de partículas. Alíquotas (10 µL) de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ (Shim-Pack CLC-ODS, 250 mm x 4.6 mm Ø, 5µm) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 280nm.

A eluição utilizou água: ácido acético: η-butanol (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel, fluxo de 0.8 mL.min⁻¹ e a identificação dos compostos de interesse foi realizada através de co-cromatografia e comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (epicatequina, galocatequina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A quantificação dos compostos fenólicos utilizou curva-padrão externa de galocatequina (2.5 - 200 µg mL⁻¹; y= 795.09x; r² = 0.999) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de compostos fenólicos foi expressa em µg por g de massa seca.

4.12 Análises bioquímicas

As extrações foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas. As análises foram realizadas em quadruplicatas. Amostras dos controles e dos tratamentos das macroalgas *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H.*

musciformis foram homogeneizadas em tampão fosfato 20 mM, pH 7.4 e centrifugados a 1.000 xg por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram separados e utilizados para determinação da atividade da glutatona peroxidase (GPx) e níveis protéicos.

4.12.1 Atividade da glutatona peroxidase (GPx)

A atividade da glutatona peroxidase foi medida de acordo com Wendel (1981), utilizando *tert*-butil hidroperóxido como substrato. A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento do desaparecimento de NADPH em 340 nm, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.0, contendo 1 mM EDTA, 1 mM de glutatona, 0.2 U/ mL glutatona redutase, 1 mM de azida, 0.2 mM-*tert*-butil hidroperóxido, 0.2 mM de NADPH e o sobrenadante contendo 0.2-0.3 mg de proteína/mL. A atividade de GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção de NADPH em 340 nm de $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.12.2 Atividade da glutatona redutase (GR)

A atividade da glutatona redutase foi medida de acordo com Carlberg & Mannervik (1985). A taxa de redução de GSSG foi determinada indiretamente através do monitoramento do desaparecimento de NADPH em 340 nm.

4.12.3 Preparação das amostras para avaliação da atividade do complexo da cadeia respiratória

Amostras dos controles e dos tratamentos das macroalgas *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* foram homogeneizadas em 10 volumes de 50 mM de tampão fosfato pH 7.4, contendo 0.3 M de sacarose, 5 mM de

MOPS, 1mM de EGTA e 0.1% de soro de albumina bovina. Os homogeneizados foram centrifugados a 1.000 xg por 10 min a 4 ° C: o precipitado foi descartado e os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade da enzima NADH desidrogenase.

4.12.4 Determinação da atividade da enzima NADH desidrogenase

A atividade da enzima NADH desidrogenase foi avaliada a partir do sobrenadante, considerando a taxa de redução do ferricianeto NADH-dependente em 420 nm ($1\text{mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$) como, descrito previamente por Cassina & Radi (1996). O método descrito para determinar atividade da enzima NADH desidrogenase foi ligeiramente modificado, como detalhado no manuscrito de Latini *et al.*, (2005). A atividade da enzima foi calculada como nmol/proteína/mg/minuto.

4.12.5 Determinação de proteínas totais

A quantidade de proteína totais nas amostras foi determinada utilizando a técnica de Lowry *et al.*, (1951).

4.13 Medidas da atividade fotossintética

As medidas da atividade fotossintética das amostras provenientes dos controles e dos tratamentos das macroalgas *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* foram realizadas no Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas. As análises foram realizadas em quaduplicatas.

Todas as incubações foram seguidas por medições da fluorescência da clorofila *a* usando um fluorômetro modulado (Diving PAM underwater fluorometer; Walz, Effeltrich, Alemanha) de acordo Schmidt *et al.*, (2010a).

4.14 Análise e interpretação dos dados

Os dados foram submetidos à análise da variância- unifatorial (ANOVA), seguida do teste *a posteriori* de Tukey para verificar a significâncias das diferenças ($p \leq 0.05$) entre as taxas de crescimento, concentrações dos pigmentos fotossintetizantes, os parâmetros fotossintéticos (α , β e P_{max}), e análises bioquímicas entre os tratamentos com radiação UVB + PAR e seus respectivos controles. Todas as análises foram realizadas no Programa *Statistica* (versão 6.0).

CAPÍTULO 1

Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain

Efeito da radiação ultravioleta-B nas taxas de crescimento, pigmentos fotossintetizantes e organização celular da variante marrom de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales)

Artigo publicado na Revista Photosynthetica

48 (2): 161-172, 2010. DOI: 10.1007/s11099-010-0022-7

Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain

Éder C. Schmidt^{*,†}, Beatriz G. Nunes^{**}, Marcelo Maraschin^{***}, and Zenilda L. Bouzon^{*,#}

Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil^{*}

Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil^{**}

Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil^{***}

Central Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil[#]

Abstract

Kappaphycus alvarezii is a seaweed of great economic importance for the extraction of kappa carrageenan from its cell walls. The most common strains are dark red, brown, yellow, and different gradations of green. It is known that ultraviolet radiation (UVR) affects macroalgae in many important ways, including reduced growth rate, reduction of primary productivity, and changes in cell biology and ultrastructure. Therefore, we examined the brown strain of *K. alvarezii* exposed to ultraviolet-B radiation (UVBR) for 3 h per day during 28 days of cultivation. The control plants showed growth rates of 7.27% d⁻¹, while plants exposed to UVBR grew only 4.0% d⁻¹. Significant differences in growth rates and in phycobiliproteins between control and exposed plants were also found. Compared with control plants, phycobiliprotein contents were observed to decrease after UV-B exposure. Furthermore, the chlorophyll *a* (Chl *a*) contents decreased and showed significant differences. UVBR also caused changes in the ultrastructure of cortical and subcortical cells, which included increased thickness of the cell wall and number of plastoglobuli, reduced intracellular spaces, changes in the cell contour, and destruction of chloroplast internal organization. Reaction with Toluidine Blue showed an increase in the thickness of the cell wall, and Periodic Acid Schiff stain showed a decrease in the number of starch grains. By the significant changes in growth rates, photosynthetic contents and ultrastructural changes observed, it is clear that UVBR negatively affects intertidal macroalgae and, by extension, their economic viability.

Additional keywords: brown strain of *Kappaphycus alvarezii*; chloroplast; growth rates; photosynthetic pigments; ultrastructure; ultraviolet-B radiation.

Resumo

Kappaphycus alvarezii é uma macroalga de grande importância econômica, devido a extração de *kappa* carragenana de suas paredes celulares. Apresenta diversas variantes pigmentares tais como: vermelho escuro, marrom, amarelas e diferentes tonalidades de verde. A radiação ultravioleta-B (RUVB) afeta as macroalgas em diversas maneiras importantes, incluindo a redução nas taxas de crescimento, redução na produtividade primária, e mudanças na biologia celular e na organização ultraestrutural. Portanto, nós examinamos o efeito da RUVB na variante marrom de *K. alvarezii* durante 28 dias de cultivo sendo 3 h diárias de exposição. As plantas controle apresentaram taxas de crescimento de 7.27% dia⁻¹, enquanto as plantas expostas a RUVB cresceram apenas 4.0% dia⁻¹. Diferenças significativas nas taxas de crescimento e nas concentrações de ficobiliproteínas entre controle e plantas a RUVB foram verificadas. Comparado com as plantas controle, as concentrações das ficobiliproteínas apresentaram redução após a exposição RUVB. Além disso, a concentração da clorofila a diminuiu e mostrou diferenças significativas após a exposição RUVB. A RUVB ocasionou mudanças na ultraestrutura das células corticais e subcorticais, incluindo o aumento da espessura da parede celular e o número de plastoglóbulos, redução nos espaços intracelulares, alterações no contorno das células e destruição de organização interna dos cloroplastos. A reação com azul de Toluidina evidenciou um aumento na espessura da parede celular, e o ácido periódico Schiff mostrou uma diminuição no número de grãos de amido. Pelas mudanças significativas nas taxas de crescimento, nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes, e mudanças ultraestruturais observadas, torna-se evidente que RUVB afeta negativamente as macroalgas intermareais e sua viabilidade econômica.

