UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

JOSÉ BONOMI BARUFI

FOTOPROTEÇÃO EM

***Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA): UMA
ABORDAGEM FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

PHOTOPROTECTION OF

***Gracilaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA): A
PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR APPROACH**

São Paulo

2010

José Bonomi Barufi

Fotoproteção em
Gracilaria tenuistipitata (Rhodophyta): uma
abordagem fisiológica e molecular

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Mariana Cabral de Oliveira
Coorientador: Félix Diego López Figueroa

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

B295 Barufi, José Bonomi

Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular / José Bonomi Barufi. São Paulo: J. B. Barufi, 2010.
xiv, 325p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, 2010.

1. Fotoproteção 2. Radiação ultravioleta 3. *Gracilaria tenuistipitata* 4. Nitrogênio I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica. II. Título.

LC: QK 569.R4

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Mariana C. Oliveira
(orientadora)

Ainda que seja repetitivo, ainda que seja um lugar comum,
dedico esta tese à minha família, cada dia maior e mais bonita,
com uma menção especial para a Stella, com carinho
porque o importante afinal é viver e não ter a vergonha de ser feliz
cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz

*Projetar é fácil quando se sabe como fazer
tudo se torna fácil quando se conhece o modo de proceder
para alcançar a solução de algum problema,
e os problemas com que deparamos na vida são infinitos
problemas simples que parecem difíceis porque não se conhecem
e problemas que parecem impossíveis de resolver*

*Quando se aprende a enfrentar pequenos problemas,
pode-se pensar também em resolver problemas maiores.
O método de projetar não muda muito,
apenas mudam as áreas
em vez de se resolver o problema sozinho,
é necessário, no caso de um grande projeto,
aumentar o número de especialistas e colaboradores
e adaptar o método à nova situação.*

(Bruno Munari, "Das coisas nascem coisas")

"Somos demasiados y no podrán pasar
Por encima de los años que tuvimos que callar
Por los libros prohibidos y las entradas secretas
Por todos los que un día se atrevieron a gritar
Que la Tierra era redonda y que había algo más
Que dragones y abismos donde acababan los mapas
Por las noches de vacío cuando te ibas a dormir
Esperando que la suerte vuelva a sonreír
Con los ojos abiertos esperando un milagro
Siento que llegó nuestra hora, esta es nuestra revolución
Somos demasiados y no podrán pasar
Por encima de la vida que queremos heredar
Donde no tenga miedo a decir lo que pienso
Por todas las canciones que empiezan a nacer
Para no ser escuchadas y al fin lo van a ser
Cantadas con rabia por los que siempre callaron
Siento que llegó nuestra hora, esta es nuestra revolución
Porque siento que este es el momento
De olvidar lo que nos separó y pensar en lo que nos une"

(E. Amaral y J. Aguirre, "Revolución")

(Figura modificada de "Níquel Náusea – Minha mulher é uma galinha", Fernando Gonsales)

Agradecimentos

Uma tese como esta não teria sido possível sem a colaboração de uma série de instituições e pessoas, às quais eu expresso minha mais sincera gratidão.

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no decorrer do projeto. Ao Programa de Doutorado com Estágio no Exterior, dessa mesma instituição, pela bolsa concedida no decorrer do ano de 2007, permitindo minha estadia em Málaga;
- A Junta de Andalucía, Ministerio de Educación y Ciencia y Ministerio de Ciencia y Innovación de España por la cofinanciación de la tesis a través de los incentivos al grupo de investigación RNM 295 “Fotobiología y Biotecnología de Organismos Marinos”;
- Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, que manteve todas as portas abertas para o desenvolvimento de meu projeto;
- A la Universidad de Málaga, por todo el apoyo logístico y físico durante el año de 2007;
- À querida Profa. Dra. Mariana Cabral de Oliveira, minha orientadora brasileira, que acreditou no meu trabalho, acreditou nas minhas idéias. Muito obrigado! Acredito que a interação com ela me ensinou muito sobre como se fazer pesquisa em uma área nova. Ela me introduziu ao mundo da biologia molecular, que de repente fazia um enorme sentido em cada banda de um gel de eletroforese; obrigado por compartilhar comigo um pouco do seu brilhantismo e conhecimento durante este projeto;
- Al muy estimado Prof. Dr. Félix López Figueroa, mi director español. Félix abrió las puertas de su universidad, del mundo exterior y de la España para que yo, un estudiante brasileño hasta entonces desconocido, pudiera probar mi valor. Por crearme, por enseñarme mucho de la fisiología de macroalgas y lecciones de la vida, por la persona estupenda que es, y más que un director un gran amigo. Muchas gracias!!

Há algumas pessoas muito importantes na minha caminhada, que colaboraram de forma direta e indireta para que esta tese pudesse ser realizada. Como colaboradores oficiais, devo agradecer aos seguintes professores doutores:

- A Nathalie Korbee Peinado, por el auxilio con el HPLC, en los análisis de carotenoides y MAAs;
- A María Segovia Azcorra, por las discusiones y ayudas con dímeros de pirimidinas y fotoliasas;
- A Francisco J.L. Gordillo, por ayudarme y explicarme protocolos y estadísticas;
- Ao Eurico Cabral de Oliveira e à Estela Maria Plastino, pela colaboração no fechamento do histórico de vida da espécie, em paralelo ao desenvolvimento desta tese;
- Ao Pio Colepicolo, pela colaboração com o uso do aparelho de RT-PCR;
- À Marie-Anne Van Sluys, colaborando nos sequenciamentos de DNA e quantificações de ácidos nucleicos pelo nanodrop, muito obrigado;

Ainda devo gratidão a outros professores das duas universidades: na USP, aos Profs. Drs. Flávio A. S. Berchez, Fanly Fungyi Chow Ho e Suzana Ursi, muito obrigado pelas discussões sempre edificantes, muitas vezes no corredor do departamento; en la UMA, a los Profesores Drs. F. Xavier Niell, Raquel Carmona, Carlos Jiménez, Enrique Moreno, José “Pepe” Aguilera, Juan Lucena y Roberto Abdala Díaz muchas gracias por las charlas, los tés, por la compañía en el Departamento y almuerzos y momentos “superguays” malagueños;

Agradeço ainda a alguns amigos e colaboradores em especial, que ajudaram bastante e foram fundamentais para a produção dessa tese:

- A María Teresa Mata Contreras, mi querida y estimada amiga Mayte, que me ayudó desde el primero hasta el último día en que yo estuve en Málaga. Gran amiga tanto dentro cuanto fuera de la universidad, me puso dentro del funcionamiento del laboratorio y aparatos en la UMA (PAMs incluso), muchas gracias!
- A Eugenia Márquez Garrido y a Mateo Márquez, por el auxilio con los experimentos en la UMA, pesando algas, midiendo fotosíntesis, por el compañerismo;
- À Dra. Marisa Moura Momoli, que me auxiliou com os experimentos de dímeros de T, y a Candela García que discutió conmigo paso a paso el protocolo de DNA-blot;
- Ao Rosário Petti por todo o suporte sempre muito eficiente dentro do LAM da USP, e por ser essa pessoa estupenda e divertida, muito obrigado!

- À MSc. Aline P. Martins e à Dra. Ângela Tonon, pelo auxílio em decifrar o aparelho de PCR em tempo real.

Agradezco aún a toda la gente del Depto de Ecología de la Universidad de Málaga, en especial: María Teresa Mata Contreras, Candela García, Concha Talavera, María Segovia, Nathalie Korbee, Eugenia Márquez Garrido, Mateo Márquez, Miriam Ruiz Nieto, Pablo Ignacio León Díaz, María López Parages, Victoriano Meco, Rosa María Rico Blanco, Beatriz “Bea” López, Celia Gil, Patricia Sánchez, Sonia Moreno, Almudena O’Valle García, María Angeles Arrojo, Rocío Muñoz Jimenez, Armando Palma Olmo, Roberto Palomino, Francisca de la Coba (Paqui). Vosotros fuisteis una compañía muy importante en mi vida, por los chistes, las comidas, los buenos momentos inolvidables grabados en mi memoria, que siempre tengo muchas ganas de repetirlos, quizá un día ¿no? Muchas gracias!

A mis compis de piso Pablo Barrero, Cesar y Antonio Luque, muchas gracias por convivir casi ocho meses con mi persona;

A mis amigos “extra-universidad”, que estuvieron conmigo en unos cuantos eventos importantes. A la gente cantante malagueña: Noemí, José Miguel, Nancho, Alejandro, Armando, Mayte, muchas gracias!

A la familia de Félix que me recibió estupendamente: Félix, Ingrid, Fabián y Stefan, a ver si vamos por tomar una taza de té una tarde cualquiera a charlar tonterías y divertirnos un poco más, o quizá nos vayamos al campo a recoger almendras o caerse en la nieve (¡inolvidable!), muchas gracias!

Aos amigos Nelso P. Navarro, Luciana B. Ferreira, Guilherme H. Pereira Filho, Amanda Wanderley e Suzana Ursi, que compartilharam momentos agradáveis da minha vida. Pelos chimarrões, discussões, chás, prosas e compartilhamentos de todas as formas; à Amanda também muito obrigado pela leitura (seguramente cansativa) desta tese; ao Guilherme e ao Lagosta, obrigado pelo Algaearte;

Aos colegas Lamigos: Leila Hayashi, Natália Ghilardi-Lopes, Monica Takahashi, Bia Torrano (+Adaílton e Au-berta), Letícia Spelta, Carlos “Lagosta” Amancio, Ig Falomir, Lúgia Ayres, Cíntia Ebert, Cíntia Coimbra, Cristian Contador, Fabíola Ornellas, Fábio Nauer, Emmanuelle Costa, Amanda Medeiros, Alexis Bellorín, Pi Nyvall, Viviane Costa, Roselene Donato, Daniela Milstein, Daniela Kikuchi, que estiveram comigo no LAM em algum momento dos últimos quase dez anos, tornando aquele ambiente mais agradável;

Aos meus amigos de sempre: Marisa e Fernando, Melissa, Tiago, Ana, Eduardo, Rodrigo e Márcia, William, Fábio, Marcos, Melina et al. e Sabrina. Cada um no seu momento, cada um de alguma maneira, surgiram na minha vida, e seguem tendo alta importância pra mim e impactaram positivamente a minha existência de alguma maneira. Muito obrigado! Sigamos juntos e próximos escrevendo capítulos importantes na interação positiva, produtiva e agradável entre pessoas!

À minha querida família que tem crescido bastante nos últimos tempos, nas figuras de minha querida mamãe (Maria Cristina) e meu pai (Luadir), que me deram a fortuna de ter meus irmãos queridos Paolo, Francisco (+Laiza), Tiago (+Mariana), Gabriela (+Marcello), João, Clara (+Marcel), Antonio (*in memoriam*) e Ana Maria (+Desnes). E também um agradecimento aos sobrinhos queridos: Tito, Artur, Pedro e Gabriel. Graças a vocês diversos valores e conhecimentos bonitos serão passados adiante para muitas e muitas gerações. Obrigado ainda ao Tio Antonio e família, pelo carinho e parceria nestes anos todos.

E finalmente, deixo por fim para fazer um agradecimento mais que especial para uma pessoa que sempre esteve ao borde de minha vida nos últimos quinze anos e de repente, passou a ser protagonista e a minha querida companheira, a pessoa que me ajuda e compartilha tudo comigo, minha querida Stella, que chegou de mansinho e ocupou meu coração. Muito obrigado!!!!

Índice

Abreviaturas.....	05
Lista de figuras.....	09
Lista de tabelas.....	24
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
1.1. O gênero <i>Gracilaria</i> e sua importância econômica.....	32
1.2. A radiação UV.....	34
1.2.1. Incidência de UV na superfície terrestre.....	34
1.2.2. Efeitos da radiação UV na zonação e estádios de algas no ambiente.....	40
1.2.3. Estratégias de defesa de organismos contra a radiação UV: os compostos filtradores.....	41
1.2.4. Efeitos da radiação UV no DNA – danos e reparo.....	50
1.2.5. Efeito da radiação UV na formação de radicais livres de O ₂ e reparo por sistemas antioxidantes em organismos fotossintetizantes..	54
1.2.6. Efeitos da radiação UV no metabolismo de C e N.....	60
1.2.7. A relação entre o suprimento de nutrientes e a fotoproteção contra a radiação UV.....	68
1.2.8. Efeitos da radiação UV na fotossíntese – fotoinibição dinâmica e crônica.....	70
1.2.9. Efeitos da radiação UV no conteúdo pigmentar.....	75
1.2.10. Efeitos da radiação UV no crescimento.....	79
1.3. Justificativa.....	80
1.4. Hipóteses e objetivos.....	81
1.4.1. Hipóteses do trabalho e objetivo geral.....	81
1.4.2. Objetivos específicos.....	82
2. Material e métodos.....	83
2.1. Material biológico.....	83
2.2. Condições de cultivo.....	83
2.3. Fontes de radiação e aparelhos para medidas de radiometria.....	85

2.4. Tratamentos de radiação executados nos diferentes experimentos.....	86
2.5. Variáveis dependentes analisadas.....	87
2.5.1. Análises fisiológicas e bioquímicas.....	87
2.5.1.1. Conteúdo pigmentar.....	88
2.5.1.1.1. Extração e quantificação de pigmentos por espectrofotometria.....	88
2.5.1.1.1.1. Clorofila <i>a</i>	88
2.5.1.1.1.2. Ficobiliproteínas.....	89
2.5.1.1.2. Extração e quantificação de pigmentos por cromatografia.....	89
2.5.1.2. Proteínas solúveis totais.....	91
2.5.1.3. Conteúdo de C e N.....	91
2.5.1.4. Fotossíntese a partir da fluorescência <i>in vivo</i> da Cla do fotossistema II.....	92
2.5.1.5. Atividade específica da anidrase carbônica (AC).....	97
2.5.1.6. Aminoácidos tipo micopsporinas (MAAs).....	98
2.5.1.7. Taxas de crescimento (TC) e relação massa fresca / massa seca (MF/MS) e rendimento de produtos de interesse econômico.....	99
2.5.2. Análises moleculares.....	100
2.5.2.1. A biblioteca de cDNA de <i>G. tenuistipitata</i>	100
2.5.2.2. Estudo dos ESTs de <i>G. tenuistipitata</i> relacionados com a fotoproteção.....	101
2.5.2.2.1. Seleção de sequências de interesse.....	101
2.5.2.2.2. Recuperação dos clones contendo sequências dos ESTs.....	101
2.5.2.2.3. Miniprep de DNA plasmidial.....	102
2.5.2.2.4. Sequenciamento do DNA presente no plasmídeo.....	103
2.5.2.2.5. Determinação do tamanho dos insertos.....	103
2.5.2.2.6. Eletroforese em gel de agarose.....	104
2.5.2.3. Desenho de oligonucleotídeos (primers).....	104
2.5.2.4. Sequenciamento dos genes das fotoliasas.....	105
2.5.2.4.1. Extração de DNA.....	105

2.5.2.4.2. Amplificação do gene, purificação e sequenciamento...	106
2.5.2.5. Extração de RNA total.....	107
2.5.2.6. Tratamento com DNase.....	108
2.5.2.7. Conversão de RNA para cDNA.....	108
2.5.2.8. Análise de expressão gênica por meio de PCR em tempo real (RT-PCR).....	109
2.5.2.8.1. Conceitos teóricos e o método do Ct comparativo.....	109
2.5.2.8.2. Teste de validação.....	111
2.5.2.8.3. RT-PCR de amostras dos experimentos.....	112
2.5.2.9. Quantificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA).....	112
2.5.2.10. Detecção de danos no DNA por imunoenensaio (DNA dot- blot).....	113
2.6. Análises estatísticas.....	115
2.7. Desenhos experimentais.....	115
2.7.1. Experimento 1 – Fotoproteção de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada em radiação PAR+UVA+UVB e concentrações crescentes de NO_3^-	116
2.7.2. Experimento 2 – Fotoproteção de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada em diferentes doses e intensidades de radiação: o efeito da reciprocidade.....	117
2.7.3. Experimento 3 – Efeitos da radiação UV na fotoproteção e fotossíntese de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada sob diferentes concentrações de NO_3^-	119
2.7.4. Experimento 4 – Efeitos da radiação UVB na fotoproteção de <i>G.</i> <i>tenuistipitata</i> cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio...	120
2.7.5. Experimento 5 – Aclimação de <i>G. tenuistipitata</i> a diferentes tipos de radiação: efeitos na fotossíntese, crescimento e nos mecanismos de fotoproteção.....	121
3. Resultados.....	123
3.1. Análises moleculares preliminares.....	123
3.1.1. Identificação dos clones de fotoliasas na biblioteca de cDNA de <i>G. tenuistipitata</i>	123
3.1.2. Sequências das fotoliasas de <i>G. tenuistipitata</i>	125

3.1.3. Análises preliminares para estudos de expressão gênica em <i>G. tenuistipitata</i>	127
3.2. Experimento 1 – Fotoproteção de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada em radiação PAR+UVA+UVB e concentrações crescentes de NO ₃ ⁻	129
3.3. Experimento 2 – Fotoproteção de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada em diferentes doses e intensidades de radiação: o efeito da reciprocidade.....	141
3.4. Experimento 3 – Efeitos da radiação UV na fotoproteção e fotossíntese de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada sob diferentes concentrações de NO ₃ ⁻	165
3.5. Experimento 4 – Efeitos da radiação UVB na fotoproteção e fotossíntese de <i>G. tenuistipitata</i> cultivada sob diferentes concentrações de NO ₃ ⁻	186
3.6. Experimento 5 – Aclimação de <i>G. tenuistipitata</i> a diferentes tipos de radiação: efeitos na fotossíntese, crescimento e nos mecanismos de fotoproteção.....	214
3.6.1. Aclimação de <i>G. tenuistipitata</i> a diferentes qualidades de radiação.....	215
3.6.2. Mecanismos de fotoproteção, fotossíntese e expressão gênica de <i>G. tenuistipitata</i> após transferência de algas a diferentes tipos de radiação.....	231
4. Discussão.....	258
4.1. Antecedentes e contribuições deste trabalho.....	258
4.2. Saturação do suprimento de N em <i>G. tenuistipitata</i>	260
4.3. Doses e intensidades: reciprocidade em <i>G. tenuistipitata</i>	263
4.4. Efeitos integrados do suprimento de N e da radiação UV no metabolismo e fotoproteção de <i>G. tenuistipitata</i>	266
4.5. Aclimação de <i>G. tenuistipitata</i> e sua plasticidade fenotípica: efeitos da radiação UVB em ausência de UVA.....	284
4.6. Implicações biotecnológicas e ecológicas.....	293
5. Conclusões.....	297
6. Referências bibliográficas.....	301
7. Anexos.....	323
7.1. Anexo 1.....	323
7.2. Anexo 2.....	324

Abreviaturas

A: anteraxantina
AA: aminoácidos
Abst: absortância
AC: anidrase carbônica
ANOVA: análise de variância
APC: aloficocianina
APX: ascorbato peroxidase
B/f: complexo de citocromos
BSA: albumina sérica bovina
C:N: relação entre os conteúdos internos de C e de N
Car: carotenoides
CAT: catalase
CB: reagente de Comassie-250G
cDNA: DNA complementar ao RNAm
CFCs: clorofluorcarbonetos
Cla: clorofila *a*
CPDs: “cyclobutane pyrimidin dimmers” ou dímeros de pirimidina ciclobutano
Ct: “comparative threshold” ou limiar comparativo
CTCPX: citocromo-c peroxidase
d: dias
D: dose de radiação
DEPC: dietil pirocarbonato
DHAR: dehidroascrobato redutase
DMF: dimetilformamida
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
ESTs: “expressed sequence tags” ou sequências etiqueta expressas
ETR: “eletron transport rate” ou taxa de transporte de elétrons
ETR_{max}: taxa de transporte de elétrons máxima
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo reduzida
Fd: ferredoxina
F_m: fluorescência máxima, medida em uma amostra pré-aclimatada ao escuro
F_m': fluorescência máxima emitida por um organismo pré-aclimatado a condições de luz
F_o: fluorescência basal de uma alga aclimatada ao escuro
F_o': fluorescência basal emitida por um organismo pré-aclimatado a condições de luz
Fotoprodutos (6-4): fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona
F_v/F_m: rendimento quântico máximo (ou ótimo)
GPX: glutatona peroxidase
GR: glutatona redutase
GSH: glutatona reduzida
GSSG: glutatona oxidada
HPLC: “high performance liquid chromatography” ou cromatografia líquida de alta eficiência
HSP70: proteína de heat shock
hv: energia

i: intensidade de radiação
 I: irradiância
 I_F: irradiância final
 I_k: irradiância de saturação do aparato fotossintetizante
 I₀: irradiância inicial
 IRGA: “infrared gas analyzer” ou analisador de gases por infravermelho
 LB: Luria-Bertani
 LED: “light-emitting-diodes” ou diodos emissores de luz
 LHC: “light harvesting complex” ou complexo coletor de luz
 MAAs: aminoácidos tipo micosporina
 MDA: monodehidroascorbato
 MDAR: monodehidroascorbato redutase
 MF: massa fresca
 MS: massa seca
 NAD(P)⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
 NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
 NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
 NiR: nitrito redutase
 NO₃⁻: íon nitrato
 NPQ: “non-photochemical quenching” ou dissipação não-fotoquímica
 NR: nitrato redutase
 ORF: “open reading frame” ou quadro aberto de leitura
 P-334: porphyrin 334, um tipo de MAA
 PA: radiação PAR + radiação UVA
 PAB: espectro contendo radiação PAR, UVA e UVB
 PAM: “pulse-amplitude-modulated fluorometers” ou fluorômetro com pulsos de amplitude modulada
 PAR: “photosynthetic active radiance” ou radiação ativa para a fotossíntese
 PB: espectro contendo radiação PAR e UVB
 pb: pares de bases
 PBS: solução contendo NaCl, KCl e Na₂HPO₄
 PBS-T: solução de PBS com adição de Tween-20
 PC/Cla: proporção entre o conteúdo de PC e o de Cla
 PC: ficocianina
 PCR: reação em cadeia da polimerase
 PE/Cla: proporção entre o conteúdo de PE e o de Cla
 PE: ficoeritrina
 PEG: polietileno glicol
 PIC: plastocianina
 PM: peso molecular
 PMSF: fenilmetilsulfonil fluorídeo
 PMSR: peptido-metionina-sulfoxido-redutase
 PQ: plastoquinona
 PS: proteínas solúveis
 PSI: fotossistema I
 PSII: fotossistema II
 PVP: polivinilpirrolidona
 Q_A: quinona A
 Q_B: quinona B
 REA: “rate of enzymatic activity” ou taxa de atividade enzimática

RNA: ácido ribonucleico
RNAm: RNA mensageiro
RT-PCR: PCR em tempo real
Rubisco: ribulose-1,5- bifosfato carboxilase/oxigenase
SDS: duodecil sulfato de sódio
SOD: superóxido dismutase
T: tratamentos
TBA: tetrabutyl amônio
TBE: tris, borato e EDTA
TC: taxa de crescimento
TE: tris-HCl e EDTA
THCs: 3,6,7-trihidroxycumarinas
Tm: “melting temperature” ou temperatura de dissociação
Tris: tris(hidroximetil)amino-metano
UV: radiação ultravioleta
UVA: radiação ultravioleta do tipo A, entre 320 e 400 nm
UVB: radiação ultravioleta do tipo B, entre 280 e 320 nm
UVC: radiação ultravioleta do tipo C, entre 100 e 280 nm
V: violaxantina
VAZ: ciclo da violaxantina-anteraxantina-zeaxantina
VdEP: violaxantina de-epoxidase
VS: solução de enriquecimento de nutrientes de Von Stosch
Z: zeaxantina
 α : eficiência fotossintetizante (“slope” ou inclinação)
 ϵ : coeficiente de extinção molar
 ϵ' : coeficiente de extinção específico

Lista de Figuras

Fig. 1.1	Espectro eletromagnético. Notar que a frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda das distintas radiações (Imagem modificada a partir de http://profs.ccems.pt/PauloPortugal/CHYMICA/REM/REM.html). Em destaque, o intervalo composto pela radiação ultravioleta.....	35
Fig. 1.2	Distribuição percentual de diferentes tipos de radiação presentes no espectro de radiação solar que atingem a superfície terrestre. (Fonte: site do INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).....	36
Fig. 1.3	Efeitos do aumento da radiação UV e irradiância PAR no DNA, na fotossíntese e na assimilação de nutrientes em organismos marinhos. Por meio dos mecanismos de fotoproteção, é possível regular e otimizar o crescimento, a reprodução, a produção primária e a distribuição desses organismos no ambiente marinho.....	40
Fig. 1.4	Os dois danos comuns induzíveis no DNA por radiação ultravioleta: A, CPD (“cyclobutane pyrimidin dimmers”, ou dímero de pirimidinas ciclobutano), representado por uma ligação entre duas timinas, e B, fotoproduto (6-4) ou dímero de pirimidina (6-4) pirimidinona. Os dímeros são formados na mesma fita de DNA (figura modificada a partir de Britt, 2004).....	51
Fig. 1.5	Sistemas enzimáticos antioxidantes do interior de uma célula fotossintetizante com formação de O ₂ . Algumas reações ocorrem no interior do cloroplasto (região com fundo verde), na porção estromática, enquanto que outras são relativas ao interior do lúmen dos tilacoides. O ciclo do ascorbato-glutationa está indicado com fundo amarelo. SOD, superóxido dismutase; APX, ascorbato peroxidase; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, monodehidroascorbato redutase; DHASC, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato redutase; GSSG, glutathiona oxidada; GSH, glutathiona reduzida; GR, glutathiona redutase; PSI, fotossistema I; Fd, ferredoxina; PSII, fotossistema II; V, violaxantina; A, anteraxantina; Z, zeaxantina; VdEP, violaxantina de-epoxidase.....	56
Fig. 1.6	Esquema de incorporação e fixação de N em aminoácidos (AA) no interior de uma célula de uma macroalga, indicando locais de consumo e estocagem de distintas substâncias nitrogenadas no interior da célula (Modificado de Lobban & Harrison, 1994). NR, Nitrato redutase. NiR, Nitrito redutase....	61
Fig. 1.7	Modelo de assimilação e incorporação de C para macroalgas, indicando a presença de distintas anidrases carbônicas (ACs) no espaço periplasmático, no citoplasma e no interior do cloroplasto (modificado desde Badger & Price, 1994). A presença de ACs no citoplasma e no cloroplasto de macroalgas ainda é duvidosa, por isso representada seguida de um símbolo de “?”.....	65

Fig. 1.8	Esquema da conversão primária de energia (hv) na fotossíntese que se relaciona com o rendimento quântico de fluorescência <i>in vivo</i> da clorofila <i>a</i> . A energia absorvida pelos complexos antena (LHC) contendo os pigmentos acessórios da fotossíntese é dissipada como fluorescência, calor (dissipação não-fotoquímica) ou reações químicas (dissipação fotoquímica). Para abreviaturas, ver lista nas páginas 5 a 7 (Figura modificada a partir de Schreiber <i>et al.</i> , 1994).....	71
Fig. 2.1	Porções apicais do tetrasporófito de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , utilizadas para os experimentos deste trabalho.....	83
Fig. 2.2	Sistema de cultivo de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> em frascos de metacrilato, com aeração, água do mar enriquecida com solução de VS e sistema de iluminação.....	84
Fig. 2.3	Espectro de radiação das fontes de radiação PAR e UV utilizadas no trabalho. Lâmpadas Phillips TL-D 36W/54-765 (PAR), Q-Panel UVA 340 (UVA e B) e Phillips Ultraviolet-B TL40W/12RS (UVB).....	85
Fig. 2.4	Espectros de ação estimados para o dano no DNA (Setlow, 1974) e inibição da fotossíntese de cloroplastos isolados de espinafre (Jones & Kok, 1966). Os dados foram normalizados a 280 nm.....	86
Fig. 2.5	Transmitância dos filtros utilizados no trabalho: Ultraphan 295, Folex 320 e Ultraphan 395. Ver referências no texto.....	87
Fig. 2.6	Esquema indicando como a fluorescência emitida por um organismo fotossintetizante se comporta ao longo do tempo, conforme o estímulo por meio de pulsos de saturação, para medir diferentes variáveis: o rendimento quântico ótimo (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivo, a taxa de transporte de elétrons (ETR) e a dissipação não-fotoquímica (NPQ). A seta cinza indica o momento que a luz de medida é acesa. A seta preta indica o momento que um pulso de saturação é fornecido pelo fluorímetro ao material fotossintetizante. E por fim, a seta branca indica quando a luz actínica é ativada (seta para cima) ou desativada (seta para baixo).....	94
Fig. 2.7	Modelo de curva de amplificação de uma PCR em tempo real. Neste exemplo, as amostras começaram a amplificar-se ao redor do ciclo 13, e por volta do 25º ciclo, já houve saturação. O método do Ct comparativo é embasado nos dados obtidos no intervalo de amplificação linear e geométrica da curva de amplificação. ΔR_n , magnitude do sinal de fluorescência obtido.....	110
Fig. 2.8	Espectros de radiação obtidos com a combinação de filtros de corte e diferentes lâmpadas para fornecer diferentes tipos de radiação. A partir destas curvas, foram obtidas as intensidades de radiação em cada um dos tratamentos realizados. Estes espectros foram utilizados nos experimentos 1 (PAB), 3 (PAR e PAB), 4 (PA e PAB) e 5 (todos).....	116
Fig. 2.9	Espectros de radiação obtidos com a combinação de filtros de corte e	

	diferentes lâmpadas para fornecer diferentes doses e intensidades de radiação. Estes espectros foram utilizados para o experimento 2.....	118
Fig. 3.1	Gel de agarose 0,7% com o produto da digestão com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i> dos clones 33, 32 e 29. O marcador 1 Kb Ladder está representado na primeira coluna à esquerda. O fragmento correspondente ao plasmídeo original linearizado, de 4,5 Kb, está indicado pela seta.....	125
Fig. 3.2	Sequências consenso dos genes codificantes para duas fotoliasas diferentes, obtidas a partir dos clones 29 e 32. Os códons de início e término dos quadros abertos de leitura estão em negrito e sublinhados. Os primers diretos e reversos estão marcados em verde e amarelo, respectivamente. As sequências codificantes para a superfamília da fotoliase de DNA estão marcadas em azul, enquanto que aquelas codificantes para o ligante FAD7 estão em rosa. Os primers (direto e reverso) utilizados pra o experimento de expressão gênica estão representados em itálico.....	126
Fig. 3.3	Identificação dos domínios proteicos das fotoliasas de <i>G. tenuistipitata</i> para as sequências consenso obtidas a partir dos clones 29 e 32. Os números acima das barras cinzas indicam o número de aminoácidos.....	127
Fig. 3.4	Esquema do experimento 1, no qual <i>Gracilaria tenuistipitata</i> foi cultivada uma semana em concentrações crescentes de NO_3^- e exposta à radiação PAR+UVA+UVB (PAB).....	129
Fig. 3.5	Símbolos empregados para representar os materiais e as condições experimentais realizados neste trabalho.....	130
Fig. 3.6	Conteúdo de clorofila <i>a</i> (Cla) em mg por g de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> ao início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	131
Fig. 3.7	Conteúdo de carotenoides (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	134
Fig. 3.8	Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	135
Fig. 3.9	Perfis das curvas de fotossíntese estimadas como ETR por irradiância para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Por meio dessas curvas foram calculados os parâmetros fotossintetizantes α , ETR_{max}	

e I_k . N=3.....	136
Fig. 3.10 Parâmetros fotossintetizantes (ETR_{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; α , eficiência fotossintetizante; e I_k , irradiância de saturação da fotossíntese) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , obtidos a partir das curvas fotossintetizantes, para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Diferentes letras acima dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.....	137
Fig. 3.11 Valores de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , obtidos para irradiâncias crescentes, para algas no início e depois de uma semana de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Cada curva representa a média de três valores. N=3.....	138
Fig. 3.12 Valores de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , obtidos das curvas de NPQ (Figura 3.10), para a irradiância de 676 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Diferentes letras acima dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.....	138
Fig. 3.13 Conteúdo de aminoácidos tipo micoposporina (MAAs) totais em mg por g de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	139
Fig. 3.14 Esquema do experimento 2, no qual <i>Gracilaria tenuistipitata</i> foi cultivada uma semana em distintas intensidades de radiação UV (i, 2i e 4i), resultando nas doses D ou 2D (ver Tabela 2.4). As algas foram cultivadas em 0,5 mM de NO_3^- . As legendas para elaboração dessa figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).....	141
Fig. 3.15 Total de clorofila <i>a</i> (C _{la}) em mg de pigmento por g de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 $W.m^{-2}$ de UVB e 8,2 $W.m^{-2}$ de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	143
Fig. 3.16 Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais	

diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....145

Fig. 3.17 Curvas de fotossíntese (ETR x irradiância) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR (♦), PA (●, ▲, + e ■) e PAB (○, Δ, + e □). As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. O formato do marcador indica a intensidade de radiação: “i”, ● e ○; “2i”, ▲, +, Δ e +; e “4i”, ■ e □. Os pontos de cada curva são resultado da média de 3 valores. Esse grupo de pontos foi ajustado de acordo com a fórmula de Platt *et al.*, 1980.....147

Fig. 3.18 Taxa de transporte de elétrons máxima (ETR_{max}) do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....149

Fig. 3.19 Eficiência do aparato fotossintetizante (α) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....151

Fig. 3.20 Valores de irradiância de saturação (I_k) do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....153

Fig. 3.21 Curva de dissipação não fotoquímica (NPQ) x irradiância de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. O formato do marcador indica a intensidade de radiação: “i”, ● e ○; “2i”, ▲, +, Δ e +; e “4i”, ■ e □. Os pontos de cada curva são resultado da média de 3 valores.....155

- Fig. 3.22 Comparação de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias, de acordo com o tipo de radiação recebida. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....156
- Fig. 3.23 Total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....158
- Fig. 3.24 Carotenoides (antheraxantina, zeaxantina, luteína e β-caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....160
- Fig. 3.25 RNA total (em ng por µL de amostra) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....162
- Fig. 3.26 Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase 32 de *Gracilaria tenuistipitata* no início (nível de expressão do calibrador) ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....163
- Fig. 3.27 Esquema do experimento 3, visando analisar os efeitos da radiação e de diferentes concentrações de nitrato nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*. As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).....165

- Fig. 3.28 Conteúdo pigmentar (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- com exposição à radiação PAR e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão dos gráficos representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....168
- Fig. 3.29 Proteínas solúveis (PS) por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre a barras de desvio padrão representam as diferenças encontradas entre os tratamentos. N=3.....170
- Fig. 3.30 Proporção entre o total de ficobiliproteínas (PE+PC) e o conteúdo de proteínas solúveis (PS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre a barras de desvio padrão representam as diferenças encontradas entre os tratamentos. N=3.....171
- Fig. 3.31 Conteúdo de C e N em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com adição de diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.....172
- Fig. 3.32 Atividade específica (REA, “Relative Enzymatic Activity”, ou Atividade Específica Relativa) da enzima anidrase carbônica (AC) de *Gracilaria tenuistipitata* por mg de PS, no início, após 3 ou 7 dias de cultivo sob radiação PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB), recebendo diferentes concentrações de NO_3^- no início do cultivo. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre as amostras dos tratamentos. N=3.....174
- Fig. 3.33 Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- , expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....175
- Fig. 3.34 Total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....177
- Fig. 3.35 Proporção entre o total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) e o total de proteínas solúveis (PS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR e PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....178

- Fig. 3.36 Dano e recuperação do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata*, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, durante a exposição à PAR+UVA+UVB por 30 min, e recuperação em 60 μmol s fôtons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR por 2 h após o período experimental de uma semana, na qual as algas foram tratadas com diferentes radiações (PAR e PAB) e concentrações de NO_3^- (0, 0,1 e 0,5 mM). As barras representam desvio padrão. Cada curva representa valores médios de três repetições.....180
- Fig. 3.37 Dano (k) e recuperação (r) durante o período de exposição de *Gracilaria tenuistipitata* por 30 min à PAR+UVA+UVB durante o experimento de exposição e recuperação do aparato fotossintetizante, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, após experimento de cultivo das algas em diferentes concentrações de NO_3^- e distintas radiações (PAR e PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão indicam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....181
- Fig. 3.38 Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase 32 de *Gracilaria tenuistipitata* no início (■, nível de expressão do calibrador) ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR (■) ou PAR+UVA+UVB (PAB, □), submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos realizados. N=3.....183
- Fig. 3.39 Taxas de crescimento (TC, em % de massa fresca por dia, $\%\text{MF}.\text{dia}^{-1}$) de *Gracilaria tenuistipitata* exposta à radiação PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- em dois períodos, do início até 3 dias e entre o terceiro dia e o sétimo dia. Diferentes letras sobre as barras implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....184
- Fig. 3.40 Esquema do experimento 4, visando analisar os efeitos da radiação (ausência de UVB) e de diferentes concentrações de nitrato nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*. As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).....186
- Fig. 3.41 Conteúdo pigmentar em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....189
- Fig. 3.42 Conteúdo de C e N em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com adição de diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....191

- Fig. 3.43 Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- , expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....193
- Fig. 3.44 Curvas de fotossíntese de *Gracilaria tenuistipitata*, com os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) para distintas irradiâncias. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras cultivadas em 0, 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^- , e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados ajustados a partir de três réplicas de séries de dados.....195
- Fig. 3.45 Curva de dissipação não fotoquímica (NPQ) x Irradiância de *Gracilaria tenuistipitata*. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras cultivadas em 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados ajustados a partir de três séries de dados.....197
- Fig. 3.46 Conteúdo de anteraxantina em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....198
- Fig. 3.47 Conteúdo de zeaxantina em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....199
- Fig. 3.48 Conteúdo de luteína em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....200
- Fig. 3.49 Conteúdo de β -caroteno em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....200
- Fig. 3.50 Total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em três diferentes concentrações de NO_3^- e expostas às radiações de PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....201

- Fig. 3.51 Quantidade (em mg por g de massa seca de alga) dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata* [shinorina, porphyra-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol] no início e após 3 ou 7 dias de tratamento com diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos distintos. N=3.....204
- Fig. 3.52 Proporção dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias do período experimental de cultivo em três concentrações de NO_3^- , e expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os dados são representados com respeito ao total de 100% identificado em cada tratamento. N=3.....205
- Fig. 3.53 Dano e recuperação do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata*, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, durante a exposição à PAR+UVA+UVB por 30 min, e recuperação em 60 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR por 2 h após o período experimental de uma semana, na qual as algas foram tratadas com diferentes radiações (PA ou PAB) e concentrações de NO_3^- (0, 0,1 ou 0,5 mM). As barras representam desvio padrão. Cada curva representa valores médios de três repetições.....206
- Fig. 3.54 Dano e recuperação durante o período de exposição de *Gracilaria tenuistipitata* a 30 min de PAR+UVA+UVB durante o experimento de exposição e recuperação do aparato fotossintetizante, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, após experimento de cultivo das algas em diferentes concentrações de NO_3^- e distintas radiações (PA ou PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão indicam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.....207
- Fig. 3.55 Quantidade de DNA extraído de *Gracilaria tenuistipitata*, com amostras obtidas no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão nos gráficos representam as diferenças significativas entre os tratamentos realizados. N=3.....208
- Fig. 3.56 Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase-32 em relação ao total de expressão reportado no início do experimento (■, nível de expressão do calibrador) de *Gracilaria tenuistipitata* após 3 ou 7 dias de cultivo sob exposição à PAR+UVA (PA, ■) ou PAR+UVA+UVB (PAB, □), para amostras submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....210
- Fig. 3.57 Taxas de crescimento (TCs, em % de massa fresca por dia, $\%\text{MF}.\text{dia}^{-1}$) de *Gracilaria tenuistipitata* exposta à radiação PA e PAB e cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- em dois períodos, do início até 3 dias e entre o terceiro dia e o sétimo dia. Diferentes letras sobre as barras implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....211