Palavras chave: variante marrom de *K. alvarezii*, cloroplasto, taxas de crescimento, pigmentos fotossintetizantes, ultraestrutura e radiação ultravioleta-B.

CAPÍTULO 2

Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance.

Efeito da radiação ultravioleta-B na agarófita *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Mudanças na organização celular, nas taxas de crescimento e na performance fotossintética.

Artigo publicado na Revista Micron

41 (8) 919-930, 2010. DOI:10.1016/j.micron.2010.07.010

Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance

Éder C. Schmidt^a, Rodrigo dos Santos^b, Paulo A. Horta^c, Marcelo Maraschin^d and Zenilda L. Bouzon^e

^aPost-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartment of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartment of Botany, Federal University of Santa Catarina 88010-970, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^dPlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^eCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

The effects of ultraviolet radiation-B (UVBR) in apical segments of the red macroalgae *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie were examined in vitro. Over a period of 21 days, the segments were cultivated and exposed to photosynthetically active radiation (PAR) at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and PAR +UVBR at 1.6 Wm^{-2} for 3 h per day. The samples were processed for electron microscopy, as well as histochemical analysis, and growth rate, photosynthetic pigment contents and photosynthetic performance were measured. Toluidine Blue reaction showed metachromatic granulations in vacuole and lenticular thickness, while Coomassie Brilliant Blue showed a higher concentration of cytoplasmic organelles, and Periodic Acid Schiff stain showed an increase in the number of floridean starch grains. UVBR also caused changes in the ultrastructure of cortical and subcortical cells, which included an increased number of plastoglobuli, changes in mitochondrial organization, destruction of chloroplast internal organization, and the disappearance of phycobilisomes. The algae cultivated under PAR-only showed growth rates of $6.0\% \text{ day}^{-1}$, while algae exposed to PAR +UVBR grew only $2.8\% \text{ day}^{-1}$. Compared with algae cultivated with PAR-only, the contents of photosynthetic pigments, including chlorophyll a, phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin, decreased after exposure to PAR + UVBR, and significant differences were observed. Finally, analysis of these four photosynthetic parameters also showed reduction after exposure to PAR + UVBR: maximum photosynthetic rate, photosynthetic efficiency, photoinhibition and relative electron transport rate. Taken together, these findings strongly suggested that UVBR negatively affects the agarophyte *G. domingensis*.

Keywords: *Gracilaria domingensis*; growth rates; photosynthetic performance; photosynthetic pigments; ultrastructure; ultraviolet radiation.

Resumo

Os efeitos da radiação ultravioleta-B (UVBR) em segmentos apicais de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie foram examinados *in vitro*. Os segmentos apicais foram cultivados e expostos a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (controle) e os segmentos do tratamento (PAR+ RUVB) foram expostos a radiação ultravioleta-B de 1.6 W m^{-2} durante 3h por 21 dias. As amostras foram processadas para análise de microscopia eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o, bem como an\u00e1lises histoqu\u00edmicas, avalia\u00e7\u00e3o das taxas de crescimento, concentra\u00e7\u00f5es dos pigmentos fotossintetizantes e o desempenho fotossint\u00e9tico tamb\u00e9m foram avaliados. A histoqu\u00edmica com azul de Toluidina evidenciou rea\u00e7\u00f5es metacrom\u00e1ticas nos vac\u00falos e espessamento lenticulado nas paredes celulares, enquanto o azul brilhante de Coomassie mostrou uma maior concentra\u00e7\u00e3o de organelas citoplasm\u00e1ticas e o \u00e1cido peri\u00f3dico de Schiff apresentou um aumento no n\u00famero de gr\u00e3os de amido das flor\u00eddeas. A RUVB tamb\u00e9m ocasionou mudan\u00e7as na ultraestrutura das c\u00e9lulas corticais e subcorticais, incluindo um aumento no n\u00famero de plastoglobulos, mudan\u00e7as na organiza\u00e7\u00e3o mitocondrial, destrui\u00e7\u00e3o dos cloroplastos e o desaparecimento dos ficobilissomos. As algas do controle apresentaram taxas de crescimento de $6.0\% \text{ dia}^{-1}$, enquanto que as algas expostas \u00e0 RUVB cresceram apenas $2.8\% \text{ dia}^{-1}$. Em compara\u00e7\u00e3o com as plantas controle, a concentra\u00e7\u00e3o dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, ficoeretrina, ficocianina e aloficocianina) das plantas expostas diminuiu ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 RUVB. Os par\u00e2metros do desempenho fotossint\u00e9tico (taxa fotossint\u00e9tica m\u00e1xima, efici\u00eancia fotossint\u00e9tica, fotoinibi\u00e7\u00e3o e taxa de transporte de el\u00e9trons) tamb\u00e9m apresentaram redu\u00e7\u00e3o ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o RUVB. Em conjunto as diferentes an\u00e1lises realizadas sugerem que a RUVB afeta negativamente a agar\u00f3fita *G.domingensis*

Palavras chave: *Gracilaria domingensis*, taxas de crescimento, desempenho fotossint\u00e9tico, ultraestrutura e radia\u00e7\u00e3o ultravioleta-B.

CAPÍTULO 3

Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales).

Alterações na arquitetura e no metabolismo da carragenófito *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales) induzida pela radiação ultravioleta-B.

Artigo aceito na Revista Protoplasma

DOI: 10.1007/s00709-011-0286-1

Data da submissão: 01/03/2011

Data do aceite: 06/05/2011

Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales)

Éder C. Schmidt^{a*#}, Beatriz Pereira^{b#}, Carime L. Mansur Pontes^b, Rodrigo dos Santos^b, Fernando Scherner^c, Paulo A. Horta^c, Roberta de Paula Martins^d, Alexandra Latini^d, Marcelo Maraschin^e, Zenilda L. Bouzon^f

^aPost-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^bScientific Initiation-PIBIC-CNPq, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartment of Botany, Federal University of Santa Catarina 88010-970, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^d Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina

^ePlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^fCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

The *in vivo* effect of ultraviolet radiation-B (UVBR) in apical segments of *Chondracanthus teedei* was examined. Over a period of 7 days, the segments were cultivated and exposed to photosynthetically active radiation (PAR) at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and PAR + UVBR at 1.6 W m^{-2} for 3 h per day. The samples were processed for electron microscopy and histochemistry; also was analyzed growth rates, mitochondrial activity, protein levels, content of photosynthetic pigments and photosynthetic performance. UVBR elicited increased cell wall thickness and accumulation of plastoglobuli, changes in mitochondrial organization and destruction of chloroplast internal organization. Compared to controls, algae exposed to PAR + UVBR showed a growth rate reduction of 55%. The content of photosynthetic pigments, including chlorophyll *a* and phycobiliproteins, decreased after exposure to PAR + UVBR. This result agrees with the decreased photosynthetic performance observed after exposing algae to PAR + UVBR. Irradiation also elicited increased activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase and decreased mitochondrial NADH dehydrogenase activity, which correlated with the decreased protein content in plants exposed to PAR + UVBR. Taken together, these findings strongly indicate that UVBR negatively affects the architecture and metabolism of the carragenophyte *C. teedei*.

Keywords: *Chondracanthus teedei*; ultraviolet radiation-B; ultrastructure; photosynthetic performance; photosynthetic pigments; mitochondrial activity.

Resumo

O efeito da radiação ultravioleta-B (RUVB) em segmentos apicais de *Chondracanthus teedei* foi examinado *in vitro*. Durante um período de 7 dias, os segmentos apicais foram cultivados e expostos a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (controle) e os segmentos do tratamento (PAR+ RUVB) foram expostos a radiação ultravioleta-B de 1.6 W m^{-2} . As amostras foram processadas para análise de microscopia eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o e de varredura e histoqu\u00edmicas. Tamb\u00e9m foram analisadas as taxas de crescimento, atividade mitocondrial, conte\u00fado prot\u00e9ico, clorofila *a*, ficobiliprote\u00ednas e o desempenho fotossint\u00e9tico. A RUVB provocou aumento na espessura da parede celular e ac\u00famulo de plastogl\u00f3bulos, mudan\u00e7as na organiza\u00e7\u00e3o mitocondrial e destrui\u00e7\u00e3o da organiza\u00e7\u00e3o interna dos cloroplastos. Comparadas ao controle as algas expostas a RUVB mostraram uma redu\u00e7\u00e3o nas taxas de crescimento de 55%. As concentra\u00e7\u00f5es dos pigmentos fotossintetizantes, incluindo a clorofila *a* e as ficobiliprote\u00ednas, apresentaram uma redu\u00e7\u00e3o ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 RUVB. Este resultado corrobora com a diminui\u00e7\u00e3o do desempenho fotossint\u00e9tico ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 RUVB. A exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 RUVB tamb\u00e9m levou ao aumento da atividade da enzima glutatona peroxidase e redu\u00e7\u00e3o da atividade da enzima NADH desidrogenase, que est\u00e1 correlacionado com a diminui\u00e7\u00e3o do conte\u00fado prot\u00e9ico. Podemos concluir que a RUVB afeta negativamente a arquitetura e metabolismo da carragen\u00f3fita *C. teedei*.

Palavras chave: *Chondracanthus teedei*, radia\u00e7\u00e3o ultravioleta-B, ultraestrutura, desempenho fotossint\u00e9tico, pigmentos fotossintetizantes, atividade mitocondrial.

CAPÍTULO 4

Morphological, physiological and biochemical responses of the carragenophyte *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B.

Respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da carragenófito *Hypnea musciformis* após exposição à radiação ultravioleta-B.

Morphological, physiological and biochemical responses of the carragenophyte *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B

Éder C. Schmidt^{a,*#}, Beatriz Pereira^{b#}, Rodrigo dos Santos^a, Fernando Scherner^c, Paulo A. Horta^c, Roberta de Paula Martins^d, Alexandra Latini^d, Fernanda Ramlov^e, Marcelo Maraschin^e, Zenilda L. Bouzon^f

^aPost-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^bScientific Initiation-PIBIC-CNPq, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartment of Botany, Federal University of Santa Catarina 88010-970, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^dLaboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^ePlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^fCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

As a source of kappa carrageenan, *Hypnea musciformis* is seaweed of great economic importance. However, it grows in a region exposed to high UV-B radiation. Therefore, to study the *in vitro* effect of UVBR on this plant, apical segments of *H. musciformis* were cultivated and exposed to photosynthetically active radiation (PAR) at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and PAR + UVBR at 1.6 W m^{-2} at 3 h per day for 7 days. The samples were processed for microscopic and histochemical analyses. Carrageenan yield, growth rates, mitochondrial activity, protein levels, content of photosynthetic pigments and photosynthetic performance were also examined. After 7 days of exposure to PAR + UVBR, *H. musciformis* showed photodamage, as well as changes in ultrastructure and photosynthetic pigments, leading to a decrease in photosynthetic performance and growth rates. As an adaptation strategy, an increase in both carotenoids and phenolic compounds was observed. Taken together, it can be concluded that UVBR negatively affects various morphological, physiological and biochemical parameters in *H. musciformis*.

Keywords: Ultraviolet radiation-B; *H. musciformis*; ultrastructure; photosynthetic performance; carotenoids; phenolic compounds; carrageenan yield; mitochondrial activity.

Resumo

Hypnea musciformis é uma macroalga vermelha de grande importância econômica na extração de *kappa* carragenana. No entanto, cresce em uma região de alta incidência de radiação ultravioleta-B (RUVB). Portanto, para avaliar os efeitos da RUVB sobre a macroalga *H. musciformis*, os segmentos apicais foram cultivados *in vitro*. Os segmentos apicais foram cultivados e expostos a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (controle) e os segmentos do tratamento (PAR+ RUVB) foram expostos a radiação ultravioleta-B de 1.6 W m^{-2} durante 3h por 7 dias. As amostras foram processadas para análise de microscopia eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o e de varredura, histoqu\u00edmicas e microscopia confocal, avalia\u00e7\u00e3o do rendimento de carragenana, avalia\u00e7\u00e3o das taxas de crescimento, atividade mitocondrial, conte\u00fado prot\u00e9ico, clorofila *a*, ficobiliprote\u00ednas, caroten\u00f3ides, compostos fen\u00f3licos e a desempenho fotossint\u00e9tico tamb\u00e9m foram avaliadas. Ap\u00f3s 7 dias de exposi\u00e7\u00e3o a PAR+ RUVB, *H. musciformis* apresentou fotoinibi\u00e7\u00e3o, altera\u00e7\u00f5es ultraestruturais e nos pigmentos fotossintetizantes, levando a uma diminui\u00e7\u00e3o no desempenho fotossint\u00e9tico e nas taxas de crescimento. Como uma estrat\u00e9gia de adapta\u00e7\u00e3o, *H. musciformis* apresentou um aumento nas concentra\u00e7\u00f5es de caroten\u00f3ides e compostos fen\u00f3licos. Pode-se concluir que a RUVB afeta negativamente diversos par\u00e2metros morfol\u00f3gicos, fisiol\u00f3gicos e bioqu\u00edmicos de *H. musciformis*.

Palavras chave: radia\u00e7\u00e3o ultravioleta-B, ultraestrutura, desempenho fotossint\u00e9tica, caroten\u00f3ides, compostos fen\u00f3licos, atividade mitocondrial.

CAPÍTULO 5

Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B: changes in ultrastructure, pigments and antioxidant systems

Respostas da agarófita *Gelidium floridanum* após exposição à radiação ultravioleta-B: mudanças na ultraestrutura, nos pigmentos e nos sistemas antioxidantes.

Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after *in vitro* exposure to ultraviolet radiation-B: changes in ultrastructure, pigments and antioxidant systems

Éder C. Schmidt^{a*}, Rodrigo dos Santos^b, Caroline de Faveri^c, Paulo A. Horta^c, Roberta de Paula Martins^d, Alexandra Latini^d, Fernanda Ramlov^e, Marcelo Maraschin^e, Zenilda L. Bouzon^f

^aPost-Graduate Program in Cell Biology and Development, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^bMacroalgae Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartment of Botany, Federal University of Santa Catarina 88010-970, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^dLaboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^ePlant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

^fCentral Laboratory of Electron Microscopy, Federal University of Santa Catarina 88049-900, CP 476, SC Florianópolis, SC, Brazil

* Corresponding author: Tel: +55 48 3721 5149

E-mail address: edcash@ccb.ufsc.br (E.C. Schmidt)

Abstract

As a source of agar, the red macroalga *Gelidium floridanum* is a seaweed of great economic importance. However, it grows in a region exposed to high UV-B radiation. Therefore, to study the *in vitro* effect of UVBR on this plant, apical segments of *G. floridanum* were cultivated and exposed to photosynthetically active radiation (PAR) at $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and PAR + UVBR at 1.6 W m^{-2} at 3 h per day for 7 days. The samples were processed for electron microscopy, and agar yield, growth rates, mitochondrial activity, protein levels, chlorophyll *a*, phycobiliproteins, carotenoids and phenolic compounds, and photosynthetic performance were examined. After 7 days of exposure to PAR + UVBR, *G. floridanum* experienced ultrastructural damage that was primarily observed in the internal organization of chloroplasts, increased cell wall thickness, as well as increased volume of plastoglobuli and free ribosomes. Moreover, this exposure might have caused photodamage and photoinhibition of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and phycobiliproteins), leading to a decrease in photosynthetic efficiency, relative electron transport rate and maximum photosynthetic rate. These phenomena were matched with a corresponding decrease in growth rates and depigmentation, combined with partial necrosis of the apical segments exposed to PAR +UVBR. Additionally, the UVBR-induced damage elicited a marked cellular antioxidant response, possibly as a consequence of free radical generation.