- Fig. 3.58 Esquema do experimento 5, no qual *Gracilaria tenuistipitata* foi cultivada uma semana em três distintas radiações (primeira parte do experimento), e em seguida foi submetida a dois dias de novos tratamentos (segunda parte do experimento). As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).....214
- Fig. 3.59 Conteúdo pigmentar (PE, PC, Cla) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB), e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....217
- Fig. 3.60 Conteúdo e proporção elementar (C e N, C:N) em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.....219
- Fig. 3.61 Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.....220
- Fig. 3.62 Curvas de fotossíntese de *Gracilaria tenuistipitata*, com os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) para distintas irradiâncias. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras expostas às radiações PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . As curvas foram ajustadas a partir de três séries de dados.....221
- Fig. 3.63 Curva de dissipação não fotoquímica (NPQ) x Irradiância de *Gracilaria tenuistipitata*. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras expostas às radiações PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . As curvas foram ajustadas a partir de três séries de dados.....222
- Fig. 3.64 Conteúdo de carotenoides (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.....223
- Fig. 3.65 Total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os

	tratamentos. N=3.....	224
Fig. 3.66	Quantidade dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> [shinorina, porphyrina-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol] no início e após 3 ou 7 dias de tratamento com diferentes tipos de radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos. N=3.....	225
Fig. 3.67	Proporção dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , no início, após 3 ou 7 dias do período experimental de cultivo de algas expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os dados são representados com respeito ao total de 100% identificado em cada tratamento. N=3.....	226
Fig. 3.68	Quantidade de DNA extraído de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , com amostras obtidas no início, após 3 ou 7 dias de cultivo de algas expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos. N=4.....	226
Fig. 3.69	Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase-32 em relação ao total de expressão reportado no início do experimento (■, nível de expressão do calibrador) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> após 3 (barras de cores sólidas) ou 7 dias (barras marcadas em linhas diagonais) de cultivo sob exposição à PAR, PAR+UVA ou PAR+UVA+UVB, para amostras submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.....	228
Fig. 3.70	Taxas de crescimento (% de massa fresca por dia, %MF.dia ⁻¹) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> cultivada em radiação PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e submetida a 0,5 mM de NO_3^- , em dois períodos, do início até 3 dias (3) e entre o terceiro dia e o sétimo dia (7). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....	228
Fig. 3.71	Conteúdo total de clorofila <i>a</i> (Cla) em mg por g de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> após 50 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco indicam as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....	233
Fig. 3.72	Quantificação e proporção de elementos C e N em mg por mg de massa seca (MS) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma	

semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....234

Fig. 3.73 Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* aclimatadas à PAR, PA e PAB antes da exposição das algas aos tratamentos com distintas radiações. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....235

Fig. 3.74 Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....236

Fig. 3.75 Rendimento quântico efetivo de *Gracilaria tenuistipitata* durante 48 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB. As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações. Cada gráfico representa as algas aclimatadas a um dos três tipos de radiação. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=8.....237

Fig. 3.76 Curvas de fotossíntese estimadas como ETR por irradiância para *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB. Cada gráfico representa as algas aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novos tratamentos de radiação. Por meio dessas curvas se calcularam os parâmetros fotossintetizantes α , ETR_{max} e I_k . N=4.239

Fig. 3.77 Parâmetros fotossintetizantes (α , ETR_{max} e I_k) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....240

Fig. 3.78 Carotenoides em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). Cada carotenoide (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno) está representado em um gráfico. As algas foram aclimatadas por uma semana à

- PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....242
- Fig. 3.79 Total de mg de aminoácidos do tipo micoposporina (MAAs) por massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata*, medidos ao início e após 2, 6, 12, 24 e 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB. Cada gráfico representa as algas aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novos tratamentos de radiação. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....244
- Fig. 3.80 Aminoácidos tipo micoposporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* durante 48 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB. As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações. Cada gráfico representa as algas aclimatadas a um dos três tipos de radiação, para os diferentes tipos de MAA: shinorina, porphyra-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....247
- Fig. 3.81 Porcentagens do total de aminoácidos do tipo micoposporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata* após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as pré-cultivadas em PAB. N=4.....248
- Fig. 3.82 Presença e variação de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) de *Gracilaria tenuistipitata* após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas a PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.....250
- Fig. 3.83 Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para fotoliase-32 de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e

mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....252

Fig. 3.84 Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para ascorbato peroxidase (APX) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....253

Fig. 3.85 Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para glutathione peroxidase (GPX) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....254

Fig. 3.86 Taxas de crescimento (TC, em %MF.h⁻¹) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas por uma semana nas radiações prévias PAR, PA e PAB, e em seguida, cultivadas em PAR, PA, PAB ou PB, de acordo com o caso, durante 48 h. As barras nos gráficos representam desvio padrão. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão, na última série de dados, representam diferenças significativas entre as amostras. N=4.....255

Fig. 4.1 Esquema da síntese dos MAAs. Aqueles encontrados neste trabalho estão marcados com o tracejado. Figura modificada a partir de Carreto *et al.* 2005.....280

Lista de Tabelas

Tab. 1.1	Estrutura básica com radicais, comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max} , nm) e coeficientes de extinção (ϵ , M cm ⁻¹) de alguns dos MAAs presentes em macroalgas (adaptada de Whitehead & Hedges, 2005).....	43
Tab. 2.1	Meio de enriquecimento da água do mar de Von Stosch (modificado de Edwards, 1970).....	84
Tab. 2.2	Coeficientes de extinção molar (ϵ) utilizados para quantificar as diferentes MAAs encontradas neste estudo. O coeficiente de extinção específico (ϵ') usado na fórmula (M-13) é calculado como $\epsilon' = \epsilon/\text{peso molecular}$	99
Tab. 2.3	Primers utilizados neste trabalho. Os primers foram utilizados para três diferentes funções: I, recuperação da sequência do plasmídeo; II, sequenciamento dos genes codificantes para estratégias de fotoproteção; e III, análise de expressão gênica por RT-PCR. Sentido de síntese dos primers: D, direto; e R, reverso.....	105
Tab. 2.4	Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de P, PA e PAB do experimento 2. A dose total recebida foi calculada desde os valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).....	118
Tab. 2.5	Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de PAR e PAB do experimento 3. A dose total recebida foi calculada desde os valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).....	119
Tab. 2.6	Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de PA e PAB do experimento 4. A dose total recebida foi calculada a partir dos valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).....	121
Tab. 2.7	Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os pré-tratamentos de PAR, PA, PAB e tratamentos de PAR, PA, PAB e PB do experimento 5. A dose total recebida foi calculada a partir dos valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias no pré-tratamento e para 2, 6, 12, 24 e 48h do período de tratamento (d).....	122
Tab. 3.1	Resultados do BlastX para os clones de cDNA da biblioteca de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> selecionados para este estudo. Apenas as primeiras 9 sequências foram incluídas para cada clone.....	124
Tab. 3.2	Resultados do teste de validação dos primers (D, direto e R, reverso) para análise de expressão gênica. O volume da tabela é o total usado de cada primer à concentração de 10 μ M em cada um dos poços de reação no aparato de PCR em tempo real. O processo é considerado eficiente e válido quando os valores de eficiência (E), calculados a partir dos valores de	

	slope, estão entre 90 e 110.....	128
Tab. 3.3	Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente concentração de nitrato. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> pré-aclimatadas a PAR e após exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) durante 7 dias. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito. gl, graus de liberdade.....	131
Tab. 3.4	Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no experimento 1. Dados em negrito são aqueles nos quais o dado de correlação foi significativo, com $p < 0,05$. N=33.....	140
Tab. 3.5	Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente dose de radiação. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> pré-aclimatadas à PAR, no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em diferentes valores de doses diárias de radiação. O valor de “i” foi de 0,4 W.m ⁻² de UVB e 8,2 W.m ⁻² de UVA. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito. gl, graus de liberdade..	142
Tab. 3.6	DNA total em ng por µL de amostras de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias. Para cada tratamento está representada a dose diária de radiação, a dose acumulada ao longo do experimento e o total de dose efetiva. Diferentes letras ao lado dos valores de desvio padrão representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	161
Tab. 3.7	Correlações de Pearson entre os valores obtidos para as diferentes variáveis dependentes avaliadas em <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. Valores de correlação de Pearson significativos estão marcados em negrito, com $p < 0,05$. N=30.....	164
Tab. 3.8	Resultados da análise multifatorial ANOVA com amostras repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas ou três variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> cultivada em diferentes concentrações de nitrato e expostas a PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas de 5 a 7.....	166
Tab. 3.9	Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE;	

	ficocianina, PC; e clorofila <i>a</i> , Cla) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ e exposta à radiação PAR e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	169
Tab. 3.10	Proporção entre C e N de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 0,1 e 0,5 mM) e expostas à radiação PAR ou PAB. Letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	173
Tab. 3.11	Quantidade de RNA de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ e expostas à PAR e PAB. Diferentes letras ao lado de cada valor de quantidade de RNA indicam diferenças significativas entre as amostras. N=3.....	182
Tab. 3.12	Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no terceiro experimento deste trabalho. Dados com valores de correlação significativos estão em negrito. N=52. Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas de 5 a 7.....	185
Tab. 3.13	Resultados da análise multifatorial ANOVA com medidas repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas ou três variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> cultivada em diferentes concentrações de nitrato e expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas de 5 a 7.....	187
Tab. 3.14	Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila <i>a</i> , Cla) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e três concentrações de nitrato (0, 0,1 ou 0,5 mM de NO ₃ ⁻). Diferentes letras ao lado de cada valor representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....	190
Tab. 3.15	Proporção entre C e N de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de nitrato (0, 0,1 ou 0,5 mM de NO ₃ ⁻) e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	192
Tab. 3.16	Parâmetros fotossintetizantes (α , eficiência fotossintetizante; ETR _{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; I _k , irradiância de saturação da fotossíntese; e NPQ, dissipação não-fotoquímica) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , obtidos a partir das curvas fotossintetizantes da figura 3.44. As amostras foram cultivadas em 0, 0,1 ou 0,5 mM de NO ₃ ⁻ , expostas à	

	PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.....	196
Tab. 3.17	Quantidade de RNA total obtido a partir de amostras de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início, após 3 ou 7 dias em cultivo sob diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ (0, 0,1 ou 0,5 mM) e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores de RNA representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.....	209
Tab. 3.18	Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no experimento 4. Dados em negrito indicam correlação significativa, com p<0,05. N=52.....	213
Tab. 3.19	Resultados da análise multifatorial ANOVA com medidas repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> cultivada em 0,5 mM de NO ₃ ⁻ e expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Os valores de % de influência na variabilidade que foram maiores do que 25% estão sublinhados. Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas de 5 a 7.....	216
Tab. 3.20	Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila <i>a</i> , Cl <i>a</i>) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes tipos de radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB), totalizando diferentes doses de radiação, submetidas a 0,5 mM de NO ₃ ⁻ . Diferentes letras ao lado de cada valor representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.....	218
Tab. 3.21	Parâmetros fotossintetizantes (α , eficiência fotossintetizante; ETR _{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; I _k , irradiância de saturação da fotossíntese; e NPQ, dissipação não-fotoquímica) de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , obtidos a partir das curvas de fotossíntese da Figura 3.62 e 3.63. As amostras foram expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.....	222
Tab. 3.22	Quantidade de RNA total obtido a partir de amostras de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no início, após 3 ou 7 dias em cultivo sob radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores de RNA representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.....	227
Tab. 3.23	Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para	

	análise de diferentes variáveis avaliadas na primeira parte do experimento 5 (aclimação). Dados em negrito são aqueles nos quais a correlação foi significativa, com $p < 0,05$. N=35.....	230
Tab. 3.24	Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente radiação. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> pré-aclimatadas a diferentes radiações (PAR, PA e PAB), logo após exposição à PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB) ou PAR+UVB (PB) durante 48 (C, N e C:N) ou 50 h (Cla, carotenoides, parâmetros da fotossíntese). Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito; gl, graus de liberdade.....	231
Tab. 3.25	Resultados das análises multifatoriais ANOVA com medidas repetidas para cada aminoácido tipo micosporina (variável dependente), com resultados de efeitos das variáveis independentes radiação e tempo, bem como da interação entre elas. Estes dados foram obtidos para <i>Gracilaria tenuistipitata</i> pré-aclimatadas a diferentes radiações (PAR, PA e PAB) e expostas durante 48 h à PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB) ou PAR+UVB (PB), com dados coletados no início, e após 2, 6, 12, 24 e 48h. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de <i>F</i> e <i>p</i> em negrito; gl, graus de liberdade.....	232
Tab. 3.26	Quantidade de DNA (em ng/μL) extraído de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , com amostras aclimatadas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB), no início e após 48 h de cultivo com exposição de algas à PAR, PA, PAB e PB, de acordo com o caso. Diferentes letras ao lado do valor de quantificação representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados. N=4.....	249
Tab. 3.27	Quantidade de RNA (em ng/μL) extraído de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> , com amostras aclimatadas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB), no início e após 48 h de cultivo com exposição de algas à PAR, PA, PAB e PB, de acordo com o caso. Diferentes letras ao lado do valor de quantificação representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados. N=4.....	251
Tab. 3.28	Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas na segunda parte do experimento 5. Dados em negrito são aqueles nos quais a correlação foi significativa, com $p < 0,05$. N=36.....	257
Tab. 4.1	Proporção entre as radiações UVB e UVA utilizadas no trabalho nos distintos experimentos com as lâmpadas Q-Panel e TL-12 (para mais detalhes, ver Material e métodos) em comparação com dados obtidos na natureza, no Hemisfério Norte, no nível do mar e em região de alta montanha (Figuerola, F.L. comunic. pes.).....	259
Tab. 4.2	Proporção entre os valores médios de C:N, dos pigmentos fotossintetizantes e do total de PS de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . Duas	

	proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.....	270
Tab. 4.3	Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.....	277
Tab. 4.4	Proporção entre os valores médios dos carotenoides de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir do experimento 4.....	279
Tab. 4.5	Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.....	282
Tab. 4.6	Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes, carotenoides e MAAs totais de <i>Gracilaria tenuistipitata</i> . Foi obtida a proporção entre o tratamento controle (PAR, PA e PAB) e os tratamentos contendo radiação UVB (PAB e PB), além da relação entre os produtos das amostras expostas a PAB em relação às que foram submetidas em seguida a PAR. Dados obtidos a partir do experimento 5.....	286
Tab. 4.7	Rendimento estimado (média $\pm$ desvio padrão) das substâncias de interesse econômico (MAAs, PE e zeaxantina) em mg por tempo por volume produzidas por <i>Gracilaria tenuistipitata</i> no decorrer dos diferentes experimentos. Diferentes letras ao lado dos valores representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.....	295

Resumo

A alga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* tem sido utilizada como matéria prima para a produção de ágar e também como modelo para estudos fisiológicos e moleculares. Este trabalho analisou estratégias de fotoproteção contra a radiação UV dessa macroalga por meio de abordagens fisiológicas e moleculares, considerando a previsão de incremento de radiação UVB nas zonas tropicais do planeta nos próximos anos. Além disso, a interação entre a radiação UV e o suprimento de N foi também investigada. Essa interação estimulou a síntese de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e outros compostos nitrogenados, o que proporciona proteção contra danos no aparato fotossintetizante. O envolvimento de um fotorreceptor para radiação UVA que regule a síntese de MAAs, com o efeito adicional de um segundo fotorreceptor, para radiação UVB é sugerido. Houve uma dependência da dose de radiação UV para aumento de MAAs. O aumento da intensidade da radiação UV causou efeitos negativos nos parâmetros da fotossíntese. Outra abordagem mostrou que a ausência de UVA causou danos ao DNA, com a presença de dímeros de ciclobutano pirimidina após 48 h de exposição à radiação PAR+UVB. Este estudo alerta para a importância da qualidade da radiação de UV e seu efeito biológico efetivo para danos no DNA e na fotoinibição. Fotoliasas podem ter sido ativadas para evitar danos no DNA sob tratamentos com a presença de radiação UVA, tal como o sistema de enzimas antioxidantes, os quais desempenharam um papel secundário na fotoproteção da alga. A composição de carotenoides de *G. tenuistipitata* foi pouco afetada pelos tratamentos com N e UV. Este é o primeiro trabalho a mostrar a presença de anteraxantina em *G. tenuistipitata*, e se sugere a existência de um ciclo de xantofilas parcial composto por anteraxantina e zeaxantina. Um aspecto adicional foi o papel fotoprotetor de ficoeritrina, observado quando *G. tenuistipitata* foi tratada na presença de N, com PAR, UVA e UVB. Finalmente, a produtividade de MAAs por *G. tenuistipitata* foi estimulada sob tratamentos com radiação PAR+UV e suprimento de N, e se propõe que seja realizada uma aplicação em larga escala dessa alga vermelha para uso dessas substâncias como filtros de UV e antioxidantes. Desta forma, *G. tenuistipitata* foi capaz de lidar com a radiação UV, principalmente quando suprida com N e UVA, obtendo uma fotoproteção eficaz. Uma vez que se espera um aumento do índice de UV na superfície terrestre nos próximos anos, é possível que os organismos em ambientes oligotróficos sofram maiores impactos negativos causados por esta radiação.

Abstract

The red alga *Gracilaria tenuistipitata* has been used for the production of agar, as well as a model to physiological and molecular studies. This study analysed the photoprotective strategies of this macroalga against UV radiation through physiological and molecular approaches, considering the UV increase in tropical zones predicted by physical models. The interactive role of nitrogen supply and UV radiation was also investigated. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) and other nitrogenous compounds was stimulated by both UVR and nitrogen, providing photoprotection against damages to photosynthetic apparatus. The involvement of a UVA-photoreceptor in the photocontrol of accumulation of MAAs and an additional effect with further activation of a second UVB-photoreceptor were suggested. There was a dependence of UV radiation dosis on MAAs accumulation. The increase of the UV irradiance caused a negative effect on the photosynthetic activity. The absence of UVA radiation caused DNA damage, with presence of cyclobutane-pirimidin dimmers after 48 h of exposure to PAR+UVB. This study shows the importance of light quality in the UV range and the biological effective irradiances to confer DNA damage and photoinhibition. Photolyases could be activated to avoid DNA damages under UVA treatments, as well as the antioxidant system, which had a possible secondary role on the photoprotection mechanisms. Carotenoid composition of *G. tenuistipitata* was slightly affected by UV and N treatments. This is the first study to show antheraxanthin in *G. tenuistipitata*, and the existence of a partial xanthophyll cycle is proposed, based on antheraxanthin and zeaxanthin. A further aspect observed was a photoprotective role of phycoerithrin in *G. tenuistipitata*, under the presence of UVA and UVB plus N supplement. Finally, MAAs productivity of *G. tenuistipitata* was stimulated under PAR+UV radiation and N supply, and we propose a large-scale application of this red alga for the use of these substances as photoprotector by both UV-screen and antioxidant capacities. Therefore, *G. tenuistipitata* was able to acclimate to UV radiation, under N-supply and UVA radiation i. e. efficient photoprotection and, considering the foreseen UV increment in the next years, it's possible that oligotrophic organisms will suffer more with the negative effects of this radiation.

1. Introdução

1.1. O gênero *Gracilaria* e sua importância econômica

O gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) possui uma distribuição ampla em zonas temperadas e tropicais ao redor do mundo, conforme revisado em Oliveira & Plastino (1994). No site do Algaebase (www.algaebase.org) são listados 314 nomes de espécies dentro deste gênero, dos quais 167 taxonomicamente são aceitos atualmente. Oliveira & Plastino (1994) apresentam uma revisão sobre a família Gracilariaceae, com a distribuição de 109 espécies aceitas naquele momento para o gênero *Gracilaria*.

O gênero *Gracilaria* é um dos principais utilizados mundialmente para a extração de ágar (McHugh, 2003). Dentro desse grupo, foram detectadas 16 espécies voltadas para essa finalidade (Zemke-White & Ohno, 1999). O ágar de *Gracilaria* tem sido destinado pra a indústria alimentícia, enquanto que o ágar extraído de *Gelidium* e *Pterocladia* possui propriedades que permitem seu aproveitamento na microbiologia (Murano, 1995). Ao redor de 145000 toneladas de massa seca de algas gracilarioides são processadas para a obtenção de ágar anualmente, o que equivale a 85% da produção mundial desse ficocoloide (Oliveira *et al.*, 2000). Além disso, algumas espécies dentro do gênero *Gracilaria* também produzem toxinas, como aplisiatoxinas, prostaglandinas e policavernosídeos, ou ainda apresentam lectinas que podem ter papel de aglutinantes, coagulantes ou estimulantes de migração celular (Smit, 2004).

O Brasil possui riqueza de espécies de algas com importância econômica, dentre as quais se incluem aquelas do gênero *Gracilaria*. Entretanto, a biomassa dessas espécies é baixa e está dispersa em comunidades heterogêneas (Oliveira, 1998). Três empresas já tentaram explorar o recurso de agarófitas brasileiras coletadas diretamente na natureza, mas apenas uma pioneira na exploração desse recurso permanece aberta (AgarGel Ltda, www.agargel.com.br). Um problema que ocorre com o aproveitamento do ágar das espécies brasileiras é a competição com a produção chilena, de maior qualidade, que é obtida a partir talos de *Gracilaria chilensis* (Oliveira, 1998).

Dentre as espécies utilizadas para a extração de ágar, pode-se destacar *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang & Xia, que é uma espécie obtida em países do leste da Ásia, incluindo China, Filipinas, Tailândia e Vietnã (Zemke-White & Ohno, 1999). A China produz grande quantidade de *Gracilaria*, principalmente nas províncias de Guangxi e Hainan (de onde é proveniente a espécie deste trabalho), cultivando

material em lagoas e estuários (McHugh, 2003). *Gracilaria tenuistipitata* foi a segunda, dentre as quatro espécies testadas por Macchiavello *et al.* (1999), a produzir maior rendimento de ágar. Além disso, o ágar dessa espécie apresentou o maior potencial de remoção de sulfato por meio de um tratamento alcalino. Sem a presença desse tratamento, o teor de radicais metoxil do ágar dessa espécie também foi o mais elevado (Rebello *et al.*, 1997). A produtividade do ágar dessa espécie foi relacionada à maior salinidade e menor disponibilidade de nitrogênio (He *et al.*, 2002).

Gracilaria tenuistipitata foi descrita para a literatura por C.F. Chang & B.M. Xia em 1976. Duas variantes são reportadas: *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang & Xia e *Gracilaria tenuistipitata* var. *tenuistipitata* C.F. Chang & B.M. Xia. Doravante, quando referida como *G. tenuistipitata* somente, trata-se da variante *liui*. *Gracilaria tenuistipitata* apresenta talo gracilarioide, com talo cilíndrico, fino, possuindo cistocarpos globosos, espermatângios do tipo *textorii* e tetrasporângios do tipo tetraédrico. Bellorín (2002) confirmou a descrição para os gametófitos da espécie obtidos diretamente do ambiente. Barufi *et al.* (2009) completaram o ciclo de vida trifásico da espécie em laboratório. Adicionalmente, uma grande variedade morfológica na progênie de tetrásporos foi observada em laboratório (Barufi *et al.*, 2009). Além desses estudos taxonômicos e morfológicos, *G. tenuistipitata* tem sido reconhecida por sua alta tolerância às condições ambientais, sobrevivendo à grande variação de salinidade e temperatura (Chaoyuan *et al.*, 1993; Macchiavello *et al.*, 1998; Israel *et al.*, 1999), apresentando também uma aclimação sazonal de seu crescimento (Lee *et al.*, 1999). Por causa dessa tolerância e um bom crescimento *in vitro*, essa espécie tem sido usada em diversos estudos fisiológicos e moleculares.

Estudos moleculares com sequências de DNA plastidial codificantes para algumas proteínas ribossomais de *G. tenuistipitata* tiveram início na década de 90, com o trabalho de Kao *et al.* (1990) e Kao & Wu (1990). Posteriormente, a sequência completa do genoma plastidial da espécie foi obtida por Hagopian *et al.* (2004). Uma biblioteca de ESTs (do inglês, “expressed sequence tags” ou sequências-etiquetas expressas) foi obtida (dados não publicados), e a partir destes dados, estudos moleculares e fisiológicos foram realizados (Falcão, 2006; Tonon, 2009; este trabalho). Além disso, um método de extração de RNA dessa alga foi otimizado (Falcão *et al.*, 2008), o que favoreceu abordagens relacionadas à expressão gênica.

Uma série de trabalhos relacionados com a fisiologia de *G. tenuistipitata* tem sido realizada nos últimos anos, incluindo abordagens na fotossíntese dessa espécie no

campo (Hanelt, 1992) e em laboratório (García-Sánchez *et al.*, 1996a; Mercado *et al.*, 2002). Outro aspecto investigado nessa espécie é a incorporação de nutrientes inorgânicos (N, C e P) (Chiang & Lin, 1989; García-Sánchez *et al.*, 1994, 1996a, 1996b), inclusive mecanismos de ajustes fisiológicos a distintos tratamentos com pulsos de N (García-Sánchez *et al.*, 1993) e a relação desses ajustes com a incorporação de ferro (Liu *et al.*, 2000). O metabolismo de carbono, incluindo principalmente sua incorporação, foi abordado por Haglund *et al.* (1992) e Haglund & Pedersen (1992), e o estado nutricional dessa espécie foi abordado por meio da relação entre C e N internos (He *et al.*, 2002). Estudos enzimáticos foram realizados para a incorporação de nitrato pela enzima nitrato redutase (Lopes *et al.*, 1997, 2002), a incorporação de prolina pela via do glutamato e da ornitina (Lee, 1998; Lee & Chang, 1999) e a incorporação de reservas de carbono como amido em algas com déficit nutricional (Nyvall-Cóllen *et al.*, 2004). Por fim, a espécie ainda foi utilizada em um estudo com crescimento e regeneração de calos sob controle hormonal (Yokoya *et al.*, 2004).

Uma vez que essa espécie possui importância econômica, o seu cultivo e utilização demandam um claro entendimento da sua biologia, produtividade e influência de fatores ambientais (Critchley, 1993). A radiação solar, que inclui a ultravioleta (UV) e a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), além da disponibilização de nutrientes, consistem em fatores que influenciam o desenvolvimento de organismos de ambientes marinhos, como apresentado a seguir.

1.2. A radiação ultravioleta

1.2.1. Incidência de UV na superfície terrestre

O espectro eletromagnético é composto por diferentes tipos de radiação, e parte dela é emitida pelo sol. Essa radiação que atinge a superfície terrestre é composta pelas radiações ultravioleta, visível e infravermelha (Figura 1.1).

Figura 1.1: Espectro eletromagnético. Notar que a frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda das distintas radiações (Imagem modificada a partir de <http://profs.ccems.pt/PauloPortugal/CHYMICA/REM/REM.html>). Em destaque, o intervalo composto pela radiação ultravioleta.

A radiação infravermelha compreende aquela cujos comprimentos de onda se encontram entre 800 nm e 1 mm, a radiação visível é composta por comprimentos de onda entre 400 e 800 nm, e a radiação UV compreende o espectro eletromagnético com ondas entre 100 e 400 nm. Além disso, essa radiação pode ser dividida em três diferentes tipos.

De acordo com a Commission Internationale de L'Eclairage (ou “Comissão Internacional de Iluminação”), as subdivisões da radiação UV foram definidas conforme as propriedades de transmissão de três filtros de cristal. Assim, a radiação UVC compreende os comprimentos de onda entre 100 a 280 nm (cristal Pirex). Essa radiação é completamente barrada por átomos de O_2 e O_3 na estratosfera. A radiação UVB entre 280 e 315 nm (cristais de Bário, Sílex e Pirex) é parcialmente filtrada pela camada de ozônio. Por fim, a radiação UVA, constituída por ondas de comprimento entre 315 e 400 nm (cristal de Bário e Sílex), atravessa a atmosfera e atinge a superfície terrestre. Entretanto, de acordo com a efetividade biológica dos comprimentos de onda da radiação UV, os pesquisadores em fotobiologia separam a radiação UV da seguinte maneira: UVC, entre 100 e 280 nm; UVB, entre 280 e 320 nm; e UVA, entre 320 e 400 nm. A radiação UV corresponde a cerca de 7% da radiação solar total que atinge a superfície terrestre (Figura 1.2).

Figura 1.2: Distribuição percentual de diferentes tipos de radiação presentes no espectro de radiação solar que atingem a superfície terrestre. (Fonte: site do INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

A camada composta pelo gás ozônio (O_3) se localiza majoritariamente entre 10 e 50 km de altitude, na região da atmosfera denominada de estratosfera. Essa camada absorve parte da radiação UV, sendo fundamental para a manutenção da vida na superfície terrestre. Existe ozônio também no nível do solo (na troposfera), porém nessa região esse gás não apresenta os efeitos benéficos na absorção de UV, e ao contrário, é um poluente muito tóxico aos organismos (WMO, 2006). Um estudo recente mostrou que íons de iodo e bromo originários da água do mar e de algas marinhas, são responsáveis pela quebra de átomos de ozônio na região da troposfera (von Glasow, 2008).

Na estratosfera, o ozônio é continuamente reduzido a um radical O^- e uma molécula de O_2 , de acordo com a reação (I-01) a seguir, absorvendo radiação UV:

Entretanto, isso não implica em perda do O_3 , uma vez que ele é novamente formado pela re-associação entre o átomo de O^- e o O_2 para formar O_3 . A perda do ozônio se dá quando ocorre a reação do O^- ou do O_3 com outro composto (X ou XO) para formar O_2 , como previsto no modelo de Chapman (reações I-02 e I-03) (McConnell & Jin, 2008):

Nesse caso, X pode ser NO, OH, H, Cl ou Br. Cada um desses átomos pode formar os radicais seguintes: HO_x (H, OH e HO_2), NO_x (NO e NO_2), ClO_x (Cl, ClO,

OCIO, HOCl e BrCl) e BrO_x (Br, BrO, BrCl e HOBr). Enquanto o HO_x e o NO_x possuem causas naturais (do vapor de água e a partir de raios cósmicos e aurora boreal), os dois últimos tipos de radicais reativos possuem origens principalmente antropogênicas. O ClO_x é derivado principalmente de clorofluorcarbonetos (CFCs) e uma porção menor advinda naturalmente de CH₃Cl (Schauffler *et al.*, 1993). A emissão de CFCs foi limitada e reduzida por meio do Protocolo de Montreal, em vigor a partir de 1987. Outra fonte antropogênica de radicais reativos com o ozônio são os BrO_x e também o CH₃Br (McConnell & Jin, 2008).

A quantidade de radiação UV registrada globalmente apresenta doses diárias maiores nas regiões tropicais (em latitudes mais baixas) do que nas zonas temperadas. Entretanto, em decorrência da existência do buraco na camada de ozônio sobre o continente antártico, cuja causa está relacionada à poluição de origem antrópica (Björn, 2007), há também registros de altas doses diárias para essa região. Jaque *et al.* (1994) observaram aumentos na quantidade de UVB que atingiu a região sul do continente americano nos momentos em que o buraco da camada de ozônio se deslocou para essa região com a influência de correntes atmosféricas. Assim, a variação e a absorção dessas quantidades e intensidades de UV se dão principalmente de acordo com a presença de ozônio na estratosfera, mas a presença de nuvens e aerossóis também influencia a presença de radiação UV na superfície terrestre (McKenzie *et al.*, 2007).

As variações verticais e latitudinais de O₃ na era pós-CFCs tem sido investigada por meio de modelos de simulação (Butchart *et al.*, 2006), que apontam que ao redor de 2060 haverá uma recuperação da camada de O₃ na estratosfera com quantidades similares ao observado nos anos 80 (Eyring *et al.*, 2007). Entretanto, a recuperação não se dará por igual nas distintas latitudes: enquanto que nas zonas temperadas e subtropicais haverá um aumento da camada de O₃ em cerca de 6 unidades Dobson, nas zonas tropicais se espera uma diminuição de 8 unidades Dobson do O₃. Essa variação seria decorrente das mudanças climáticas sobre a circulação atmosférica, que favorecerá o transporte do O₃ de latitudes tropicais em direção às zonas temperadas, por transporte horizontal. Consequentemente, nas zonas tropicais (que são as áreas que já recebem as maiores doses biológicas efetivas de UV) se espera que ocorra um aumento (e não uma redução) da quantidade de radiação UVB que atingirá a superfície terrestre (Li *et al.*, 2009), de modo que a dose biológica efetiva de radiação UV também tende a aumentar. Portanto, haverá uma intensificação do estudo dos efeitos da radiação UV em organismos da zona tropical, em combinação com outras variáveis ambientais

(eutrofização, variações climáticas, poluição e acidificação da água do mar, entre outros). Adicionalmente, por meio da análise de modelos físicos das variações do índice de UV entre 1965 e 2095 se estima que ocorra a redução de 9% desse índice de UV no Hemisfério Norte, mas em contrapartida, o aumento de 4% nos trópicos e até 20% nas latitudes altas do Hemisfério Sul durante a primavera e no início do verão (Hegglin & Shepherd, 2009).

A partir do momento que é emitida pelo sol, a radiação eletromagnética sofre dois processos físicos fundamentais: a dispersão e a absorção, em relação aos átomos e moléculas que estão presentes em seu caminho (Falkowski & Raven, 2007). Uma vez que atinge a superfície terrestre, a radiação pode ser atenuada ao penetrar na água do mar (Bischof *et al.*, 1998), sendo que a zona eufótica é definida pela profundidade na qual a radiação PAR é atenuada a 0,1% daquela medida à superfície (Häder & Figueroa, 1997). A penetração da radiação na coluna de água (incluindo PAR e UV) é afetada pela concentração de substâncias dissolvidas e particuladas na água. Uma série de fatores influencia na redução espectral da radiação conforme aumenta a profundidade da coluna de água. Inicialmente, a própria água pura absorve e dispersa as radiações PAR e UV. Em seguida, a matéria orgânica dissolvida e cromofórica aumenta a absorção de UV, e em menos intensidade, de PAR (o espectro de absorção dessa matéria orgânica dissolvida aumenta conforme diminui o comprimento de onda). E em terceiro lugar, as partículas suspensas, incluindo o fitoplâncton e os detritos, absorvem fortemente os comprimentos de onda de PAR e UVR, aumentando sua absorção e dispersão (Franklin & Forster, 1997). Nas zonas costeiras e rasas, ocorrem “blooms” de fitoplâncton, deságue de águas de rios, suspensão de sedimentos, produção de exudatos por macrófitas e distúrbios antropogênicos, os quais aumentam a concentração de materiais que dispersam e absorvem radiação nessa região (Franklin & Forster, 1997). Os comprimentos de onda mais curtos tendem a se dispersar mais, e a absorção de determinada radiação por uma substância ocorre apenas quando os fótons possuem a quantidade exata de energia para mover elétrons entre orbitais das estruturas atômico-moleculares da mesma (Falkowski & Raven, 2007).

Entretanto, com a redução da camada de O₃ nas zonas tropicais e a tendência a aumentar a quantidade de radiação UVB e de irradiância que atinjam a superfície terrestre, os efeitos biológicos dessas radiações também serão maiores, mesmo com a atenuação da coluna de água, incluindo danos no DNA, na fotossíntese e na assimilação de nutrientes de organismos aquáticos. Uma série de mecanismos de fotoproteção e

reparo estão presentes nos organismos marinhos, e por meio deles, esses organismos podem vir a tolerar e se aclimatar à radiação UVB, de modo que seu crescimento, reprodução, produção primária e zonação não sejam prejudicados por esses incrementos de radiação (Figura 1.3). Há que se ressaltar ainda que cada tipo de radiação possui um efeito distinto sobre cada componente celular. Um fóton de determinado comprimento de onda influencia apenas uma molécula. Um espectro de ação descreve a eficiência relativa da radiação UV, em função do comprimento de onda, na produção de uma determinada resposta biológica (Kendrick & Frankland, 1981). O efeito biológico sobre algumas substâncias, por exemplo o DNA, é mais incrementado por radiações de comprimentos de onda mais curtos, conferindo o que se denomina de espectro de ação para dano no DNA (Setlow, 1974).

Os organismos se diferenciam na maneira de lidar com a radiação UV, tanto na proteção contra a mesma, quanto nos mecanismos para reparar os danos que venham a ocorrer (Björn, 2007). Dessa forma, algumas estratégias com essa finalidade têm sido reportadas na literatura: i, o impedimento do dano por deslocamento na coluna de água (no caso de fitoplâncton) (Sinha *et al.*, 1998); ii, a síntese de compostos filtradores de radiação UV, como scitonemina ou aminoácidos tipo micoporina (MAAs) e outras substâncias de dissipação de energia, como os carotenoides e as ficobiliproteínas (Sinha *et al.*, 1995); iii, a presença de sistemas enzimáticos como a superóxido dismutase ou substâncias antioxidantes que reagem e reduzem a toxicidade de espécies reativas de oxigênio produzidas por UV (Sinha *et al.*, 1998); e iv, sistemas de correção de dano, incluindo a fotorreativação por meio de fotolases, o fotorreparo por excisão de nucleotídeos danificados ou o reparo por polimerases específicas que permitem a replicação de DNA danificado (Britt, 2004) (Figura 1.3).

Figura 1.3: Efeitos do aumento da radiação UV e irradiância PAR no DNA, na fotossíntese e na assimilação de nutrientes em organismos marinhos. Por meio dos mecanismos de fotoproteção, é possível regular e otimizar o crescimento, a reprodução, a produção primária e a distribuição desses organismos no ambiente marinho.

1.2.2. Efeitos da radiação UV na zonação e estádios de algas no ambiente

A radiação UV tem sido considerada com um dos principais fatores que afetam a distribuição dos organismos fotossintetizantes em ambientes aquáticos (Björn, 2007), tendo efeitos biológicos diversos, os quais são em grande parte negativos. Esse é um dos principais fatores que contribuem para a zonação e distribuição vertical de macroalgas ao longo do costão rochoso, com influência na fotoinibição desses organismos (Maegawa *et al.*, 1993). Adicionalmente, as algas em região mais rasa, como *Mastocarpus stellatus*, estão mais adaptadas à radiação UV do que aquelas localizadas em zonas mais profundas, como *Chondrus crispus* (Bischof *et al.*, 2006).

Além de influenciar na distribuição, a radiação UV também tem efeitos sobre estádios iniciais do desenvolvimento de algas, como verificado para algas pardas (Han

& Kain, 1993; Wiencke *et al.*, 2000; Altamirano *et al.*, 2003a, 2003b; Henry & van Alstyne, 2004; Huovinen *et al.*, 2000; Roleda *et al.*, 2005), algas verdes (Gómez *et al.*, 1998; Han & Han, 2005) e em algas vermelhas (Figuerola *et al.*, 1997; Flores-Moya *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2001; Roleda *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2008). A interação entre UV e temperatura causou a morte de estádios iniciais do desenvolvimento em espécies de *Fucus* (Altamirano *et al.*, 2003b). A sensibilidade à radiação UVB em zoósporos de algas pardas *Laminaria* spp. está ligada à produção sazonal dos mesmos, e também à distribuição vertical dos esporófitos que os formam (Roleda *et al.*, 2005). Os carpósporos de *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus* foram mais sensíveis à UV do que os estágios juvenis de gametófitos (Roleda *et al.*, 2004). Os esporos de *M. stellatus* foram mais resistentes do que os de *C. crispus*. A primeira espécie teve menos danos no DNA e menor fotoinibição da fotossíntese do que a segunda, e a recuperação desses danos também foi mais rápida. Entretanto essa diferença não foi observada com a comparação entre os gametófitos das duas espécies (Roleda *et al.*, 2004). A diferença de sensibilidade à UV foi relacionada com os distintos locais ocupados pelas espécies em seu ambiente natural (Roleda *et al.*, 2004). A sensibilidade de diferentes algas vermelhas à radiação UVB variou de acordo com a profundidade de ocorrência das mesmas no ambiente natural (Dring *et al.*, 1996).

1.2.3. Estratégias de defesa de organismos contra radiação UV: os compostos filtradores

Diversos metabólitos têm sido apontados como protetores das células contra a radiação UV. As plantas terrestres possuem nas células epidérmicas a deposição de fenilpropanóis ou flavonoides (Jenkins *et al.*, 1995; Xiong *et al.*, 1997), que desempenham papel similar ao reportado às MAAs, absorvendo comprimentos de onda entre 220 e 380 nm com alta fotoestabilidade (Hóllósy, 2002). A fotoproteção contra a radiação UVB foi comprovada com mutantes de soja, sendo que os que não sintetizavam flavonoides eram mais sensíveis à UVB. Além disso, nessas plantas, os carotenoides também desempenharam um papel de fotoproteção dos fotossistemas (Middleton & Teramura, 1993).

No caso de algas pardas, considera-se que a presença de polifenóis (inclusive os do tipo florotaninos) seria suficiente para efetuar a fotoproteção química contra a radiação UV. Essa radiação estimulou a síntese de florotaninos em *Ascophyllum nodosum* (Pavia *et al.*, 1997). Outras algas pardas, como “kelps”, possuem a exudação

de florotaninos, que servem como escudo contra a radiação UVB. A radiação UVA estimulou a síntese dessas substâncias em *Macrocystis integrifolia* (Swanson & Druehl, 2002). Entretanto, no caso de estádios embrionários ou juvenis de *Fucus gardneri*, não houve tal estímulo dos florotaninos, embora o crescimento desses estádios tenha sido estimulado por radiação UVA e inibido por radiação UVB (Henry & van Alstyne, 2004).

No caso de macroalgas verdes, também é reportada a presença de substâncias fotoprotetoras contra a radiação UV, tendo sido isoladas cumarinas (compostos fenólicos) e flavonoides em distintas espécies de Charophyceae (Kubitz, 1987). *Dasycladus vermicularis* possui a produção de 3,6,7-trihidroxycumarinas (THCs), que são compostos fenólicos do tipo cumarinas presentes na região apical do talo (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2003). Os THCs internos absorvem radiação na região do UV, sendo o pico de absorção levemente deslocado quando comparados com os THCs excretados pelas algas, possivelmente por ligação dessas substâncias com glicosídeos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2001). Essas substâncias apresentam ainda atividade antioxidante similar ao observado para o ácido ascórbico, e ainda podem ser exudadas pelas algas, conferindo fotoproteção para outras macrófitas associadas ou próximas de *D. vermicularis* (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2001, 2003).