Keywords: *Gelidium floridanum*, ultraviolet radiation-B, ultrastructure, photosynthetic pigments, mitochondrial activity.

Resumo

Como uma fonte de ágar, a macroalga vermelha *Gelidium floridanum* é alga de grande importância econômica. No entanto, cresce em uma região de alta incidência de radiação ultravioleta-B (RUVB). Portanto, para avaliar os efeitos da RUVB sobre a macroalga *G. floridanum*, os segmentos apicais foram cultivados *in vitro*. Os segmentos apicais foram cultivados e expostos a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (controle) e os segmentos do tratamento (PAR+ RUVB) foram expostos a radiação ultravioleta-B de 1.6 W m^{-2} durante 3h por 7 dias. As amostras foram processadas para análise de microscopia eletr\u00f4nica de transmiss\u00e3o, e foram avaliados o rendimento de \u00e1gar, avalia\u00e7\u00e3o das taxas de crescimento, atividade mitocondrial, conte\u00fado prot\u00e9ico, clorofila *a*, ficobiliprote\u00ednas, caroten\u00f3ides, compostos fen\u00f3licos e o desempenho fotossint\u00e9tico tamb\u00e9m foram avaliadas. Ap\u00f3s 7 dias de exposi\u00e7\u00e3o a PAR+ RUVB, *G. floridanum* apresentou altera\u00e7\u00f5es ultraestruturais, modificando a organiza\u00e7\u00e3o interna dos cloroplastos, aumento da espessura de parede celular, bem como aumento de plastoglobulos e ribossomos livres. Al\u00e9m disso, a RUVB ocasionou a fotodestrui\u00e7\u00e3o e fotoinibi\u00e7\u00e3o dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliprote\u00ednas), levando a uma diminui\u00e7\u00e3o no desempenho fotossint\u00e9tico, nas taxas de transporte de el\u00e9trons e nas taxas de fotoss\u00edntese m\u00e1xima. Estes fen\u00f4menos combinados levaram a uma diminui\u00e7\u00e3o nas taxas de crescimento, despigmenta\u00e7\u00e3o e necrose dos segmentos apicais expostos a RUVB. A exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 RUVB tamb\u00e9m levou a um aumento na resposta antioxidante, como conseq\u00fancia da gera\u00e7\u00e3o de radicais livres.

Palavras chave: *Gelidium floridanum*, radia\u00e7\u00e3o ultravioleta-B, ultraestrutura, pigmentos fotossintetizantes, atividade mitocondrial.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A radiação ultravioleta-B (RUVB) afeta negativamente diversos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos das macroalgas *Gracilaria domingensis*, *Gelidium floridanum*, *Chondracanthus teedei*, *Hypnea musciformis* e variante marrom de *Kappaphycus alvarezii* cultivadas com radiação UVB. Após 7 dias (*Ge. floridanum*, *C. teedei*, e *H. musciformis*), 21 dias (*G. domingensis*) e 28 dias (variante marrom de *K. alvarezii*) com 3h de exposição à RUVB diárias, pode-se observar modificações e/ou danos ultraestruturais, como alterações na organização interna do cloroplasto, da mitocôndria e aumento da espessura da parede celular. Além disso, após a exposição, houve uma diminuição dos pigmentos fotossintéticos, levando a uma diminuição na eficiência fotossintética e na taxa de crescimento. Foram observadas também mudanças na quantidade de carotenóides e compostos fenólicos das plantas tratadas com RUVB, o que sugere a expressão de mecanismos de defesa associados àqueles compostos antioxidantes. Algumas destas plantas também apresentaram aumento na atividade das enzimas glutathione peroxidase e redutase, como mecanismo de redução das espécies reativas de oxigênio. A RUVB provocou também o aumento da atividade mitocondrial e degradação do conteúdo protéico.

A Tabela 1 sumariza comparativamente os resultados de todas as análises realizadas nas macroalgas *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* e na variante marrom de *K. alvarezii*.

Efeitos da radiação UVB nas taxas de crescimento e na morfologia dos segmentos apicais

Os primeiros dias de cultivo das espécies foi um período de aclimação dos segmentos apicais à exposição à RUVB, onde todas as plantas apresentaram uma redução nas taxas de crescimento quando comparadas ao controle (Tabela 1). Entretanto, ao longo do período de cultivo e exposição a RUVB, estas diferenças foram reduzidas ao longo do tempo. Estas observações são corroboradas por estudos com *Ulva expansa* (Setchell) Setchell & N. L. Gardner e *U. rigida* C. Agardh, onde as taxas de crescimento também diminuíram nos primeiros dias de exposição à RUVB (Grobe & Murphy, 1998; Altamiro *et al.*, 2000).

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 podem levar 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 nas taxas de crescimento observado nas macroalgas estudadas pode estar relacionada à utilização de energia para ativação de mecanismos de aclimação e reparos de danos induzidos pela RUVB, como o

observado em *Emiliana huxleyi* (Lohmann) W. H. Hay & H. Mohler (van de Poll *et al.*, 2001).

A radiação UVB 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).

Houve diminuição das taxas de crescimento das cinco macroalgas analisadas mostram a diminuição quando submetidas à RUVB e corroborando com o estudo de algumas espécies, como *Gracilaria conferta* (Schousboe ex Montagne) Montagne (Freedlander & Bem-Amotz, 1991), com *U. expansa* (Grobe & Murphy, 1998) e *Delesseria sanguinea* (Hudson) J. V. Lamouroux (Pang *et al.*, 2001).

Os efeitos danosos, ocasionados pela RUVB, diminuem nos organismos com o aumento do número da camada de células. As camadas mais externas seriam capazes de absorver a maior parte da RUVB e com isto as camadas internas estariam protegidas (Sutherland, 1997). No presente estudo, foi observado o encurvamento dos segmentos apicais expostos à radiação somente para a espécie *G. domingensis*, um fenômeno que pode estar relacionado com uma forma de proteção dos segmentos apicais expostos. Resultados similares foram observados nas macroalgas: *Laminaria ochroleuca* Bachelot de la Pylaie Roleda *et al.*, (2004), *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vicent Navarro *et al.*, (2010) e *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agarth Navarro *et al.*, (2008). Outras alterações macroscópicas como a redução na ramificação apical foram observadas em *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei* e *H. musciformis* após a RUVB.

Além da redução do crescimento das ramificações, *G. domingensis*, *Ge. floridanum* e *C. teedei*, apresentaram despigmentação dos segmentos apicais, após tratamento com RUVB indicando que ocorreu uma alteração no metabolismo. Em *L. ochroleuca* (Roleda *et al.*, 2004) e *I. cordata* (Navarro *et al.*, 2010) também foi observado despigmentação e necrose nos segmentos apicais.