Os aminoácidos tipo micosporina (MAAs) são substâncias presentes em diversos organismos, incluindo cianobactérias, microalgas eucarióticas, macroalgas, fungos e alguns animais (Korbee *et al.*, 2006). Algumas revisões são referidas na literatura, incluindo um banco de dados de MAAs em diferentes tipos de organismos, realizado por Gröniger *et al.* (2000).

O trabalho de Sivalingam *et al.* (1974) foi uma das primeiras evidências da presença de alguma substância que absorvesse radiação UV em diferentes espécies de algas. A origem do nome de micosporinas para as mesmas provém dos primeiros organismos nos quais elas foram isoladas, isto é, espécies de fungos. Quimicamente, são aminoácidos modificados, possuidores de dois possíveis anéis cromóforos, um aminociclohexenona ou outro denominado aminociclohexeminina. O primeiro tipo, denominado efetivamente de micosporinas, é reportado principalmente para fungos com o máximo de absorbância de 310 e 320 nm, enquanto o segundo é encontrado em macroalgas (Bandaranayake, 1998). Esse tipo de composto aminociclohexeminina é um imino derivado do primeiro tipo, e por isso, ao invés de chamar-se micosporinas puramente, são denominados de aminoácidos tipo micosporinas (Bandaranayake, 1998).

A faixa de absorção dos MAAs de organismos marinhos encontra-se entre 310 e 360 nm. A Tabela 1.1 apresenta a estrutura básica de alguns dos MAAs encontrados em macroalgas marinhas.

Tabela 1.1. Estrutura básica com radicais, comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\max}$, nm) e coeficientes de extinção (ϵ , M cm⁻¹) de alguns dos MAAs presentes em macroalgas (adaptada de Whitehead & Hedges, 2005).

Estrutura básica	MAA	Radical	$\lambda_{\max}$	ϵ
Palitina	N	320	36200
	Paliteno	N-CH=CHCH ₃ (trans)	360	50000
	Asterina-300	N-CH ₂ CH ₂ OH	330	43800
	Palitinol	N-CH(CH ₃)CH ₂ OH	332	43500
	Ac. Palitênico	N-C(CO ₂ H)=CHCH ₃	337	29200
	Shinorina	N-CH(CO ₂ H)CH ₂ OH	334	44668
	Porphyra-334	N-CH(CO ₂ H)CH(OH)CH ₃	334	42300

O metabolismo secundário de algas vermelhas resulta na produção de compostos envolvidos em processos de adaptação das espécies ao meio ambiente. A principal característica do metabolismo secundário dessas algas é a síntese de substâncias halogenadas (Teixeira, 2002). Os MAAs são substâncias que têm sido relacionados ao metabolismo secundário, e sabe-se que sua síntese, que foi estudada em fungos e corais, está relacionada à via do ácido chiquímico (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Os MAAs apresentam um precursor comum, o gadusol, o qual sofre algumas modificações, incluindo a adição de um aminoácido do tipo glicina e forma o composto micosporina-glicina. Essa substância é precursora direta de uma série de MAAs, por adição ou substituição bioquímica de alguns compostos. Quando é adicionado o aminoácido valina, forma-se a micosporina-glicina-valina. No caso de adição de serina, se forma a shinorina. Com a adição de mais uma glicina à micosporina-glicina, se pode formar a micosporina-2-glicina, ou ainda por aminação, se obtém a palitina. A adição de treonina ou ácido glutâmico à micosporina-glicina resulta na formação de porphyra-334 ou micosporina-glicina-ácido glutâmico (Carreto *et al.*, 2005). É interessante ressaltar que enquanto que micosporina-glicina possui um N em sua estrutura, os demais MAAs derivados apresentam dois Ns em sua estrutura, implicando na dependência da

disponibilidade de N (na forma de distintos aminoácidos) para a síntese dessas substâncias (Carreto *et al.*, 2005). Shick *et al.* (1999) especulam que a via de formação de MAAs seja altamente sensível à radiação UV, ainda que se mantenha ativa sob condições de ausência da mesma. Além disso, Portwich & Garcia-Pichel (2003) mostraram em uma cianobactéria que a síntese de MAAs é regulada por UV e estresse osmótico.

Além de atuar como compostos filtradores de UV, os MAAs podem ainda atuar como pigmentos acessórios, transferindo energia radiante para os centros de reação da fotossíntese, e podem ainda atuar como osmorreguladores, sendo estimulados sob condições de estresse osmótico, como visto em *Chlorogloopsis* sp. (Portwich & García-Pichel, 1999). Além disso, a proposta de que essas substâncias atuem como antioxidantes foi feita por Dunlap & Yamamoto (1995), e comprovada por De La Coba *et al.* (2009). Misonou *et al.* (2003) sugerem a atividade filtradora de UV e a dissipação de energia de resíduos de timina excitados por meio de MAAs. Korbee *et al.* (2006) ainda sustentam um outro papel, de sinalizadores, em sistemas reprodutivos de organismos marinhos. Entretanto, o principal papel dos MAAs efetivamente parece ser a filtragem e dissipação da energia de radiação UV, por conta de sua capacidade de absorver comprimentos de onda curtos (Korbee *et al.*, 2006). Além disso, os MAAs têm sido caracterizados como sendo substâncias com alta fotoestabilidade (Conde *et al.*, 2000, 2004), seja em água destilada ou em água do mar (Whitehead & Hedges, 2005). Adicionalmente, Sinha *et al.* (2000) observaram que os MAAs de *Gracilaria cornea* foram altamente resistentes ao calor e à radiação UV. Zheng & Gao (2009) propuseram que as substâncias que absorvem UV em *Gracilaria lemaneiformis* (possivelmente MAAs) estivessem localizadas próximas ao aparato fotossintetizante, dada a sua capacidade de impedir redução da fotossíntese em tratamento com UV.

A radiação ultravioleta tem sido relacionada ao estímulo ou não da síntese de compostos relacionados à fotoproteção (Sinha *et al.*, 1998; Zheng & Gao, 2009). Na cianobactéria *Anabaena* sp., Sinha *et al.* (1999) observaram um aumento na síntese de MAAs quando expuseram esse organismo a tratamento com PAR+UV, comparando-se com o observado para tratamento apenas com PAR. Eles encontraram somente um tipo de MAA, a shinorina. O efeito diferenciado de UVB para a síntese dessa substância foi observado por Sinha *et al.* (2001) para outras três espécies de cianobactérias, durante o período de luz do fotoperíodo, evidenciando um ritmo circadiano nesse processo. Adicionalmente, os estudos com *Anabaena* sp. foram realizados tanto em condições de

radiação artificial quanto em condições de radiação natural, e o padrão de resposta de estímulo à síntese de MAAs por UVB foi similar (Sinha *et al.*, 1999, 2001). Posteriormente, Sinha *et al.* (2002) determinaram o espectro de ação de shinorina em *Anabaena* sp. Já no caso de *Heterocapsa triquera*, o aumento de síntese de MAAs foi relacionado com o aumento do tamanho celular e com a radiação UVB (Wängberg *et al.*, 1997). Outro trabalho, com o dinoflagelado *Gyrodinium dorsum*, mostrou que vários tipos de MAAs estão presentes nesse organismo, mas que a radiação UVB com comprimentos de onda mais curtos (295 e 280 nm) resultou na redução geral da síntese dessas substâncias (Klisch & Häder, 2000). Esses autores sugerem ainda que o status nutricional de nitrogênio nos dinoflagelados pode alterar a composição de MAAs. Por fim, outro trabalho com a cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes* mostrou que a distribuição de diferentes tipos de MAAs atendeu um padrão biogeográfico ou ecotípico de diversificação. Esse trabalho também observou o estímulo à síntese de MAAs por concentrações crescentes de salinidade, indicando um possível papel de regulador osmótico dessas substâncias em duas das três variantes estudadas, além de atuar na fotoproteção da espécie contra a radiação UVB (Karsten, 2002).

No caso de microalgas componentes do fitoplâncton marinho, foi observado que os MAAs têm papel de filtro contra a radiação UV (Neale *et al.*, 1998). Na diatomácea *Phaeocystis antartica*, foi observado um aumento do total de MAAs com o aumento de radiação PAR (Moisan & Mitchell, 2001). Esses autores sugerem que a síntese dessas substâncias seja regulada por UV e PAR, mas que a energia absorvida pelos MAAs não seria transferida para o aparato fotossintetizante. Os MAAs seriam um filtro passivo contra a radiação UV. Sua localização citoplasmática verificada por Garcia-Pichel & Castenholz (1993) e os resultados obtidos com *P. antartica* desvinculam a atividade de MAAs com a fotossíntese (Moisan & Mitchell, 2001), embora Zheng & Gao (2009) tenham proposto uma localização próxima aos CR em *Gracilaria lemaneiformis*. Xiong *et al.* (1997) analisaram diversas espécies de microalgas, tolerantes ou não à UVB. A síntese de MAAs foi estimulada por exposição à UVB, independentemente da condição preliminar de tolerância das espécies utilizadas, quando as espécies foram expostas a tratamentos sem a presença de radiação UVA em laboratório. Já no caso de um tratamento por três dias em radiação solar completa no campo, foi observado que o total de MAAs de *Scenedesmus* sp. foi muito maior do que o observado após estímulo por UVB em laboratório, ressaltando o papel da radiação UVA no estímulo à síntese dessas substâncias (Xiong *et al.*, 1997).

Os primeiros trabalhos com MAAs em macroalgas foram realizados como um inventário a respeito de espécies que possuem essas substâncias (Karsten *et al.*, 1998a, 1998b). Por meio desses trabalhos, foram detectados MAAs em algas dentro do grupo das algas vermelhas (Rhodophyta), enquanto que as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas pardas (Phaeophyceae) apresentaram apenas traços dessas substâncias.

Dois trabalhos determinaram padrões fisiológicos de resposta das algas quanto à presença e a indução de MAAs. Hoyer *et al.* (2001) classificaram as macroalgas em três grupos fisiológicos em termos de valores de MAAs: i, composto por espécies que não possuem MAAs; ii, com espécies que possuem concentração basal de MAAs ajustável de acordo com as condições ambientais; e o iii, com as algas que possuem altos teores de MAAs, independentemente das condições ambientais. Posteriormente, Hoyer *et al.* (2002) separaram novos grupos fisiológicos de acordo com os padrões de indução ou não da síntese de MAAs, considerando os grupos “ii” e “iii” acima discernidos. No grupo “ii”, foi detectado que o aumento de MAAs poderia ser causado por tratamentos com radiação solar completa (PAR+UVA+UVB) (tipo a) ou então com a ausência da radiação UVB (PAR+UVA) (tipo b). O terceiro tipo de resposta seria vinculado ao grupo “iii”, no qual os tratamentos com quaisquer combinações de PAR+UV resultam numa redução dos teores inicialmente elevados de MAAs presentes em macroalgas desse grupo (Hoyer *et al.*, 2002). Esse processo de indução não foi consistente para um determinado tipo de MAA, evidenciando que a indução, formação e acúmulo de MAAs individuais são processos flexíveis e mecanismos espécie-específicos (Hoyer *et al.*, 2002).

Os trabalhos de investigação sobre a fisiologia e síntese de MAAs em macroalgas marinhas foi iniciado com o trabalho de Karsten *et al.* (1998c), usando *Chondrus crispus* como organismo modelo. Nesse estudo, foi verificado que a síntese de MAAs foi estimulada diferencialmente de acordo com o tipo de radiação provida. Enquanto que alguns MAAs aumentaram em quantidade após exposição à PAR, a síntese de shinorina foi fortemente estimulada por um tratamento com UV sem adição de PAR (Karsten *et al.*, 1998c). Um padrão na síntese de MAAs foi sugerido por Franklin *et al.* (1999), ao ressaltar que a radiação PAR estimulou inicialmente a síntese de shinorina, seguida de palitina e asterina, e posteriormente um declínio no total de shinorina. Além desse estudo com síntese de MAAs em *C. crispus*, outras espécies de macroalgas apresentaram uma quantidade elevada de MAAs independentemente do tratamento de radiação, como o caso de *Gracilaria cornea*, cujo extrato manteve a

absorção nos comprimentos de onda referentes aos MAAs mesmo com exposição ao calor e à radiação UV (Sinha *et al.*, 2000). No caso de *Porphyra* spp., altas quantidades de MAAs também foram detectadas no início de experimentos, considerando algas expostas à PAR+UVA+UVB e diferentes quantidades de amônio (Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a). Um estímulo à síntese de MAAs somente foi observado em *P. leucosticta* e *P. columbina* tratadas com maior suprimento de N, enquanto que os MAAs de *P. umbilicalis* não variaram (Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a). Um incremento no conteúdo de N da água de cultivo de *Asparagopsis armata* em tanques causou o aumento da produção de MAAs nessa macroalga, utilizada como organismo biofiltrador (Figueroa *et al.*, 2008). Um acúmulo de MAAs foi observado em *Pterocladia capillacea* (alga encontrada em mesolitoral superior) expostas a concentrações crescentes de UVB, enquanto que tal efeito não foi verificado em *Gelidium amansii* (do mesolitoral inferior) sendo esta segunda espécie mais suscetível à radiação UVB (e com alto stress oxidativo quando exposta a essa radiação). Esse aumento se deu até determinada dose, acima da qual o conteúdo de MAAs não foi mais estimulado por UVB. Em contrapartida, nessa situação houve aumento de carotenoides, indicando que essas substâncias podem ter um papel na fotoproteção quando os MAAs não estão presentes (Lee & Shiu, 2009).

A presença de MAAs em macroalgas marinhas também pode ser influenciada pela profundidade. Isso foi verificado para *Devaleraea ramentacea*, que apresentou uma forte correlação entre o total de MAAs e a profundidade (Karsten *et al.*, 1999). Em trabalho comparando duas macroalgas vermelhas, foi observado que *Chondrus crispus* (de profundidade) tinha maior suscetibilidade à radiação UVB do que *Mastocarpus stellatus* (encontrada em águas mais rasas). *M. stellatus* apresentou seis vezes mais MAAs do que *C. crispus*, fator que explica a maior tolerância e fotoproteção do aparato fotossintetizante nessa espécie (Bischof *et al.*, 2000). A radiação UV atua nesse caso como fator limitante para a distribuição de *C. crispus*, sendo *M. stellatus* mais tolerante à radiação UV do que *C. crispus* (Bischof *et al.*, 2000).

Em estudos posteriores com *Chondrus crispus*, foi verificado o tipo de radiação que efetivamente influencia a síntese de MAAs. O efeito da radiação azul e da radiação UVA para estímulo à síntese de MAAs levou Franklin *et al.* (2001) a sugerirem a existência de um controle fotomorfogenético desse processo por meio de dois fotorreceptores diferentes. Adicionalmente, foi demonstrado que diferentes comprimentos de onda induziram de forma diferente a cada tipo de MAA em *C.*

crispus. Enquanto que a radiação UVA estimulou a síntese de shinorina e palitina (os MAAs majoritários dessa alga), a radiação UVB inibiu a síntese desses dois compostos e induziu a síntese de outros três MAAs: asterina, palitinol e paliteno (Kräbs *et al.*, 2002). Esses autores consideraram quatro hipóteses para explicar esses resultados: i, as MAAs seriam estimuladas por um único fotorreceptor, porém pelas diferenças nas proporções entre UVB:UVA:PAR causadas pelo uso de diferentes filtros de corte, haveria um estímulo diferente para cada MAA; ii, poderia haver um fotorreceptor para estimular a síntese de shinorina e palitina, e outro para estimular a síntese de asterina, palitinol e paliteno, sendo que esses MAAs seriam formadas em duas vias metabólicas diferentes, com um precursor comum (micosporina-glicina); iii, poderia haver uma interconversão entre MAAs de acordo com os comprimentos de onda e as condições de irradiância empregadas; e iv. a síntese de shinorina seria estimulada por um fotorreceptor menos sensível, para seu incremento quantitativo nos primeiros dias de tratamento, servindo como agente filtrador de UV. Num momento seguinte, a shinorina seria utilizada como um precursor de antioxidante, e os outros MAAs sintetizados posteriormente assumiriam a função de filtro de UV (Kräbs *et al.*, 2002). Um trabalho subsequente de Kräbs *et al.* (2004) determinou o espectro de ação para a síntese de shinorina em *C. crispus*. Esses autores sugerem que a indução desse MAA seja intermediada pela atividade de um fotorreceptor de UVA, uma vez que seus picos de absorção seriam de 320, 340 e 400 nm (Kräbs *et al.*, 2004). No caso de *Porphyra leucosticta*, foi verificado que as radiações azul e branca favoreceram o acúmulo de substâncias nitrogenadas, incluindo alguns MAAs como palitina e asterina, com o meio de cultivo suprido com alta concentração de amônio (Korbee *et al.*, 2005b). Outros comprimentos de radiação monocromática estimularam o acúmulo de shinorina nessa alga. Esse acúmulo diferencial de MAAs em *P. leucosticta* submetida a diferentes qualidades de radiação pode estar relacionado à atuação de um fotorreceptor não-fotossintetizante de radiação azul (Korbee *et al.*, 2005b).

No caso de *Gracilaria tenuistipitata*, foram realizados apenas dois estudos com MAAs. Cardozo *et al.* (2006) utilizando o método de moléculas protonadas (marcação com deutério) para isolar novos MAAs, encontraram quatro MAAs em *G. tenuistipitata*: palitina, asterina, palitinol e shinorina. Outros MAAs (porphyra-334 e paliteno ou usujireno) foram observados nessa alga usando distintos métodos de análise, que incluíram espectrometria de massas de alta e baixa resolução, e o total de MAAs apresentou um ritmo circadiano (Cardozo, 2007).

A fotoproteção das algas também ocorre por meio de outra via alternativa, que inclui a atuação dos carotenoides, que desempenham a função de fotoprotetores por dissipação de excesso de energia e como antioxidantes. Essa função decorre da habilidade dessas substâncias em prevenir a formação de radicais livres de O₂ (O₂ singlet, ¹O₂), que é formado a partir de transferência da energia de clorofila em estado triplet para o O₂ basal. Os carotenoides previnem esse evento por ser uma via (I-04) de desexcitação da clorofila:

O carotenoide em estado triplet é relaxado ao estado basal. Adicionalmente, os carotenoides podem servir de via alternativa de dissipação de energia e redução de espécies reativas de O₂, como representado na reação (I-05):

Dessa forma, os processos relacionados com os carotenoides envolvem transferência de energia de excitação, nos quais os doadores e receptores dessa energia são os estados eletrônicos diferentes de clorofilas e carotenoides (Ramirez, 1992). Além dessa atividade, os carotenoides ainda podem inibir a penetração de substâncias oxidativas e íons metálicos no interior das células, e dessa forma, retardar o processo de peroxidação lipídica (Wisniewska & Subczynski, 1998), como observado para a peridina por Barros *et al.* (2001). Esses autores também verificaram forte atividade antioxidante de astaxantina em lipossomos marcados com Fe²⁺.

O processo de fotoproteção se relaciona com a dissipação de energia térmica, com a atuação de ciclos de xantofilas, que envolvem de-epoxidação de algumas xantofilas específicas e a recuperação de seu “pool” inicial no escuro (Esteban *et al.*, 2009; ver Figura 1.5). Esses autores consideram seis diferentes tipos de ciclos das xantofilas, sendo dois deles baseados em xantofilas formadas no ramo α, e os outros quatro relacionados ao ramo β: i, ciclo da diadionxantina; ii, ciclo da violaxantina- anteraxantina-zeaxantina (VAZ); iii, ciclo de VAZ truncado; e iv, ciclo de anteraxantina-zeaxantina. Esse último foi sugerido para algas vermelhas (*Gracilaria gracilis*) por Rmiki *et al.* (1996). Esses autores, junto a Ursi *et al.* (2003) determinaram a variação de pigmentos carotenoides violaxantina, anteraxantina e zeaxantina em algas vermelhas. Entretanto, a presença de um ciclo de xantofilas estabelecido em macroalgas vermelhas é controverso (Esteban *et al.*, 2009), ainda que Ursi *et al.* (2003) tenham determinado a presença das três principais xantofilas em *Gracilaria birdiae*, bem como

uma regulação desses pigmentos em alta e baixa quantidade de luz (escuro) tenha sido reportada, dando suporte à presença de um ciclo de dissipação de energia relacionado às xantofilas nessa alga vermelha.

Os pigmentos carotenoides que se creditavam às algas vermelhas eram o α -caroteno, β -caroteno, luteína e zeaxantina, até o momento que Brown & McLachlan (1982) observaram anteraxantina em diversas espécies do gênero *Gracilaria*. Esse pigmento teria quatro possíveis funções: estabilidade estrutural, coleta de luz, fotoproteção ou atividade antioxidante (Esteban *et al.*, 2009). Schubert *et al.* (2006) realizaram uma análise de carotenoides de 65 espécies de algas vermelhas, e detectaram sempre uma xantofila como carotenoide principal. A dominância de luteína, anteraxantina ou zeaxantina foi observada em distintas espécies por Esteban *et al.* (2009). Um dado adicional importante observado por esses autores foi a possível presença de uma zeaxantina epoxidase ativa em *Corallina elongata*. Essa enzima converte zeaxantina em anteraxantina, por epoxidação, denotando um ciclo de dissipação de calor incompleto, tal como já fora observado para espécies de *Gracilaria* por Rmiki *et al.* (1996). No caso de *Gracilaria tenuistipitata*, a zeaxantina foi o pigmento majoritário encontrado por Carnicas *et al.* (1999). Dois “pools” desse pigmento foram propostos por esses autores, sendo um relacionado à coleta de luz para a fotossíntese e o outro voltado à fotoproteção, embora outros pigmentos relacionados ao ciclo das xantofilas clássico (VAZ) não foram verificados nessa alga. Organismos com a presença de alta quantidade de zeaxantina foram considerados mais resistentes a efeitos adversos causados por alta intensidade de luz (Demmig-Adams, 1990).

1.2.4. Efeitos da radiação UV no DNA – danos e reparo

Danos no DNA pela radiação UV têm sido reportados para diferentes macroalgas, com a formação de dímeros de pirimidina de dois tipos: dímeros de pirimidina ciclubutano (CPDs, “cyclobutane pyrimidin dimers”) e fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (fotoprodutos (6-4)) (Franklin & Forster, 1997, Pakker *et al.*, 2000a). A Figura 1.4 mostra a conformação desses dois tipos de dano no DNA. Dentre os quatro tipos possíveis de CPDs (TT, TC, CT e CC), os dímeros de timina são os mais comuns. O método de detecção de ambos os dímeros se faz por um imunoenensaio com anticorpos monoclonais específicos, seguido de detecção quimioluminescente (modificado de Vink *et al.*, 1994). Esse método foi usado neste trabalho com *Gracilaria tenuistipitata* para detectar a formação de CPDs (ver Material e Métodos mais adiante).

Figura 1.4: Os dois danos comuns induzíveis no DNA por radiação ultravioleta: A, CPD (“cyclobutane pyrimidin dimmers”, ou dímero de pirimidinas ciclobutano), representado por uma ligação entre duas timinas, e B, fotoproduto (6-4) ou dímero de pirimidina (6-4) pirimidinona. Os dímeros são formados na mesma fita de DNA (figura modificada a partir de Britt, 2004).

A presença desses dímeros bloqueia a atividade da DNA polimerase e interrompe o crescimento. No caso da diatomácea *Cyclotella* sp., a redução do crescimento foi fortemente correlacionada com a formação desse tipo de dano no DNA em tratamentos com radiação menor do que 302 nm (Buma *et al.*, 1997). Além disso, nesses tratamentos, os autores também verificaram o aumento do tamanho médio das células, indicando um atraso no ciclo celular. O trabalho de Buma *et al.* (1997) confirmou o que fora verificado por Setlow (1974), ou seja, que os menores comprimentos de onda da radiação UVB são responsáveis por causar maiores danos no DNA de organismos. No caso de macroalgas vermelhas, duas doses biologicamente efetivas de radiação UVB foram utilizadas para produzir danos no DNA de *Rhodomenia pseudopalmata* (1,6 KJ.m⁻² e 3,9 KJ.m⁻² obtidas desde a intensidade de cerca de 0,7 W.m⁻²) e também uma dose efetiva (3,2 KJ.m⁻²) para causar dano no DNA de *Palmaria palmata* (Pakker *et al.*, 2000a, 2000b). A produção de dano no DNA não esteve relacionada com a temperatura e sim com o espectro de radiação incidente (Pakker *et al.*, 2000b). A temperatura apresentou influência sobre o processo de reparo tanto de CPDs quanto de fotoprodutos (6-4) de *P. palmata*. Outro trabalho com danos de UV no DNA de macroalgas vermelhas foi realizado por van de Poll *et al.* (2001), que observaram que o crescimento de *Polyneura hiliae* e *Phycodrys rubens* foi inversamente proporcional à formação de CPDs em tratamento com PAR+UVA+UVB.

Adicionalmente, eles verificaram que a radiação UVB foi responsável pela indução de dano no DNA de distintas espécies de macroalgas, sendo que aquelas de zonas mais altas do costão (*Chondrus crispus* e *P. palmata*) não apresentaram a formação de CPDs após 15 dias de exposição à PAR+UVA+UVB. Os autores consideram que diferentes estratégias de fotoproteção (fotorreativação e compostos absorventes de UV) impediram a formação de lesão no DNA dessas algas. Noutras algas do sublitoral, foi observada a ocorrência de fotoinibição acoplada à formação de dímeros no DNA. Um eficiente reparo dos danos no DNA foi considerado fundamental para ocorrência de crescimento sob condições com radiação UV (van de Poll *et al.*, 2001). Um estudo de Roleda *et al.* (2004) apontou a formação de CPDs em carpósporos de *C. crispus* e *Mastocarpus stellatus*, sendo que a indução dessas lesões no DNA foi maior com o aumento da intensidade de UVB aplicada.

Os organismos expostos à radiação UV que tenham seu DNA danificado pela formação de dímeros possuem algumas estratégias de reparo de DNA. A formação desses dímeros pode interromper o processo de replicação e transcrição do DNA. Esses danos podem ser tolerados, de modo que a replicação ou transcrição sejam feitas apesar da presença do mesmo, ou então, podem ser corrigidos. No sistema de tolerância do dano, o dímero pode ser saltado, ou pode haver uma recombinação das fitas de DNA. Para o sistema de reparo, duas estratégias são reportadas: a reversão direta do dano pela atuação de um sistema de excisão de nucleotídeos ou a fotorreativação (Britt, 1995; 2004). Outra abordagem feita com extratos de substâncias absorventes de UV em *Porphyra yezoensis* sugere que ocorra uma transferência de energia entre essas substâncias e as moléculas de timina, impedindo a formação de dímeros. Dessa forma, a energia de excitação de moléculas de timina, prévia à formação de dímeros, poderia ser dissipada pela presença das substâncias que absorvem UV, permitindo o retorno das timinas ao seu estado de conformação basal e monomérico (Misonou *et al.*, 2003).

Dois tipos de fotoliasas foram descritas para efetuar o reparo nos danos causados no DNA pela radiação UV, no sistema de fotorreativação. A primeira delas seria uma fotoliase que corrige CPDs, enquanto que a segunda, uma fotoliase específica para corrigir o fotoproduto (6-4), foi detectada inicialmente em *Drosophila melanogaster* (Todo *et al.*, 1993). As fotoliasas são componentes de uma família de substâncias relacionadas aos fotorreceptores de radiação azul (criptocromos), embora estes últimos não apresentem atividade de reparo de DNA (Sancar & Sancar, 2006). As fotoliasas de CPD foram purificadas em uma série de organismos (Sancar *et al.*, 1984) e são

separadas em duas classes, I e II, de acordo com o mecanismo de reconhecimento de seus cofatores, esclarecido conforme similaridade de seus aminoácidos (Kanai *et al.*, 1997).

Os métodos de purificação das fotoliasas de distintos organismos são revisados por Sancar & Sancar (2006), que ainda apresentam as propriedades espectroscópicas dessas enzimas. Um ensaio para medir a atividade da enzima fotoliase de *Escherichia coli* foi proposto por Nakayama *et al.* (2004), usando um dímero CPD em fita simples de DNA como substrato. Kanai *et al.* (1997) separaram cinco grupos pertencentes à família das fotoliasas e fotorreceptores de luz azul. Esses autores ainda fizeram uma análise filogenética das sequências de aminoácidos dessas proteínas, e concluíram que a proteína ancestral das fotoliasas já continha atividade de correção de danos de CPDs.

O mecanismo de fotorreativação de fotoliasas de CPD da classe I foi investigado em detalhes e é composto dos seguintes passos: i, a fotoantena absorve um fóton de radiação azul; ii, a energia de excitação é transferida para o sítio ativo do cofator FAD por uma interação dipolo-dipolo; iii, o radical FADH excitado doa um elétron para os CPDs, que atua na correção do dímero de pirimidina; e iv, o elétron volta para o FADH, acompanhado pela geração de duas bases canônicas (Hearst, 1995). O mecanismo molecular do reparo por meio da fotoliase CPD foi diretamente observado por Kao *et al.* (2005), por um método de conversão de fluorescência entre moléculas. Os mecanismos de fotorreativação por meio das fotoliasas de classe II e das fotoliasas do fotoproduto (6-4) não estão esclarecidos, uma vez que os cofatores não foram completamente determinados, embora alguns trabalhos tenham já sido realizados como o de Kim *et al.* (1996) para *Drosophila melanogaster*, indicando que a enzima desse organismo seja ligada a um FAD e a um folato como cofatores cromóforos. Carell *et al.* (2001) consideram que o mecanismo de fotorreativação da fotoliase do fotoproduto (6-4) e da fotoliase CPD é similar, uma vez que ambas possuem o cofator FAD. Esse mecanismo implicaria na transferência de elétrons a partir do FAD reduzido para o substrato, para proceder ao reparo do dímero (Zhao *et al.*, 1997).

Os estudos de dano e reparo de DNA em macroalgas tiveram início recentemente. *Rhodomenia pseudopalmeta* e *Palmaria palmata* apresentaram um processo de fotorreativação rápida, relacionada à presença de PAR e UVA (Pakker *et al.*, 2000a; 2000b). Enquanto que *R. pseudopalmeta* não teve reparo de CPDs no escuro (Pakker *et al.*, 2000a), esse processo foi observado em *P. palmata* para um total de 67% dos dímeros formados por UVB. Além disso, a fotorreativação foi relacionada com a

temperatura nessa última espécie (Pakker *et al.*, 2000b). No caso de *P. palmata*, foi ainda analisado o reparo de fotoproducto (6-4), o qual também foi corrigido sob tratamentos com PAR e UVA e que teve um ótimo de eficiência em temperatura distinta do que a observada para o reparo de CPDs. Os autores especulam que dois processos de reparo independentes ocorram nessa espécie (Pakker *et al.*, 2000b). O sistema de reparo de lesões no DNA esteve ativo em outras macroalgas analisadas sob tratamentos com PAR+UVA+UVB, uma vez que a formação de dímeros foi mínima, sendo evidente a indução de enzimas de reparo (fotoliasas) após 15 dias de experimento (van de Poll *et al.*, 2001). O reparo observado em tratamento artificial foi similar ao verificado para um tratamento natural de fotorreativação em *P. palmata*, havendo ainda evidências de fotoliasas ativas na espécie. Por outro lado, a ausência de reparo em *Odonthalia dentata*, *Coccotylus truncatus* e *Monostroma arcticum* indica a possível ausência de fotoliasas nessas espécies (van de Poll *et al.*, 2002). Esses autores apontam que o reparo de DNA está ligado a fatores físicos do ambiente, tais como temperatura e a disponibilidade de luz e nutrientes, os quais poderiam inibir a expressão de genes ligados às vias de reparo como a excisão de nucleotídeos (van de Poll *et al.*, 2002).

A análise de fotoliasas por meio de ferramentas moleculares foi feita por Isely *et al.* (2009) em diferentes fases do desenvolvimento de um ouriço-do-mar (*Sterechinus neumayeri*). É o único trabalho na literatura que trata da análise da fotoproteção de organismos marinhos em nível molecular. Esses autores sequenciaram e analisaram por PCR em tempo real quantitativa a taxa de expressão gênica de uma fotoliase desse ouriço, e observaram que há um estímulo à expressão gênica conforme aumenta a exposição do organismo à radiação UV (Isely *et al.*, 2009). Não é conhecida na literatura tal abordagem em macroalgas com relação aos sistemas de fotoproteção.

1.2.5. Efeito da radiação UV na formação de radicais livres de O₂ e reparo por sistemas antioxidantes em organismos fotossintetizantes

A dissociação de O₃ e O₂ resulta na formação de radicais livres na troposfera, que são causadores de danos nos organismos. Uma série de fatores antrópicos ou ambientais causam o processo de dissociação, com a formação de radicais livres de oxigênio, também denominadas espécies reativas de oxigênio (Lesser, 2006). Entre os fatores, podem ser citados: a poluição do ar (aumento de O₃ ou SO₂ na troposfera), metais pesados, seca, variação de temperatura (calor e congelamento), radiação UV e radiação PAR intensas, que ainda podem causar fotoinibição (Buchanan *et al.*, 2000). A

formação de radicais livres de oxigênio tem início com a excitação de O₂ para formar oxigênio singlet (¹O₂), ou com a transferência de um, dois ou três elétrons para o O₂, a fim de formar, respectivamente, o radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou o radical hidroxila (OH[•]) (Mittler, 2002; Lesser, 2006).

O ânion superóxido também reage com metais de transição (como cobre e manganês, por exemplo) e forma intermediários reduzidos dessas substâncias (reação I-06) (Kohen, 1999). Esses metais de transição reduzidos podem estimular a formação de radicais hidroxila (I-07). Outra forma de induzir a formação de radicais hidroxila é a reação de Haber-Weiss (I-08).

O radical hidroxila pode oxidar uma série de moléculas biológicas, incluindo açúcares, nucleotídeos e lipídios. Esse radical pode abstrair átomos de hidrogênio de proteínas e lipídios, desencadeando a peroxidação lipídica e dano irreversível à membrana plasmática das células. Pode ainda danificar as bases do DNA, rompendo suas fitas e desativar mecanismos de reparo (Kohen, 1999). Os radicais livres de O₂ podem ser removidos por meio de sistemas antioxidantes (Mittler, 2002).

A fotoproteção contra a formação de radicais livres pode ser realizada por alterações anatômicas, adaptações fisiológicas e mecanismos moleculares de rearranjo do aparato fotossintetizante (Mittler, 2002). No caso que ainda assim ocorra a formação desses radicais, a atividade de antioxidantes se dá de maneira a remover os radicais livres de oxigênio e seus derivados do interior das células. Essa defesa ocorre por meio de compostos antioxidantes, como o caso de vitaminas (ascorbato e α-tocoferol) e carotenoides (β-caroteno, peridinina, astaxantina e zeaxantina), glutathione reduzida e ainda poliaminas ou flavonoides em plantas terrestres (Buchanan *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2003). Outra estratégia consiste na presença de sistemas enzimáticos que removem as espécies reativas de oxigênio (Pinto *et al.*, 2003).

A remoção de radicais livres de oxigênio por substâncias antioxidantes foi avaliada em macroalgas, cujos extratos contendo algumas substâncias isoladas como as cumarinas e os aminoácidos tipo micosporina apresentaram atividade antioxidante (por exemplo, ver Pérez-Rodríguez *et al.*, 2001; De La Coba *et al.* 2009). O trabalho de De La Coba *et al.* (2009) analisou diferentes tipos de MAAs de um líquen e de macroalgas

vermelhas e suas atividades antioxidantes, que aumentaram com a alcalinidade do meio, em uma relação dose-dependente.

Os sistemas enzimáticos de remoção de radicais livres incluem a atividade de diferentes sistemas: i, superóxido dismutase (SOD); ii, ascorbato peroxidase (APX); iii, monodehidroascorbato redutase (MDAR); iv, violaxantina de-epoxidase (VdEP); v, glutathiona redutase (GR); vi, dehidroascorbato redutase (DHAR); e vii, catalase (CAT), que estão sintetizados na Figura 1.5.

Figura 1.5: Sistemas enzimáticos antioxidantes do interior de uma célula fotossintetizante com formação de O_2 . As reações ocorrem no interior do cloroplasto (região com fundo verde), na porção estromática, no interior do lúmen dos tilacoides e ainda na região citoplasmática. O ciclo do ascorbato-glutationa está indicado com fundo amarelo. SOD, superóxido dismutase; APX, ascorbato peroxidase; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, monodehidroascorbato redutase; DHASC, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato redutase; GSSG, glutathiona oxidada; GSH, glutathiona reduzida; GR, glutathiona redutase; PSI, fotossistema I; Fd, ferredoxina; PSII, fotossistema II; V, violaxantina; A, anteraxantina; Z, zeaxantina; VdEP, violaxantina de-epoxidase.

A primeira linha de defesa contra radicais livres de oxigênio consiste na superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a reação (I-09) de conversão do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2):

Três tipos de SOD foram reportados em algas, de acordo com suas isoformas, ligadas a diferentes metais: MnSOD, CuZnSOD e FeSOD (Pinto *et al.*, 2003). Cada uma delas predomina em determinados compartimentos celulares, sendo que a FeSOD é considerada a principal removedora de ânions superóxido no cloroplasto, enquanto que a MnSOD é ativa principalmente na mitocôndria.

O peróxido de hidrogênio também danifica moléculas intracelulares. Sua remoção e detoxificação se dão por meio dos ciclos de ascorbato-glutationa e de glutathione peroxidase e ainda pela atividade da catalase. A catalase (CAT) permite a conversão de H_2O_2 em O_2 , porém sua atividade se restringe aos peroxissomos (reação I-10). A enzima ascorbato peroxidase (APX) também catalisa a redução de H_2O_2 à H_2O , porém o ascorbato é o doador de elétrons, produzindo monodehidroascorbato (MDA), tal como na reação (I-11). A glutathione peroxidase (GPX) catalisa a reação (I-12) entre glutathione (GSH) com H_2O_2 e forma H_2O e glutathione oxidada (GSSC) (Pinto *et al.*, 2003). As reações (I-11) e (I-12) fazem parte do ciclo ascorbato-glutationa:

O ascorbato pode ser recuperado pela reação entre MDA e NAD(P)H, cuja catálise pela monodehidroascorbato redutase, forma $NAD(P)^+$ e ascorbato. Essa regeneração do ascorbato também se dá pela reação de glutathione (GSH) e MDA modificado, produzindo glutathione oxidada (GSSC) e ascorbato. A GSSC retorna ao estado reduzido (fórmula I-13) por meio da atividade da enzima glutathione redutase (GR):

Essas duas últimas reações perfazem o ciclo do ascorbato-glutationa (Figura 1.5). A redução da glutathione também é parte do ciclo da GPX. Outras enzimas que atuam no processo de remoção de radicais livres são a tioredoxina e peroxirredoxina.

Entretanto, o fato de o ciclo de ascorbato-glutationa estar presente em praticamente todos os compartimentos celulares, adicionado à alta afinidade de H_2O_2 à

enzima ascorbato peroxidase (APX), sugere que este seja o principal sistema de remoção de espécies reativas de oxigênio. A APX seria responsável pela fina modulação dessas substâncias, enquanto que a CAT seria responsável por remover o excesso de espécies reativas de oxigênio durante o estresse (Mittler, 2002).

Alguns estudos envolvendo os sistemas enzimáticos contra os radicais livres de oxigênio foram realizados em macroalgas. A regulação de SOD foi analisada em *Gracilariopsis tenuifrons*, com um estímulo à sua atividade com aumento de exposição dessa macroalga à radiação visível, com um ritmo diurno (Rossa *et al.*, 2002). Além disso, o pico de atividade de SOD nessa alga vermelha correspondeu ao momento de maior intensidade de radiação e fotossíntese. Essa maior intensidade luminosa causaria a formação de radicais livres de oxigênio, devidamente combatidos pelo aumento de atividade de SOD (Rossa *et al.*, 2002).

A comparação de tolerância entre duas algas vermelhas (*Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus*) foi realizada por Cólleen & Davison (1999a). A primeira espécie foi mais resistente ao estresse oxidativo induzido por adição de H₂O₂ ou fontes de oxigênio singlet, uma vez que apresentou maior quantidade de β-caroteno e α-tocoferol. Essas espécies foram altamente resistentes ao estresse oxidativo pela presença de altas atividades de SOD, comparando-se com os resultados de outros trabalhos, como o observado em *Fucus* spp. (Cólleen & Davison, 1999b). A atividade de enzimas antioxidantes foi maior em *M. stellatus* do que em *C. crispus*, de maneira geral. O uso de diferentes estratégias pode ser adotado de acordo com a presença de nitrogênio no meio, sendo que as algas expostas a ambientes com pouco N preferem usar ascorbato (por exemplo, *M. stellatus* em zonas altas de costão), e as que possuem N suficiente, preferencialmente aplicam glutathionas para controlar o estresse oxidativo (como visto em *C. crispus*) (Cólleen & Davison, 1999a). Esses autores consideram que a disponibilidade de N influencia também no conteúdo e atividade das distintas enzimas antioxidantes. Cólleen & Davison (1999c) observaram que os teores da proporção entre glutathiona e ascorbato das algas pardas do gênero *Fucus* foram baixos, relacionados com a adaptação à uma situação de limitação de N. Adicionalmente, Choo *et al.* (2004) observaram que o estresse oxidativo em duas espécies de algas verdes aumentou com alta intensidade de luz e baixas temperaturas, além do déficit de carbono durante o experimento. Entretanto, essas algas responderam de forma distinta, sendo *Cladophora glomerata* mais tolerante (com maiores atividades de CAT e APX) e *Enteromorpha ahlnieriana*, mais suscetível a esse tipo de dano. Essa segunda espécie ainda apresentou

maior liberação de H_2O_2 no meio em baixas temperaturas, estratégia que pode ser relacionada a evitar epífitas e predadores (Choo *et al.*, 2004).

O primeiro trabalho relacionando radiação UV aos sistemas antioxidantes em macroalgas foi realizado por Aguilera *et al.* (2002). Esses autores verificaram maior atividade de enzimas antioxidantes em algas árticas de zona supralitoral e mesolitoral superior do que aquelas no infralitoral. Essa resposta indicou que as algas expostas a maior estresse apresentam um sistema bioquímico mais eficaz de defesa. Além disso, as algas verdes tiveram maiores atividades de enzimas antioxidantes e maior conteúdo de ácido ascórbico do que as algas vermelhas ou pardas (Aguilera *et al.*, 2002). Os tratamentos com radiação UVA+UVB causaram aumentos na atividade de glutathione redutase em três espécies abordadas (*Monostroma arcticum*, *Coccotylus truncatus* e *Phycodrys rubens*). Essa atividade aumentou ainda mais com a exposição subsequente das algas a 24 h de escuro, indicando que o sistema bioquímico de dispersão de espécies reativas de oxigênio pode estar relacionado com a recuperação de um aparato fotossintetizante com fotoinibição (Aguilera *et al.*, 2002).

O efeito da UVB diretamente sobre o sistema antioxidante de *Ulva fasciata* indicou que os sistemas de defesa (incluindo o ciclo ascorbato-glutathione) funcionaram bem sob médias e baixas doses de UVB, já que o crescimento não foi alterado (Shiu & Lee, 2005). Nessas condições, houve estímulo à atividade de enzimas antioxidantes, após 4 dias de exposição à essa radiação. Por outro lado, sob altas doses de radiação UVB, os sistemas de defesa foram insuficientes, e as algas aumentaram a produção de O_2^- e H_2O_2 , numa evidência de dano oxidativo, com baixa indução do ciclo ascorbato-glutathione nessa situação, e baixa detoxificação desse radical livre de oxigênio sob altas doses de UVB (resultantes de intensidades $\geq 2,5 \text{ W.m}^{-2}$) (Shiu & Lee, 2005). Em estudo posterior, Lee & Shiu (2009) observaram um controle do estresse oxidativo por meio de APX e GR em *Pterocladia capillacea*, uma alga mais tolerante à radiação UVB. Por outro lado, *Gelidium amansii*, sensível à essa radiação, teve redução na atividade de GR, indicando que o ciclo ascorbato-glutathione pode ter sido inibido por essa radiação. Além disso, essa alga teve menos capacidade de remover H_2O_2 com APX, indicando a menor habilidade de dissipar radicais livres de oxigênio por *G. amansii* do que *P. capillacea* (Lee & Shiu, 2009).

Como revisado acima, os métodos de análise de reparo de danos causados por radicais livres de oxigênio passam pela atividade de algumas enzimas específicas, pela presença de produtos decorrentes das reações catalisadas por essas enzimas, ou ainda

pela presença de atividade de remoção de radicais livres por extratos ou substâncias fotoprotetoras, como os MAAs. Nenhum dos trabalhos acima referidos para macroalgas abordou os sistemas antioxidantes por meio da variação da expressão de genes codificantes para algum desses compostos. Neste trabalho, os níveis de expressão gênica de genes codificantes para sistemas de reparo (fotoliasas) tanto do DNA quanto de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase, glutathione redutase) foram avaliados por meio da técnica de PCR em tempo real.

1.2.6. Efeitos da radiação UV no metabolismo de C e N

O conteúdo de nitrogênio inorgânico na água do mar, com sua variação sazonal, foi sugerido como o principal fator que influencia o conteúdo de ficocoloides e o crescimento de populações naturais de algas marinhas (DeBoer *et al.*, 1978). O nitrogênio é necessário para a constituição de substâncias fundamentais para as células dos organismos, tais como aminoácidos, ácidos nucleicos, amino açúcares e aminas (Lobban & Harrison, 1994), e como frequentemente sua concentração é limitante no ambiente marinho, os estudos de nutrição de macroalgas têm sido voltados principalmente para este elemento (McLachlan, 1982). Além disso, a concentração de N na água varia consideravelmente por conta da atividade biológica, sendo 10^4 a 10^5 vezes mais concentrado em tecidos do que na água do mar (Lobban & Harrison, 1994).

O nitrogênio precisa ser captado e assimilado a diferentes compostos orgânicos nas macroalgas marinhas. Lobban & Harrison (1994) revisaram o tema, indicando que as macroalgas podem captar nitrogênio (i, inorgânico como NO_3^- e NH_4^+ , o qual é tóxico em altas concentrações para as células de algumas macroalgas; e ii, orgânico, como ureia). De acordo com a Figura 1.6, o nitrogênio captado pode ser estocado ou então assimilado por meio da conversão interna de NO_3^- a NO_2^- com a atuação da enzima nitrato redutase (NR), e posteriormente, de NO_2^- a NH_4^+ com a atuação da enzima nitrito redutase (NiR). O NH_4^+ é assimilado a glutamato e posteriormente convertido a outros aminoácidos e compostos nitrogenados (Lobban & Harrison, 1994).

Figura 1.6: Esquema de incorporação e fixação de N em aminoácidos (AA) no interior de uma célula de uma macroalga, indicando locais de consumo e estocagem de distintas substâncias nitrogenadas no interior da célula (Modificado de Lobban & Harrison, 1994). NR, Nitrato redutase. NiR, Nitrito redutase.

As macroalgas podem apresentar variações no seu metabolismo dependendo da fonte de nitrogênio disponível para seu desenvolvimento. As fontes de nitrogênio inorgânico mais utilizadas nos estudos com macroalgas são os íons nitrato (NO_3^- , forma mais abundante de N nos oceanos) e amônio (NH_4^+). Uma fonte alternativa utilizada como fonte de nitrogênio orgânico é a uréia. A concentração dessas fontes de nitrogênio podem variar no ambiente, como observado por Döhler *et al.* (1995) com a flutuação no total de NH_4^+ e NO_3^- . Alguns trabalhos reportam que as algas podem tomar preferencialmente os íons NH_4^+ como fonte de N (Figura 1.6). Por exemplo, DeBoer *et al.* (1978) observaram que o crescimento de *Gracilaria foliifera* e de *Neogardhiella baileyi* foi maior quando as algas foram supridas com NH_4^+ , em comparação com outras fontes de N, incluindo o NO_3^- . Döhler *et al.* (1995) observaram maior captação de NH_4^+ do que NO_3^- por parte de três espécies de macroalgas: *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina* e *Ulva lactuca*. Por outro lado, outras algas têm melhor capacidade de aproveitar NO_3^- , como o caso de *Porphyra tenera* que teve maiores taxas de crescimento com suprimento por NO_3^- do que com NH_4^+ (Iwasaki, 1967). Entretanto, algumas algas podem ser indiferentes à fonte de N, como o caso de *Gracilaria cornea*, cujo crescimento ao longo de oito semanas foi similar em tratamentos com as diferentes

fontes de nitrogênio: NO_3^- , NH_4^+ , $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ e ureia (Navarro-Angulo & Robledo, 1999). Além disso, algumas espécies podem apresentar maior crescimento quando NO_3^- e NH_4^+ são disponibilizados ao mesmo tempo, como o caso de *Gelidiella acerosa* (Mairh *et al.*, 1990). Uma regulação por meio da disponibilidade de nitrogênio para a síntese de ficocoloides é sugerida por DeBoer *et al.* (1978), para as algas vermelhas *Gracilaria foliifera* e *Neogardhiella baileyi*, e também por He *et al.* (2002) para *G. tenuistipitata*.

Além de tratamentos com o fator de disponibilidade de nitrogênio sobre a fisiologia de algas, alguns estudos foram realizados para verificar a interação desse fator com outros fatores abióticos, como com a temperatura (Gerard, 1997; Kim *et al.*, 2007), a irradiância em termos de intensidade (Algarra & Rüdiger, 1993), a qualidade de luz (Aparicio & Quiñones, 1991) e o suprimento de outros elementos, como o fósforo, no crescimento e composição química tissular de espécies de macroalgas (Björnsäter & Wheeler, 1990).

No caso de *Gracilaria tenuistipitata*, houve uma interferência de outros fatores físicos como a temperatura e a salinidade para a captação de NO_3^- , sendo menor a captação desse nutriente em baixas temperaturas, altas salinidades e plantas mantidas no escuro (Chiang & Lin, 1989). Tal como observado por D'Elia & DeBoer (1978) para duas algas vermelhas, Chiang & Lin (1989) verificaram para *G. tenuistipitata* que sob saturação de N, a captação desse nutriente diminuiu durante tratamento com luz e cessou completamente no escuro, havendo até perda de NO_3^- durante o experimento. Liu & Dong (2001) sugerem que *G. tenuistipitata* deveria ser cultivada em policultura com disponibilidade intermitente de nutrientes, após análise de sua capacidade de incorporar NH_4^+ . Nesta tese, optou-se por analisar os efeitos de variação no suprimento de N na forma de NO_3^- a fim de evitar possíveis danos por concentrações crescentes de NH_4^+ nos processos fisiológicos e bioquímicos de *G. tenuistipitata*.

A enzima nitrato redutase (NR) que permite a conversão de NO_3^- a NO_2^- , pode ter sua atividade mediada e estimulada pela luz, num processo de ativação da enzima, como mostrado para *Chlorella* por Tischner & Hüttermann (1978). Recentemente, Wanderley (2009) observou a regulação dessa enzima com redução de sua atividade em *Gracilariopsis tenuifrons* submetida a concentrações crescentes de NO_3^- . A autora propôs uma regulação por realimentação negativa da enzima. A NR é uma flavoproteína de alto peso molecular, que usa NAD(P)H ou NADH como poder redutor, e, por meio de dois centros de reação, catalisa a conversão de NO_3^- a NO_2^- . Lopes *et al.* (1997)

otimizaram o método de extração e análise da atividade específica dessa enzima em *G. tenuistipitata*. Esses autores verificaram um controle *in vitro* da atividade de NR nessa macroalga por meio da luz, com um ritmo circadiano mantido por até dez dias, e por meio da adição de NO_3^- às algas sujeitas à limitação de N (Lopes *et al.*, 1997). Uma atividade basal da NR durante o período noturno também foi observada. Lopes *et al.* (2002) caracterizaram a NR circadiana de *G. tenuistipitata*, composta por um tetrâmero de 4 subunidades monoméricas de 110 kDa.

Na água do mar, alguns dos principais elementos para as macroalgas estão como constituintes mínimos, como o caso do nitrogênio e o fósforo. Para as macroalgas sésseis e bentônicas, ocorre uma lavagem constante por um alto volume de água do mar, provendo, portanto, um volume suficiente de suprimento de nutrientes (McLachlan, 1982). Entretanto, o autor postula que é possível que alguns desses nutrientes, incluindo o nitrogênio, tenham uma redução sazonal na sua disponibilidade, para níveis abaixo dos detectáveis. Dessa forma, as algas marinhas precisam de mecanismos de acúmulo desses nutrientes. Nas algas vermelhas, a ficoeritrina pode servir de composto de estocagem de nitrogênio, como no caso de *Gracilaria tikvahiae* (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984). Além disso, a enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxidase (Rubisco) também pode ser fonte de nitrogênio em macroalgas, como reportado para *Gracilaria secundata* submetida a condições de ausência de nitrogênio (Ekman *et al.*, 1989). *Gracilaria cornea* submetida a tratamentos com deficiência de N também direcionou o nitrogênio presente nos seus pigmentos e proteínas para manter seu crescimento durante sete dias (Navarro-Angulo & Robledo, 1999). No caso de *G. tenuistipitata*, García-Sánchez *et al.* (1993) observaram que as principais fontes de N em caso de déficit nutricional deste composto são as ficobiliproteínas e as proteínas relacionadas ao complexo antena da fotossíntese.

O ambiente marinho possui carbono disponível para os organismos no formato de CO_2 e de HCO_3^- , correspondente a mais de 90% do C inorgânico (C_i) disponível nos oceanos. A entrada desses compostos para o interior das células se dá por troca iônica ou por difusão direta. Entretanto, o C é fixado no organismo por meio da atividade da enzima Rubisco, que necessita que ele esteja no formato de CO_2 . A quantidade de CO_2 disponível no ambiente marinho é menor do que o necessário para a fotossíntese, de modo que as algas precisam converter uma parte do HCO_3^- para CO_2 . Isso pode ser realizado externamente à célula por meio de anidrases carbônicas (ACs) externas, ou internamente, de modo a concentrar o C para a sua fixação durante o ciclo de Calvin-

Benson. Enquanto que algumas plantas terrestres desenvolveram mecanismos de incorporação do CO₂ em moléculas de malato, ou mesmo regulam a incorporação de CO₂ em momentos de ausência de luz para contrabalancear a perda de água (metabolismo CAM), em diatomáceas foi proposto a ocorrência de um ciclo de incorporação e estocagem de CO₂ em moléculas de 4 carbonos, e paralelamente, um mecanismo de concentração de carbono no cloroplasto para a atividade da Rubisco (Riebesell, 2000). O mesmo tipo de mecanismo tem sido sugerido para macroalgas, de modo a manter o crescimento desses organismos em circunstâncias com limitação de CO₂ disponível no ambiente marinho (Wu *et al.*, 2008). Esses autores ainda consideram que as macroalgas que conseguem utilizar o HCO₃⁻ poderiam ter uma vantagem adaptativa frente a outras incapazes de tal atividade.

A anidrase carbônica (AC) é uma metalo-enzima relacionada à presença de zinco no meio ambiente. A diminuição na quantidade desse metal no ambiente pode implicar na redução da incorporação de CO₂. Ela catalisa a seguinte reação (I-14), reversível:

Essa enzima pode estar localizada em diferentes regiões dentro da célula, de acordo com a necessidade dos organismos fotossintetizantes. Duas revisões amplas a respeito da presença dessa enzima e de sua atividade em micro e macroalgas foram realizadas respectivamente por Badger & Price (1994) e Sültemeyer (1998). As macroalgas teriam um mecanismo de concentração de C similar ao verificado em microalgas, usando principalmente HCO₃⁻ como fonte de carbono inorgânico. Os possíveis pontos de atuação de AC são representados pela Figura 1.7.

Figura 1.7: Modelo de assimilação e incorporação de C para macroalgas, indicando a presença de distintas anidrases carbônicas (ACs) no espaço periplasmático, no citoplasma e no interior do cloroplasto (modificado desde Badger & Price, 1994). A presença de ACs no citoplasma e no cloroplasto de macroalgas ainda é duvidosa, por isso representada seguida de um símbolo de “?”.

A AC, externamente, estaria envolvida na conversão de HCO_3^- para CO_2 , o qual se difunde para o interior da célula. Esse é o caso da captação de C_i por *G. tenuistipitata*, *Fucus serratus*, *Laminaria saccharina* e *Ulva rigida* (Björk *et al.*, 1993; Haglund *et al.*, 1992). Evidências de associação da AC com o cloroplasto foram verificadas em *G. tenuistipitata* por Haglund *et al.* (1992). Badger & Price (1994) ainda propõem a existência de uma AC citoplasmática que facilitaria a difusão de C_i para o cloroplasto, além de uma associação de AC com o carboxissomo ou os pirenoides das macroalgas (Figura 1.7).

O conteúdo de carbono pode ser medido diretamente no organismo, estimando-se o conteúdo total de carbono tecidual por meio de um analisador de elementos. Uma alternativa para se estimar o carbono se dá por meio da análise do total desse elemento no meio que circunda o organismo. Dessa forma, com um IRGA (“Infra-Red Gás Analyzer”, ou analisador de gás por infra-vermelho), pode-se medir o CO_2 do ambiente antes e depois de inserir um organismo fotossintetizante (método diferencial). Ou então, pode-se medir o total de CO_2 que o organismo produziu, de maneira direta (Bidwell & McLachlan, 1985). Esses autores consideram que o método diferencial permite uma análise mais precisa da quantidade de CO_2 fixado pelos organismos fotossintetizantes.

Outro método considerado foi o de estimativa de carbono fixado por meio da marcação com ^{14}C radioativo.

Além desses métodos acima descritos, a fixação do CO_2 pela planta pode ser feita de maneira indireta estimando-se a atividade da enzima AC. Dois métodos têm sido utilizados na literatura: o método potenciométrico de Haglund *et al.* (1992) e o método de Mercado *et al.* (1997), de estímulo à entrada de CO_2 na célula quando a AC externa é inibida por acetazolamida. Esses últimos autores sugerem a combinação de ambos os métodos para obter-se a atividade da AC de forma mais acurada. Pode-se estimar a atividade da enzima AC externa utilizando material vivo ou então a partir de um extrato macerado das algas com o qual se obtém a atividade total da enzima. Neste trabalho, por questões metodológicas, se optou por medir a atividade relativa da enzima total, e também o total de C fixado por meio de análise elementar.

Os experimentos de curto prazo de fotossíntese podem incorrer no erro de estimativa da produtividade das algas, porque mensuram o fluxo de C e não o carbono assimilado. Além disso, McLachlan (1982) considera que os meios de cultura apresentam baixa concentração de carbono e que os organismos cultivados em laboratório ou obtidos no campo possam estar limitados por ausência de C. Portanto, esse autor sugere que o C pode ser um fator limitante em cultivos de macroalgas feitos *in vitro* em laboratório. Em experimentos com aumento da disponibilidade de C_i para *Gracilaria* sp. foi observado um aumento na fotossíntese e no acúmulo de carboidratos internos dessa alga, porém com redução na afinidade da fotossíntese por C_i , além da diminuição do total de Rubisco e ficobiliproteínas, em comparação com amostras expostas a menores concentrações de C_i . Esse aumento no total de C também causou redução na captação de N, mesmo com concentrações suficientes de N disponíveis para esse organismo (Andria *et al.*, 1999). Há uma clara associação do regime de incorporação de C e o aproveitamento de N por esta espécie. Portanto, variações em um dos compostos podem ocasionar um desequilíbrio por causa do aproveitamento desfavorável de outro. No caso de *G. tenuistipitata*, por meio da análise da proporção entre C e N, García-Sánchez *et al.* (1993) detectaram deficiência interna de N. O aumento de concentração de CO_2 causou aumento no conteúdo de carboidratos da fotossíntese em *Porphyra leucosticta* (Mercado *et al.*, 1999). No caso de *Ulva rigida*, o aumento de crescimento sob altas quantidades de CO_2 foi relacionado ao incremento de N, e a liberação de C orgânico foi sugerida como um mecanismo de regulação do

conteúdo interno de C, de modo a manter a proporção entre C e N constante (Gordillo *et al.*, 2001).

A radiação UV pode ter efeitos sobre o processo de captação e assimilação de C e N em macroalgas. Efeitos da radiação UV na captação e no metabolismo de N foram observados em macroalgas por Döhler *et al.* (1995). A captação de amônio foi influenciada pela presença de radiação UV, tendo sido reduzida em *Fucus vesiculosus* e *Ulva lactuca*. A captação de nitrato foi menos afetada pela radiação UV nessas duas macroalgas, e também em *Laminaria saccharina*. Esses autores concluem que há um efeito da radiação UV na captação de nitrogênio inorgânico, mas que essa resposta é espécie-específica (Döhler *et al.*, 1995). Entretanto, todas as espécies testadas tiveram impacto negativo da radiação UVB sobre a captação de NH_4^+ . Essa resposta foi associada a um possível dano da radiação UVB sobre o fotossistema II, reduzindo o suprimento de energia e esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos (Döhler *et al.*, 1995). O efeito da ausência da radiação UVB pode ser também de estímulo à captação de NO_3^- , NH_4^+ ou uréia em curto prazo, como observado em uma comunidade de fitoplâncton (Fauchot *et al.*, 2000).

Os efeitos da radiação UV em enzimas relacionadas ao metabolismo de C e N (AC e NR) foram avaliados em distintas espécies de macroalgas (Flores-Moya *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1998; Figueroa & Viñegla, 2001; Huovinen *et al.*, 2007). A atividade de NR sofreu redução com o tratamento de PAR+UVA+UVB em *Dasycladus vermicularis*, o que não ocorreu em tratamentos com ausência de UVB, e a atividade de AC apresentou variações pontuais de redução sob PAR+UVA (Gómez *et al.*, 1998). Esses autores concluem que, embora existam efeitos da radiação UV sobre essas enzimas, esses efeitos não são claros, e somente tendências podem ser postuladas. Em outro estudo, a atividade da NR teve um ciclo diário de redução e recuperação da atividade ao longo do dia em *Plocamium cartilagineum*, quando tratada com PAR+UVA+UVB (Figueroa & Viñegla, 2001). Esse ciclo foi atrasado quando a radiação UVB foi suprimida, e um pico de atividade de AC foi observado no final do ciclo diário. O aumento de atividade de AC estimulado por radiação UV estaria relacionado ao aumento da síntese de esqueletos de carbono para prover a produção de compostos fotoprotetores (Figueroa & Viñegla, 2001). A radiação UV atuaria como sinal ambiental para controlar os ciclos de assimilação de C e N. Esse tipo de resposta foi variável em diferentes espécies de macroalgas do sul do Oceano Pacífico, já que em algumas algas houve aumento e noutras redução da atividade dessas enzimas após

exposição artificial a 6 h de PAR+UVA+UVB. Dessa forma, Huovinen *et al.* (2007) consideraram que o impacto da radiação UV nesses sistemas seja espécie-específico. Adicionalmente, muitos outros fatores regulam a atividade de AC e NR, de modo que isso poderia explicar a ausência de um padrão relacionado ao tipo morfofuncional, ao grupo taxonômico ou à profundidade de ocorrência de cada uma das 25 espécies analisadas (Huovinen *et al.*, 2007).

1.2.7. A relação entre o suprimento de nutrientes e a fotoproteção contra a radiação UV

Considerando estudos com microalgas, a limitação de nitrogênio pode levar a um aumento na sensibilidade de organismos marinhos à UVB. Lesser *et al.* (1994) relacionou a ausência de N com a menor capacidade de reparo a danos causados por UVB para a diatomácea *Thalassiosira pseudonana*. Geider *et al.* (1993) apontaram que a diatomácea *Pheodactylum tricornutum*, quando submetida a condições limitantes de N, apresentou uma redução em clorofila *a*, proteínas estruturais do fotossistema II e a Rubisco, paralelamente a um aumento dos pigmentos do ciclo das xantofilas. Essas alterações foram reversíveis ao transferir a diatomácea para condições não limitantes de N (Geider *et al.*, 1993). Num estudo com dinoflagelados, foi observado que em condições de déficit de nitrogênio, ocorre redução no crescimento, no volume celular e no conteúdo de clorofila (Litchmann *et al.*, 2002). Houve também um aumento à sensibilidade desses dinoflagelados à radiação UVB, com maiores taxas de dano em 60 minutos de exposição, ao passo que no caso de algas supridas com N, quase não foi verificada redução no rendimento quântico efetivo desses dinoflagelados (Litchmann *et al.*, 2002). Outro aspecto analisado nesse estudo foi o sistema de defesa contra UV, com o aumento de MAAs induzível sob tratamentos com PAR e UV desde que supridos de nitrogênio, enquanto que o conteúdo dessas substâncias diminuiu em organismos tratados com déficit de N (Litchmann *et al.*, 2002). Uma alocação de N a partir de MAAs para os pigmentos fotossintetizantes é sugerida, numa otimização de alocação de recursos em condições limitantes.

Os trabalhos feitos com macroalgas relacionando o suprimento de nutrientes e a fotoproteção têm aumentado nos últimos anos. Um exemplo é o trabalho de Grobe & Murphy (1998) com *Ulva expansa*, na qual o suprimento de N estimulou o crescimento, seja sob tratamento de UV ou não, de modo que a quantidade de N adicionada não afetou a sensibilidade da alga à UVB (Grobe & Murphy, 1998). Outro estudo, com a

alga vermelha *Porphyra columbina* apontou que a mesma teve estímulo para a síntese de MAAs sob tratamento com radiação UV quando incubada com 300 μ M de amônio (Korbee-Peinado *et al.*, 2004). Esse foi o primeiro estudo que indicou a relação da concentração de nutrientes e qualidade de radiação com o incremento de síntese de MAAs em macroalgas. Essa alga foi mantida sob cultivo em baixa concentração de N antes do experimento de suprimento de N e exposição à UV, de modo que havia uma quantidade basal mínima dessas substâncias no início do experimento. Condições de déficit de N implicaram em maiores reduções nos totais de ficobiliproteínas e maior fotoinibição (medida pelo rendimento quântico ótimo) de *P. columbina* (Korbee-Peinado *et al.*, 2004). O mesmo tipo de resultado, de redução nos parâmetros fotossintetizantes, foi observado em *Porphyra leucosticta* e *Porphyra umbilicalis* submetidas a tratamentos com radiação UV e limitação de N. Nessas duas espécies também foi observado aumento de MAAs estimulado por suprimento de amônio, o qual também causou aumento no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) (Korbee *et al.*, 2005a). As taxas de crescimento dessas espécies de *Porphyra* também foram menores em condições de déficit de N (Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a). O amônio teve um papel importante na fotoproteção de *Grateloupia lanceola* contra altas irradiâncias, mas não diretamente ligado à síntese de MAAs. Em conjunto com a radiação UV, o suprimento de nitrogênio estimulou a recuperação da fotossíntese desta macroalga (Huovinen *et al.*, 2006). Outro estudo, agora com uma alga parda (*Laminaria saccharina*), também mostrou que as respostas à radiação UV estão atreladas ao N. O suprimento desse elemento no meio de cultivo estimula o crescimento, o total de pigmentos fotossintetizantes e o conteúdo total de Rubisco nessa alga. A radiação UV inibiu o crescimento de *L. saccharina*, porém menos intensamente quando a alga foi cultivada sob suprimento de nitrogênio, e essa radiação não teve efeitos sobre os pigmentos ou o conteúdo tecidual de N (Davison *et al.*, 2007). Esses autores enfatizam que os efeitos de variação do crescimento de algas supridas ou limitadas de N podem ser relacionados às doses de radiação UV e à suscetibilidade interna de cada macroalga.

O status de suprimento de N também deve ser levado em conta quando se trata de respostas de macroalgas a tratamentos de radiação UV (Davison *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo foi feito por Zheng & Gao (2009), com *Gracilaria lemaneiformis*, expondo a alga a tratamentos com radiações PAR, PA e PAB, em combinação com o suprimento de concentrações crescentes de NO_3^- . O suprimento de N

permitiu maiores taxas de crescimento nessa espécie, as quais foram também mais elevadas sob tratamentos sem UV. A fotossíntese dessa espécie foi inibida na presença de radiação UVA e UVB, principalmente quando as algas estavam sem suprimento de N. A radiação UV também estimulou a síntese de compostos absorventes de UV (possivelmente MAAs; Zheng & Gao, 2009). Os resultados desse trabalho permitiram concluir que a radiação UV inibiu mais o crescimento do que a fotossíntese de *G. lemaneiformis*, e que o nitrogênio usado para o crescimento foi desviado para a síntese de compostos absorventes de UV. Desta forma, o nitrogênio pode tanto estimular sistemas de fotoproteção das macroalgas, estimulando a síntese de compostos fotoprotetores, ou então estimular a habilidade de recuperação e reparo de danos causados pela radiação UV.

1.2.8. Efeitos da radiação UV na fotossíntese – fotoinibição dinâmica e crônica

O processo da fotossíntese pode ser convenientemente dividido em quatro partes: i, absorção da luz e direcionamento de energia pelos sistemas antena; ii, transferência primária de elétrons nos centros de reação; iii, estabilização de energia por processos secundários; e iv, síntese e exportação de produtos estáveis (Blankenship, 2002). As primeiras três fases descrevem a “fase clara”, enquanto que a última se relaciona com a “fase escura” da fotossíntese. A Figura 1.8 apresenta um esquema da conversão primária de energia no processo de fotossíntese, ressaltando que a energia absorvida pode ser direcionada para três caminhos: a dissipação fotoquímica, calor e fluorescência. Neste trabalho, foram avaliados processos referentes à emissão de fluorescência, que indiretamente evidenciam o estado do funcionamento do aparato fotossintetizante como um todo. A fluorescência é emitida principalmente pelo fotossistema II (PSII). Os centros de reação (P_{680} e P_{700} , ou PSII e PSI) recebem o afunilamento da energia de excitação da clorofila *a* (Schreiber *et al.*, 1994). A dissipação fotoquímica cria um fluxo de elétrons e um poder redutor na forma de NAD(P)H, os quais são relacionados com a formação de ATP, fixação de CO_2 pela Rubisco e ainda a fotólise da água formando O_2 . O excesso de radiação pode causar a fotoinibição do aparato fotossintetizante, a qual é remediada, por exemplo, por meio de mecanismos de dissipação de energia excedente, como o ciclo de xantofilas (ver adiante).

Figura 1.8: Esquema da conversão primária de energia ($h\nu$) na fotossíntese que se relaciona com o rendimento quântico de fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. A energia absorvida pelos complexos antena (LHC) contendo os pigmentos acessórios da fotossíntese é dissipada como fluorescência, calor (dissipação não-fotoquímica) ou reações químicas (dissipação fotoquímica). Para abreviaturas, ver lista nas páginas 5 a 7. Figura modificada a partir de Schreiber *et al.*, 1994).

A fotossíntese pode ser avaliada experimentalmente por meio dos métodos seguintes: a fluorescência da clorofila *a* (Cla), a liberação de oxigênio e a assimilação de CO_2 . O primeiro método pode ser um bom indicador da captura de fótons pelo aparato fotossintetizante, das reações relacionadas com a fase clara e das reações de transporte de elétrons nos tilacoides dos cloroplastos e reações enzimáticas da fase escura (Schreiber *et al.*, 1986; Villafañe *et al.*, 2003). A relação entre a liberação de O_2 ou assimilação de CO_2 e a fluorescência da clorofila *a* tem sido demonstrada, validando esse método para estimar a fotossíntese (Genty *et al.*, 1989; Flameling & Kromkamp, 1998; Figueroa *et al.*, 2003), o qual tem sido aplicado para micro e macroalgas (Häder & Figueroa, 1997). Os parâmetros de fluorescência, como a produtividade quântica otimizada (F_v/F_m), representam a eficiência fotossintetizante máxima, e podem ser utilizados como indicadores de fotoinibição. Por outro lado, a taxa de transporte de elétrons (ETR, “electron transport rate”) pode ser relacionada à fotossíntese bruta (como a liberação de O_2), como observado por Figueroa *et al.* (2003), em condições de baixa irradiância para espécies de *Porphyra* e *Ulva*.

A radiação UV tem efeitos sobre o processo fotossintetizante de micro e macroalgas. Esses efeitos podem ter impactos consideráveis sobre níveis tróficos superiores no ecossistema aquático, bem como sobre os ciclos biogeoquímicos e as mudanças climáticas (Villafañe *et al.*, 2003).

Os principais alvos da UVB no aparato fotossintetizante têm sido relacionados à desestruturação do complexo coletor de luz, no centro de reação do fotossistema II (PSII), reduzindo a eficiência da transferência de energia do complexo antena ao PSII, como observado para *Macrocystis pyrifera* (Clendennen *et al.*, 1996). Esse tipo de dano pode ocorrer por meio de degradação da proteína D1 do PSII (Schnettger *et al.*, 1994). Critchley & Russel (1994) propuseram que parte dos PSII na membrana dos tilacoides está relacionada com a dissipação de energia e outra parte, com a transferência de elétrons para o fotossistema I (PSI). Esses autores propõem o envolvimento da proteína D1 (e sua degradação e síntese) na determinação da função do PSII (Critchley & Russell, 1994). A proteína D1 sofreria uma alteração conformacional que favoreceria sua desfosforilação irreversível. A regeneração do centro de reação passa pela síntese de uma nova proteína D1 (Critchley & Russell, 1994). Schnettger *et al.* (1994) consideraram que a ocorrência de fotoinibição é acentuada quando o sistema de degradação e síntese de novas proteínas D1 é modificado ou obstruído (como feito com o uso de inibidores de síntese proteica em cloroplastos). No processo de fotoinibição, ocorre a inativação de centros de reação, que, conseqüentemente, deixam de atuar transferência de elétrons. Estes CRs inativos são redirecionados para o sistema de fotoproteção e dissipação de energia, como sugerido acima para o PSII. A fotoinibição dinâmica pode ser referida ainda como uma estratégia de fotoproteção que interrompe a cadeia de transporte de elétrons sob condições de radiação solar elevada para dissipar o excesso de energia do PSII, de modo que inicialmente apenas uma perda na funcionalidade do centro de reação do PSII seja observada, sem necessariamente implicar em redução na concentração da proteína D1. No caso da irradiância elevada persistir por muito tempo, uma perda da rede de proteínas D1 pode ser observada (Russell *et al.*, 1995). Esse tipo de resposta, com dano no aparato fotossintetizante, foi observada em plantas de sol que apresentaram fotoinibição dinâmica, enquanto que plantas de sombra tiveram fotoinibição crônica (Häder & Figueroa, 1997). Xiong *et al.* (1997) sugerem que a maquinaria de reparo de proteínas seria danificada pela presença de UVB, impedindo a síntese da proteína D1 em organismos suscetíveis à UVB, num processo de fotoinibição crônica.

A fotoinibição da fotossíntese tem sido avaliada com experimentos de exposição das algas a tratamentos com radiação UV e subsequente recuperação dos talos sendo expostos a condições não estressantes. Dring *et al.* (1996) verificaram em diferentes espécies de algas vermelhas que houve um aumento de sensibilidade à radiação UV

com o aumento de profundidade, porém sem uma correlação exata entre esses dois parâmetros. Somente uma alga (*Porphyra umbilicalis*), dentre as analisadas nesse trabalho, não apresentou redução do rendimento quântico com a exposição a diferentes doses de UV. Além disso, a radiação UVA foi considerada responsável pela fotoinibição observada nas diferentes espécies analisadas (Dring *et al.*, 1996). Em macroalgas de zonas frias, o padrão de resposta foi similar, porém a fotoinibição foi causada por altas doses de radiação PAR e a recuperação foi atrasada com a aplicação de radiação UV (Hanelt *et al.*, 1997). Um trabalho com *Ulva pertusa* mostrou que a fotossíntese foi severamente fotoinibida num tratamento com PAR+UVA+UVB, em comparação a tratamentos com PAR ou PAR+UVA, e houve uma sensibilidade diferencial em partes do talo dessa alga, com as bordas do talo sendo mais sensíveis à radiação UVB do que a região central (Han *et al.*, 2003a). A fotoinibição foi avaliada por parâmetros de dissipação de energia, estimados a partir de medidas de fluorescência em *Ulva rigida*, e foi observado um aumento da dissipação não-fotoquímica em amostras tratadas com UVB em comparação com as algas que não receberam essa radiação, num indicativo de que esse parâmetro atesta a forte fotoinibição e a perda de energia excessiva como calor (Altamirano *et al.*, 2000).

Os danos na fotossíntese de macroalgas causados por radiação UV variam de acordo com a profundidade de crescimento dos organismos, sendo as algas de mesolitoral geralmente mais resistentes do que as de infralitoral (Figuerola & Gómez, 2001). A fotossíntese de *Chondrus crispus* foi afetada pela radiação UV, com redução no rendimento quântico ótimo e no rendimento quântico efetivo após a exposição dos talos a tratamentos PAR+UVA+UVB. Uma subsequente transferência dos talos para tratamento com PAR permitiu a recuperação do aparato fotossintetizante. Além disso, a menor redução do rendimento quântico ótimo de *Mastocarpus stellatus* (uma alga de locais mais rasos), indica que seu centro de reação foi menos danificado por radiação UVB do que o de *C. crispus* (Bischof *et al.*, 2000). Nesse experimento, o efeito se acumulou ao longo do tempo, uma vez que no quinto dia de tratamento, o efeito de UVB em reduzir o rendimento quântico foi muito maior do que no início do tratamento, o que se pode traduzir como um efeito crônico acumulado no fotossistema de *C. crispus* (Bischof *et al.*, 2000). Em um estudo com *Alaria esculenta*, uma alga parda, foi verificado um resultado diferente, no qual o aparato fotossintetizante se danificou menos com o tempo, depois de repetidas exposições à radiação UV e se recuperou completamente (Bischof *et al.*, 1999). No caso de *Porphyra leucosticta*, a fotoinibição

do aparato fotossintetizante em laboratório foi maior com o tratamento contendo UVB do que nos tratamentos com PAR+UVA ou somente PAR (Figuerola *et al.*, 1997). A radiação UVA, e depois o tratamento contendo radiação UVA+UVB, causaram uma maior queda no rendimento quântico do aparato fotossintetizante das amostras na metade do ciclo diário dessa espécie. A fotoinibição observada foi relacionada também a uma redução do conteúdo de pigmentos acessórios da fotossíntese em *P. leucosticta* (Figuerola *et al.*, 1997).

A fotoinibição pode ser distinta considerando variantes cromáticas dentro de uma mesma espécie, como observado por Ayres (2009). Essa autora encontrou diferenças de resposta de fotoinibição em *Gracilaria birdiae*, sendo que houve variantes de cor que tiveram fotoinibição dinâmica e outras que apresentaram fotoinibição crônica com o tratamento feito sob radiação UVB. O trabalho de van de Poll *et al.* (2001) também observou redução no rendimento quântico ótimo de diferentes espécies de algas vermelhas, neste caso oriundas de águas temperadas, após tratamento com radiação PAR+UVA+UVB. A fotoinibição causada por essa combinação de radiações foi maior do que aquela observada para tratamentos sem UVB, e foi completamente recuperada após 3h de exposição à radiação PAR. O reparo dos danos no aparato fotossintetizante pode ser relacionado com a temperatura utilizada nos experimentos, como verificado para *Gelidium pulchellum* por Gómez *et al.* (2001). Esses autores enfatizam a possibilidade de uma temperatura ótima para o melhor funcionamento dos sistemas de fotoproteção de um organismo.

Enquanto que os trabalhos acima citados apresentam efeitos negativos da radiação UVB na fotossíntese, estimulando a fotoinibição em diferentes espécies de macroalgas, houve um caso em que a radiação UVB apresentou efeito benéfico, estimulando a recuperação do aparato fotossintetizante fotoinibido de *Dictyota dichotoma* (Flores-Moya *et al.*, 1999).

Existem poucos trabalhos feitos considerando as doses de radiação UV acumuladas ao longo do tempo em comparação com a intensidade (efeito de reciprocidade). O trabalho de Cullen & Lesser (1991) mostrou que a fotoinibição de *Thalassiosira pseudonana*, em função da exposição à radiação UV, foi claramente dependente da escala de tempo. Entretanto, essa diatomácea apresentou a falha de reciprocidade, ou seja, para doses iguais de radiação, uma exposição em curto prazo com altas intensidades causou maior dano à fotossíntese dessa diatomácea do que uma exposição em longo prazo com intensidades menores (Cullen & Lesser, 1991).

Adicionalmente, esses autores observaram que *T. pseudonana* foi muito mais sensível à radiação UVB quando limitada em nitrato. Ainda com diatomáceas, porém usando outras espécies, Rech *et al.* (2005) verificaram a aclimação em longo prazo à radiação UV. Eles expuseram as diatomáceas ao total de 110 kJ.m⁻² de dose de UV, com a proporção entre UVA e UVB fixada. As respostas observadas variaram de acordo com a espécie, e a fotossíntese das diatomáceas foi pouco afetada pela radiação UV. Os autores consideram que a duração da exposição dos organismos à radiação UV é o fator principal para afetar o crescimento das mesmas, e que doses similares diárias podem causar diferentes respostas (Rech *et al.*, 2005), confirmando que os efeitos da radiação UV tanto dependem dos valores instantâneos aplicados quanto das doses totais diárias.