Efeitos da radiação UVB nos pigmentos fotossintetizantes e no desempenho fotossintético

A exposição à RUVB levou à diminuição nas concentrações da clorofila *a* em *G. domingensis*, *C. teedei* e variante marrom de *K. alvarezii* (Tabela 1). De outra forma, *G. floridanum* e *H. musciformis* mostraram-se mais resistente à RUVB, mantendo as concentrações de clorofila *a* semelhantes às plantas submetidas à PAR (Tabela 1). Alguns estudos realizados com macroalgas expostas à RUVB evidenciaram a diminuição na concentração da clorofila *a*, tais como o realizado por Wood (1989) com *Eucheuma strictum* F. Schmitz, e por Eswaran *et al.*, 2001 com *K. alvarezii*. Entretanto, outros estudos com as macroalgas *K. alvarezii* variante pigmentar verde e vermelha (Schmidt *et al.*, 2010b), e *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry in Guiry e *Chondrus crispus* Stackhouse (Roleda *et al.*, 2004b), apontaram o aumento na concentração de clorofila *a* após a exposição à RUVB. Assim, não se pode generalizar que a RUVB seja um fator estressante que induza sempre a redução da clorofila *a* nas macroalgas.

As concentrações das ficobiliproteínas em todas as macroalgas deste estudo diminuíram após exposição à RUVB (Tabela 1). Esta degradação de ficobiliproteínas pode se relacionar à localização espacial destas proteínas na parte externa dos tilacóides, na estrutura denominada de ficobilissomos. Estas ficobiliproteínas desempenham uma fundamental função na transmissão da energia de excitação dos pigmentos mais externos para as moléculas de clorofila *a* do fotossistema II (Zuber, 1986). Desta forma, os três tipos de ficobiliproteínas, a ficoeretrina, a ficocianina e aloficocianina absorvem a energia solar transferindo em seqüência ficoeretrina→ficocianina →

aloficocianina para o centro de reação do fotossistema II, onde a clorofila *a* é oxidada, estabelecendo o fluxo de elétrons (Gantt, 1981; Talarico, 1996).

Nas algas vermelhas, a ficoeretrina é relevante no processo de aclimatação, pois, está localizada mais externamente nos ficobilissomos (Talarico, 1996). Segundo Falkowski & La Roche (1991), o processo de aclimatação 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; Hader & Hader, 1991).

Em resposta à radiação solar elevada, a degradação dos pigmentos ocorre naturalmente nas algas e está relacionada à diminuição nas taxas fotossintéticas (Figueroa *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 também foram descritas para a macroalga *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis, onde os níveis de ficoeretrina, a ficocianina, e a clorofila *a* mostraram-se diminuídos sob condições de exposição à radiação solar, podendo ser re-sintetizadas ao longo do dia. O processo de foto-destruição dos pigmentos ocorre naturalmente, alterando a atividade fotossintética que, em última análise, leva à diminuição das taxas de crescimento (Figueroa *et al.*, 1997).

O efeito da RUVB observado nas macroalgas do presente estudo pode ser ocasionado pelo excesso de estimulação do fotossistema II. Após 3h de exposição à RUVB, pode ter ocorrido uma foto-oxidação e foto-inibição dos pigmentos fotossintetizantes e conseqüentemente, uma diminuição da

eficiência fotossintética e um decréscimo na taxa de crescimento. Plantas de *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* apresentaram uma diminuição da eficiência fotossintética e do transporte de elétrons, quando expostas à RUVB. O fotossistema II é um dos principais alvos da RUVB em plantas e macroalgas (Post *et al.*, 1992; Neale *et al.*, 1993; Vass, 1997). Na medida em que a RUVB aumenta, a dificuldade de estabelecer um gradiente de prótons através da membrana tilacóide aumenta também prejudicando a síntese de ATP e as reações do processo fotossintético são prejudicadas (Poppe *et al.*, 2002). Por outro lado, o excesso de energia absorvida pelos sistemas pode provocar alterações no aparato fotossintético (Holzinger *et al.*, 2004).

Como uma estratégia para evitar os efeitos das espécies reativas de oxigênio, *H. musciformis* submetida à RUVB aumentou a concentração de compostos fenólicos (58.9%) e de carotenóides (3.6%) como um mecanismo de fotoproteção contra os efeitos da RUVB. O mecanismo de fotoproteção que foi evidenciado em *H. musciformis* após exposição à RUVB não foi verificado em *G. floridanum*, onde os conteúdos de compostos fenólicos e carotenóides diminuíram após serem tratadas com RUVB (Tabela 1). Segundo, Ruhland *et al.*, (2007), o aumento nas concentrações dos compostos fenólicos em resposta à exposição à elevada incidência de radiação UVB apresenta duas funções: **1.** Atuar como mecanismo fotoprotetor e **2.** Mitigar os danos ocasionados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio.

Os padrões de carotenóides em *H. musciformis* também foram alterados após exposição à RUVB. Essas alterações incluem a ausência de luteína, um pequeno aumento na quantidade de *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno, bem

como aumento no conteúdo de zeaxantina livre. Este último aumento pode estar relacionado aos efeitos da RUVB quebrando as ligações éster da zeaxantina esterificada. Döhler (1998) observou a diminuição nos níveis de luteína e zeaxantina na macroalga vermelha *Leptosomia simplex* (A.Gepp & E.S.Gepp) Kylin. No entanto, no mesmo estudo, um aumento nos níveis de carotenos também foi observado, provavelmente como um mecanismo de proteção do aparato fotossintético. Os principais efeitos da RUVB nos organismos fotossintetizantes são redução da eficiência fotossintética, alterações da atividade enzima Rubisco, alterações de lipídios estruturais dos cloroplastos, tais como glicolipídeos e glicerol fosfatidil (Roleda, 2010). Uma das estratégias utilizadas pelas macroalgas para sobreviverem à exposição aos altos níveis de radiação UVB são a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos do tipo micosporina e os carotenóides, que direta ou indiretamente absorvem a energia da RUVB (Sommaruga, 2001; Sonntag *et al.*, 2007). Como estas análises foram feitas em uma espécie de agarófita e uma espécie de carragenófito, pode-se observar que estes grupos de macroalgas apresentam comportamentos antagônicos quando da resposta dos compostos fenólicos e carotenóides a RUVB.

Efeitos da radiação UVB no metabolismo protéico e na atividade enzimática

A carragenófito *C. teedei* apresentou uma redução significativa no conteúdo de proteínas após exposição à RUVB (Tabela 1), resultados estes que corroboram com observados por Eswaran *et al.*, (2001) com a carragenófito *K. alvarezii*. Estes resultados indicam que a RUVB inibe em alguma extensão determinadas vias do metabolismo protéico, provavelmente mudando vias de biossíntese, ou mobilizando proteínas para os processos de reparo, incluindo a ativação de mecanismo antioxidante. Por outro lado, na espécie carragenófito estudada, *H. musciformis*, o conteúdo protéico não foi alterado nas plantas tratadas com RUVB, um resultado possivelmente associado ao aumento do retículo endoplasmático rugoso observado nas análises de microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, outra agarófito, *G. floridanum*, também não apresentou alterações no conteúdo protéico, porém, não foi verificado aumento no retículo endoplasmático rugoso, sugerindo a existência de uma condição de maior resistência ao fator estressante sobre o metabolismo protéico.