1.2.9. Efeitos da radiação UV no conteúdo pigmentar

Nas algas vermelhas, os complexos acessórios de coleta de luz para a fotossíntese incluem ficobiliproteínas (organizadas em ficobilissomos) e os carotenoides (Wehrmeyer, 1990; Grossman *et al.*, 1993). Esses organismos possuem cloroplastos com tilacoides não empilhados, com a presença dos ficobilissomos aderidos à membrana dos tilacoides. As bilinas são cromóforos tetrapirróis abertos, sendo presentes em animais e plantas. Em plantas, são ligadas a apoproteínas, formando conjugados denominados biliproteínas. No caso das algas, são denominadas de ficobiliproteínas, e ocorrem em cianobactérias, glaucófitas, algas vermelhas e criptomonados, funcionando como principais captadores da luz para o aparato fotossintetizante (Ó Carra & Ó hEocha, 1976). Esses autores sugerem que as ficobiliproteínas podem representar um tipo ancestral de fotorreceptor que foi perdido em outros grupos de algas e plantas ao longo da evolução. Os três pigmentos componentes dos ficobilissomos são a aloficocianina (APC), ficocianina (PC) e ficoeritrina (PE), que normalmente são compostos por duas subunidades protéicas, α e β . A subunidade α tem a massa molecular entre 15 e 20 kDa e a subunidade β tem massa molecular entre 17 e 22 kDa, sendo sintetizadas a partir do genoma plastidial (Egelhoff & Grossman, 1983). A transferência da energia absorvida é dirigida de um composto ao outro seguindo a ordem PE $\rightarrow$ PC $\rightarrow$ APC $\rightarrow$ Clorofila *a* (Grossman *et al.*, 1993). As apoproteínas dessas ficobiliproteínas são ligadas a diferentes tipos de cromóforos, sendo quatro atualmente conhecidos: ficoeritrobilina, ficocianobilina, ficourobilina e ficobiliviolina, e são ligados covalentemente às proteínas por ligações tioéter (Tandeau de Marsac, 2003). A montagem do ficobilissomo é relacionada à

presença de peptídeos de ligação entre esses pigmentos. Quatro grupos de peptídeos de ligação foram determinados por Wehrmeyer (1990), considerando o peso molecular e a função dos mesmos. De acordo com o tipo de peptídeo de ligação, distintos cromóforos se ligarão ao ficobilissomo, e isso influencia as propriedades de absorção de luz por parte desses compostos. Dentre os pigmentos componentes do ficobilissomo, o total de aloficocianina é mais estável do que as ficocianinas ou ficoeritrinas (Talarico, 1996).

Os carotenoides, que são hidrocarbonetos de 40 átomos de C, podem ser separados em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas (derivativos contendo oxigênio no seu esqueleto carbônico). Além da fotoproteção, como visto anteriormente, essas substâncias também são capazes de realizar a absorção de luz. Como coletores de luz, os carotenoides absorvem fótons de comprimentos de onda diferentes da clorofila *a*. A energia de excitação do carotenoide em estado singlet é transferida para a clorofila, como na reação (I-15) (Ramirez, 1992):

A síntese de carotenoides ocorre nos cloroplastos, e compreende uma ação sucessiva de enzimas a partir de um licopeno linear comum a todos eucariotos fotossintetizantes, o qual inicialmente leva à formação de α -caroteno (ramo α) ou β -caroteno (ramo β). Por meio de hidroxilação do β -caroteno, no ramo β , é produzida a zeaxantina, e a partir da epoxidação dessa substância, são formados anteraxantina e violaxantina (Cunningham & Gantt, 1998). A hidroxilação de anéis de α -caroteno causa a produção de luteína (Esteban *et al.*, 2009). A preferência por uma das duas rotas foi referida para distintos grupos de algas vermelhas (Schubert *et al.*, 2006), e uma tentativa de associação do conteúdo de carotenoides com a filogenia de distintos grupos taxonômicos foi proposta por esses autores.

A radiação UV danifica os pigmentos e reduz seu conteúdo, possivelmente por três razões: i, os pigmentos sofrem fotodegradação quando absorvem a energia da radiação UV diretamente e, ii, por fotossensibilidade, e iii, por produção de radicais livres de oxigênio (Roleda *et al.*, 2004). A radiação UVB causou estresse oxidativo em *Gelidium amansii* (Lee & Shiu, 2009). No caso de *Gracilaria edulis*, foi observada uma redução do conteúdo pigmentar com a exposição à UVB, bem como uma diminuição no rendimento de ágar dessa espécie (Eswaran *et al.*, 2002). Uma desmontagem dos ficobilissomos de cianobactérias foi relatado por Sinha *et al.* (1995), prejudicando sua função como pigmentos acessórios. Esse processo seria causado pela destruição das

proteínas de ligação dos componentes do ficobilissomo (Sinha *et al.*, 1995). Aguirre-von-Wobeser *et al.* (2000) comentam que esse desacoplamento dos pigmentos antena do aparato fotossintetizante pode ser uma estratégia de fotoadaptação para proteger o fotossistema II de danos quando exposto às altas intensidades de PAR e UV. Em *Porphyra umbilicalis*, tratada sob níveis naturais de UVB, foi observado que a concentração dos pigmentos de talos expostos à PAR, PAR+UVA e PAR+UVA+UVB não variou, enquanto que os picos de absorção sofreram alteração ao longo do tempo. Isso pode ser explicado como um empacotamento (sem fotodegradação) dos pigmentos como uma maneira de fotoproteção das algas contra a radiação UV (Aguilera *et al.*, 1999).

Por outro lado, a síntese de pigmentos pode ser estimulada por tratamentos contendo UVB, como no caso de *Ulva rigida*, que aumentou seu conteúdo de clorofilas e carotenoides quando tratada com essa radiação, em detrimento do crescimento (Altamirano *et al.*, 2000). Essa espécie ainda apresentou capacidade de rápida aclimação do crescimento a novas condições de cultivo. Por outro lado, *Ulva lactuca* teve redução no seu total de clorofilas após exposta por 5 horas à radiação UVB, e outros pigmentos incluindo carotenoides foram drasticamente reduzidos com a exposição da alga à radiação UVA (Döhler *et al.*, 1995). Os pigmentos de *Porphyra leucosticta* foram regulados e sofreram fotodestruição, sendo relacionados ao processo de inibição da fotossíntese nessa espécie. O tratamento com PAR+UVA+UVB causou forte diminuição no conteúdo de ficoeritrina e ficocianina nessa espécie (Figuerola *et al.*, 1997). Já no caso de estágios jovens e maduros de *Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus*, o tratamento com PAR+UVA+UVB causou aumento no total de carotenoides e não no conteúdo de clorofilas, possivelmente relacionado ao papel fotoprotetor desses carotenoides na dissipação de energia da radiação UV (Roleda *et al.*, 2004).

A exposição de algas à radiação UV causou danos ultraestruturais, tanto no caso de microalgas (Meindl & Lütz, 1996) quanto no caso de macroalgas (Poppe *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2003; Navarro, 2004; Ayres, 2009). No caso de *Palmaria decipens*, houve desarranjo das membranas dos tilacoides dos cloroplastos, formando vesículas (Poppe *et al.*, 2002). No caso de outras três espécies de macroalgas, esse efeito também foi observado, mas diferencialmente ao longo do tempo (Poppe *et al.*, 2003), denotando uma sensibilidade diferencial à UV de diferentes macroalgas, por conter quantidades distintas de compostos fotoprotetores como os MAAs. No caso de *P. decipens*, houve ainda um processo de fotoinibição dinâmica da fotossíntese, e uma redução do conteúdo

pigmentar. Porém, ao longo do tempo foi verificada uma recuperação ultraestrutural e fisiológica dessa alga, ainda durante a exposição à UVB (PAR+UVA+UVB) (Poppe *et al.*, 2002).

O processo de adaptação cromática complementar foi reportado para espécies de algas vermelhas, relacionado com a distribuição de pigmentos acessórios (Talarico & Maranzana, 2000). De acordo com esse mecanismo, as algas vermelhas do fundo possuem mais ficobiliproteínas por causa da predominância de radiação verde nessa faixa da coluna de água (relação de pigmentos com a qualidade de luz) ou que a quantidade de pigmentos acessórios do tipo ficobiliproteínas é maior por causa de menor intensidade de radiação que atinge esses organismos de profundidade (relação de pigmentos com quantidade de luz) (Merril *et al.*, 1983). Em algas vermelhas de mesolitoral, foram observados maiores conteúdos de ficocianinas, que absorvem mais a radiação vermelha, disponível nesse ambiente (Czeczuga, 1985). Talarico considera que a adaptação à qualidade de luz seria mais relacionada à cianobactérias, enquanto que algas vermelhas seriam adaptadas às distintas intensidades de luz (Talarico, 1996). Essas algas vermelhas teriam fotorreceptores modulando seu conteúdo pigmentar (López-Figueroa & Niell, 1989), sendo dois grupos possíveis de serem discernidos: o primeiro contendo algas do gênero *Porphyra* teria o controle pelo fitocromo para a síntese de clorofila, e o segundo, com outras espécies de algas vermelhas, a síntese de clorofila seria regulada por uma interação entre um fitocromo e um fotorreceptor de luz azul ou criptocromo (López-Figueroa & Niell, 1991). O estímulo ao acúmulo de pigmentos fotossintetizantes foi relacionado com a fotoestimulação do transporte de NO_3^- e com a ativação da enzima NR (López-Figueroa & Rüdiger, 1991). Desta forma o controle da síntese de pigmentos fotossintetizantes está intimamente relacionado com o controle do metabolismo de N (Rüdiger & López-Figueroa, 1992; López-Figueroa, 1993; Figueroa *et al.*, 1995)

A quantidade de ficoeritrina de *Gracilaria cornea* aumentou após tratamento com radiação UV em detrimento da diminuição de ficocianina (Sinha *et al.*, 2000). Esses autores sugerem que a adaptação cromática dos pigmentos de *G. cornea* tenha ocorrido por estímulo da radiação UV, e que a ficoeritrina seja uma segunda linha de defesa contra incrementos de radiação UV (Sinha *et al.*, 2000). O empacotamento desses pigmentos, causado por alterações no fluxo de energia entre as ficobiliproteínas e a clorofila *a*, poderia ser uma maneira de fotoproteção, como observado por Aguilera *et al.* (1999) em *Porphyra umbilicalis* e já sugerido em cianobactérias por Sinha *et al.*

(1995). Adicionalmente, a formação de agregados de ficoeritrina livres no estroma do cloroplasto foi observada por microscopia eletrônica em algas vermelhas (Talarico, 1996). Isso decorreu da dissociação de ficobilissomos, e, além disso, pode ter havido uma função fotoprotetora por dissipação de energia e empacotamento de pigmentos. O papel da ficoeritrina como composto de fotoproteção contra a radiação UVB foi recentemente sugerido por Ayres (2009) em estudo com variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae*.

1.2.10. Efeitos da radiação UV no crescimento

Um aspecto da fisiologia dos organismos marinhos que tem sido utilizado como parâmetro para o entendimento do funcionamento geral dos mesmos é o crescimento, que pode ser interpretado como um fator integrador de diferentes processos. Em *Laminaria saccharina* e *Gracilaria lemaneiformis*, as variações de crescimento fornecem evidências de que a limitação de nutrientes como o N está diretamente relacionada à suscetibilidade da macroalga à radiação UV (Davison *et al.*, 2007; Zheng & Gao, 2009). A radiação UVB afetou negativamente o crescimento de *Chondrus crispus* em laboratório, com o uso de doses de PAR+UVA+UVB artificiais similares ao observado no campo (Franklin *et al.*, 1999). Essa radiação também causou menores taxas de crescimento em *Fucus gardneri*, enquanto que a radiação PAR+UVA apresentou estímulo ao crescimento dessa alga (Henry & van Alstyne, 2004). Para a alga verde *Ulva expansa*, tratamentos contendo UVB resultaram em menores taxas de crescimento (Grobe & Murphy, 1994; Grobe & Murphy, 1998). Já para *U. pertusa*, Han *et al.* (2003a) observaram que a radiação UVB estimulou o crescimento em detrimento da inibição do processo de esporulação. Os autores consideram esse tipo de resposta como um processo de sinalização entre duas vias antagônicas, a reprodução e o crescimento (Han *et al.*, 2003a). Adicionalmente, as algas podem se aclimatar a longo prazo à radiação UVB, desviando a energia que seria empregada para o crescimento para a formação de alguma estrutura fotoprotetora. Isso foi observado em *Ulva rígida*, que teve redução nas taxas de crescimento quando submetida à UVB após 7 dias, em comparação com tratamentos com PAR, mas que depois de 20 dias de experimento, essa diferença não foi observada entre os tratamentos (Altamirano *et al.*, 2000). A concentração de pigmentos nessa espécie aumentou com o tratamento contendo radiação UVB, e esse tipo de tratamento foi responsável por mais de 78% das variações sazonais no conteúdo interno de C e N. Pang *et al.* (2001) considera que os efeitos da

radiação UVB que implicam em redução no crescimento, como observado para *Delesseria sanguinea*, possam ser consequência de dois possíveis motivos: diminuição no acúmulo de produtos da fotossíntese em decorrência de fotoinibição e atraso deletério ou interrupção da divisão celular por formação de dímeros no DNA.

1.3. Justificativa

Uma vez que as doses de radiação UV tendem a se elevar no decorrer das próximas décadas, é importante compreender os mecanismos de resposta dos organismos frente a essa variável ambiental. Espera-se que ocorra um aumento da radiação UVB nas zonas tropicais, onde esta já é mais elevada do que nas demais regiões do globo, o que reforça a necessidade de estudar organismos dessas zonas, como o caso de *G. tenuistipitata*. Os estudos com macroalgas tropicais relativos a processos de fotoproteção são escassos até o momento (Bischof *et al.*, 2006).

Os estudos sobre o tema podem abordar três diferentes estratégias: exposição à radiação solar, com seletividade por meio de filtros; exposição à radiação solar com o acréscimo de radiação artificial; e por fim, exposição plena à radiação artificial (Villafañe *et al.*, 2003). Os estudos com radiação artificial (controlando a qualidade e a intensidade das radiações utilizadas) permitem compreender a regulação e os mecanismos do metabolismo de um organismo, incluindo a variação e síntese de compostos que podem ter grande importância econômica, como aqueles relacionados a algum processo específico, incluindo a fotoproteção.

Os estudos sobre a interação entre variáveis atende aos novos rumos da ecofisiologia moderna, com relevância da investigação sobre mudanças climáticas (Vitousek, 1994), incluindo as variações da radiação UV. Os desenhos experimentais numa abordagem integrada obrigam a se conhecer previamente o efeito das variáveis separadamente. No caso deste trabalho, se escolheu uma espécie na qual já se conhecem informações preliminares em relação à incorporação e assimilação de N (García-Sanchez *et al.*, 1993; Lopes *et al.*, 1997, 2002), e ainda se sabe sobre o metabolismo de C (Haglund *et al.*, 1992; Haglund & Pedersen, 1992; García-Sanchez *et al.*, 1994, 1996a). Essa espécie também é altamente tolerante ao cultivo em diferentes salinidades, irradiâncias e temperaturas (Macchiavello *et al.*, 1998), sendo conhecidas as condições ótimas de cultivo em laboratório. Entretanto, o conhecimento dos efeitos da radiação UV sobre essa alga é escasso, havendo poucas abordagens referentes aos compostos

fotoprotetores dessa espécie, como os trabalhos de Cardozo *et al.* (2006) e Cardozo (2007).

Há carência de abordagens em macroalgas que incluam o tempo de exposição e a resposta relacionada à exposição em curto ou longo prazo à UV (efeito de reciprocidade). Além disso, a abordagem incluindo a análise de expressão gênica aliada à fisiologia de uma macroalga marinha também é nova. A escolha de *G. tenuistipitata* para este estudo se deu com base na existência de trabalhos preliminares de biologia molecular com a espécie (Hagopian *et al.*, 2002; 2004; Falcão, 2006; Tonon, 2009) que forneceram sustentação para executar os procedimentos incluídos nesta tese.

Por fim, o conhecimento de respostas integradas frente à interação entre N e UV está em crescente expansão, sendo uma área recente de estudos em macroalgas (Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a; Korbee *et al.*, 2006; Huovinen *et al.*, 2006; Davison *et al.*, 2007; Zheng & Gao, 2009). Esta tese se justifica para incrementar as informações referentes a este tópico em macroalgas. A possibilidade de abordar diferentes estratégias de resposta paralelamente permite inclusive conhecer a ordem de ativação destas frente a diferentes tipos de estresse.

Desta forma, se justifica o estudo dos efeitos de variáveis integradas, com abordagens integradas, a fim de se conhecer mais profundamente sobre as respostas ecofisiológicas de *G. tenuistipitata* frente a uma combinação de fatores de estresse (N e UV) em laboratório.

1.4. Hipóteses e objetivos

1.4.1. Hipóteses do trabalho e objetivo geral

Este trabalho partiu da hipótese de que a maior disponibilidade de nitrogênio inorgânico favoreça a fotoproteção frente à radiação ultravioleta por meio do acúmulo de compostos fotoprotetores nitrogenados (MAAs) e pelo incremento na atividade fotossintetizante, a qual proveria mais energia para ser investida em sistemas de fotoproteção. Por outro lado, se esperaria que a síntese de MAAs e outros compostos nitrogenados (como ficobiliproteínas) e ainda a ação de enzimas reparadoras do dano no DNA fossem reguladas por meio da radiação UVA a partir da ação de fotorreceptores específicos não fotossintetizantes, como reportado em outras algas. A atuação de sistemas antioxidantes seria estimulada pela presença de radiação UV, assim como a expressão dos genes que codificam para possíveis fotoliasas e o grau de fotoproteção

deitaria da dose de radiação e do nitrogênio disponível. Por fim, o crescimento (como uma variável integradora) seria maior em tratamentos com maiores concentrações de N, com possível maior dano da radiação UVB do que da radiação UVA.

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os mecanismos de fotoproteção de *Gracilaria tenuistipitata* mediante o tratamento com radiação ultravioleta e diferentes concentrações de nitrogênio, abordando alguns aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares dessa espécie.

1.4.2. Objetivos específicos

O objetivo geral pode ser desmembrado nos seguintes objetivos específicos:

- i. Verificar a saturação de alguns componentes da fotoproteção de *G. tenuistipitata* contra a radiação ultravioleta, por meio do cultivo de algas em concentrações crescentes de nitrogênio em radiação PAR+UVA+UVB.
- ii. Analisar se a fotoproteção de *G. tenuistipitata* está vinculada à dose ou à intensidade de radiação ultravioleta (efeito da reciprocidade).
- iii. Verificar aspectos relacionados com a fotoproteção (fotoinibição dinâmica e acúmulo de MAAs e carotenoides) de *G. tenuistipitata* com relação a tratamentos com radiação ultravioleta (PAR+UVA+UVB) comparados a tratamentos com ausência de radiação UVB (PAR+UVA) ou sem radiação UV (PAR), em algas cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura.
- iv. Analisar mecanismos fisiológicos e moleculares da fotoproteção para talos de *G. tenuistipitata* pré-aclimatados por uma semana a diferentes tipos de radiação.
- v. Avaliar a capacidade de dano e recuperação do aparato fotossintético de *G. tenuistipitata* aclimatada em diferentes tipos de radiação e condições de suprimento de N, após o tratamento com ausência ou presença de radiação ultravioleta.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Para realização deste trabalho foram utilizadas porções apicais com quantidades similares de ramificações de talos de um tetrasporófito de *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Figura 2.1), provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A cepa original desse tetrasporófito foi coletada por E.C. Oliveira em Haikou, Ilha de Hainan, China, em 1990. Esses fragmentos foram transferidos e aclimatados às condições de cultivo na Universidad de Málaga.

Figura 2.1: Porções apicais do tetrasporófito de *Gracilaria tenuistipitata*, utilizadas para os experimentos deste trabalho.

2.2. Condições de cultivo

As algas foram cultivadas em frascos cilíndricos de metacrilato Plexiglas® (Figura 2.2), com tampa quadrada e preenchidos com 1 L de água do mar. Os frascos continham algas na proporção de 2 g.L⁻¹ no início dos experimentos, e foram mantidos numa câmara de cultivo de organismos do Departamento de Ecología da Facultad de Ciencias da Universidad de Málaga. A temperatura da câmara de cultivo esteve sempre em 25±1 °C. A aeração foi fornecida por um compressor e mantida constante ao longo dos experimentos.

A água do mar foi coletada na Playa de Misericórdia (Málaga) e levada à Universidad de Málaga, onde foi armazenada em tanques para decantação. Previamente ao uso nos experimentos, essa água foi filtrada à vácuo com uso de filtros de microfibras

de vidro com poro de 0,7 μm (Whatman. GF/F de 47 mm). A salinidade da água foi ajustada para 20 psu com adição de água destilada (Macchiavello *et al.*, 1998).

A solução de enriquecimento de Von Stosch (Edwards, 1970) preparada de acordo com a Tabela 2.1 foi adicionada à água do mar diluída (8 mL de solução de enriquecimento para 1 L de água do mar). A fonte de nitrogênio foi o NaNO_3 , cuja concentração final variou entre 0 e 2 mM, de acordo com os experimentos realizados (ver detalhamentos nos desenhos experimentais). Um exemplo do sistema de cultivo está representado na Figura 2.2.

Tabela 2.1: Meio de enriquecimento da água do mar de Von Stosch (modificado de Edwards, 1970).

Sais	Diluição	Volume final
Na-EDTA	0,4650 g / 100 mL	100 mL
NaNO_3	5,3125 g / 100 mL	100 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 (12\text{H}_2\text{O})$	1,3438 g / 100 mL	100 mL
$\text{FeSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$	0,0348 g / 100 mL	100 mL
$\text{MnCl}_2 (4\text{H}_2\text{O})$	0,0124 g / 500 mL	100 mL
Tiamina	0,2 g / 100 mL	12,5 mL
Biotina	0,01 g / 100 mL	1,25 mL
Cianocobalamina	0,01 g / 100 mL	1,25 mL

Figura 2.2: Sistema de cultivo de *Gracilaria tenuistipitata* em frascos de metacrilato, com aeração, água do mar enriquecida com solução de VS e sistema de iluminação.

2.3. Fontes de radiação e aparelhos para medidas de radiometria

A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” (Phillips TL-D 36W/54-765) e a radiação UV foi proveniente de lâmpadas Q-Panel UVA 340 (Q-Panel Co., Cleveland, OH, USA) ou lâmpadas de UVB (Philips Ultraviolet-B TL40W/12RS). O espectro de radiação das lâmpadas utilizadas é apresentado na Figura 2.3. O fotoperíodo utilizado nos experimentos foi de 12 h.

As medidas de intensidade de irradiância PAR foram obtidas, em $\mu\text{mol de f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, por meio de um medidor de quanta Li-Cor Biosciences modelo Li-250A®, conectado ao sensor modelo US-SQS/L S/N:SQSA0235 (Heinz Walz GbmH, 91090, Effeltrich, Alemanha). A intensidade de radiação UV foi obtida, em W.m^{-2} , com um radiômetro MACAM Ultraviolet Radiometer, conectado aos sensores específicos para UVB ou UVA. As medidas de espectro de radiação total emitidas pelas fontes de radiação (PAR e/ou UV) foram obtidas por meio do espectrorradiômetro SphereOptics SMS-500 (Spectral Measurements System, Espectrómetro UV-Visible).

Figura 2.3: Espectro de radiação das fontes de radiação PAR e UV utilizadas no trabalho. Lâmpadas Phillips TL-D 36W/54-765 (PAR), Q-Panel UVA 340 (UVA e B) e Philips Ultraviolet-B TL40W/12RS (UVB).

As doses de radiação biologicamente efetivas foram calculadas para os danos em cloroplastos e no DNA, de acordo com Jones & Kok (1966) e Setlow (1974) (Figura 2.4; Anexo 1). A cada experimento foi possível, portanto, se obter as intensidades de

radiação, bem como a dose total recebida em um determinado intervalo de tempo, pela integração do espectro de radiação emitido pelas lâmpadas e recebido pelas algas. Além disso, foram obtidas as doses biologicamente efetivas para danos no DNA e para a fotoinibição da fotossíntese.

Figura 2.4: Espectros de ação estimados para o dano no DNA (Setlow, 1974) e inibição da fotossíntese de cloroplastos isolados de espinafre (Jones & Kok, 1966). Os dados foram normalizados a 280 nm.

2.4. Tratamentos de radiação executados nos diferentes experimentos

Os tratamentos de radiação foram obtidos por meio da combinação entre as fontes de radiação acima discriminadas e filtros de corte, posicionados ao redor dos frascos de metacrilato. A transmitância dos filtros é apresentada na Figura 2.5. Com a aplicação dos mesmos, somente o espectro de interesse atingiu as algas, de acordo com os tratamentos:

- PAR: (400-700nm) obtido por meio de lâmpadas “luz do dia” e do filtro de corte Ultraphan 395 (Digefra GmbH, Munich, Germany). Com esse tratamento, as plantas não receberam radiação UV.
- PA: (320-700nm) obtido por meio de lâmpadas do tipo “luz do dia” e Q-Panel, com aplicação do filtro de corte Folex 320 (Folex GmbH, Dreieich, Germany) ao redor dos frascos, resultando em recepção de radiação PAR e UVA pelas plantas.
- PAB: (295-700nm) representando o espectro total emitido pelas lâmpadas “luz do dia” e Q-Panel, com a aplicação do filtro Ultraphan 295 (Digefra GmbH, Munich, Germany),

para eliminar quaisquer traços de UVC que pudessem estar presentes pela emissão de alguma das lâmpadas. Assim, as algas receberam somente radiação PAR, UVA e UVB. - PB: (295-320 e 400-700nm) predominantemente UVB e PAR, obtidos por meio da lâmpada Philips Ultraviolet-B TL40W/12RS (para emissão da radiação UVB). Entretanto, pequenas quantidades de UVA também eram emitidas pela lâmpada, acoplada a lâmpadas de “luz do dia” (para emissão de PAR).

Para cada um dos experimentos, os espectros recebidos pelas algas foram calculados multiplicando-se o espectro de radiação recebido pelas amostras pelo fator de corte, que representam, proporcionalmente, o quanto de radiação em cada nanômetro é transmitido pelo filtro. Esses fatores foram calculados medindo-se o espectro total de radiação emitido pelas lâmpadas “luz do dia” e Q-Panel e, posteriormente, os espectros com a intercalação do filtro entre a fonte emissora e o sensor do espectrorradiômetro utilizado. Além do espectro recebido em cada tratamento para cada experimento, são também apresentados os valores de doses (total e ponderada) e intensidades de radiação, em cada tópico correspondente dos desenhos experimentais.

Figura 2.5: Transmitância dos filtros utilizados no trabalho: Ultraphan 295, Folex 320 e Ultraphan 395. Ver referências no texto.

2.5. Variáveis dependentes analisadas

2.5.1. Análises fisiológicas e bioquímicas

Os fatores analisados em relação à fisiologia e a bioquímica de *G. tenuistipitata* nos diferentes experimentos foram os seguintes: conteúdo pigmentar (por espectrofotometria ou cromatografia), proteínas solúveis totais, conteúdo de C e N,

atividade fotossintetizante, atividade específica da anidrase carbônica, aminoácidos tipo micosporinas e crescimento.

2.5.1.1. Conteúdo pigmentar

O conteúdo pigmentar (clorofila *a*, ficobiliproteínas e carotenoides) foi obtido por meio de espectrofotometria ou por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.5.1.1.1. Extração e quantificação de pigmentos por espectrofotometria

2.5.1.1.1.1. Clorofila a (Cla)

Dois procedimentos foram usados para extrair e analisar o conteúdo de Cla. O primeiro deles utilizou acetona 90% e o segundo, N,N- dimetilformamida (DMF), mais tóxico do que o primeiro. O método com acetona é mais trabalhoso do que aquele com DMF, porque implica em macerar as amostras. Quando o tempo disponível para proceder às extrações por meio de acetona 90% era curto, foi adotado o método com DMF. Além disso, a acetona evapora muito depressa, de modo que cuidados foram tomados para evitar a perda de solvente em relação ao soluto no momento da extração. O método de extração com DMF foi realizado nos experimentos 2 e 5, enquanto que a acetona 90% foi empregada nos demais experimentos. O rendimento dos dois métodos foi similar.

No caso da extração com acetona 90%, amostras de 20 mg de massa fresca de algas provenientes dos experimentos foram congelados. Essas amostras foram maceradas em almofarizes com pistilo com a adição de nitrogênio líquido. Ao macerado foi adicionado 1 mL de acetona 90%. Esse extrato foi centrifugado a 12000 g, 4°C, por 10 min. O sobrenadante do extrato foi lido em espectrofotômetro UV-1603 UV-Visible Shimadzu ® entre 400 e 750 nm.

No caso de extração em DMF, 1 mL dessa substância foi adicionado à 20 mg de massa fresca de algas provenientes dos experimentos e congeladas. Essa mistura permaneceu por 24h no escuro, a 4°C. A seguir, o extrato obtido foi lido em espectrofotômetro, de 400 a 750 nm.

Os dados de absorbância obtidos foram usados para o procedimento de quantificação dos pigmentos. Quando os valores de absorbância excederam 1, as amostras foram diluídas em acetona 90% ou DMF, de acordo com o caso. O conteúdo de Cla foi estimado a partir da fórmula (M-01), modificada de Jeffrey & Humphrey (1975) para extratos obtidos a partir de acetona 90% ou da fórmula (M-02), alterada de

Wellburn (1994), para extratos obtidos a partir de DMF (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A modificação dessas fórmulas significou a remoção da porção da fórmula referente ao pico de absorção pela clorofila *b*, ausente em algas vermelhas. Portanto:

$$\text{Cla}_{\text{acetona } 90\%} = 11,93 \cdot (A_{664} - A_{750}) \quad (\text{M-01})$$

$$\text{Cla}_{\text{DMF}} = 11,65 \cdot (A_{664} - A_{750}) \quad (\text{M-02})$$

O total de Cla foi ajustado para mg por g de massa seca da amostra.

2.5.1.1.1.2. Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas foram extraídas a partir de 50 mg de massa fresca de amostras de algas congeladas no decorrer dos experimentos. Essas amostras foram maceradas em almofarizes com pistilos, com uso de nitrogênio líquido no escuro. Ao macerado, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato (0,1 M Na_2HPO_4 , 4 mM ácido etilenodiaminotetraacético, EDTA, 2 mM Triton X-100, 0,2% PVP e 2 mM fenilmetilsulfonil fluorídeo, PMSF, pH 6,5). Os extratos foram centrifugados a 10000 g por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi recuperado e as amostras resultantes foram acondicionadas em gelo. Parte desse sobrenadante (0,2 mL) foi separada para a análise de proteínas solúveis totais (item 2.5.1.2). A outra parte das amostras foi lida no espectrofotômetro entre 400 e 750 nm. Quando ocorreram valores de absorbância maiores do que 1, as amostras foram diluídas no mesmo tampão usado na extração. Os dados de absorbância obtidos foram normalizados em relação ao valor de absorbância de 750 nm. Esses dados normalizados foram aplicados nas fórmulas (M-03) e (M-04), descritas por Beer & Eshel (1985), para a quantificação de ficocianinas (PC) e ficoeritrinas (PE), respectivamente:

$$\text{PC} = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15 \quad (\text{M-03})$$

$$\text{PE} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0,2] \cdot 0,12 \quad (\text{M-04})$$

A partir dessas fórmulas, obtiveram-se valores de μg de pigmentos por mL de extrato. Esses valores foram ajustados a mg de pigmentos por g de massa seca de alga. As relações de PE/Cla, PC/Cla e PE/PC foram obtidas.

2.5.1.1.2. Extração e quantificação de pigmentos por cromatografia

Amostras de 100 mg de massa fresca de algas foram congeladas e posteriormente, a elas foi adicionado 1 mL de DMF. As amostras permaneceram

durante pelo menos 12 h a 4 °C no escuro. Os sobrenadantes foram coletados com uma seringa, passando por um filtro de milipore de 0,2 µm, e inseridos nos tubos de vidro do cromatógrafo, totalizando pelo menos 0,7 mL de extrato filtrado por frasco. Os extratos foram analisados no sistema Waters (Barcelona, Spain) de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou do inglês, “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC). Foram injetados 65 µL de extrato, em um fluxo de gradiente de duas fases móveis: A (H₂O bidestilada: par iônico: metanol para cromatografia) e B (acetona: metanol). O par iônico foi constituído de uma solução composta por tetrabutyl amônio (TBA) 0,05 M e acetato de amônio 1 M. O fluxo da fase móvel de 1 mL.min⁻¹ em gradiente foi composto pelas seguintes etapas:

1. Quando a amostra foi injetada, a fase móvel estava estável, sendo composta por 75% de solução A e 25% de solução B.
2. A seguir, o fluxo alterou-se de forma linear para 25% de solução A e 75% de solução B, permanecendo nessa condição de 0 a 8 min da corrida.
3. De 8 a 10 min, o fluxo permaneceu isocrático.
4. Em seguida, foi alterado de forma convexa para 10% de solução A e 90% de solução B, permanecendo assim de 10 a 18 min do tempo total de corrida.
5. O fluxo modificou-se de forma côncava para 100% de solução B, e ficou nessa condição de 18 a 23 min.
6. De 23 a 30 min, o fluxo alterou-se novamente de forma côncava para 75% de solução A e 25% de solução B. O fluxo permaneceu com essa composição pelos 10 minutos seguintes da corrida (de 30 até 40 min), quando uma nova amostra foi injetada no sistema.

Os pigmentos de cada amostra presentes no momento da injeção ao fluxo foram separados pela aplicação do mesmo à coluna de cromatografia C18 5µm (Symmetry® C18 of 5µm 4,16x150mm column T91671L 02). O tempo total de eluição por amostra foi de 40 min. A absorbância das substâncias componentes de cada um dos picos foi medida por um fotodiodo no intervalo de 350-800 nm. Os diferentes tipos de pigmentos (incluindo os carotenoides e clorofilas) foram identificados comparando-se o tempo de retenção e os picos de absorbância de cada um deles com os padrões comerciais de cada um dos pigmentos puros: clorofila *α*, zeaxantina, anteraxantina, β-caroteno e luteína (DHI Water & Environment, DK-2970 Hoersholm, Denmark). Uma curva padrão relacionando a área do pico obtido por concentração da amostra padrão com cinco

diluições foi realizada para cada um dos pigmentos em questão. Dessa forma, foi possível quantificar o total de cada um dos pigmentos em mg por g de massa seca.

Além disso, partindo dos dados de experimentos em que o conteúdo de clorofila *a* foi obtido por espectrofotometria e por cromatografia, foi gerado um fator de conversão do total obtido por cada um dos métodos, após uma correlação entre os pontos obtidos em um mesmo tratamento comparando-se os dois métodos.

2.5.1.2. Proteínas solúveis totais

As proteínas solúveis foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Para tal mensuração, foi preparado o reagente de Bradford, composto por azul brilhante de Comassie-250G (CB) diluído em 50 mL de etanol 96% (v/v) e 100 mL de ácido ortofosfórico. O volume foi completado até 1 L com água miliq e guardado protegido da luz a 4 °C.

Para a quantificação das proteínas solúveis, foram utilizados 0,2 mL de extrato obtido a partir das amostras analisadas para ficobiliproteínas. Esse volume foi misturado com 2 mL do reagente Bradford acima especificado, em temperatura ambiente. O princípio de mensuração da concentração protéica está relacionado à alteração do pico de absorbância do CB presente no reagente de Bradford. Quando não ligado a proteínas, seu pico de absorbância ocorre a 465 nm, e quando se liga a proteínas, o pico máximo de absorbância se transfere para 595 nm. Após 10 min de reação, foi feita a leitura espectrofotométrica da absorbância a 595 nm.

A quantificação das proteínas solúveis foi feita por comparação a uma curva padrão, preparada a partir de diferentes diluições de amostras de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações conhecidas: 200, 160, 120, 80, 40, 20 e 0 (branco) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diluídos no tampão fosfato 0,1 M pH 6.5. O procedimento com as amostras de BSA foi similar ao realizado com o extrato. Uma reta linear, com a respectiva equação foi gerada, de modo que os valores de A_{595} obtidos desde os tratamentos pudessem ser correlacionados a uma determinada concentração protéica.

2.5.1.3. Conteúdo de C e N

O conteúdo de elementos C e N foi determinado por meio de um analisador LECO CHNS – 932, do SCAI (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación) da Universidad de Málaga. Esse aparelho identifica cada um dos compostos em questão por meio de um detector de infravermelho, durante um aquecimento a 1050 °C, que

permite uma combustão completa dos compostos até gases simples e puros. O total detectado foi comparado com um padrão comercial de cada elemento.

As amostras de algas secas em sílica gel foram maceradas com pistilos em almofarizes, de modo que o pó pudesse ser acondicionado em tubos eppendorf. Entre 1 e 2 mg de massa seca foram utilizados para determinar a quantidade de cada elemento em mg por g de massa seca de alga.

2.5.1.4. Fotossíntese a partir da fluorescência *in vivo* da Cla do fotossistema II

Quando a radiação atinge os organismos fotossintetizantes, em seus centros de reação do fotossistema II, a energia pode ser direcionada de três maneiras: absorvida pela clorofila e aproveitada para as reações químicas da célula, dissipada como calor ou outra forma de perda energética e, por fim, re-emitada em um comprimento de onda diferente (ex. fluorescência). Por meio dessa fluorescência emitida pela Cla dos organismos fotossintetizantes é possível estimar-se o funcionamento do aparato fotossintético. Para medir a fluorescência, foram utilizados os fluorímetros com pulsos de amplitude modulada (PAM, do inglês, “pulse amplitude modulated fluorometer”): PAM 2000 e Water-PAM (com uma adaptação para medir fluorescência emitida por uma macroalga). Uma das grandes vantagens deste método é que ele não é destrutivo e é bastante rápido.

O PAM 2000 possui uma lâmpada LED, com a emissão de uma luz de medida em luz vermelha, e ainda 11 intensidades diferentes de luz actínica e de luz de medida, e o pulso de saturação com pico em 655 nm. O pulso de saturação pode ser ajustado entre 10 níveis diferentes. Todos esses ajustes podem ser realizados no software PAM-Win versão 1.17 (© Heinz Walz GmbH, 2003).

O Water-PAM foi adaptado para que a medida de fluorescência emitida pelas algas pudesse ser obtida, uma vez que a sua fibra ótica não pode ser encostada na água diretamente. Além disso, medir a fluorescência em algas secas por papel toalha traria como problema o estresse por dessecação. Uma tampa de material opaco preto com um orifício circular na parte central (para encaixe da fibra ótica) foi utilizada, de modo que a alga pudesse ser acondicionada em uma placa de Petri, contendo 50 mL de água do mar. A aplicação dessa tampa preta acoplada permitiu que a fibra ótica permanecesse suficientemente próxima das algas para detectar a fluorescência das mesmas. O Water-PAM possui também uma lâmpada LED com 11 intensidades possíveis de luz de

medida ou actínica, porém seu controle é feito por meio do software Win-Control versão 2.133/03.00 (©Heinz Walz GmbH, 2000).

Os seguintes parâmetros foram medidos com o uso de um fluorímetro de amplitude modulada (Figura 2.6), e permitiram o cálculo posterior dos rendimentos quânticos e outros parâmetros do aparato fotossintetizante:

- F_o : fluorescência basal de uma alga adaptada ao escuro (centros de reação totalmente oxidados), emitida naturalmente pelo organismo fotossintetizante, independentemente da ocorrência da fotossíntese.
- F_m : fluorescência máxima, medida em uma amostra pré-aclimatada ao escuro, e que possui todos os centros de reação abertos para transferir elétrons. Dessa forma, a quantidade de fluorescência será aquela maior possível suportada pelo sistema fotossintetizante do organismo em questão.
- F_o' : medida de fluorescência basal emitida por um organismo pré-aclimatado a condições de luz.
- F_m' : fluorescência máxima emitida por um organismo pré-aclimatado a condições de luz, após a ativação de um pulso de saturação com alta intensidade de radiação para saturar o sistema. Normalmente, esse valor é menor do que F_m , porque alguns dos centros de reação já estão ocupados quando o pulso de saturação é fornecido à amostra.
- F ou F_t : fluorescência emitida em condição com a luz actínica do aparelho acesa, de modo que representa uma quantidade de fluorescência emitida em uma situação normal de fotossíntese, com a planta pré-aclimatada a condições de claro.

O rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) foi medido com as algas pré-aclimatadas ao escuro por 10 minutos, para que todos os centros de reação se oxidassem (estivessem abertos). Para início da medida do F_v/F_m , a fibra ótica enviou um sinal de luz de medida sobre as amostras. O valor de F_o foi obtido, e em seguida, um pulso de saturação de aproximadamente $9000 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi ativado durante 0,8 s, de modo a saturar completamente todos os centros de reação da alga. O valor de fluorescência obtido logo depois desse pulso foi correspondente ao F_m . O valor do rendimento quântico ótimo foi calculado a partir da seguinte fórmula (M-05):

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \quad (\text{M-05})$$

Figura 2.6: Esquema indicando como a fluorescência emitida por um organismo fotossintetizante se comporta ao longo do tempo, conforme o estímulo por meio de pulsos de saturação, para medir diferentes variáveis: o rendimento quântico ótimo (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivo, a taxa de transporte de elétrons (ETR) e a dissipação não-fotoquímica (NPQ). A seta cinza indica o momento que a luz de medida é acesa. A seta preta indica o momento que um pulso de saturação é fornecido pelo fluorímetro ao material fotossintetizante. E por fim, a seta branca indica quando a luz actínica é ativada (seta para cima) ou desativada (seta para baixo).