A exposição à RUVB induz a produção de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo a diversas moléculas, incluindo lipídios de membrana, proteínas, enzimas e DNA (Ruhland *et al.*, 2007). Em *H. musciformis* foi observado um aumento na atividade da enzima NADH desidrogenase, após exposição à RUVB. O aumento da atividade da enzima NADH desidrogenase observada em *H. musciformis*, possivelmente esteja relacionado ao aumento do consumo de oxigênio para compensar a

perda potencial de membrana e o déficit de energia. Este aumento na atividade mitocondrial pode resultar em aumento da formação de ROS mitocondrial.

Em *C. teedei*, o aumento na atividade de glutathione peroxidase e em *G. floridanum*, o aumento na atividade de glutathione reductase após a radiação ultravioleta-B, podem estar relacionados com a maior produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que a exposição à radiação bloqueou a atividade mitocondrial da enzima NADH desidrogenase, incluindo a do complexo I. O complexo I da cadeia respiratória é um dos principais alvos das espécies reativas de oxigênio (Boveris *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 2003) e uma produção de espécies reativas de oxigênio é observado quando o centro redox é bloqueado (Turrens, 1997; Turrens & Boveris, 1980). Além disso, as espécies reativas de oxigênio formadas no complexo I são liberadas na matriz mitocondrial (Chen *et al.*, 2003), assim provocando alterações em enzimas mitocondriais, incluindo os complexos da cadeia respiratória, enzimas do ciclo de Krebs e várias outras proteínas sensíveis, bem como DNA mitocondrial (Zhang *et al.*, 1990; Hausladen & Fridovich, 1994; Bandy & Davison, 1990).

Segundo Costa *et al.*, (2002), a exposição à RUVB estimula a geração de ROS. Shiu e Lee (2005) demonstraram que o aumento das espécies reativas de oxigênio induz ao aumento na resposta enzimática antioxidante. No entanto, *H. musciformis* mostrou que o potencial antioxidante das células poderia ser caracterizado por um aumento significativo nas defesas antioxidantes não-enzimáticas, enquanto a atividade antioxidante da glutathione peroxidase não foi alterada pela RUVB.

Efeitos da radiação UVB na organização celular e na ultraestrutura observada através de microscopia de luz e confocal, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura

A morfologia celular das macroalgas tratadas com RUVB foi alterada. As células apresentaram contorno celular irregular e aumento da espessura da parede celular das primeiras células corticais, com o aumento no número de microfibrilas. Após a exposição à RUVB as primeiras células corticais da variante marrom de *K. alvarezii* perderam o formato de taça, apresentando um aumento da espessura da parede celular e um contorno irregular. Em *C. teedei* e *H. musciformis*, as primeiras células corticais tornam-se alongadas, perdendo o formato arredondado após o tratamento com RUVB, enquanto, em *G. domingensis* e *G. floridanum* as primeiras células corticais evidenciaram perda do formato alongado, adquirindo o formato arredondado. Segundo Ståxen & Bornmann (1994), a exposição à RUVB altera a disposição das microfibrilas da parede celular, os microtúbulos são despolimerizados, quando expostos a RUVB, ocorrendo um rompimento da rede cortical de microtúbulos, podendo alterar a forma e conseqüentemente a morfologia.

Ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície celular de *C. teedei* e *H. musciformis* apresentou alterações na topografia celular, após exposição à RUVB, indicando uma diminuição na mucilagem que recobre o talo das algas. Provavelmente, após a exposição à RUVB ocorra uma alteração no metabolismo, diminuindo a produção de componentes da mucilagem, tais como D-glucose, D-xilose, D-ácido glucurônico, ou galactose.

A parede celular das algas é formada por dois componentes: **1.** O componente fibrilar que forma o esqueleto da parede e **2.** O componente

amorfo que forma a matriz que embebe a porção fibrosa (Bouzon, 2006). 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). O aumento da parede celular também foi verificado em *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* e variante marrom de *K. alvarezii* quando foram submetidas ao tratamento com ácido periódico de Schiff, evidenciando uma reação mais intensa, característica de uma maior presença de polissacarídeos neutros, como a celulose.

Quando analisada sob microscopia eletrônica de transmissão, a parede celular das macroalgas analisadas apresentou uma textura microfibrilar, com microfibrilas estruturadas em camadas concêntricas e em diferentes graus de compressão. Em contraste, após a exposição à RUVB, a espessura parede celular aumentou, indicando ser este um dos principais mecanismos de proteção contra os efeitos danosos da RUVB. Este mecanismo também foi observado nas células da macroalga vermelha *Audouinella savina* (F.S. Collins) Woelkerling (Talarico, 1996) e nas variantes verde e vermelha de *K. alvarezii* (Schmidt *et al.*, 2009; 2010b) expostas à RUVB, onde ocorreu o aumento da espessura e de microfibrilas. Estas alterações podem indicar um mecanismo de defesa contra a radiação, onde as algas aumentariam a espessura das paredes celulares para reduzir a intensidade de radiação no meio intracelular. Foi possível observar, nas plantas expostas a RUVB, o aumento de vesículas formadoras de parede celular e é provável que a atividade dos corpos de Golgi, embora esta organela tenha sido pouco observada nas plantas analisadas, tenha resultado numa maior produção de vesículas com material formador de

matriz de parede celular. Apesar de ser verificado o espessamento da parede celular nas macroalgas expostas a RUVB, em *H. musciformis* e *Ge. floridanum* não foi verificado o aumento de carragenana e ágar, respectivamente e, em função disto, supõe-se que esta ampliação seja deposição de celulose ou outro componente da matriz.

Independemente do tratamento, as paredes celular das macroalgas *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* e variante marrom de *K. alvarezii* reagiram positivamente ao tratamento com azul de Toluidina (AT-O), evidenciando a presença de polissacarídeos sulfatados, o ágar nas agarófitas e a carragenana nas carragenófitas. A reação metacromática com AT-O é produzida por polissacarídeos com grupo carboxila e sulfatados se corados com pH 4.4, porém, em pH com valor igual ou menor que 1.0 somente os grupos sulfatos têm carga elétrica e resultam em metacromasia (McCully, 1968). Entretanto, ocorreu aumento na espessura da parede celular após à exposição a radiação UVB, que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra a exposição à radiação ultravioleta. Em *G. domingensis* foi verificado um aumento nos espessamentos lenticulados e em *C. teedei* a metacromasia foi mais intensa nas células irradiadas com RUVB. Granulações metacromáticas foram observadas no citoplasma das células corticais e das células subcorticais de *G. domingensis* e *H. musciformis* após exposição à RUVB, indicando que os vacúolos são reservas de polissacarídeos complexos, que possuem na sua constituição a presença de grupamentos sulfatados. Estas granulações poderiam ser locais de acúmulo de material que posteriormente seria incorporado à parede celular.

As mitocôndrias das macroalgas *Ge. floridanum*, *H. musciformis* e variante marrom de *K. alvarezii* não apresentaram modificações ultraestruturais após a exposição à RUVB. Entretanto, em *G. domingensis* e *C. teedei* foram verificadas alterações na organização das cristas mitocondriais, modificações na forma tubular para a forma sacular após a exposição à radiação UVB. Outros estudos relatam as mesmas alterações ultraestruturais nas mitocôndrias de *P. palmata* e *P. decipiens* (Poppe *et al.*, 2003).

Nas algas vermelhas o material de reserva é extra plastidial, sendo conhecido como amido das florídeas. Nas plantas controle, observadas na microscopia de luz, coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e na microscopia eletrônica de transmissão, estes grãos estão presentes nas células corticais e principalmente mais concentrados nas células subcorticais. Entretanto, nas carragenófitas *C. teedei*, *H. musciformis* e variante marrom de *K. alvarezii*, submetidas à RUVB, ocorreu redução no número de grãos de amido das florídeas. Por outro lado, nas agarófitas *G. domingensis* e *Ge. floridanum* observou-se aumento no número destes grãos. A diminuição dos grãos de amido das florídeas observada nas carragenófitas à RUVB pode estar relacionada a uma mudança na via de biossíntese de enzimas do ciclo de Calvin, possivelmente através da ativação da via catabólica. Os processos de degradação podem ser utilizados para ativar a biossíntese de compostos de defesa. De acordo com Sinha *et al.*, (2000), alguns organismos têm uma capacidade para produzir mecanismos para neutralizar os efeitos danosos da RUVB. A inibição da síntese dos grãos de amido das florídeas por meio da molécula UDP-glucose, pode também estar relacionada com um desvio da rota metabólica para produção de componentes da parede celular, tais como a

celulose e a carragenana, que também usam a UDP-glucose como precursor para a biossíntese destes polissacarídeos. Por outro lado, nas agarófitas *G. domingensis* e *Ge. floridanum* foi verificado um aumento da síntese de amido das florídeas em conjunto com o aumento da espessura da parede celular, sugerindo que a perturbação do metabolismo de carboidratos decorrente do efeito da RUVB é espécie específica. O aumento na quantidade de grãos de amido também foi verificado em outras espécies agarófitas tais como *Gracilaria birdiae* Plastino & E. C Oliveira (Aires, 2009) e esporos de *Gelidium floridanum* (Scariot, 2009). Segundo Malanga (1997), este aumento provavelmente ocorre, devido à incapacidade das células em mobilizar estes grãos, como uma consequência das alterações das membranas tilacóides dos cloroplastos, modificando a permeabilidade, assim como de enzimas, com danos ao processo fotossintético.

As proteínas são os principais constituintes das organelas celulares e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas (Schmidt *et al.*, 2009). As proteínas são sintetizadas no citoplasma, em ribossomos livres, ou provenientes de pequenas vesículas derivadas do retículo endoplasmático rugoso. O azul brilhante de Coomassie (CBB) foi proposto como corante quantitativo para as proteínas totais em células de plantas (Cawood *et al.*, 1978; Gahan, 1984). Com este método de coloração as proteínas não foram detectadas na parede celular, entretanto, foram encontradas no citoplasma das células corticais e subcorticais das plantas controle e das tratadas com RUVB. Quando coradas com CBB, as células irradiadas exibiram uma forte reação de cor, indicando o aumento na quantidade de organelas ricas em material protéico. Esta reação mais intensa

pode estar relacionada com a grande quantidade de ribossomos livres que foi verificado em *G. domingensis*, *Ge. floridanum* e *C. teedei*, e de retículo endoplasmático rugoso em *H. musciformis*. A grande quantidade de ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso 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 às 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). Por outro lado, as proteínas são conhecidas por serem eficientes na absorção da RUVB (Karentz, 1994). Mecanismos de reparo a danos induzidos pela RUVB nas membranas ou nos componentes do transporte de elétrons aumentariam a demanda da atividade enzimática com o aumento na exigência de nitrogênio (Poppe *et al.*, 2003).

Nas algas vermelhas, os tilacóides não se associam uns aos outros, encontram-se livres nos cloroplastos onde um tilacóide periférico envolve os tilacóides paralelos. O número de tilacóides paralelos é variável e este número depende, principalmente, da localização espacial da célula nas algas. Os cloroplastos das macroalgas expostas à RUVB mostraram alterações ultraestruturais significativas, incluindo a modificação na quantidade, tamanho e organização dos tilacóides. Em diversas espécies de macroalgas submetidas à

RUVB também foram evidenciadas alterações na organização dos cloroplastos tais como: *P. palmata*, *P. decipiens*, *Ph. austrogeorgica* e *B. atropurpurea* (Poppe *et al.*, 2002; 2003), variantes verde e vermelha de *K. alvarezii* (Schmidt *et. al.*, 2009). Além da desorganização das membranas dos tilácóides, as macroalgas expostas à RUVB apresentaram um aumento no número de plastoglóbulos. De acordo com Holzinger *et al.*, (2009), quando as algas são submetidas a estresse, são desencadeadas alterações na limitação de nitrogênio e um concomitante aumento na síntese de lipídios que ficam concentrados nos plastoglólulos. Estes fenômenos ocorrem porque a rota de biossíntese protéica é suprimida. Resultados semelhantes foram relatados por Poppe *et al.*, (2002; 2003); Holzinger *et al.*, (2006) e Schmidt *et. al.*, (2009) em algas expostas a RUVB. Este aumento no número de plastoglóbulos pode ser considerado como uma mudança no metabolismo, que, por sua vez, resulta em redução da proliferação celular e diminuição nas taxas de crescimento.

Pelas análises realizadas podemos concluir que os principais mecanismos de proteção contra a exposição à RUVB foram: **1.** Aumento na espessura da parede celular; **2.** Ativação de defesa enzimática (glutathione peroxidase e glutathione reductase); **3.** Ativação de defesa não enzimática (compostos fenólicos e carotenóides). Finalmente podemos concluir que o principal alvo subcelular da ação da RUVB são os cloroplastos. Nestas organelas o sistema tilacoidal tornou-se desorganizado, tendo como consequência redução da eficiência fotossintética e da composição pigmentar. Após avaliar os efeitos da RUVB, podemos concluir que as algas servem como um excelente modelo de estudo, tendo em vista os escassos conhecimentos

referentes aos mecanismos adaptativos relacionados com a exposição à radiação ultravioleta-B.

	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gelidium floridanum</i>	<i>Chondracanthus teedei</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	<i>Kappaphycus alvarezii</i>
Alterações nas taxas de crescimento e morfologia					
Taxas de crescimento	-	-	-	-	-
Encurvamento dos ramos apicais	+	=	=	=	=
Despigmentação dos ramos apicais	+	+	+	=	=
Ramos apicais	-	-	-	-	=
Alterações nas concentrações dos pigmentos fotossintetizantes					
Clorofila a	-	=	-	=	-
Ficoeretrina	-	-	-	-	-
Ficocianina	-	-	-	-	-
Aloficocianina	-	-	-	-	-
Carotenóides	NR	-	NR	+	NR
Compostos fenólicos	NR	-	NR	+	NR
Alterações na eficiência fotossintética observada através do PAM					
Eficiência fotossintética	-	-	-	-	NR
Transporte de elétrons	-	-	-	-	NR
Alterações bioquímicas					
Conteúdo protéico total	NR	=	-	=	NR
NADH desidrogenase	NR	=	-	+	NR
Glutaciona peroxidase	NR	NR	+	=	NR
Glutaciona redutase	NR	+	NR	NR	NR
Alterações citoquímicas observadas através de ML					
Parede celular	+	+	+	+	+
Quantidade de grãos de amido	+	+	-	-	-
Citoplasma denso	+	+	+	+	+
Metacromasia com a parede celular	+	+	+	+	+
Granulações metacromáticas	+	=	=	+	=
Espessamento lenticulado	+	=	=	=	=
Alterações ultraestruturais observadas através do MET					
Alterações na forma das células	+	+	+	+	+
Vesículas formadoras de parede celular	=	+	+	+	=
Desorganização do cloroplasto	+	+	+	+	+
Plastoglóbulos	+	+	+	+	+
Desorganização da mitocôndria	+	=	+	=	=
Ribossomo livre	+	+	+	=	=
Retículo endoplasmático rugoso	=	=	=	+	=

Legenda: + Aumento; - Diminuição; = Semelhante ao controle; NR Não realizada.