O rendimento quântico efetivo ($\Delta F_v/F_m'$) foi obtido pelo mesmo princípio, porém com as plantas pré-aclimatadas e expostas a condições de iluminação de acordo com o experimento. Dessa forma, quando a luz de medida se acendeu, os valores registrados inicialmente corresponderam ao F_o' . Com o pulso de saturação dado, obteve-se o valor de F_m' . A fórmula (M-06) utilizada para calcular esse rendimento efetivo foi a seguinte:

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m' \quad (M-06)$$

A partir dos valores de fluorescência máximos medidos em condição de luz ou em condição de adaptação ao escuro, foi possível ainda estimar o rendimento quântico não-fotoquímico (NPQ), que se calculou a partir da seguinte fórmula (M-07):

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m' \quad (M-07)$$

Uma terceira abordagem realizada com os fluorímetros permitiu a obtenção da estimativa do fluxo de elétrons no aparato fotossintetizante, calculando-se a taxa de transporte de elétrons (do inglês, ETR, “electron transport rate”), e, portanto, da capacidade fotossintetizante (produção). Os valores de ETR foram obtidos a partir da seguinte fórmula (M-08):

$$\text{ETR} = \Delta F/F_m \cdot I \cdot \text{Abst} \cdot 0,15 \quad (\text{M-08})$$

Na qual o valor de $\Delta F/F_m$ foi obtido para diferentes intensidades PAR de irradiância “I”. O fator 0,15 é acrescido à fórmula porque o ETR deve ser calculado considerando-se o ajuste de quanto de irradiância será aproveitada pela fração de clorofila a associada ao fotossistema II e seus complexos coletores de luz (Grzyski *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 1997).

Para proceder à obtenção do fator “Abst” que corresponde à absorvância de *G. tenuistipitata*, distintas porções de talos de algas foram mantidos em condições de estoque em baixas irradiâncias (até 5 $\mu\text{mol de f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com suprimento nutricional e em tratamento com irradiância PAR similar ao experimento, porém sem suprimento de N, de modo que fosse criado um gradiente de pigmentos. Após cerca de um mês nessas condições, as algas apresentavam diferença visual de coloração, sendo as mantidas em condição de estoque com uma cor vermelho-amarronzado escuro, enquanto que as mantidas em PAR e sem N apresentavam talos marrom-esverdeados claros. Cinco categorias de algas variando desde o vermelho escuro até o marrom esverdeado foram selecionadas.

Os talos dessas algas foram cortados em porções aleatórias de até 3 cm de comprimento, de modo que cobrissem uma lâmina histológica. Em seguida, foi medida a irradiância PAR emitida por uma lâmpada “luz do dia”, com o sensor coberto por uma lâmina histológica sem algas, a determinada distância da lâmpada, obtendo o valor I_0 . Três medidas foram feitas com o sensor do medidor de quanta no mesmo ponto fixo. Em seguida, com o sensor mantido no mesmo local, a lâmina contendo os talos de algas foi inserida sobre o sensor, de modo a medir o valor I_F , que se refere à irradiância transmitida através dos talos e detectada pelo aparelho medidor. Os valores de I_F foram obtidos para os cinco distintos talos em gradiente de cor e conteúdo de pigmentos. A partir dos dados de I_0 e I_F , foram calculados os dados de absorvância “Abst”, conforme a fórmula (M-09):

$$\text{Abst} = 1 - I_F/I_0 \quad (\text{M-09})$$

Em seguida, quatro alíquotas de talos de cada um dos tipos usados para perfazer o gradiente pigmentar, contendo a massa fresca de cerca de 20 mg, foram separados para extração de Cla, com acetona 90%, tal como explicado no item 2.5.1.1.1.1. Os valores de quantificação de Cla foram utilizados para construir uma curva padrão, contendo o valor de absorvância no eixo das ordenadas pela concentração de Cla no eixo das abscissas. Optou-se pela Cla porque ela foi quantificada em todos os experimentos (ver item 2.7), o que possibilitou a obtenção de valores de absorvância para quaisquer das algas provenientes dos tratamentos realizados neste trabalho. A relação linear obtida entre os dois fatores foi: $\text{Abst} = 0,0002 [\text{Cla}] + 0,5585$.

Uma curva de ETR x Irradiância foi obtida, incubando-se as amostras de algas em diferentes intensidades de luz actínica por 20 s cada. Previamente, as amostras permaneceram por 10 min no escuro, para que os centros de reação estivessem abertos, e que o primeiro valor medido pudesse ser tratado tal qual o rendimento quântico ótimo. A cada período de 20 s, as algas receberam doses crescentes de luz actínica emitida pela lâmpada LED do aparelho e, ao final de cada um desses períodos, um pulso de saturação de luz foi fornecido sobre as amostras, de modo que fosse estimado o rendimento quântico efetivo. Os valores de ETR foram calculados como descrito acima. A curva obtida foi ajustada de acordo com as fórmulas de Platt *et al.* (1980) (M-10) e a fórmula de Webb *et al.* (1974) (M-11):

$$\begin{aligned} \text{ETR} &= \text{ETR}_s [1 - e^{(-\alpha \cdot I / \text{ETR}_s)}] [e^{(-\beta \cdot I / \text{ETR}_s)}] \\ \text{ETR}_{\max} &= \text{ETR}_s \{ [\alpha / (\alpha + \beta)] [\beta / (\alpha + \beta)] \}^{\beta/\alpha} \end{aligned} \quad (\text{M-10})$$

$$\text{ETR} = \text{ETR}_{\max} [1 - e^{(-\alpha \cdot I / \text{ETR}_{\max})}] \quad (\text{M-11})$$

A fórmula de ajuste (M10) foi utilizada quando a curva aparentava redução dos valores de ETR com o aumento da irradiância (evidência da presença da fotoinibição), enquanto que nos outros casos, foi usado o ajuste da fórmula (M11).

Por meio dos ajustes da curva de ETR x Irradiância, foram obtidos outros parâmetros fotossintetizantes, tais como a $\text{ETR}_{\max}$, o valor de α (parâmetro para estimar a eficiência fotossintetizante) e o valor de β (para avaliar uma possível fotoinibição). A curva ajustada foi obtida por meio do software KaleidaGraph 4.0 Tools for Discovery, Sinergy Software.

2.5.1.5. Atividade específica da anidrase carbônica (AC)

A anidrase carbônica catalisa a reação de conversão entre CO_2 e HCO_3^- . Pode-se medir a atividade dessa enzima macerando-se ou não as amostras. No primeiro caso, obtém-se a atividade total, e no segundo caso, a atividade de ACs externas. A atividade de ACs internas pode ser obtida subtraindo-se a atividade externa da atividade total de AC. Neste trabalho, optou-se por estimar apenas a atividade específica de AC total segundo o método potenciométrico adaptado de Haglund *et al.* (1992). O princípio do método consiste em relacionar os tempos de redução de pH de amostras saturadas de CO_2 , com adição ou não de extrato algáceo contendo AC.

Antes da análise das amostras, 200 mL de água destilada foi saturada com CO_2 durante 1 h. O tampão utilizado no ensaio foi composto por Tris(hidroximetil)amino-metano 50 mM, Na-EDTA 5 mM e ácido ascórbico 25 mM, mantido a 4 °C e com o pH inicial ajustado para 8,5. O pH foi medido e ajustado com o sensor do pH-metro Crison GLP22.

Inicialmente, foi medida a redução de pH da amostra controle, isto é, sem a adição do extrato de alga. Assim, o tempo de diminuição do pH foi medido no volume formado por 1 mL de água destilada saturada de CO_2 adicionada a 2 mL de tampão. A cada segundo, o valor de pH obtido foi registrado, até que atingisse 7,3. O tempo em segundos de permanência de cada valor decimal de pH foi anotado.

O mesmo procedimento foi adotado para a medida das amostras provenientes dos tratamentos. Para isso, 100 mg de massa fresca de amostra de alga congelada foram macerados em um almofariz, com auxílio de um pistilo e adição de nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados os 2 mL de tampão utilizados na reação. Para cada reação, no momento da medida de pH, foi acrescido 1 mL de água destilada saturada de CO_2 , e o tempo de redução do pH desde o valor inicial até 7,3 foi anotado, tal como explicado acima para as amostras dos controles. As amostras e os controles permaneceram em gelo e agitação constante durante a leitura de pH.

A possível presença de AC nos extratos causaria uma redução do pH mais rápida do que nas amostras controle. Para a análise da atividade da AC foi selecionado um intervalo de pH no qual ocorreu uma decaída linear do mesmo. Posteriormente, a atividade específica de AC foi estimada a partir da fórmula (M-12):

$$\text{REA} = [(t_o/t_c) - 1]/\text{MF} \quad (\text{M-12})$$

Na qual REA é a atividade enzimática relativa, t_0 é o tempo que tardou a redução de pH do controle, t_c é o tempo de redução do pH nesse mesmo intervalo acima discriminado, porém com a presença do extrato algáceo, e MF é a massa fresca da amostra original. Vale ainda ressaltar que por tratar-se de amostras maceradas, este trabalho tratou da atividade total da AC em *G. tenuistipitata* submetida aos diferentes tratamentos experimentais.

2.5.1.6. Aminoácidos tipo micoporinas (MAAs)

As amostras com 100 mg de massa fresca foram coletadas dos experimentos e secas em sacos plásticos contendo sílica-gel, de modo que 15 a 20 mg de massa seca fossem obtidos (ver relação massa fresca / massa seca no item 2.5.1.7). As amostras secas foram inseridas em tubos eppendorf e os aminoácidos tipo micoporina foram extraídos em 1 mL de metanol 20%, sonicados por 5 min e, a seguir, incubados por 2 h a 45 °C.

Alíquotas de 600 µL dos extratos foram transferidas para novos tubos, e o conteúdo líquido dos tubos foi removido por meio de uma microcentrífuga a vácuo. A esse resíduo sólido foram adicionados 600 µL de metanol 100% cromatográfico (para a remoção de sais e proteínas do extrato), misturados por agitação em vórtex, e centrifugados a 13000 g, 4 °C por 10 min. Um total de 100 µL do sobrenadante desse extrato foi transferido para os tubos de vidro do sistema Waters (Barcelona, Spain) de HPLC.

O volume de 30 µL das amostras foi injetado em um fluxo isocrático de uma fase móvel filtrada e degaseificada composta por metanol 2,5% e ácido acético 0,1%. Essa fase móvel foi bombeada num fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ através da fase fixa, uma coluna C8 (Spheroclone Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) de 5 µm de diâmetro, com tamanho de 250x4,6 mm. Uma pré-coluna (Phenomenex, Alemanha) foi utilizada para filtrar as amostras antes que as mesmas passassem pela coluna. O tempo de eluição de cada uma das amostras foi de 25 min.

As amostras foram detectadas por meio de um diodo de UV-visível (Photodiode Array Detector 996). A cada segundo, foram tomados dados de absorbância para cada comprimento de onda entre 290 e 400 nm. Ao final, um cromatograma selecionado para as absorbâncias a 330 nm foi obtido, e os picos observados foram identificados de acordo com o espectro e os tempos de retenção, comparando-se com um padrão de

Porphyra leucosticta. Os dados foram recolhidos e analisados por meio do programa Millenium 3.2.

A partir do valor de área dos picos presentes em cada cromatograma (relacionados a cada uma das micosporinas ou o seu total) e também dos coeficientes de extinção molar (Tabela 2.2), foi obtido o total de MAAs em mg por g de massa seca de acordo com a fórmula (M-13):

$$\text{MAAs} = (A \cdot F) / (\epsilon' \cdot V \cdot \text{MS} \cdot 60) \quad (\text{M-13})$$

Na qual A é a área dos picos ($\mu\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$), F é o fluxo da fase móvel ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), ϵ' é o coeficiente de extinção específico ($\text{g}^{-1} \cdot \text{L}$), V é o volume injetado (mL) e MS é a massa seca original das amostras, em g.

Tabela 2.2: Coeficientes de extinção molar (ϵ) utilizados para quantificar as diferentes MAAs encontradas neste estudo. O coeficiente de extinção específico (ϵ') usado na fórmula (M-13) é calculado como $\epsilon' = \epsilon / \text{peso molecular}$.

Nome	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Peso Molecular	Referência
Shinorina	334	44668	332,3	Tsujino <i>et al.</i> , 1980
Porphyra-334	334	43300	346,3	Takano <i>et al.</i> , 1978
Palitine	320	36200	244,2	Takano <i>et al.</i> , 1978
Asterina-330	330	43500	288,3	Gleason, 1993
Palitinol	332	43500	302,3	Dunlap <i>et al.</i> , 1986

2.5.1.7. Taxas de crescimento (TC), relação massa fresca / massa seca (MF/MS) e rendimento de produtos de interesse econômico

As taxas de crescimento foram determinadas a partir de dados de massa fresca, obtidos após secagem das algas em papel toalha e pesagem das mesmas em balança analítica Salter-and. modelo ER-60A, nº serie 3402718. Esses valores de massa fresca foram inseridos na fórmula (M-14) de Lignell & Pedersén (1989) para o cálculo das taxas de crescimento (TCs):

$$\text{TC} = [(MF_f / MF_i)^{1/t} - 1] \cdot 100 \quad (\text{M-14})$$

Onde MF_f e MF_i são os valores de massa fresca medidos no instante final e inicial, respectivamente, e t é o tempo de intervalo entre essas duas medidas. A unidade das taxas de crescimento foi $\%MF \cdot \text{dia}^{-1}$ ou $\%MF \cdot \text{h}^{-1}$, de acordo com o experimento.

Para a obtenção da relação MF/MS, foram selecionadas desde o cultivo de manutenção 20 repetições de amostras com massa fresca de 50 mg cada uma. Os ápices de alga foram inseridos em pequenos pacotes de papel alumínio, dentro de uma estufa a 60°C durante 24h. Posteriormente, as amostras foram novamente pesadas (massa seca). O valor obtido para a relação MF/MS foi de $5,089 \pm 0,65$. Esse valor foi utilizado para converter unidades entre massa fresca e massa seca no decorrer de todo trabalho.

O rendimento de substâncias de interesse econômico foi feito com relação aos totais de ficoeritrina, MAAs e do carotenoide majoritário obtidos nos diferentes experimentos com *G. tenuistipitata*. Para obter o valor de rendimento após determinado tempo n (medido em dias), foi realizado o seguinte cálculo (M-15):

$$\text{Rendimento} = (\text{mg de substância} / \text{gMS})_{\text{tempo n}} \cdot \text{MS}_{\text{tempo n}} / \text{tempo n} \cdot \text{Vol.} \quad (\text{M-15})$$

A unidade de rendimento foi mg de substância por dia por L de água utilizado.

2.5.2. Análises moleculares

Neste tópico, descrevemos todos os procedimentos realizados com os ácidos nucleicos de *G. tenuistipitata*, considerando tanto o RNA quanto o DNA (ou cDNA de acordo com o caso). Incluem-se aqui as análises de expressão gênica e também o imunoenensaio para detecção de danos no DNA.

2.5.2.1. A biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*

A biblioteca diurna de cDNA da fase tetrasporofítica de *Gracilaria tenuistipitata* foi construída pelos Drs. Pi Nyvall e Jonas Collén. O RNAm total da alga foi extraído pelo método do TRIZOL®, desenvolvido por Chomcynski & Sacchi (1987). O RNAm foi separado dos demais RNAs por meio de uma coluna de afinidade por oligo-dT.

Para a construção da biblioteca de cDNA foram utilizados os kits ZAP Express cDNA Synthesis Kit e o ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit da Strategene. O material foi sequenciado no 377 DNA Sequence da ABI prism™. O conjunto de sequências obtidas a partir desse procedimento é denominado ESTs (do inglês, “expressed sequence tags”).

Essa biblioteca permanece congelada em freezers do Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula”. Foi obtido um total de 3631 ESTs, os quais foram submetidos ao programa BlastX. Este procedimento permitiu saber a homologia das

sequências protéicas depositados no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) e as possíveis proteínas codificadas pelas sequências de ESTs de *G. tenuistipitata* foram identificados por similaridade.

Os clones de *Escherichia coli* contendo as sequências de cDNA de *G. tenuistipitata* foram congelados em placas de 96 poços com 1 mL de meio de cultura CIRCLEGROW® (meio de cultura para *E. coli*, que permite maior replicação dos plasmídeos inseridos nas bactérias em cultivo).

2.5.2.2. Estudo dos ESTs de *G. tenuistipitata* relacionados com a fotoproteção

2.5.2.2.1. Seleção das sequências de interesse

Foram selecionados clones de ESTs identificados como codificantes para fotoliasas. Os clones foram recuperados da biblioteca de cDNA e os ESTs foram completamente sequenciados. Para o caso dos outros ESTs, relacionados com estratégias de defesa, o trabalho foi desenvolvido diretamente da sequência consenso presente no banco de sequências da biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*. Dentre as sequências presentes no banco, foram selecionadas aquelas com maior similaridade reconhecida como codificantes para as mesmas proteínas de outras algas vermelhas. O valor de “e-value” obtido no BlastX do GenBank foi determinante, bem como a proximidade taxonômica do organismo possuidor da sequência similar à de *G. tenuistipitata*. Dessa forma, foram utilizadas como molde as sequências codificantes para: peptido-metionina-sulfoxido-redutase (duas sequências, PMSR1 e PMSR2), proteína de heat shock 70 (HSP70), ascorbato peroxidase (APX), citocromo-c peroxidase (CTCPX) e glutathione peroxidase (GPX).

2.5.2.2.2. Recuperação dos clones contendo sequências dos ESTs

Os clones com plasmídeos contendo sequências codificantes para fotoliase que foram recuperados são os seguintes: Gt01032G11.b, Gt01033C11.b e Gt01029B07, doravante denominados clones 32, 33 e 29.

Uma vez identificados, os clones de *E. coli* foram recuperados por meio do crescimento das bactérias em meio líquido. Todo trabalho foi realizado sob uma câmara de fluxo, a fim de impedir a contaminação dos cultivos de bactérias.

O meio de cultura LB (Luria-Bertani com bacto-triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar) foi preparado com a adição de kanamicina. As bactérias foram inseridas

em tubos com 2 mL de meio LB e 2 μL de kanamicina ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) por meio de um palito de madeira autoclavado. Esse tubo permaneceu durante a noite em temperatura de 37 °C sob agitação.

A fim de garantir a seleção das bactérias de interesse, foi realizado um plaqueamento dessas bactérias em meio sólido, após a recuperação das mesmas em meio líquido. Foram inoculadas e formadas colônias em placa com ágar sólido e meio de cultura LB com adição de kanamicina. Dentre as colônias formadas, foram selecionadas aquelas mais uniformes, a partir das quais novo crescimento em meio líquido foi realizado. Esse segundo crescimento de bactérias em meio líquido proveu material para o procedimento de miniprep do DNA plasmidial, descrito a seguir.

2.5.2.2.3. Miniprep de DNA plasmidial

A partir de 1,5 mL da cultura de bactérias obtidas no item 2.5.2.2.2, foi realizada a miniprep do DNA plasmidial, a fim de isolar o plasmídio em relação ao restante dos componentes bacterianos. Inicialmente, foi feita uma centrifugação desse material a 4000 g, 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 150 μL da solução P1 (EDTA 5 mM pH 8,0, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e RNAase 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), seguido de agitação. A seguir, foram acrescidos 150 μL da solução P2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%), misturando-se por inversão. Finalmente, 150 μL da solução P3 (KOAc 3 M e ácido acético glacial 11,6%) foram adicionados ao tubo. Foi realizada uma centrifugação a 14000 g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi separado em novo tubo e a este foram adicionados 300 μL de isopropanol, a fim de lavar o material, que foi novamente centrifugado a 14000 g, a 18 °C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o DNA foi seco em uma microcentrífuga a vácuo.

O material foi re-suspendido com 20 μL de H_2O miliq e a essa mistura foram adicionados 12 μL de PEG-NaCl (polietilenoglicol, PEG 8000 20% e NaCl 2,5 M). Após incubação em gelo por 1 hora, foi realizada uma centrifugação a 14000 g, 4 °C por 15 min. O precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% e novamente centrifugado a 10000 g, 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA, seco na microcentrífuga a vácuo. O material foi ressuspendido em 20 μL de H_2O miliq autoclavada e armazenado a -20°C.

2.5.2.2.4. Sequenciamento do DNA presente no plasmídeo

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados 3 µL do DNA proveniente da miniprep, 2 µL de BigDye e 1 µL de primer reverso (XanthoB) ou direto (T3) (a 10 ng.µL⁻¹). O volume total foi completado até 10 µL com H₂O miliq autoclavada.

A reação de sequenciamento foi feita com os seguintes passos no termociclador: 96 °C por 10 s (desnaturação), 55 °C por 20 s (anelamento) e 60 °C por 4 min (polimerização). Esse programa foi repetido por 40 vezes, e posteriormente, os tubos de PCR permaneceram a 4 °C.

Em seguida, o DNA foi purificado com a adição de 40 µL de isopropanol 65%, agitado no vortex e, posteriormente, mantido no escuro por 20 min. Após esse período, o material foi centrifugado a 14000 g, 17 °C por 25 min. O isopropanol que se manteve como sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram acrescidos 180 µL de etanol 60%, para a lavagem do material, realizada por centrifugação a 4000 g, 17 °C por 10 min. O precipitado foi seco na microcentrífuga a vácuo.

O precipitado de DNA foi re-suspendido com 10 µL de HiDye. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser. Os cromatogramas e as sequências obtidas foram analisados com o programa Bio Edit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 Copyright © 1997-2007 Tom Hall. Foi verificada a qualidade da extração por meio do cromatograma e, em seguida, as diferentes sequências foram alinhadas, até a obtenção do fragmento completo de interesse. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências do GenBank por meio de BlastX (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.5.2.2.5. Determinação do tamanho dos insertos

O tamanho dos insertos de cDNA de *G. tenuistipitata* nos plasmídios foi determinado por digestão com as enzimas de restrição *EcoR*I e *Xho*I (BioLabs Inc.). Para a realização desse procedimento, foi utilizado o material obtido nas minipreps acima descritas. O tampão React2 (Gibco.BRL Life Technologies) foi selecionado para a reação de digestão.

Para a reação de digestão, foram adicionados num tubo de 0,2 mL: 1 µL de tampão React2, 1 µL da enzima *EcoR*I, 1 µL de *Xho*I e 7 µL de DNA plasmidial. A reação ocorreu em banho seco, a 37 °C, por 4 h. O tamanho dos insertos resultantes da

digestão foi observado em um gel de agarose 0,7%, de acordo com o método descrito no item 2.5.2.2.6.

2.5.2.2.6. Eletroforese em gel de agarose

A agarose foi dissolvida por aquecimento em micro-ondas por 20 s em TBE (0,5x Tris-Borato 0,045 M e EDTA 0,001 M), de modo que estivesse na concentração de 0,7%. A essa solução de agarose foi adicionado entre 0,5 e 1,5 µL de brometo de etídio.

Foram adicionados 2 µL de LB (loading buffer) a 5 µL das amostras de DNA. Essa solução foi colocada em cada um dos poços do gel de agarose mergulhado na cuba com TBE. O marcador 1 Kb da Invitrogen foi utilizado como controle de tamanho. A eletroforese foi realizada em uma corrida de 70 V e 67 mA, durante cerca de 45 min. A corrida do gel foi analisada em um transiluminador de UV Pharmacia LKB Macro-Vve (Biotechnology AB Sweeden) e o gel foi fotografado por uma máquina fotográfica Kodak num aparato Kodak Edas 290 Spectroline UV TransiluminatorSlimLine™.

2.5.2.3. **Desenho de oligonucleotídeos (primers)**

A partir das sequências obtidas no item 2.5.2.2.3, foram desenhados primers no programa PrimerExpress (AppliedBiosystems) e testados para formação de estruturas secundárias no programa GeneRunner v. 3.0.5 (Hasting Software, Inc.). Outros primers foram desenhados no software on-line Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Todos os primers utilizados no trabalho estão representados na Tabela 2.3. Foram desenhados primers para três finalidades: recuperação dos clones, sequenciamento dos genes codificantes para a fotoliase e amplificação de fragmentos por RT-PCR.

Tabela 2.3: Primers utilizados neste trabalho. Os primers foram utilizados para três diferentes funções: I, recuperação da sequência do plasmídeo; II, sequenciamento dos genes codificantes para estratégias de fotoproteção; e III, análise de expressão gênica por RT-PCR. Sentido de síntese dos primers: D, direto; e R, reverso.

Nome	Sentido	Sequência (5'→3')	Uso
T3	D	AATTAACCCTCACTAAAGGG	I
T7	R	GTAATACGACTCACTATAGGGC	I
XanthoB	R	GTAAAACGACGGCCAGT	I
Photol-29F	D	CAGTTGCTTGATTTGC	II
Photol-33F	D	TTTACTCTGACTTTTCGC	II
Photol-29R	R	GCATTTACCGCCAGTTCACG	II
Photol-32R	R	GGCGAAAGAGCAGCATC	II
Photol-29F-start	D	ATGCGTCCCGCGTTCATAC	II
Photol-29R-stop	R	GGAGGCGTTGGCAGTAATGG	II
ActinGT-F	D	AAGATGAGTACGTTGGTGACGC	III
ActinGT-R	R	ATCTTTTCCATATCGTCCCAGTT	III
Photol-29F _{RT}	D	CCAATGCCGTCAACAAATCC	III
Photol-29R _{RT}	R	TAGATGGCGTGTCTAGAGCAA	III
Photol-32F _{RT}	D	GCTCTGTCATTTGCGTTGGA	III
Photol-32R _{RT}	R	CAAAGTGCCCTCGGGTCAAAG	III
PMSR1-F	D	ATTGCGTATCTGCCAAGTCC	III
PMSR1-R	R	CCAAGATGTGCCATTGTGTC	III
PMSR2-F	D	ACCTTTTGGAACAGCGTGTC	III
PMSR2-R	R	TGTTGCATAGCACTGCCTTC	III
HSP70-F	D	TTGTGGTTCCTTGGCTTACC	III
HSP70-R	R	CATCCGGGTGTCAAAGTCT	III
APX-F	D	AAAGTATGCTGCGGACCAAG	III
APX-R	R	TCCATTGCAGCATCTACTGG	III
CTCPX-F	D	ACGATTTCGACATGTTCTGTGA	III
CTCPX-R	R	TCAGTATGACATCGCCCAAG	III
GPX-F	D	AAATCAAGTCTCGCCCAGTG	III
GPX-R	R	AGAGGTCGTAGCCAGCTTGA	III

2.5.2.4. Sequenciamento dos genes das fotoliasas

2.5.2.4.1. Extração de DNA

O DNA das algas foi extraído a partir do protocolo de Faugeron *et al.* (2001), com modificações. Amostras de 30 mg de alga fresca foram congeladas a -80 °C. Essas amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, em um tubo de 1,5 mL eppendorf com auxílio de um micro-pistilo. Ao macerado, foram adicionados os seguintes compostos: 0,8 mL de tampão de lise (Tris 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M, NaCl 0,2 M e KAc 2,5 M), 0,1 mL de Tween 20, 16 µL de proteinase K e 5 µL de RNAase A.

As amostras foram centrifugadas a 12000 g e 20 °C por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos, totalizando 880 µL de extrato em cada

um deles. Na capela, foram adicionados 700 µL de fenol equilibrado e, posteriormente, o mesmo volume de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) em cada um dos tubos acima destacados. As amostras foram agitadas delicadamente e centrifugadas a 13000 g, 20 °C por 5 min. Ao término do processo de centrifugação, foram recuperados 800 µL do sobrenadante (fase aquosa) em um novo tubo eppendorf. Ao mesmo, foram adicionados 1000 µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de agitação. Esses tubos contendo essa nova mistura foram centrifugados a 13000 g, 20 °C por 5 min.

Ao término dessa última centrifugação, a fase superior aquosa foi pipetada para um novo tubo eppendorf, totalizando 600 µL. A precipitação foi realizada por meio da adição de 0,6 volumes (equivalente nesse caso a 480 µL) de álcool isopropílico. As amostras foram mantidas durante a noite a 4 °C.

O DNA precipitado foi separado do restante da solução por meio de centrifugação a 14000 g, 4 °C por 30 min. O álcool foi posteriormente descartado e o DNA permaneceu aderido ao fundo do tubo eppendorf. O DNA foi lavado com 500 µL de álcool etílico gelado 70% e o tubo foi novamente centrifugado, dessa vez a 14000 g, 4 °C por 5 min. Por fim, o álcool foi descartado e as amostras foram secas em microcentrífuga a vácuo. O DNA foi re-suspendido ao final do procedimento com 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 200 mM, EDTA 20 mM, pH 7,5) e as amostras de DNA foram mantidas em freezer a -20 °C até o momento da quantificação.

2.5.2.4.2. Amplificação do gene, purificação e sequenciamento

Para o processo de amplificação, foi realizada uma reação de PCR. Os seguintes reagentes foram adicionados num tubo de PCR: 1 µL de tampão flexibuffer, 3 µL de MgCl (concentração final de 0,75 mM), 1 µL dNTP's (0,2 mM), 1 µL de primer direto (10 µM) e 1 µL de primer reverso (10 µM), 1 µL de DNA extraído no passo anterior e 0,25 µL de *Taq* polimerase. O volume foi completado até 50 µL com H₂O miliq autoclavada.

O seguinte programa foi aplicado no termociclador Biômetra® Tpersonal (Biomedizinische Analytik GmbH, Alemanha) para as reações de amplificação em cadeia: i. 94 °C, 5 min; ii. 94 °C, 30 s; iii. 52 °C, 30 s; iv. 72 °C, 30 s; v. repetição dos passos ii a iv 39x; vi. 51 °C, 1 min; vii. 72 °C, 5 min; e vii. 4 °C, até o momento de congelar as amostras a -20 °C.

O sucesso do processo de amplificação foi verificado em uma eletroforese em gel de agarose 0,7%. O produto da PCR foi purificado por meio do kit GFX Illustra (GE Healthcare), conforme protocolo do fornecedor. O sequenciamento do DNA purificado foi realizado da mesma maneira que detalhado no item 2.5.2.2.4.

Os primers desenhados e utilizados nesta parte do trabalho estão discriminados na Tabela 2.3. Os primers foram escolhidos para que se realizar o método “primer walking”, até que os fragmentos obtidos desde cada uma das duas extremidades fossem complementares, resultando na sequência inteira dos genes de interesse.

2.5.2.5. Extração de RNA total

Para o trabalho com RNA, as bancadas e todo material manuseado (incluindo ponteiras, pipetas, luvas e potes contendo reagentes) foram limpos com o reagente RNAase ZAP® Ambion®. Os reagentes líquidos não-comerciais e preparados no laboratório (incluindo NaCl, etanol 75% e a água miliq) foram tratados com DEPC (dietilpirocarbonato) na proporção 0,01% (v/v). Após a adição desse componente, os reagentes permaneceram em repouso por 24 h em temperatura ambiente e, em seguida, foram autoclavados. Esses procedimentos removem RNases, garantindo a integridade do RNA no decorrer dos protocolos relacionados à extração e manuseio dessas moléculas.

O RNA foi extraído a partir de 100 mg de massa fresca de alga que foi previamente congelada. As amostras foram maceradas em N₂(liq) com auxílio de um micropistilo em um tubo de eppendorf, e mantidas em nitrogênio líquido. Quando todas as amostras estavam maceradas, os tubos foram removidos do nitrogênio líquido e rapidamente abertos.

A cada um dos tubos eppendorf contendo as amostras maceradas foi adicionado 0,5 mL de PureLink™ Plant RNA Reagent na capela. O conteúdo do tubo foi misturado por vórtex, e as amostras permaneceram em incubação por 5 min em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000 g à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, o sobrenadante contendo o RNA (totalizando cerca de 460 µL) foi transferido a um novo tubo e o precipitado foi descartado. O extrato foi clarificado com a adição de 0,1 mL de NaCl 5 M, misturando-se bem ao conteúdo dos tubos. Em seguida, 0,3 mL de clorofórmio foram adicionados e misturados por inversão. Os extratos com clorofórmio e NaCl foram centrifugados a 12000 g, a 4 °C por 10 min, a fim de separar as fases. Os 400 µL da fase aquosa superior foram transferidos para um

novo tubo, enquanto que o precipitado foi descartado. A essa fase aquosa, o mesmo volume de isopropanol foi adicionado para precipitar o RNA. Os tubos ficaram em incubação à temperatura ambiente por 10 min e, a seguir, foram centrifugados a 12000 g, 4°C por 10 min. O RNA ficou aderido ao fundo do tubo e o sobrenadante foi descartado. O pellet no tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Esse procedimento foi seguido de centrifugação a 12000 g, à temperatura ambiente por 1 min. O álcool foi descartado e, em seguida, o conteúdo do tubo foi seco por 30 min na microcentrífuga vácuo. Ao final, o RNA total foi ressuspensionado em 50 µL de H₂O miliq.

2.5.2.6. Tratamento com DNase

Para garantir que somente o RNA estivesse presente nas amostras decorrentes da extração de RNA total no passo anterior, foi realizado um tratamento das amostras de RNA por meio do kit TURBO DNA-free™ da Applied Biosystems.

Às amostras de 50 µL de RNA foram adicionados 5 µL do tampão Turbo DNase e 1 µL de Turbo DNase. Esse conjunto foi misturado e incubado a 37 °C por 30 min, em um banho seco. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL do reagente de inativação de DNase, seguido de agitação em vórtex por 5 s e incubados por 2 min à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o RNA puro foi coletado por centrifugação a 10000 g, à temperatura ambiente por 1,5 min. Esse sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o RNA puro foi armazenado a -80 °C. O RNA foi quantificado conforme explicado no item 2.5.2.9 a seguir.

2.5.2.7. Conversão de RNA para cDNA

A partir do RNA total obtido no passo anterior, foi possível realizar a reação de transcriptase reversa para obter o cDNA. Isso foi feito por meio do kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix da Invitrogen (Cat. No. 18080-400).

Após quantificar-se o RNA puro, decidiu-se por aplicar 2 µL de RNA de cada amostra (considerando que o kit converte entre 0,1 pg a 500 ng de RNA). Todos os componentes do kit e as amostras foram descongelados, misturados e centrifugados antes do uso. Os seguintes compostos foram misturados às amostras em um tubo de 0,2 mL: 1 µL de primer 50 µM oligo(dT)20, 1 µL de tampão de anelamento (Annealing Buffer), e o volume foi completado até 8 µL com água miliq autoclavada tratada com

DEPC. O primer que vem com o kit foi selecionado porque ele hibridiza em caudas 3'poli(A), características dos RNAm de organismos eucarióticos.

O conteúdo desse tubo foi incubado a 65 °C durante 5 min e após esse tempo, as amostras foram transferidas imediatamente para o gelo, permanecendo ali por pelo menos 1 min. O conteúdo dos tubos foi coletado por uma breve centrifugação, e a ele foi adicionado o seguinte: 10 µL de 2X First-Strand Reaction Mix e 2 µL de SuperScript™III/RNaseOUT™ Enzyme Mix, totalizando 20 µL no tubo de reação.

A reação de transcriptase reversa e síntese do cDNA foi realizada por incubação do tubo de reação acima preparado em 50 °C por 50 min seguido de 5 min a 85 °C, e por fim, os tubos foram transferidos ao gelo. O volume total de cDNA foi completado até 60 µL por uma diluição com H₂O miliq tratada com DEPC e autoclavada.

2.5.2.8. Análise de expressão gênica por meio de PCR em tempo real (RT-PCR)

2.5.2.8.1. Conceitos teóricos e o método do Ct comparativo

A análise de expressão gênica por meio de RT-PCR baseia-se no acompanhamento do total de um cDNA alvo amplificado ao longo de uma reação de PCR, enquanto está ocorrendo, de modo que se torna possível saber se um gene está sendo mais ou menos amplificado comparando-se dois ou mais tratamentos entre si.

O acompanhamento dessa reação de amplificação é possível porque um marcador fluorescente é adicionado à amostra, o SYBR®-Green, que se liga a duplas fitas de DNA durante o processo de síntese. Esse componente é excitado em 494 nm e emite uma fluorescência a 521 nm. O aparato de RT-PCR possui um detector que reconhece essa fluorescência e consegue registrar sua variação, permitindo saber se ela está aumentando ou não ao longo dos ciclos de amplificação. O aparato utilizado foi o StepOne™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems, conectado ao programa StepOne™ Real Time PCR System v. 1.0.

Durante o período de amplificação, a fluorescência emitida pelo DNA amplificado ligado ao marcador SYBR®-Green aumenta seguindo uma curva exponencial. Num primeiro momento, ocorre a formação da linha de base, onde não há amplificação significativa e a fluorescência não aumenta. Em seguida, ocorre um aumento exponencial da amplificação (onde o DNA amplificado dobra a cada ciclo), o qual se prolonga até o momento em que há uma limitação e a curva apresenta um platô

de saturação. A comparação de níveis de expressão do gene alvo em diferentes tratamentos se faz por comparação dos diferentes Cts (ou ciclos de “threshold”). A partir de um total de fluorescência acima da linha de base (threshold) em que todas as curvas se encontrem na fase exponencial (Figura 2.7) pode ser obtido o valor de Ct. É importante que todas as reações envolvidas estejam ocorrendo com 100% de eficiência (ver teste de validação adiante).

Figura 2.7: Modelo de curva de amplificação de uma PCR em tempo real. Neste exemplo, as amostras começaram a amplificar-se ao redor do ciclo 13, e por volta do 25º ciclo, já houve saturação. O método do Ct comparativo é embasado nos dados obtidos no intervalo de amplificação linear e geométrica da curva de amplificação. ΔRn , magnitude do sinal de fluorescência obtido.

O método de quantificação realizado foi o do método do Ct comparativo. Por esse método, é possível saber se um gene está sendo mais ou menos expresso em uma amostra, comparado a outra de tratamento diferente, sem precisar exatamente a ordem de grandeza dessa expressão gênica, apenas quantas vezes a mais ou a menos o gene alvo se amplifica para os diferentes tratamentos. O sistema de quantificação relativa implica no uso de um gene chamado de controle endógeno, que permite uma normalização dos dados. A princípio, supõe-se que esse gene não terá alteração em suas taxas de expressão quando as amostras sejam submetidas a diferentes tratamentos. Neste trabalho, optou-se pelo gene codificante para a actina como controle.

Outro aspecto a ser considerado é a presença de um calibrador, que é uma condição controle sem a presença do tratamento (ex. amostras tratadas com UV x

amostras não tratadas com UV). Neste trabalho, as amostras submetidas a tratamentos com PAR e no momento inicial do período experimental foram utilizadas como calibrador.

A partir dos valores de Ct obtidos para o controle endógeno e o gene alvo, é possível comparar-se o nível de expressão desse gene alvo nos diferentes tratamentos. Os seguintes passos são realizados para atingir esse valor final.

Inicialmente, faz-se o cálculo do ΔCt , conforme a fórmula (M-16) (diferença entre o Ct do gene alvo e do controle endógeno):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{endógeno}} - Ct_{\text{gene alvo}} \quad (\text{M-16})$$

Em seguida, por meio da fórmula (M-17), normalizam-se os valores de ΔCt , calculando-se assim o $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra tratada}} - \Delta Ct_{\text{amostra calibradora}} \quad (\text{M-17})$$

Por fim, calcula-se a variação de expressão, como indicado na fórmula (M-18):

$$\text{Var} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{M-18})$$

2.5.2.8.2. Teste de validação

Um experimento de validação foi realizado antes da análise de PCR em tempo real. Por meio desse experimento, é possível saber se os primers escolhidos para o trabalho (ver Tabela 2.4) amplificam os cDNAs alvo com a mesma eficiência. Para isso, 6 diluições de dez vezes foram feitas com amostras de DNA extraído de algas mantidas em cultura. Na mesma placa de reação foram colocadas amostras para cada uma das diluições considerando-se os genes alvos e o controle endógeno.

O valor de ΔCt obtido para cada uma das amostras diluídas foi plotado em um gráfico com o logaritmo da diluição. Uma reta foi ajustada com os pontos desse gráfico, e para considerar o experimento como 100% eficaz, a inclinação dessa reta deve estar ao redor de -3,32. Uma reação 100% eficaz promove um aumento de dez vezes no total de amplicon a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação. O valor preciso de eficiência é obtido a partir da fórmula (M-19):

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \cdot 100 \quad (\text{M-19})$$

2.5.2.8.3. RT-PCR das amostras dos experimentos

Os experimentos de RT-PCR foram realizados usando o kit SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal da Invitrogen. Para cada reação em um poço da placa de 48 poços da Applied Biosystems, foram adicionados os seguintes reagentes: 10 µL de SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, 0,4 µL do marcador de referência ROX, 4,5 µL de amostra de cDNA, e os volumes de primer direto e reverso foram ajustados de acordo com o teste de validação. O volume total da reação foi ajustado para 20 µL com adição de H₂O miliq tratada com DEPC e autoclavada.

A placa foi selada, centrifugada rapidamente, e incubada no instrumento de RT-PCR de acordo com as seguintes temperaturas: i. 50 °C por 2 min; ii. 95 °C por 10 min; e iii. 40 ciclos de 95 °C, 15 s e 60 °C por 60 s. A curva de dissociação (melting) para os produtos foi obtida por incubação a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e outra vez a 95 °C por 15 s. Quando a mesma temperatura de dissociação (T_m, do inglês, “melting temperature”) é obtida para as diferentes amostras, isso implica que o mesmo produto está sendo formado. E uma única curva de T_m indica produto sem contaminação.

As análises dos valores de Ct obtidos nos experimentos foram todas realizadas no computador, através do programa StepOne™ Real Time PCR System v. 1.0.

2.5.2.9. **Quantificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA)**

Os ácidos nucleicos extraídos conforme descrito nos itens 2.5.2.4.1 para DNA e 2.5.2.5 para RNA foram descongelados e mantidos em gelo (4 °C). Amostras de 2 µL foram aplicadas no espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000) (Copyright © 2007 NanoDrop Technologies, Inc.), acoplado a um computador. O ponto de aplicação da amostra no aparelho foi previamente lavado com água miliq autoclavada. Posteriormente, o aparelho foi normalizado com a aplicação dos solventes (água miliq autoclavada e tampão TE, para RNA e DNA, respectivamente) sem os solutos, e em seguida, a absorbância foi medida entre 220 e 350 nm, e o aparelho forneceu diretamente os valores totais de ácidos nucleicos estimados a partir da absorbância a 260 nm e da Lei de Beer-Lambert modificada, como na fórmula (M-20):

$$c = (A \cdot e)/b \quad (M-20)$$

Onde “c” é a concentração de ácidos nucleicos, em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, “A” é a absorbância em Unidades de Absorbância, “e” é o coeficiente de extinção dependente do comprimento de onda em $\text{ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, e “b” é o comprimento do percurso em cm. Os coeficientes utilizados para ácidos nucleicos foram: DNA dupla fita, $50 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; e RNA, $40 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

A partir das relações entre 260/280 e 260/230, foi possível estimar a pureza do extrato de ácidos nucleicos. Os valores de quantidade de ácidos nucleicos foram fornecidos em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Todos os valores de quantificação foram obtidos a partir do programa NanoDrop ND-1000 3.3.1 (Coleman Technologies Inc.).

2.5.2.10. Detecção de danos no DNA por imunoenensaio (DNA dot-blot)

O procedimento de detecção de danos no DNA (formação de dímeros de pirimidina) foi realizado a partir do DNA extraído dos diferentes tratamentos, seguindo o mesmo protocolo que descrito no item 2.5.2.4.1. Esse DNA foi quantificado conforme descrito no tópico 2.5.2.9. Foi utilizado um aparato de sucção de substâncias à vácuo Omniphor® (aparato de dot-blot).

O aparato foi desmontado e lavado com SDS 1% e água miliq autoclavada antes do uso. A seguir, um pedaço de papel filtro foi cortado a fim de cobrir o número de poços de interesse a cada aplicação de DNA. Esse papel foi molhado em tampão TE (Tris-HCl 200 mM, EDTA 20 mM, pH 7,5) antes de ser aplicado no aparato. Sobre esse papel, foi colocado um pedaço do mesmo tamanho da membrana de nylon Hybond™-N⁺ (Amersham Biosciences UK limited, Amersham Place, Little Chalfont, UK) que esteve previamente incubado em TE. A seguir, a estrutura contendo o papel filtro com a membrana por cima foi parafusada, de modo que ao fundo de cada poço estava a membrana apta a receber o DNA na concentração de interesse.

O DNA foi quantificado (item 2.5.2.9) e diluído à concentração de $0,075 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ antes de ser aplicado à membrana. Para cada amostra, 200 μL de DNA foram fervidos a 100 °C por 10 minutos, e logo a seguir inseridos no gelo, a fim de separar as fitas do DNA. O DNA foi aplicado pipetando-se nos poços do aparato com o vácuo produzido a partir de um compressor-aspirador Fanem® DIAPUMP®, São Paulo, Brasil. Por meio desse vácuo, a solução de DNA foi carregada através da membrana, de modo que o DNA permaneceu retido na mesma. Após todo o DNA ter sido aplicado na membrana,

essa foi removida do aparato de dot-blot e foi inserida num forno (Amersham Life Science) a 80 °C por 2 h, para imobilizar o DNA.

A partir desse ponto, foi realizada a imunoincubação. A membrana foi lavada em 20 mL de PBS (NaCl 1,3 M, KCl 20 mM, Na₂HPO₄ 0,1 M) duas vezes por 5 min. A seguir, o PBS foi descartado e a membrana foi bloqueada por meio da agitação em 20 mL de PBS com leite em pó desnatado instantâneo Molico® Nestlé® a 4% durante pelo menos 30 min.

A seguir, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS-0,05% Tween 20 (PBS-T) por 10 min no agitador. Após essa lavagem para remoção do excesso de leite, foram aplicados 30 µL do anticorpo primário Mouse Monoclonal [H3] para Dímeros de Timina (ab10347; 0,4 µg.µL⁻¹; Abcam Inc. One Kendall Square, Cambridge, MA, UK), diluído em 10 mL de PBS-T e leite desnatado 1% (1:333,3). A concentração final do anticorpo primário foi de 0,001 µg.µL⁻¹. A membrana com o DNA aderido permaneceu mergulhada nessa substância acima, sob agitação durante a noite, a 4 °C.

A membrana foi lavada três vezes sob agitação com 20 mL de PBS-T, por 20 min cada lavagem. Em seguida, foi aplicado, durante 2 h e em agitação, o anticorpo secundário A2304 Anti-Mouse IgG (Fab. Specific)- peroxidase, produzido em cabras, diluído em PBS-T em leite 1% (1:2000 de anticorpo secundário a 0,1 mg.mL⁻¹). Por fim, a membrana foi lavada três vezes com 20 mL de PBS-T, por 20 min a cada vez. Antes da detecção quimioluminescente, a membrana foi inserida em PBS.

Os procedimentos de marcação quimioluminescente e revelação da membrana foram realizados em uma sala escura.

Os dois reagentes de detecção do kit ECL (Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare UK limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foram misturados na proporção 1:1, em volume suficiente para mergulhar totalmente a membrana durante 1 min. A seguir, a membrana foi posicionada dentro do cassete de revelação, protegida por filme plástico, e sobre a membrana, foi posicionado um filme para raios-X Kodak T-MAT G/RA de 20,3 x 25,4 cm. O cassete foi então fechado, e a membrana foi exposta ao filme durante 5 min. Posteriormente, o filme foi removido, sendo inserido em revelador por 3 min, lavado em água por 2 min e exposto ao fixador por 5 min. A membrana permaneceu dentro do cassete, até que o procedimento de revelação do filme terminasse, de modo que fosse possível detectar a correta posição da mesma no filme. O filme foi posto pra secar, sendo escaneado em seguida. A imagem

obtida foi analisada no programa analisador de imagens Kodak 1D 3.5.4 (Kodak Scientific Imaging Systems © 1994-2000 Eastman Kodak Company).

2.6. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram feitos no mínimo em triplicata. Os dados foram submetidos aos tratamentos de validação preliminares de normalidade e homogeneidade de variâncias (teste de validação de Cochran). Uma vez validados, os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) uni ou multifatorial de acordo com o caso. Quando o tempo foi tomado como variável, foi realizada uma ANOVA do tipo medidas repetidas. Quando necessário, um teste *a posteriori* de Newman Keuls foi realizado, com um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Adicionalmente, alguns dados foram submetidos a testes de correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

2.7. Desenhos experimentais

Cinco diferentes experimentos foram realizados neste trabalho. O primeiro tratou de apresentar a saturação de alguns compostos fotoprotetores, tratando as algas com PAB e concentrações crescentes de nitrogênio. O segundo foi realizado para comparar a fotoproteção de *G. tenuistipitata* em diferentes tipos, doses e intensidades de radiação, testando o efeito de reciprocidade. No terceiro experimento, o objetivo foi verificar os efeitos de diferentes radiações (PAR x PAB) e concentrações de nitrogênio sobre diferentes variáveis fisiológicas e moleculares de *G. tenuistipitata*. No quarto experimento, pretendeu-se estudar a fotoproteção da alga também com diferentes suprimentos de nitrogênio, mas em termos de radiação comparando-se a ausência ou a presença de UVB nos tratamentos (PA x PAB). Por fim, o quinto experimento buscou saber como a alga se fotoprotege quando ocorre uma alteração do espectro de radiação disponibilizado, sob concentração fixa de nitrogênio. Serão referidos como experimento 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Os espectros de radiação recebidos pelas algas nos diferentes experimentos estão detalhados nas Figuras 2.8 e 2.9.

Figura 2.8: Espectros de radiação obtidos com a combinação de filtros de corte e diferentes lâmpadas para fornecer diferentes tipos de radiação. A partir destas curvas, foram obtidas as intensidades de radiação em cada um dos tratamentos realizados. Estes espectros foram utilizados nos experimentos 1 (PAB), 3 (PAR e PAB), 4 (PA e PAB) e 5 (todos).

2.7.1. Experimento 1 – Fotoproteção de *G. tenuistipitata* cultivada em radiação PAR+UVA+UVB e concentrações crescentes de NO_3^-

A fim de verificar os efeitos de saturação e limitação de NO_3^- na fotoproteção de *G. tenuistipitata*, amostras de 2 g de alga provenientes do pré-tratamento por uma semana em VS a 0,5 mM NO_3^- foram cultivadas em 1 L de água do mar enriquecida com solução de VS, com a adição das seguintes concentrações de nitrato: 0; 0,03; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 e 2 mM. A condição de radiação escolhida para o cultivo foi de PAB. A intensidade e a dose recebidas pelas algas no decorrer dos 7 dias de experimento estão apresentadas na Tabela 2.4 (ver terceira linha, com tratamento PAB) e o espectro dessa radiação recebido pelas algas está presente na Figura 2.8. Vale ressaltar que as amostras foram pré-aclimatadas em PAR e 0,5 mM de NO_3^- por uma semana antes da execução do experimento.

Ao início e final do experimento, foram medidos o rendimento quântico ótimo e a quantidade de carotenoides, clorofila *a*, e ainda dos MAAs. Ao final foi obtida também uma curva de luz para cálculo de valores de ETR_{max} e α .

2.7.2. Experimento 2 – Fotoproteção de *G. tenuistipitata* cultivada em diferentes doses e intensidades de radiação: o efeito da reciprocidade

Amostras de *G. tenuistipitata* permaneceram uma semana em aclimação a PAR, com suprimento de Von Stosch e 0,5 mM de NO_3^- no início desse período. Ao final do mesmo, 2 g de massa fresca foram inseridos em frascos contendo 1 L de meio de cultura VS enriquecido com 0,5 mM de NO_3^- . Essas amostras permaneceram uma semana em novos tratamentos de radiação, recebendo PAR, PA ou PAB. Uma vez que a dose é resultado da intensidade de radiação multiplicada pelo tempo de exposição, é possível que em um dado valor de intensidade “i” por um tempo de 12 h se obtenha o total definido de dose diária. Esse mesmo total de dose também pode ser obtido ao expor o material ao dobro da intensidade de radiação “2i” pela metade do tempo 6 h. Partindo desse princípio, foram elaborados os seguintes tratamentos compostos por [radiação-intensidade de UV(tempo de exposição)]: PAR-sem UV, PA-i(12h), PA-2i(6h), PA-2i(12h), PA-4i(6h), PAB-i(12h), PAB-2i(6h), PAB-2i(12h) e PAB-4i(6h). Os espectros de radiação recebidos pelas algas em cada um dos tratamentos foram obtidos pela combinação de filtros de corte e diferentes fontes emissoras de radiação (Figura 2.9). Nesse caso, os valores de intensidade de “i” utilizados como base para o posicionamento dos frascos na prateleira de cultivo foram: 0,42 W.m⁻² de UVB e 8,13 W.m⁻² de UVA. Os valores de doses e intensidades totais e ponderadas recebidas por cada tratamento estão apresentados na Tabela 2.4. Duas réplicas biológicas e três réplicas experimentais foram utilizadas para cada tratamento.

Tabela 2.4: Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de P, PA e PAB do experimento 2. A dose total recebida foi calculada desde os valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).

T	Irradiância total			Irradiância ponderada**(W.m^{-2})		Dose total recebida (KJ.m^{-2})			
	tipos *	Tempo UV/dia (h)	Intensidade absoluta (W.m^{-2})	DNA	Fotoinibição	código	1d	3d	7d
PAR	p + i	-	16,17	0,00	0,00		698,35	2095,05	4888,46
PA	p + i	12	23,67	0,00	0,86	D _{PA}	1022,46	3067,39	7157,24
PA	p + 2i	6	31,61	0,00	1,84	D _{PA}	1032,02	3096,07	7224,16
PA	p + 2i	12	30,07	0,00	1,58	2D _{PA}	1298,86	3896,59	9092,04
PA	p + 4i	6	45,57	0,00	3,56	2D _{PA}	1333,55	4000,64	9334,83
PAB	p + i	12	24,90	0,01	1,28	D _{PAB}	1075,54	3226,62	7528,78
PAB	p + 2i	6	34,76	0,02	2,73	D _{PAB}	1100,03	3300,09	7700,22
PAB	p + 2i	12	32,75	0,02	2,39	2D _{PAB}	1414,95	4244,84	9904,63
PAB	p + 4i	6	52,23	0,00	5,28	2D _{PAB}	1477,25	4431,75	10340,75

* p, irradiância PAR; i, irradiância de UVA ($8,17 \text{ W.m}^{-2}$) e de UVB ($0,42 \text{ W.m}^{-2}$).

** Dados obtidos a partir dos fatores de Setlow, 1974 (DNA) e Jones e Kok, 1966 (fotoinibição).

Figura 2.9: Espectros de radiação obtidos com a combinação de filtros de corte e diferentes lâmpadas para fornecer diferentes doses e intensidades de radiação. Estes espectros foram utilizados para o experimento 2.

No início, após 3 e 7 dias de exposição das algas às condições acima especificadas, foram coletadas amostras para quantificação de clorofila *a*, MAAs totais e ainda para a análise da expressão gênica de genes codificantes para uma fotoliase. Além disso, foram quantificados o total de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e a possível formação de dímeros de pirimidinas. Os parâmetros fotossintetizantes a partir da fluorescência da clorofila *a* também foram obtidos, incluindo o rendimento quântico

ótimo (nos três períodos) e a quantidade de carotenoides e, além disso, a medição de curvas de luz no início e final do período experimental, que permitiu a obtenção dos valores de ETR_{max} e α .

2.7.3. Experimento 3 – Efeitos da radiação UV na fotoproteção e fotossíntese de *G. tenuistipitata* cultivada sob diferentes concentrações de NO_3^-

Amostras de algas permaneceram por uma semana em pré-tratamento sob condições de PAR e suprimento de 0,5 mM de NO_3^- na água do mar. No início do experimento, 2 g de algas aclimatadas receberam novo suprimento de 1 L de meio de cultura (com adição de solução de Von Sotsch), porém tratadas com 0, 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^- na água do mar. Além disso, os frascos de metacrilato com as algas nesse volume foram expostos a tratamentos de PAR ou PAB, com os valores calculados a partir do espectro da Figura 2.8 (curvas de PAR e PAB). Os valores de doses e intensidades absolutas são mostrados na Tabela 2.5. Amostras foram coletadas no início, após três dias e no término do período experimental (sete dias), permitindo a obtenção também de dados de massa fresca. Além disso, a fluorescência da clorofila *a* foi mensurada nesses mesmos momentos. Três réplicas biológicas foram executadas para cada tratamento.

Tabela 2.5: Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de PAR e PAB do experimento 3. A dose total recebida foi calculada desde os valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).

T	Irradiância total			Irradiância ponderada** (W.m ⁻²)		Dose total recebida (KJ.m ⁻²)		
	tipos *	Tempo UV (h)	Intensidade absoluta (W.m ⁻²)	DNA	Fotoinibição	1d	3d	7d
PAR	p + i	-	16,17	0,00	0,00	698,35	2095,05	4888,46
PAB	p + i	12	24,90	0,01	1,28	1075,54	3226,62	7528,78

* p, irradiância PAR; i, irradiância de UVA (8,17 W.m⁻²) e de UVB (0,42 W.m⁻²).

** Dados obtidos a partir dos fatores de Setlow, 1974 (DNA) e Jones & Kok, 1966 (fotoinibição).

Os seguintes parâmetros foram medidos nas amostras obtidas neste experimento: crescimento a partir da massa fresca, atividade específica da anidrase carbônica, conteúdo de C e N, quantificação do total de aminoácidos tipo micosporinas, conteúdo pigmentar (incluindo clorofila *a* e ficobiliproteínas), o total de proteínas solúveis e o rendimento quântico ótimo. Além disso, foi realizada a extração, limpeza e quantificação de RNA para a análise posterior da expressão dos genes codificantes para uma fotoliase.

Após os sete dias experimentais, 0,1 g de alga fresca foi acondicionado em placas de Petri com 50 mL de meio de cultura e 0,5 mM de NO_3^- , mantidos no escuro para abrir todos os centros de reação do aparato fotossintetizante e, em seguida, e expostos ao tratamento de PAB durante 30 min, recebendo $70 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ de PAR, 16 W.m^{-2} de UVA e $0,9 \text{ W.m}^{-2}$ de UVB. Após esse período, as amostras permaneceram durante 2 h em condição de PAR, recebendo $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

Após a aclimação inicial ao escuro, foi obtido o rendimento quântico ótimo. Logo depois, as algas permaneceram expostas diretamente às lâmpadas de PAR e UV, sem aeração nas placas de Petri. Durante o período de exposição à radiação UV, o rendimento quântico efetivo foi medido a cada 6 min, totalizando 5 medidas para o período. Em seguida, os ápices nas placas de Petri foram colocados no período de recuperação. Quatro medidas de rendimento quântico efetivo foram feitas, uma a cada 6 min, totalizando o tempo de 24 min. Após totalizar 2 h de recuperação, foi feita a última medida de rendimento quântico efetivo.

Os dados de dano e recuperação foram obtidos a partir da fórmula (M-21) de Kok (1956) para o período de exposição à radiação UV:

$$P/P_i = r/(k+r) + k/(k+r) \cdot e^{-(k+r) \cdot t} \quad (\text{M-21})$$

Na qual “r” é o reparo e “k” é o dano causado às algas durante a fase de exposição à radiação UV. “ P_i ” e “P” são os dados de rendimento quântico efetivo para o início e o término do período de exposição (t). Ao final do período de recuperação, o rendimento quântico efetivo foi comparado em percentual ao valor do rendimento quântico ótimo, medido antes da exposição das amostras à radiação UV.

2.7.4. Experimento 4 – Efeitos da radiação UVB na fotoproteção de *G. tenuistipitata* cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Após um período de aclimação de uma semana às condições gerais de cultivo, as amostras de 2 g de algas utilizadas neste experimento foram submetidas às mesmas condições do experimento 3, como descrito acima, com uma diferença nos tratamentos de radiações: ao invés de receber PAR e PAB, as algas foram expostas a 12 h diárias do fotoperíodo às radiações PA e PAB. Os valores de intensidade absolutos e ponderados para danos no DNA e fotoinibição, além da dose total recebida em 1, 3 e 7 dias utilizados neste experimento estão apresentados na Tabela 2.6. Os procedimentos de

tomada de amostras foram similares àqueles do experimento 3, com amostras retiradas dos frascos de cultivo no início, após 3 e 7 dias de cultivo.

Tabela 2.6: Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os tratamentos (T) de PA e PAB do experimento 4. A dose total recebida foi calculada a partir dos valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias (d).

T	Irradiância total			Irradiância ponderada** (W.m ⁻²)		Dose total recebida (KJ.m ⁻²)		
	tipos *	Tempo UV/dia (h)	Intensidade absoluta (W.m ⁻²)	DNA	Fotoinibição	1d	3d	7d
PA	p + i	12	23,67	0,00	0,86	1022,46	3067,39	7157,24
PAB	p + i	12	24,90	0,01	1,28	1075,54	3226,62	7528,78

* p, irradiância PAR; i, irradiância de UVA (8,17 W.m⁻²) e de UVB (0,42 W.m⁻²).

** Dados obtidos a partir dos fatores de Setlow, 1974 (DNA) e Jones & Kok, 1966 (fotoinibição).

Os seguintes parâmetros foram analisados a partir das amostras tratadas neste experimento: crescimento, conteúdo de C e N, conteúdo pigmentar (incluindo clorofila *a*, ficobiliproteínas e carotenoides), rendimento quântico ótimo e curvas de luz de fotossíntese, quantificação de MAAs, de DNA e RNA, medição de dímeros de pirimidina e análise da expressão gênica para o gene codificante para uma fotoliase.

Após os 7 dias experimentais, amostras de 0,1 g foram selecionadas e foi procedido um tratamento idêntico de dano e recuperação do aparato fotossintetizante tal como explicado no experimento 3.

2.7.5. Experimento 5 – Aclimação de *G. tenuistipitata* a diferentes tipos de radiação: efeitos na fotossíntese, crescimento e nos mecanismos de fotoproteção

Antes dos experimentos, as algas foram cultivadas por uma semana em PAR, com suprimento de 0,5 mM de NO₃⁻ no início do período. Amostras de 2 g com partes homogêneas do talo de *G. tenuistipitata* foram inseridas em condições de aclimação a diferentes radiações por uma semana. Essas radiações consistiram em PAR, PA e PAB, com suprimento de VS contendo nitrogênio na concentração de 0,5 mM de NO₃⁻. As intensidades e doses de radiações são mostradas na Tabela 2.7.

Durante essa aclimação (no início, após 3 e 7 dias), os seguintes parâmetros foram medidos: crescimento, conteúdo de C e N, rendimento quântico ótimo, pigmentos fotossintetizantes (carotenoides, clorofila *a* e ficobiliproteínas), MAAs e, ainda, a quantidade de DNA, RNA e a expressão gênica do gene codificante para uma fotoliase.

Após o período de aclimação a PAR, PA e PAB, 0,8 g de massa fresca de alga foram inseridos em novos cilindros de cultivo, contendo 400 mL de meio de cultura VS

com adição de 0,5 mM de NO_3^- . Os seguintes tratamentos foram executados: i, para as algas aclimatadas à PAR, foram obtidas amostras e cultivadas em PAR (controle), PAB e PB; ii, para as algas aclimatadas à PA, amostras foram obtidas e inseridas em cultivos com PA (controle), PAB e PB; iii, e por fim, as algas aclimatadas à PAB foram inseridas em novos cultivos com os tratamentos de PAB (controle), PAR e PB. Esses cultivos foram realizados por até 50 h de exposição ininterrupta às diferentes radiações. As intensidades e as doses utilizadas estão mostradas na Tabela 2.7. Os espectros de radiação recebidos por essas algas (PAR, PA, PAB e PB) são apresentados na Figura 2.8.

As algas foram pesadas e amostras foram coletadas no início do experimento e após 2, 6, 12, 24 e 48 h. Essas amostras foram utilizadas para análise de MAAs. Além de obter dados de massa fresca para esses momentos, foi também medido o rendimento quântico efetivo nesses intervalos.

Ao início e após 50h, foram obtidas amostras para avaliar os seguintes parâmetros: conteúdo de C e N, conteúdo pigmentar (carotenoides e clorofila *a*), quantidade de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e quantificação relativa de dímeros de T, além de análise da expressão gênica de genes codificantes para fotoliase, ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidase (GPX). Adicionalmente, foram obtidas curvas de luz de ETR x irradiância ao final do período experimental (após 50h).

Tabela 2.7: Valores de doses e intensidades de radiação totais e ponderados para os pré-tratamentos de PAR, PA, PAB e tratamentos de PAR, PA, PAB e PB do experimento 5. A dose total recebida foi calculada a partir dos valores de intensidade absoluta para 1, 3 e 7 dias no pré-tratamento e para 2, 6, 12, 24 e 48h do período de tratamento (d).

Irradiância total				Irradiância ponderada**(W.m ⁻²)		Dose total recebida (KJ.m ⁻²)				
tipos *	Tempo UV/dia (h)	Int. absoluta (W.m ⁻²)		DNA	Fotoinibição	1d	3d	7d		
<i>pré-tratamento</i>										
PAR	p + i	-	16,17	0,00	0,00	698,4	2095,1	4888,5		
PA	p + i	12	23,67	0,00	0,86	1022,5	3067,4	7157,2		
PAB	p + i	12	24,90	0,01	1,28	1075,5	3226,6	7528,8		
<i>tratamentos</i>										
						2h	6h	12h	24h	48h
PAR	p + i		16,17	0,00	0,00	116,4	349,2	698,4	1396,7	2793,4
PA	p + i		23,67	0,00	0,86	170,4	511,2	1022,5	2044,9	4089,9
PAB	p + i		24,90	0,01	1,28	179,3	537,8	1075,5	2151,1	4302,2
PB	p + i		17,40	0,12	0,62	125,2	375,7	751,5	1503,0	3006,0

* p, irradiância PAR; i, irradiância de UVA (8,17 W.m⁻²) e de UVB (0,42 W.m⁻²).

** Dados obtidos a partir dos fatores de Setlow, 1974 (DNA) e Jones & Kok, 1966 (fotoinibição).

3. Resultados

3.1. Análises moleculares preliminares

Neste bloco do trabalho são apresentados os resultados obtidos previamente a todas as análises de expressão gênica realizados com a PCR em tempo real. São incluídos os resultados da identificação e digestão dos clones obtidos na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata* e o sequenciamento realizado para dois genes codificantes para duas fotoliasas diferentes. Além disso, os resultados preliminares dos testes de validação dos diferentes pares de primers utilizados para a análise de expressão gênica também são apresentados.

3.1.1. Identificação dos clones de fotoliasas na biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*

Inicialmente, foram identificados na biblioteca de ESTs de *Gracilaria tenuistipitata* três clones com sequências semelhantes a fotoliasas, denominados Gt01029B07.b, Gt01032G11.b e Gt01033C11.b, doravante denominados de clone-29, clone-32 e clone-33, respectivamente.

Os três clones apresentaram semelhança significativa (usando o BlastX) com sequências codificantes para proteínas fotoliasas envolvidas no reparo de DNA principalmente de plantas e cianobactérias (Tabela 3.1).

A digestão dos plasmídeos contendo os ESTs com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* produziu fragmentos de tamanhos diferentes para os três clones (Figura 3.1). O clone-29 apresentou dois fragmentos de cerca de 800 pb e 600 pb, enquanto que o clone-32 foi constituído de um fragmento apenas de 1600 pb. Já o clone-33 teve também dois fragmentos menores, com cerca de 400 e 200 pb.

Tabela 3.1: Resultados do BlastX para os clones de cDNA da biblioteca de *Gracilaria tenuistipitata* selecionados para este estudo. Apenas as primeiras 9 sequências foram incluídas para cada clone.

No. de acesso	Nome da proteína	Organismo	Score	E-value
Clone-29				
YP001680430	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	121	6e-26
YP643445	deoxyribodipyrimidine photo-lyase type II	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	120	1e-25
ZP01466362	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	119	2e-25
YP002605182	DNA deoxyribo-dipyrimidine photolyase family protein	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	119	3e-25
YP379184	DNA photolyase, class 2	<i>Chlorobium chlorochromatii</i>	119	4e-25
NP276041	DNA deoxyribodipyrimidine photolyase (photoreactivation)	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	115	3e-24
YP002508252	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	<i>Halothermothrix orenii</i>	114	1e-23
YP002431508	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	110	1e-22
YP001930914	deoxyribodipyrimidine photo-lyase	<i>Sulfurihydrogenibium</i> sp.	110	2e-22
Clone-32				
EEF39277	DNA photolyase, putative	<i>Ricinus communis</i>	164	8e-39
AAM64933	photolyase/blue-light receptor PHR2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	164	1e-38
NP182281	PHR2 (photolyase/blue-light receptor 2); DNA photolyase DNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	164	1e-38
ABD93512	photolyase protein	<i>Coffea canephora</i>	160	1e-37
ABD93509	DNA photolyase protein	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	160	2e-37
YP001516750	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Acaryochloris marina</i>	159	3e-37
ABD93507	DNA photolyase protein	<i>Solanum melongena</i>	159	3e-37
YP473788	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Synechococcus</i> sp.	157	1e-36
ABD93505	DNA photolyase protein	<i>Physalis</i> sp.	157	1e-36
Clone-33				
YP473788	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Synechococcus</i> sp.	182	3e-44
YP001516750	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Acaryochloris marina</i>	182	4e-44
YP001658309	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Microcystis aeruginosa</i>	176	3e-42
AAM64933	photolyase/blue-light receptor PHR2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	175	3e-42
NP182281	PHR2 (photolyase/blue-light receptor 2); DNA photolyase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	175	3e-42
EEF39277	DNA photolyase, putative	<i>Ricinus communis</i>	174	8e-42
YP445305	deoxyribodipyrimidine photolyase	<i>Salinibacter ruber</i>	173	2e-41
YP001735899	DNA photolyase	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 700	171	5e-41
ABD93509	DNA photolyase protein	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	171	5e-41

Por meio do processo de sequenciamento “primerwalking”, executado para os três clones com semelhança à fotoliasas identificados da biblioteca de cDNA de *G. tenuistipitata*, verificou-se que os clones 32 e 33 possuíam partes em comum. Dessa forma, acredita-se que ambos codifiquem para a mesma proteína. Decidiu-se prosseguir o estudo e completar o sequenciamento apenas dos clones 29 e 32.

Figura 3.1: Gel de agarose 0,7% com o produto da digestão com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* dos clones 33, 32 e 29. O marcador 1 Kb Ladder está representado na primeira coluna à esquerda. O fragmento correspondente ao plasmídeo original linearizado, de 4,5 Kb, está indicado pela seta.

3.1.2. Sequências das fotoliasas de *G. tenuistipitata*

As sequências obtidas a partir dos clones 29 e 32 possuem, em sua totalidade, 1842 pb e 1417 pb, respectivamente (Figura 3.2).

Para o clone-29, o quadro aberto de leitura (ORF, “Open Reading Frame”) foi obtido a partir do códon de iniciação ATG e possui 1599 pb até o códon terminal TAA (Figura 3.2), codificando um total de 532 aminoácidos. Nesse ORF, foi encontrada homologia para dois domínios proteicos: um de uma fotoliase de DNA e o outro equivalente a um ligante FAD7 (Figura 3.3). A sequência codificante para o domínio da fotoliase possui 507 pb enquanto que aquela que codifica o domínio proteico FAD7 é composta por 699 pb (Figura 3.2).

A sequência completa para o clone-32 apresenta um códon de iniciação alternativo (TTG) em vez do ATG tradicional. O ORF dessa sequência, por sua vez, é composto por 1113 pb do TTG até o códon terminal TAG, codificando um total de 370 aminoácidos. Neste caso, também foi possível detectar um trecho codificante para um domínio fotoliase, contendo 558 pb e outro trecho codificante para um ligante FAD7, constituído por 264 pb (Figura 3.2).

Clone-29

GACGACCTCCACATCGCCTGCCG**ATGCGTCCCGCGTTCATAC**CCTCAACT**CCAATGCCGTCAACAAATCC**
GGGC**TCATTTGTGCTGTACTGGATGTCCAAC**TCGTTGCGTACTCGCTACAAC**TTTGCTCTAGGACACGCC**
ATCTACCTTTTGTGAAAAGTATCGCAAACCACTTCGAGTGGTGCACGTGTTTCGAGACTATCGCGCAAGACG
GACAACCTCTGGCGGAGCGTCATGCGGGGTTC**CAAC**TTGAGAGTTTTATAGATGTCGAGGATGACCTACG
AAAAAGTCCATTCCGTTTGCGGTTATTGAGCCAGGGCATGACACGCGGGAGACCATTACTGCACTGGCT
AGACACGCTGTTTCAGTGGTTACTGATACTTCGTATCTACGTCTGGGCAGAGCTAGCCGAGAGGCAGTCG
CTTCTTCTTTAAATGTGCCTCTTTATGACGTGCAAGCTGATGTCATCGTTCCGTGTC**CAAC**AGCATCGGA
CAAGGCTGAATACGCCGCGCGAACAATTCGTCCCAAGATAACTCGTGCTTTGAAGGATTATTTGGTTCCC
ATGCCAGAAATAGAAATAACCCAACAATCTACGTGTGACGTGAAGAAGTGGATAGAGTCGGCGAATCCTG
ACATT**CAGTTGCTTGATTG**CAGGACGTGGATACTGGTTTGGACAAAATGGAAGGCTTAGATCTCGGAGC
TTCTCGAGTTTCGATTCTTCCGAGGTGGGCAGAACGAAGCTCAAGCTCGCCTTCAC**TCTTTTCTCACCAAG**
AGACTCAGAGATTATGGTTTCGGGGCGAAATGAACCTGCCAAACAGTTGCAATCTGATCTCAGTCTTATC
TTTCGAGCAGGCAATATATCTCCCTTTGATATTGCGTTACGAGCAAAAGAGAGCGCTCGAAAGAAGCCATC
CATGAAGGAAAAGTGAAGAGTCTTTCTAGAAAGAACTTATCGTGCGC**GTGAAC****TGGCGGTAAATGC**ATGC
TGGTTCAATCCCAAGGTCTACGACATATATGAAAGAATTGTCCCAACTTTGCGCAGCAGTCTCTTGCTC
TGCATAAGAGCGACAAGAGACCTAGAATTCGTACGTACGACGAAC**TTGACGCAGCTGTCACGGCCACCC**
GTACTGGAACGCTGCGCAACTGAAGATGATTGTAAGAGAGAAAATGCACGGATACATGAGGATGTACTGG
GTGAAGCGAATAATTGGATGGGTTGAGGATCCAAAGGATGCCATGGACTTCGCTCTTCGACTGAAAAATA
GATGGGAGCTCGACCTGTGGATCCCAACGCGTACACTGGGGTTATCTGGTGCTTTGGACTTCATGATCG
TGGCTGGACCGAAAGACCGATATGGGGTAAAGTGCGGTACATGAACGAGAGTGGCTTGAAAAGAAAATTC
AACATGGCTGCATACATTGCTAATGTGGATAAGTTGGTTGCCAAAGAAGGGCTGCCCTCTCATATAGCCG
AACTCAGAAAAACAGCATGGAAAAAGGGCGACGACAAACAAACGATTGAAGAGACTCTAAAACGACGCAGCAC
AAACAAAATAACTCCGGAACCTTCAAAGGCCCTCAAACGTTTGAAGGTGTCACATCTGTCAATAGGAGA
ATGAAGACT**TAA**GCTCTGGTGTGGAGTTTGCTCTCTTGGCACCATTTCGCAAGCCCGTCTTCTTCTATG
CAATCACATTCAAAACTT**CCATTACTGCCAACGCCTCC**GCATCTAAACCACCGACCTTCCCACTTCCCTG
CACAAAGACGACAGTCTTTTCTTTTGTAAACTGAATTGGTGCCATTTTCTTCATGAGTGAAGTCCACTC
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Clone-32

CGGCACGAGGTTTTCCT**TTG**GCTAGTGTGAGACCTGTGGCTGTCTCTCCGGCGCCTAATTTGTCCACCAA
CTCGCGCCGTTGCGTACGCTGCGGGCTTTTTTGATGATGGCGCCTTGGGGAAGGCTTTGGATAAG**GTTG**
TTGTCTTGTTCGTTCCGATTTGAGACTTGATGACCACCCG**GCTCTGTCAATTTGCGTTGGA**AGACGCCAA
GGATGTTGTGCTGTCTATTG**CTTTGACCCGAGGCAC****TTTG**GAAGGACTGATTATGGTTTTTCAGAAAACC
GGAAAATATAGGGCAGCCTTCTTGATTGAGAGCGTGGAAGACCTGAGAAAGTCTTTACGTGCCAAAGGTA
GTGACCTTATTGTGCGTATTGGACGCCCAGAGCAGGTCA**TTCCGGA**ACTGTGCCGTTCAACCAATTGTGCG
TAATGTTTTTTCGCATAAGGAGGTCACTCATGATGAGCAACAGGTGAAGTTGCTTTGGAAGAAGCTCTT
AAAAAGAACGGAGCCCAATTGTCCACCTTCTGGGCGAATACCCTGTATCATGAGGATGACCTTCCCTTCC
CGATTCAAGACATCCCAGATG**TTTACTCTGACTTTTCG**GAAGCCGTT**CAGA**AGTCGGGTACCATCCGCAC
GCCGTTGCACACACCTGACTCATTTCCTGCTCTG**CCCAATGGGCTCAAGCCGGGAGATATTCCT**ACTCTT
CGCCAACTCGGCATCGAATACTCGCCGCTCACATCTAAGCTCAGCCCCAACAAAGACGGCCACGAGCGGAA
TTTCTTCTGTAACA**GGAGGTGAAACTGAAGCTATGTTGCGCGTGCAGGCGTATGTCGACGAAAGCAAGCG**
TTTTGATGCTGCTCTTTCGCGGAGAGCGCAAGTTACAAAACACCTTGGGGCTGATTTTTCTGTGTCGATC
TCACCGTGGTTGGCACTTGGATGCATTTCCGCCGAAGGATCTTTGATGAAATGAAAAGGCTTCCCTTA
GACCGCACACTCTGGTTACTTCCACTACGTATTTGAACTGGTGTGGCGGGATTTCTTTAGATATATTAC
TGCCAAATACTCTGGCAAGAGAAAATGCTGCTGCTGCGCGGAGTGCTAATTTGTGCGAGAGATTGCTGCG
CGTTCA**TAG**ATGGTTTGTGTTGGGCTTACATGTGTGGTGCCCTTGATGCCGAGTGTCAAATTCCTCCTT
TGTACGGTTCAACAACATGATATACGTGGATACATATCTTTCTTGACTTGGCGAATTGAGGAAAGGGAT
ATGTCGTTTATCATTACCTTAGTACTCTGTTCAAGTGCATATGAGTGGTCTAGCTAGAGAACGGCACTGT
CTACTGCAATAATAATGTAAACGGGGGGGTTTAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 3.2: Sequências consenso dos genes codificantes para duas fotoliasas diferentes, obtidas a partir dos clones 29 e 32. Os códons de início e término dos quadros abertos de leitura estão em negrito e sublinhados. Os primers diretos e reversos estão marcados em verde e amarelo, respectivamente. As sequências codificantes para a superfamília da fotoliasa de DNA estão marcadas em azul, enquanto que aquelas codificantes para o ligante FAD7 estão em rosa. Os primers (direto e reverso) utilizados pra o experimento de expressão gênica estão representados em itálico.

Figura 3.3: Identificação dos domínios proteicos das fotolases de *G. tenuistipitata* para as sequências consenso obtidas a partir dos clones 29 e 32. Os números acima das barras de coloração cinza indicam o número de aminoácidos.

3.1.3. Análises preliminares para estudos de expressão gênica em *G. tenuistipitata*

Os diferentes pares de primers (Tabela 2.3) usados para os experimentos de RT-PCR foram testados quanto à sua eficiência e especificidade de amplificação utilizando-se DNA total para amplificação por PCR das regiões alvo. Todos os pares de primers apresentaram produtos de PCR do tamanho esperado (dados não mostrados), que foram sequenciados mostrando que região alvo estava correta.

O teste de validação para as análises de expressão gênica foi positivo para os pares de primers que amplificam trechos de DNA das seguintes sequências: actina, fotoliase do clone-32, ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX) (Tabela 3.2). O par de primers desenhados para RT-PCR (Photol-29F_{RT} e Photol-29R_{RT}) para amplificar o trecho presente na sequência da fotoliase 29 não funcionou, isto é, não foi verificado um produto amplificado nas reações de PCR em tempo real. Foi testado ainda o par de primers composto pelo direto Photol-29F_{start} e o reverso Photol-29R_{RT} (ver Tabela 2.3). O trecho do gene amplificado por este par de primers foi composto por 95 pb. Entretanto, como os resultados prévios de sequenciamento não ficaram bons, decidiu-se por não proceder aos testes no aparato de RT-PCR, por escassez de recursos, priorizando as análises com os outros pares de primers.

Após essa série de testes, decidiu-se trabalhar com os pares de primers codificantes para a actina (ActinGt-F e ActinGt-R) como controles endógenos, e os alvos utilizados foram os pares que amplificam para a fotoliase do clone-32 (Fotol-32F_{RT} e Fotol-32R_{RT}), ascorbato peroxidase (APX-F e APX-R) e glutathiona peroxidase (GPX-F e GPX-R). Quanto aos demais primers, amplificadores para PMSR1, PMSR2,

Proteína de Heat-Shock 70 e citocromo-c peroxidase, apesar de ter sido observado um fragmento na PCR qualitativa, optou-se por não utilizar esses pares de primers nas análises de expressão gênica, devido a limitação de tempo e de recursos, e também porque são referentes a vias de controle secundárias dos sistemas de antioxidantes dentro do sistema de fotoproteção.