Tabela 1: Comparação das diferentes análises realizadas em *G. domingensis*, *Ge. floridanum*, *C. teedei*, *H. musciformis* e na variante marrom de *K. alvarezii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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 Métodos Ficológicos**. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 529-549pp.

AYRES, L. 2009. **Efeito da radiação UVB no crescimento e fotossíntese de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Botânica)). Universidade de São Paulo, São Paulo. 146pp.

BANDY, B. & DAVISON, A.J. 1990. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? **Free Radical Biology Medicine**, 8: 523-539.

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

BOUZON, Z.L. 2006. Histochemistry and ultrastructure of the ontogenesis of the tetrasporangia of *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, 29: 229-238.

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

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.

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

BOVERIS, A., CADENAS, E. & STOPPAN, A.O. 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, 156:435-444.

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.

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

CASSINA, A. & RADİ, R. 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry Biophysics**, 328: 309-316.

CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. 1985. Glutathione reductase. **Methods Enzimología**, 113: 484-490.

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.

CHEN, Q., VAZQUEZ, E.J., MOGHADDAS, S., HOPPEL, C.L., LESNEFSKY, E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**, 278: 36027-36031.

COSTA, H., GALLEGOS, S.M. & TOMARO M.L. 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Plant Science**, 162:939-945.

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.

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

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

DÖHLER, G., 1998. Effect of UV radiation on pigments of the Antarctic macroalga *Leptosomia simplex* L. **Photosynthetica**, 35: 473-476.

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

ESWARAN, K., SUBBA RAO, P.V. & MAIRH, O.P. 2001. Impact of ultraviolet-B radiation on *Kappaphycus alvarezii* (Solieraceae, Rhodophyta). **Indian Journal of Marine Science**, 30:105–107

ESWARAN, K., MAIRH, O.P. & SUBBA RAO, P.V. 2002. Inhibition of pigments and phycocolloid in a marine red algae *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. **Biologia Plantarum**, 45: 157-159.

FALKOWSKI, P.G. & LA ROCHE, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. **Journal of 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 Series**, 151: 81-90.

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.

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

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

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.

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

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

GUIMARÃES, M., PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 1999. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. **Botanica Marina**, 42: 481-486.

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.

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

HAUSLADEN, A. & FRIDOVICH, I. (1994). Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. **The Journal of Biological Chemistry** 269: 29405-29408.

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

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.

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

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

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

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.

HULSHOF, P.J.M., KOSMEIJER-SCHUIL, T., WEST, C.E. & HOLLMAN, P.C.H. 2007. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20: 655-661.

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.

KAAS, R. 1998. The seaweed resources of France. *In*: CRITCHLEY, A.T. & OHNO, M. (Eds.) **Seaweed resources of the world**. Japan: JICA Yokosuka. p. 233-244.

KAIN, J.M. & DESTOMBE, C. 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, 7: 269-281.

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.

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.

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

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.

KUHNEN, S., LEMOS, P.M.M., CAMPESTRINI, L.H., OGLIARI, J.B., DIAS, P.F. & MARASCHIN, M. 2009. Antiangiogenic properties of carotenoids: a potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, 1: 284-290.

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.

LATINI, A., RODRIGUEZ, M., BORBA ROSA, R., SCUSSIATO, K., LEIPNITZ, G., REIS DE ASSIS, D., DA COSTA FERREIRA, G., FUNCHAL, C., JACQUES-SILVA, M. C., BUZIN, L., GIUGLIANI, R., CASSINA, A., RADI, R. & WAJNER, M. 2005. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**, 135, 111-120.

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.

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.

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.

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

LOWRY, O. H., ROSEBOUGH, N. G. & FARR, A. L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275.

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,

MALANGA, G., CALMANOVICI, G. & PUNTARULO, S. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, 101: 455-462.

MATULEWICZ, M.C. 1996. Polisacáridos de algas rojas: Agar. In: FERRARIO, M. & SAR, E. (Eds.). **Macroalgas de interes económico. Cultivo, manejo, industrialización**. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, p.111-133.

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

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

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

MURANO, E. 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, 7: 245-254.

NAVARRO, N.P., MANSILLA, A., PALACIOS, M. 2008. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. **Journal Applied Phycology**, 20: 897-906.

NAVARRO, N.P., MANSILLA, A., PLASTINO, E.M. 2010. *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. **Journal Applied Phycology**, 22: 385-394.

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, 61-77 pp.

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

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

NUNES, J.M.C. 2005. **Rodofíceas marinhas bentônicas do Estado da Bahia, Brasil.** São Paulo: Universidade de São Paulo-USP, 410pp. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. 1998. *In*: CRITHCLEY, A.T. & OHNO, M. (Eds.). **Seaweeds Resources of the World**. Japan: International Cooperation Agency, p.366-371.

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. & OSTINI, S. 1998. Introdução de espécies exóticas de *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: abordagem teórica e experimental. *In*: PAULA, E.J., CORDEIROMARINO, 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.

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.

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.

POST, A., GENTLE, S., LARKUM, A.W.S. 1992. **Algal photosynthesis: inhibition by UV-B radiation, recovery and UV-absorbing pigments**. *In*: MURATA, N. (Ed) Research in photosynthesis. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 847-850.

PUESCHEL, C. M. 1992. An ultrastructural survey of the diversity of crystalline, proteinaceous inclusions in red algal cells. **Journal Phycology**, 31: 489-499.

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.

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

ROLEDA, M.Y., van de Poll W.H., WIENCKE, C., HANELT, D. 2004b. PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting *Gigartinales*: implications for recruitment and zonation pattern. **Marine Ecology Progress Series**, 281:37–50

ROLEDA, M.Y., LÜTZ-MEINDL, U., WIENCKE, C., & LÜTZ, C. 2010. Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Urospora penicilliformis* from Arctic Spitsbergen to UV radiation. **Protoplasma**, 243:105-116.

RUHLAND, C.T., M.J. FOGAL, C. R. BUYARSKI & M.A KRNA, 2007. Solar Ultraviolet-B radiation increases phenolic content and ferric reducing antioxidant power in *Avena sativa*. **Molecules**, 12: 1220-1232.

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

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

SCHMIDT, E.C., MARASCHIN, M. & BOUZON, Z.L. 2010b. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. **Hydrobiologia**, 649:171-182.

SCARIOTA, L. A. 2010. Efeitos da radiação ultravioleta na germinação e desenvolvimentos dos tetrasporos de *Gelidium floridanum* (Gelidiales, Rhodophyta): crescimento morfologia e ultraestrutura. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 83pp.

SCOTT, CE & ELDRIDGE, AL 2005. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal Food Composition and Analysis**, 18: 551-559.

SHIU, C.T. & LEE, T.M. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. **Journal of Experimental Botany**, 56: 2851-2865.

SINHA, R.P., KLISCH, M., GRÖNIGER, A. & HADER, D.P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*: effects of UV and heat. **Environmental and Experimental Botany**, 43:33-43.

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.

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

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

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

STAXÉN, I. & BORNMAN, J.F. 1994. A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. **Physiology Plantarum**, 91, 735-740.

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

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: 205-222.

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

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

TSENG, C.K. 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. **Journal of Applied Phycology**, 13: 375-380.

TURRENS, J.F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, 17:3-8.

TURRENS, J.F. & BOVERIS, A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, 191:421-427.

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

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, p. 931-949.

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.

WELLBURN, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307-313.

WENDEL, A. 1981. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, 77: 325-333.

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

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. (Eds.). **The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems**. New York: Plenum Press, p. 429-457.

ZHANG, Y., MARCILLAT, O., GIULIVI, C., ERNSTER, L. & DAVIES, K.J. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, 265:16330-16336.

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