Tabela 3.2: Resultados do teste de validação dos primers (D, direto e R, reverso) para análise de expressão gênica. O volume da tabela é o total usado de cada primer à concentração de 10 μ M em cada um dos poços de reação no aparato de PCR em tempo real. O processo é considerado eficiente e válido quando os valores de eficiência (E), calculados a partir dos valores de slope, estão entre 90 e 110.

primers (D + R)	slope	E	volume (8L)
actina	-3,4691	94,20	0,8
fotoliase 32	-3,1667	106,91	0,4
APX	-3,185	106,05	0,4
GPX	-3,3747	97,84	0,4

Experimento 1 – Fotoproteção de *G. tenuistipitata* cultivada em radiação

PAR+UVA+UVB e concentrações crescentes de NO_3^-

Por meio deste experimento, se pretendeu descobrir como variam os compostos fotoprotetores de *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em concentrações crescentes de nitrato e em radiação total, contendo PAR e UV (PAB). As algas foram submetidas ao desenho experimental descrito no item 2.7.1, que está resumido na Figura 3.4. A partir deste experimento foi possível selecionar as concentrações de NO_3^- para o desenvolvimento dos experimentos posteriores.

Figura 3.4: Esquema do experimento 1, no qual *Gracilaria tenuistipitata* foi cultivada uma semana em concentrações crescentes de NO_3^- e exposta à radiação PAR+UVA+UVB (PAB).

Os símbolos e códigos presentes na montagem da Figura 3.4, e também utilizados na elaboração de esquemas do desenho experimental dos demais experimentos deste trabalho são apresentados na Figura 3.5.

Figura 3.5: Símbolos empregados para representar os materiais e as condições experimentais realizados neste trabalho.

Os parâmetros fisiológicos avaliados em *Gracilaria tenuistipitata* cultivada sob concentrações diferentes de nitrato foram influenciados significativamente pela quantidade de NO_3^- disponibilizado para as amostras ao longo do experimento. Os resultados da ANOVA estão representados na Tabela 3.3.

Efeitos significativos da concentração de NO_3^- foram observados com relação ao total de Cla de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.3). As algas cultivadas com concentrações entre 0 e 0,1 mM de NO_3^- apresentaram menores valores de Cla do que as demais. Uma saturação do total de clorofila também foi detectada, uma vez que a partir do suprimento de 0,25 mM de NO_3^- , os valores de Cla determinados para as amostras de *G. tenuistipitata* foram similares, variando entre $1,64 \pm 0,03$ e $1,84 \pm 0,02$ mg por g de massa seca de amostra (Figura 3.6). A concentração de NO_3^- para atingir metade da saturação de clorofila *a* foi de 0,016 mM NO_3^- .

Tabela 3.3: Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente concentração de nitrato. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* pré-aclimatadas a PAR e após exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) durante 7 dias. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de F e p em negrito. gl, graus de liberdade.

Fonte de variação	Concentração de NO_3^-	
Variável	gl=10	
	F	p
NPQ	36,69	0,00
F_v/F_m	32,48	0,00
ETR_{max}	2,93	0,02
I_k	3,59	0,01
α	18,04	0,00
β -caroteno	7,14	0,00
Anteraxantina	34,96	0,00
Zeaxantina	10,47	0,00
Luteína	93,91	0,00
Cla	41,35	0,00
MAAs	116,28	0,00

Figura 3.6: Conteúdo de clorofila a (Cla) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* ao início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. $N=3$.

Efeitos significativos do aumento da concentração de NO_3^- para o conteúdo dos quatro carotenoides (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno) de *G. tenuistipitata* foram verificados pela ANOVA (Tabela 3.3).

Dentre os quatro carotenoides de *G. tenuistipitata* cultivada sob diferentes concentrações de NO_3^- , zeaxantina foi o majoritário, seguido por anteraxantina, e depois, luteína e β -caroteno que foram aqueles com menores quantidades nas amostras. Apesar do conteúdo de zeaxantina apresentar pequenas variações, o conteúdo total desse composto em algas expostas durante uma semana a 0,5 mM NO_3^- , 0,75 ou 2 mM de NO_3^- foi similar ao observado no início do experimento (que são decorrentes de 7 dias de aclimação à radiação PAR em 0,5 mM NO_3^- ; Figura 3.7). Os maiores valores médios de zeaxantina foram observados para algas submetidas a 1 e 1,5 mM de NO_3^- : $0,30 \pm 0,02$ e $0,29 \pm 0,008$ mg por g de massa seca de alga, respectivamente.

Os outros três carotenoides apresentaram um perfil similar da resposta frente aos tratamentos com concentrações crescentes de NO_3^- : as amostras submetidas a 0, 0,03, 0,075 e 0,1 mM de NO_3^- apresentaram totais de anteraxantina, luteína e β -caroteno menores do que aquelas que receberam suprimento de concentrações maiores de NO_3^- . No caso de anteraxantina e luteína, as algas submetidas a esses tratamentos apresentaram quantidades similares entre si. Para β -caroteno, as algas cultivadas sem NO_3^- tiveram quantidade similar àquelas sob 0,03 mM, porém menores do que as cultivadas com 0,075 ou 0,1 mM NO_3^- . (Figura 3.7). Analisando-se o total de anteraxantina, pode-se observar que as amostras tratadas com 0,25 e 1,5 mM apresentavam totais similares ao material algáceo antes do experimento. Entretanto, com maiores concentrações de NO_3^- disponíveis, o total de anteraxantina atingiu um patamar de saturação e os maiores valores ($0,016 \pm 0,001$ mg de anteraxantina por g de massa seca de alga) foram observados em amostras tratadas com 0,75 e 1 mM de NO_3^- , sendo próximo ao máximo estimado pelo parâmetros de Michaelis Menten ($0,015$ mg de anteraxantina por g de massa seca; Figura 3.7).

As algas cultivadas entre 0,25 e 2 mM de NO_3^- apresentaram total de luteína estatisticamente similares, variando entre $0,007 \pm 0,001$ e $0,010 \pm 0,0006$ mg de luteína por g de massa seca de alga. Esses totais foram também semelhantes ao valor observado nas algas antes de receberem o tratamento, com exceção do total observado em algas cultivadas com 1 mM de NO_3^- , cujo total de luteína foi maior. O valor de K_m obtido para esse produto foi de 0,05 mM NO_3^- , e o valor máximo (estimado pelo parâmetro $V_{\max}$) seria de 0,009 mg de luteína por g de massa seca de alga (Figura 3.7). Um resultado de saturação similar foi verificado com o total de β -caroteno, entretanto os valores constantes e similares ao observado no início do experimento ($0,0067 \pm 0,0005$

mg por g de massa seca) foram verificados para amostras submetidas a concentrações de NO_3^- maiores ou iguais a 0,5 mM, e o K_m foi de 0,103 mM NO_3^- . Esses valores variaram entre $0,0059 \pm 0,0006$ e $0,007 \pm 0,0002$ mg de β -caroteno por g de massa seca, e o valor de $V_{\max}$ foi de 0,007 mg por g de massa seca de alga. Além disso, as amostras cultivadas em 0,25 mM de NO_3^- apresentaram um total de β -caroteno intermediário entre os valores mínimos reportados para algas sob quantidade menor de nitrato (0 a 0,1 mM) e aquelas expostas a concentrações maiores desse nutriente ($>0,5$ mM) (Figura 3.7).

Foi observado efeito significativo da variação de concentração de NO_3^- no rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *G. tenuistipitata* após 7 dias de experimento (Tabela 3.3), que aumentou conforme o incremento de NO_3^- disponibilizado às amostras, atingindo um patamar após 0,25 mM de NO_3^- . As medidas desse parâmetro fotossintetizante foram similares entre amostras que receberam 0,5, 0,75 ou 2 mM de NO_3^- e as realizadas no início do experimento ($0,63 \pm 0,014$; Figura 3.8).

Os perfis da fotossíntese estimada por meio das taxas de transporte de elétrons em irradiâncias crescentes estão representados na Figura 3.9. Todos os tratamentos apresentaram curvas com formato similar, independentemente da quantidade de NO_3^- disponibilizada para as algas. Entretanto, a partir dessas curvas, as diferenças nos parâmetros da fotossíntese puderam ser observadas e são representadas na Figura 3.10

Figura 3.7: Conteúdo de carotenoides (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β-caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO₃⁻. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Figura 3.8: Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata*, para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os parâmetros da fotossíntese (ETR_{max} , α e I_k) de *G. tenuistipitata* tratada com diferentes concentrações de NO_3^- variaram significativamente (Tabela 3.3). Enquanto que os valores de ETR_{max} apresentaram pouca variação, a eficiência da fotossíntese (α) foi menor em algas submetidas a tratamentos com concentrações de NO_3^- entre 0 e 0,1 mM. Quando as algas receberam mais do que 0,25 mM de NO_3^- , a eficiência da fotossíntese foi similar àquela das algas no início do experimento, e se manteve nesse patamar (entre $0,046 \pm 0,003$ e $0,055 \pm 0,003$) independentemente do aumento de disponibilidade de NO_3^- . O valor absoluto mais alto de α foi reportado para algas tratadas com 0,5 mM de NO_3^- . Em relação aos valores de ETR_{max} , foi verificado que as algas submetidas a tratamento com menos NO_3^- tiveram uma tendência a taxas de transporte de elétrons mais baixas do que aquelas supridas com NO_3^- . A única diferença significativa observada nesse parâmetro se deu entre as algas que não receberam NO_3^- com dados de ETR_{max} menores do que aquelas submetidas a 0,75 mM desse nutriente. Além disso, os valores de ETR_{max} das algas sem NO_3^- foram menores também do que os registrados para algas antes do experimento. Os dados de ETR_{max} variaram entre $3,60 \pm 0,83$ e $5,02 \pm 0,72 \mu\text{mol de elétrons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ quando as algas receberam quaisquer suprimentos entre 0,03 e 2 mM de NO_3^- (Figura 3.10).

Os valores de irradiância de saturação do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* não variaram significativamente, após a análise *a posteriori* com o teste de Newman-Keuls, mesmo que efeitos significativos da concentração de NO_3^- disponível às algas tenham sido detectados sobre os dados de I_k na análise de variância (Tabela

3.3). O aparato fotossintetizante das amostras de *G. tenuistipitata* nesse primeiro experimento apresentou saturação com valores de irradiância entre $83,39 \pm 1,57$ e $131,2 \pm 18,03 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3.10).

A dissipação não-fotoquímica (NPQ) de energia em *G. tenuistipitata* variou conforme o suprimento de NO_3^- . As algas submetidas a maiores concentrações de N apresentaram valores crescentes de NPQ (Figura 3.11). A partir dos dados obtidos no valor mais alto de irradiância das curvas dessa figura ($676 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), foi realizada uma ANOVA para verificar o efeito de diferentes concentrações de NO_3^- nos dados de NPQ dessa alga (Tabela 3.3). Na Figura 3.12, são apresentados os resultados obtidos após o teste *a posteriori* de Newman-Keuls, que apontaram que os valores de NPQ foram significativamente menores em algas tratadas entre 0 e 0,1 mM NO_3^- . O dado obtido em algas supridas com 0,25 mM de NO_3^- foi intermediário entre o registrado para as amostras do início do experimento e os valores máximos atingidos após sete dias de cultivo em PAB, com suprimento de 0,5 ou 0,75 mM NO_3^- (Figura 3.12)

Figura 3.9: Perfis das curvas de fotossíntese estimadas como ETR por irradiância para *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Por meio dessas curvas foram calculados os parâmetros fotossintetizantes α , ETR_{max} e I_k . $N=3$.

Figura 3.10: Parâmetros fotossintetizantes (ETR_{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; α , eficiência fotossintetizante; e I_k , irradiância de saturação da fotossíntese) de *Gracilaria tenuistipitata*, obtidos a partir das curvas fotossintetizantes, para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Diferentes letras acima dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

Figura 3.11: Valores de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *Gracilaria tenuistipitata*, obtidos para irradiâncias crescentes, para algas no início e depois de uma semana de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Cada curva representa a média de três valores. N=3.

Figura 3.12: Valores de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *Gracilaria tenuistipitata*, obtidos das curvas de NPQ (Figura 3.10), para a irradiância de $676 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para algas no início (○) e depois de uma semana (●) de exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivo sob concentrações crescentes de NO_3^- . Diferentes letras acima dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

Efeitos significativos foram observados para os tratamentos de distintas concentrações de NO_3^- em relação ao total de MAAs de *G. tenuistipitata*, evidenciado pela ANOVA (Tabela 3.3). O cultivo de *G. tenuistipitata* em radiação PAB após 7 dias resultou em aumento no conteúdo total de MAAs, em relação ao início do experimento

e em concentrações de N maiores do que 0,075 mM NO_3^- (Figura 3.13). O total de MAAs das amostras tratadas com 0 e 0,03 mM de NO_3^- foi similar ao observado nas algas no início do experimento, e aumentou até atingir um patamar acima de 0,25 mM de NO_3^- . O valor de K_m obtido foi de 0,117 mM NO_3^- . As taxas de síntese dessas substâncias atingiram entre $0,21 \pm 0,03$ e $0,27 \pm 0,02$ mg de MAAs por g de massa seca por dia para algas tratadas com 0,25 mM a 2 mM de NO_3^- . As amostras que receberam 0,5 mM de NO_3^- apresentaram a maior taxa de produção de MAAs ($0,309 \pm 0,009$ mg por g de massa seca por dia), resultando no maior total de MAAs em amostras de *G. tenuistipitata* após 7 dias de cultivo em PAB: $2,53 \pm 0,06$ mg de MAAs por g de massa seca de alga (Figura 3.13).

Figura 3.13: Conteúdo de aminoácidos tipo micospolina (MAAs) totais em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

As variáveis dependentes analisadas neste experimento foram altamente correlacionadas entre si. Este padrão de resposta reflete o perfil similar destas variáveis, de saturação por aumento com a concentração de NO_3^- . A biomassa das algas foi correlacionada apenas com três dos carotenoides e o total de MAAs. Observando as demais variáveis, somente os dados de ETR_{max} não se correlacionaram significativamente com os valores de I_k , o total de MAAs e o conteúdo de zeaxantina, o qual também não teve correlação com os dados de NPQ. O restante das combinações entre os parâmetros apresentou correlação significativa. Os carotenoides (antheraxantina,

zeaxantina, luteína e β -caroteno) foram positivamente correlacionados entre si e com o total de MAAs e Cla, além do parâmetro α de eficiência fotossintetizante. A irradiância de saturação (I_k) foi a única variável com correlação negativa em relação às demais variáveis avaliadas. As demais correlações possíveis entre os outros parâmetros foram positivas (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no experimento 1. Dados em negrito são aqueles nos quais o dado de correlação foi significativo, com $p < 0,05$. N=33.

	Cla	ETR _{max}	α	I_k	F _v /F _m	NPQ	Anterax.	Zeax.	Luteína	β -carot.	MAAs
Biomassa	0,26	-0,02	0,22	-0,33	0,06	0,08	0,54	0,36	0,42	0,27	0,72
Cla		0,62	0,89	-0,68	0,88	0,89	0,88	0,50	0,82	0,93	0,73
ETR _{max}			0,74	-0,11	0,75	0,74	0,50	0,16	0,38	0,64	0,34
α				-0,73	0,94	0,90	0,79	0,41	0,67	0,89	0,67
I_k					-0,63	-0,60	-0,66	-0,45	-0,59	-0,67	-0,64
F _v /F _m						0,97	0,75	0,35	0,60	0,90	0,58
NPQ							0,76	0,31	0,59	0,91	0,59
Anteraxantina								0,47	0,74	0,93	0,79
Zeaxantina									0,77	0,39	0,52
Luteína										0,67	0,71
β -caroteno											0,70

Mediante os resultados deste experimento, decidiu-se por trabalhar com as concentrações de 0,1 e/ou 0,5 mM de NO₃⁻ nos demais experimentos realizados nesta tese. O valor de 0,1 mM foi escolhido por apresentar resultados intermediários entre a ausência e a saturação desse nutriente no cultivo de *G. tenuistipitata*. A segunda concentração de nitrato é aquela normalmente adicionada com o enriquecimento da água do mar usando o meio de cultura de VS e que esteve associado aos maiores valores de praticamente todos os parâmetros analisados.

doses e intensidades de radiação: o efeito da reciprocidade

item 2.7.2).

para elaboração dessa figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).

Os tratamentos de diferentes doses de radiação resultaram da exposição das amostras de *G. tenuistipitata* por um período diário a distintas intensidades de radiação UV, durante 3 ou 7 dias. A dose de radiação total acumulada que as algas receberam ao longo do experimento foi considerada na análise estatística unifatorial de variância feita com os dados das variáveis dependentes analisadas (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente dose de radiação. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* pré-aclimatadas à PAR, no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em diferentes valores de doses diárias de radiação. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito. gl, graus de liberdade.

Fonte de variação Variável	gl	Dose de radiação	
		<i>F</i>	<i>p</i>
MAAs	18	37,12	0,00
ETR _{max}	18	26,61	0,00
F _v /F _m	18	21,46	0,00
Zeaxantina	9	24,96	0,00
I _k	18	15,57	0,00
β-caroteno	9	12,58	0,00
α	18	11,53	0,00
Luteína	9	7,07	0,00
RNA	18	6,08	0,00
Cla	18	2,84	0,00
Anterax.	9	1,11	0,38
DNA	18	0,80	0,69

As amostras de *G. tenuistipitata* tratadas com diferentes doses e intensidades de diferentes tipos de radiação não apresentaram grande variação no conteúdo de Cla, ainda que tenha sido verificado estatisticamente um efeito significativo do tipo de tratamento realizado (Tabela 3.5). Apenas as algas expostas à PAR por 7 dias (com a dose diária total de 698 KJ.m⁻² de radiação) apresentaram maior quantidade de Cla do que aquelas que receberam diariamente durante 3 dias o total de 1100 KJ.m⁻² de PAB e do que aquelas expostas à 1334 KJ.m⁻² de PA após 7 dias (Figura 3.15). As demais comparações do total de Cla obtido a partir dos tratamentos diferentes com doses e intensidades de radiações resultaram em valores similares de Cla, os quais variaram de 1,59±0,22 a 2,27±0,22 mg de Cla por g de massa seca de alga (Figura 3.15).

Figura 3.15: Total de clorofila *a* (Cla) em mg de pigmento por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os tratamentos com diferentes doses e intensidades de radiação apresentaram efeitos significativos no rendimento quântico máximo de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.5). O F_v/F_m do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* se manteve constante quando as amostras foram tratadas com PAR ou PA, independentemente da intensidade, dose diária ou dose total acumulada, após o período experimental (Figura 3.16). Entretanto, após 3 dias em PAB, foi observado um padrão no qual a dose e a intensidade foram influentes: as amostras tratadas com “4i” de PAB apresentaram valores de F_v/F_m menores do que aquelas que receberam “2i”, e estas por sua vez foram similares entre si, independentemente do tempo de exposição. O valor desse rendimento em algas expostas à intensidade “i” de PAB diminuiu com relação àquele observado no início do experimento, porém foi similar aos dados de F_v/F_m das amostras tratadas com PA e PAB após 3 dias experimentais. Ao final do processo, isto é, após 7 dias, houve uma recuperação no rendimento quântico máximo. As amostras que estiveram submetidas à PAB apresentaram valores de F_v/F_m similares independentemente da intensidade e da dose recebidas. Além disso, esses valores foram similares aos observados nos tratamentos com PA, quando a dose diária foi de cerca de 1025 KJ.m^{-2} e nos tratamentos com a dose diária total de cerca de 1300 KJ.m^{-2} (Figura 3.16). O menor valor de F_v/F_m foi reportado para amostras tratadas com “4i” de PAB, após 3 dias de experimento (dose diária de 1477 KJ.m^{-2}), resultando no valor médio $0,30 \pm 0,04$. O valor máximo de F_v/F_m obtido para *G. tenuistipitata* foi registrado no início do experimento: $0,66 \pm 0,01$, e as algas mantidas em PAR pelos 7 dias, com doses acumuladas crescentes de radiação desse tipo, não apresentaram variação significativa nos valores desse parâmetro (Figura 3.16).

Figura 3.16: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

As curvas de fotossíntese foram obtidas no início, após 3 e 7 dias do experimento, sendo calculadas as taxas de transporte de elétron (ETR) para distintos valores de irradiância. Essas curvas estão representadas na Figura 3.17. O perfil das amostras foi similar nos distintos tratamentos. Entretanto, os valores que são representados em cada curva são notadamente distintos, principalmente após 3 dias experimentais. Nota-se que o perfil das curvas de amostras tratadas com PAR estão acima dos demais, no início e após 3 dias experimentais. Além disso, conforme aumentou a intensidade de radiação PA ou PAB disponível nos tratamentos, o perfil das curvas englobou valores cada vez menores de ETR para o aumento de irradiância. Além disso, as algas que receberam “2i” tiveram curvas similares, quando tratadas com PA e também quando tratadas com PAB. No caso de 7 dias experimentais, não foi detectado um padrão evidente entre as curvas, apenas uma tendência de que as amostras que receberam a mesma dose total diária de radiação apresentassem um perfil similar dessas curvas (Figura 3.17). Com base nessas curvas, foram obtidos os dados de ETR_{max} , α e I_k , que são apresentados nas figuras seguintes (Figuras 3.18 a 3.20).

3 dias

7 dias

Figura 3.17: Curvas de fotossíntese (ETR x irradiância) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR (♦), PA (●, ▲, + e ■) e PAB (○, △, + e □). As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. O formato do marcador indica a intensidade de radiação: “i”, ● e ○; “2i”, ▲, +, △ e +; e “4i”, ■ e □. Os pontos de cada curva são resultado da média de 3 valores. Esse grupo de pontos foi ajustado de acordo com a fórmula de Platt *et al.*, 1980.

A dose de radiação acumulada resultou em diferenças significativas para os parâmetros da fotossíntese analisados em *G. tenuistipitata* (Tabela 3.5), incluindo os valores de taxa de transporte máxima de elétrons (ETR_{max}), eficiência da fotossíntese (α) e irradiância de saturação (I_k).

Os valores de ETR_{max} das amostras de *G. tenuistipitata* após tratamento com distintas doses e intensidades de radiação se mantiveram constantes quando as algas não receberam quaisquer tipos de radiação UV (Figura 3.18). Entretanto, quando as amostras foram tratadas com PA, e com os valores de intensidade “i” ou “2i” resultando na dose diária de cerca de 1025 KJ.m^{-2} , os dados de ETR_{max} foram similares, variando entre $4,44 \pm 0,10$ e $4,58 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para as que receberam PA, e maiores do que os observados quando as algas foram submetidas a PAB ($2,98 \pm 0,28$ e $3,82 \pm 0,14 \text{ } \mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Figura 3.18). Quando as algas receberam o dobro da dose de radiação UV, com os tratamentos com intensidades “2i” e “4i”, somente com amostras tratadas com PAB houve diferenças significativas. As algas que receberam PAB e “4i” por 3 dias tiveram ETR_{max} menores do que as tratadas nessa radiação porém com metade da intensidade. O valor de ETR_{max} observado para as algas advindas desse tratamento ($1,82 \pm 0,28 \text{ } \mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi o menor reportado no experimento inteiro, mesmo comparando com os valores obtidos depois de 7 dias e doses acumuladas de radiação maiores que foram disponibilizadas para as algas nos distintos tratamentos com PA e PAB (Figura 3.18). Após 7 dias, os tratamentos com PA ou PAB, recebendo o mesmo aporte de intensidade e dose total diária de radiação, apresentaram valores de ETR_{max} similares entre si. Entretanto, as amostras que receberam “2i” de PA ou PAB apresentaram maiores taxas de transporte de elétrons máximas do que as algas tratadas com intensidade “i”. Já em se tratando de algas irradiadas com “2i” por 12 h e “4i” por 6 h diárias após 7 dias, não houve diferenças significativas, e as ETR_{max} variaram entre $3,50 \pm 0,16$ e $5,09 \pm 0,22 \text{ } \mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3.18).

Figura 3.18: Taxa de transporte de elétrons máxima (ETR_{max}) do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os valores de eficiência do aparato fotossintetizante apresentaram variação somente após 3 dias de experimento com relação aos dados iniciais. A dose total acumulada nesse período que foi emitida sobre as algas variou entre 3000 e 4500 KJ.m⁻². Neste caso, a eficiência da fotossíntese das algas tratadas com PA respondeu diferentemente àquelas tratadas com PAB. As algas expostas à PA apresentaram valores de α maiores quando as algas receberam intensidade de radiação maiores, independentemente da dose, isto é, algas que receberam a mesma dose diária (cerca de 1025 KJ.m⁻²) tiveram maior eficiência fotossintetizante com intensidade “2i” do que aquelas na mesma dose e intensidade de radiação “i”. Esse padrão similar também é notado nas amostras tratadas com “4i” e “2i”, sendo que quando *G. tenuistipitata* recebeu intensidade “4i” de PA, sua eficiência fotossintetizante foi maior do que quando esteve exposta a apenas “2i”, resultando na dose total diária de cerca de 1300 KJ.m⁻². No caso das amostras tratadas com PAB, a resposta foi inversa, isto é, as algas tratadas com “4i” foram menos eficientes do que as submetidas à “2i” (totalizando a dose de cerca de 1450 KJ.m⁻²). Para a dose diária de cerca de 1100 KJ.m⁻², os valores de eficiência da fotossíntese de algas que receberam intensidade “i” foram similares aos das expostas ao dobro de intensidade “2i” nesse tipo de radiação (Figura 3.19). As algas expostas por 7 dias às condições experimentais de distintas doses e intensidades de radiação PA e PAB apresentaram α similar àquele do início do experimento, ou das algas tratadas somente com PAR. Não houve diferenças significativas entre amostras que receberam PA ou PAB e quaisquer intensidades (“i”, “2i” e “4i”) após uma semana de experimento (Figura 3.19). Os dados de α variaram entre 0,048±0,002 e 0,063±0,01.

Figura 3.19: Eficiência do aparato fotossintetizante (α) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A irradiância de saturação (I_k) da fotossíntese de *G. tenuistipitata* foi maior nas algas que receberam radiação PAR, após 3 e 7 dias: $116,9 \pm 5,9 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $125,5 \pm 7,4 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3.20). Este último valor foi maior do que os dados de I_k encontrados em algas expostas a quaisquer doses ou intensidades de radiação PAR acrescida de radiação UV. As algas expostas à PA apresentaram maior I_k do que as expostas à PAB após 3 dias de experimento, quando foram tratadas com a intensidade “i” por 12 h resultando em 1022 KJ.m^{-2} , ou o dobro de intensidade, “2i”, pelo mesmo período diário, resultando em 1299 KJ.m^{-2} de PA. Apenas em algas expostas à PA verificou-se um efeito claro da intensidade de radiação utilizada, independentemente da dose total diária, após 3 dias de experimento: as algas expostas a intensidade “i” por 12 h tiveram maior valor de I_k do que as expostas ao dobro de intensidade (por 6h diárias), e o mesmo pode ser relatado para as amostras que receberam a intensidade de “2i” por 12 h diárias, cujos valores de I_k foram maiores dos obtidos em algas expostas à intensidade “4i” por 6 h. Com o tratamento de PAB, após 3 dias experimentais, não foram verificadas diferenças significativas entre as amostras que foram submetidas a quaisquer das intensidades utilizadas, que resultaram nas doses diárias de 1100 ou 1450 KJ.m^{-2} (Figura 3.20). Após 7 dias experimentais, as algas que receberam cerca de 1450 KJ.m^{-2} diários (entre 9000 e 10500 KJ.m^{-2} de dose acumulada) tiveram I_k similares entre si, variando os valores médios desse parâmetro desde $68,6 \pm 4,1$ a $90,7 \pm 12,8 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3.20). Já as amostras que receberam a dose total diária de cerca de 1100 KJ.m^{-2} durante 7 dias (acumulando entre 7000 e 8000 KJ.m^{-2} de radiação), seja para o tratamento com PA ou para o tratamento com PAB, a exposição à intensidade maior (“2i”) resultou em maiores valores de I_k do que para as algas expostas à intensidade “i” (Figura 3.20).

Figura 3.20: Valores de irradiância de saturação (I_k) do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os valores de dissipação não-fotoquímica (NPQ) das amostras de *G. tenuistipitata* estão representados na Figura 3.21, conforme foi aplicada uma irradiância crescente nas amostras. Percebe-se claramente que, após três dias de exposição às distintas doses e intensidades de radiação, o aspecto mais relevante foi o tipo de radiação para separação de padrões de resposta, uma vez que as algas expostas à PAB e intensidades “2i” ou “4i” (independentemente da dose total) tiveram valores de NPQ menores do que as demais. Esse padrão está bem evidente quando se analisa o gráfico da Figura 3.22, no qual os valores de NPQ obtidos com a irradiância de $676 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ foram comparados. Efeitos significativos do tratamento com doses e intensidades foram observados com a ANOVA unifatorial ($F=9,47$; $p=0$), e os valores de NPQ em tratamentos com PAB foram menores do que os demais (Figura 3.22). Com o decorrer do tempo, após 7 dias de experimento, os perfis das curvas de NPQ das amostras de *G. tenuistipitata* foram muito similares, independentemente do tipo e da quantidade de radiação provida aos talos tratados, mesmo que os perfis de amostras expostas à PAB e “2i” ou “4i” tenha sido ainda discernido dos demais (Figura 3.21). A análise estatística unifatorial ainda mostrou um efeito significativo do tratamento com doses e intensidades sobre os valores de NPQ na irradiância mais alta ($F=3,70$; $p=0,005$), porém na análise *a posteriori*, somente uma diferença entre os tratamentos foi observada, sendo os valores de NPQ de amostras expostas à PAB em intensidade “4i” por 6 h, totalizando a dose diária de 1477 KJ.m^{-2} , foram menores do que os dados de NPQ para amostras tratadas com intensidade “i” de PA por 12 h, resultado na dose diária de 1022 KJ.m^{-2} (Figura 3.22).

Figura 3.21: Curva de dissipação não fotoquímica (NPQ) x irradiância de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de $0,4 \text{ W.m}^{-2}$ de UVB e $8,2 \text{ W.m}^{-2}$ de UVA. O formato do marcador indica a intensidade de radiação: “i”, ● e ○; “2i”, ▲, +, △ e +; e “4i”, ■ e □. Os pontos de cada curva são resultado da média de 3 valores.

Figura 3.22: Comparação de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias, de acordo com o tipo de radiação recebida. O valor de “i” foi de $0,4 \text{ W.m}^{-2}$ de UVB e $8,2 \text{ W.m}^{-2}$ de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A ANOVA unifatorial considerando o tratamento de radiação no conteúdo de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) de *G. tenuistipitata* resultou em efeitos significativos (Tabela 3.5). As amostras que não receberam radiação UV (somente PAR) mantiveram uma quantidade basal de MAAs de $0,20 \pm 0,05$ a $0,30 \pm 0,08$ mg por g de massa seca de alga (Figura 3.23). Um aumento nos totais dessas substâncias foi verificado tanto para o tratamento com PA quanto para aquele com PAB. O total de MAAs observado em amostras tratadas com PA aumentou de acordo com o aumento de dose de radiação acumulada que as amostras receberam ao longo do experimento, atingindo após 7 dias os valores de $1,81 \pm 0,14$ e $1,21 \pm 0,20$ mg de MAAs por g de alga tratada com intensidade “2i” e “4i”, respectivamente. O valor de MAAs obtido com o tratamento de “2i” de PA foi o maior observado para as amostras tratadas com esse tipo

de radiação e atingiu montantes similares aos observados em amostras tratadas com PAB, que apresentaram as maiores quantidades de MAA (Figura 3.23). Observando essa figura, nota-se que o estímulo à síntese de MAAs esteve relacionado principalmente à presença de UVA e UVB adicionadas à radiação PAR nos tratamentos, além de que a dose diária total recebida pelas algas teve mais influência direta no estímulo do que a intensidade de radiação ou a dose de radiação acumulada ao longo do tempo. Isso porque os maiores valores de MAAs foram verificados em algas tratadas com as doses diárias de cerca de 1450 KJ.m^{-2} de radiação PAB. Esses valores foram similares entre si, e correspondem a $1,93 \pm 0,25$ para algas tratadas com “2i” (em 12 h diárias) por 3 dias, $1,81 \pm 0,43$ para algas tratadas com “4i” de PAB por 3 dias, $2,09 \pm 0,17$ com “2i” dessa radiação por 7 dias e $2,20 \pm 0,46$ mg de MAAs por g de alga seca submetidas à “4i” de PAB após 7 dias (Figura 3.23). O estímulo à síntese de MAAs foi detectado em menor intensidade também quando as algas receberam a dose diária de cerca de 1100 KJ.m^{-2} de PAB, totalizando entre $1,15 \pm 0,20$ a $1,57 \pm 0,18$ mg de MAAs por g de massa seca de *G. tenuistipitata* (Figura 3.23).

Figura 3.23: Total de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os tratamentos com doses de radiação resultaram em diferenças significativas em três dos carotenoides (zeaxantina, luteína e β -caroteno) encontrados em *G. tenuistipitata* (Tabela 3.5). Tal como já observado neste trabalho no experimento anterior (com concentrações crescentes de N, ver item 3.2), quatro carotenoides foram encontrados nas amostras de *G. tenuistipitata*: anteraxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno. Foram coletadas amostras após 3 e 7 dias experimentais, porém os dados referentes às amostras de 7 dias foram perdidos, e a análise se restringiu apenas ao total e tipo de carotenoides observados em amostras de *G. tenuistipitata* do início até 3 dias de experimento.

O pigmento majoritário deste grupo foi a zeaxantina, seguida da anteraxantina e posteriormente a luteína e o β -caroteno (Figura 3.24). No caso de anteraxantina, não houve diferenças significativas entre quaisquer das amostras observadas, com radiações (PAR, PA e PAB) disponibilizadas em distintas intensidades e doses diárias. O total de anteraxantina observado variou de $0,012 \pm 0,001$ a $0,017 \pm 0,006$ mg por g de massa seca de alga (Figura 3.24). No caso do conteúdo de luteína, em algas tratadas com “2i” durante 12 h diárias com PAB foram observados valores maiores ($0,009 \pm 0,002$ mg por g de massa seca) do que nos demais tratamentos (entre 0,003 e 0,005 mg de luteína por massa seca de *G. tenuistipitata*) (Figura 3.24).

O total de zeaxantina de *G. tenuistipitata* apresentou a tendência de aumento com o aumento da dose acumulada de radiação, embora diferenças pontuais também puderam ser detectadas. As algas tratadas com PA na intensidade “i” por 12 h (dose diária de 1026 KJ.m^{-2}) apresentaram maior total de zeaxantina do que aquelas submetidas às mesmas condições, porém com o dobro de intensidade de UV durante 6 h diárias. O mesmo padrão foi verificado quando foram comparadas as amostras submetidas à PA em doses diárias de cerca de 1300 KJ.m^{-2} , ou seja, amostras tratadas com “2i” por 12 h tiveram maiores teores de zeaxantina do que aquelas expostas à “4i” durante 6 h. Já na comparação das amostras que foram expostas à PAB, se submetidas à mesma dose diária (entre 1076 e 1100 KJ.m^{-2}), não foram verificadas diferenças entre o conteúdo de zeaxantina, seja com tratamento de intensidade “i” durante 12 h ou “2i” por 6 h diárias. Porém, com a dose diária de cerca de 1450 KJ.m^{-2} , as amostras que receberam intensidade “2i” por 12h tiveram o conteúdo de zeaxantina de $0,30 \pm 0,017$ mg por g de massa seca, sendo maior do que todos os demais valores observados no

experimento, inclusive das amostras submetidas à “4i” de PAB por 6h, tratamento que resultou na mesma dose diária (Figura 3.24).

Figura 3.24: Carotenoides (anteraxantina, zeaxantina, luteína e β-caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Considerando o total de β -caroteno, foi verificada uma tendência a diminuição do seu conteúdo com tratamentos de exposição a doses diárias de radiação UV. A única exceção foi a amostra submetida à “2i” de PAB por 12h (resultando na dose diária de 1415 KJ.m^{-2}), cujo total de β -caroteno ($0,01 \pm 0,001 \text{ mg por g de massa seca}$) foi similar ao observado para os tratamentos com PAR (inicial e 3 dias de experimento). Os demais valores desse pigmento, similares entre si, foram observados nas demais amostras expostas à radiação UV e variaram de $0,006$ a $0,007 \pm 0,0005 \text{ mg de } \beta\text{-caroteno por g de massa seca}$ (Figura 3.24).

A quantidade de DNA extraída das algas provenientes dos tratamentos com diferentes doses e radiações está representada na Tabela 3.6. O total de DNA foi similar em todas as amostras. O procedimento de marcação quimioluminescente de dímeros de pirimidina no DNA não detectou a presença dos mesmos em nenhuma dessas amostras.

Tabela 3.6: DNA total em ng por μL de amostras de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores de doses totais diárias. Para cada tratamento está representada a dose diária de radiação, a dose acumulada ao longo do experimento e o total de dose efetiva. Diferentes letras ao lado dos valores de desvio padrão representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos. $N=3$.

Tipo de radiação	Tempo (dias)	Horas diárias de UV	Dose diária de radiação (KJ.m^{-2})	Intensidade de UV* (W.m^{-2})	Dose total (KJ.m^{-2})	Dose total efetiva** (KJ.m^{-2})	DNA (ng/ μL)
PAR	0	ñ	0	ñ	0,00	0,00	$82,95 \pm 8,12$ a
PAR	3	ñ	698	ñ	2095,05	0,00	$91,23 \pm 21,80$ a
PAR	7	ñ	698	ñ	4888,46	0,00	$95,40 \pm 33,46$ a
PA	3	12	1022	i	3067,39	0,00	$45,33 \pm 17,25$ a
PA	3	6	1032	2i	3096,07	0,00	$108,21 \pm 10,13$ a
PA	3	12	1299	2i	3896,59	0,00	$60,83 \pm 4,27$ a
PA	3	6	1334	4i	4000,64	0,27	$127,01 \pm 8,05$ a
PA	7	12	1022	i	7157,24	0,00	$115,57 \pm 38,64$ a
PA	7	6	1032	2i	7224,16	0,00	$183,49 \pm 176,89$ a
PA	7	12	1299	2i	9092,04	0,00	$145,46 \pm 114,98$ a
PA	7	6	1334	4i	9334,83	0,62	$248,78 \pm 314,29$ a
PAB	3	12	1076	i	3226,62	1,18	$92,07 \pm 15,41$ a
PAB	3	6	1100	2i	3300,09	2,25	$160,66 \pm 123,66$ a
PAB	3	12	1415	2i	4244,84	2,96	$51,67 \pm 37,04$ a
PAB	3	6	1477	4i	4431,75	0,48	$114,10 \pm 14,92$ a
PAB	7	12	1076	i	7528,78	2,76	$88,36 \pm 9,77$ a
PAB	7	6	1100	2i	7700,22	5,24	$34,80 \pm 29,64$ a
PAB	7	12	1415	2i	9904,63	6,92	$102,76 \pm 24,03$ a
PAB	7	6	1477	4i	10340,75	1,11	$160,70 \pm 119,78$ a

* valor de i: UVA = $8,2$ e UVB = $0,4 \text{ W.m}^{-2}$

** a partir de Setlow *et al.* 1974

ñ = não se aplica.

O total de RNA das amostras de *G. tenuistipitata* antes do tratamento com doses e intensidades de radiação (PAR, PA e PAB) foi de $119 \pm 42,89 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Apesar de haver uma tendência de redução da quantidade de RNA ao longo do tempo de experimento,

com quantidades médias absolutas menores do que este valor inicial, não houve diferenças significativas entre as amostras (Tabela 3.5; Figura 3.25).

Figura 3.25: RNA total (em ng por μL de amostra) de *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade de radiação ultravioleta “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias de radiação, representados no eixo das abscissas. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A análise de expressão gênica para a fotoliase-32 está apresentada na Figura 3.26, para amostras após 3 e 7 dias. Após 3 dias, as algas que receberam distintas doses e intensidades de radiação apresentaram expressão gênica similar às amostras do tratamento calibrador, isto é, taxas de variação de expressão de amostras aclimatadas à radiação PAR. A única exceção foi o tratamento com “2i” de PA por dia, resultando na dose diária de cerca de 1032 KJ.m⁻² de radiação, cujas amostras tiveram maior expressão do gene codificante para a fotoliase-32 com relação ao controle endógeno (gene codificante para actina) e o calibrador inicial. Entretanto, este resultado de estímulo à expressão desse gene não se repetiu nesse tratamento após 7 dias, e, ao contrário, houve uma redução da taxa de expressão do mesmo em comparação somente com o calibrador, tal como observado também em amostras expostas à PAB em intensidades “2i” resultando na dose diária D e em intensidades “4i” com a dose diária 2D. Há que se ressaltar que, apesar dessa redução com relação ao calibrador da expressão do gene codificante para a fotoliase-32 nessas amostras destes tratamentos, a taxa de expressão do referido gene foi similar quando se comparou todas as amostras provenientes dos diferentes tratamentos entre si (Figura 3.26).

Figura 3.26: Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase 32 de *Gracilaria tenuistipitata* no início (nível de expressão do calibrador) ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. As algas permaneceram sob intensidade “i” por 12h e “2i” por 6h, ou “2i” por 12h e “4i” por 6h, resultando em valores similares de doses totais diárias. O valor de “i” foi de 0,4 W.m⁻² de UVB e 8,2 W.m⁻² de UVA. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

O total de MAAs teve correlação positiva significativa com três diferentes carotenoides de *G. tenuistipitata*, e sua relação foi inversamente significativa em relação a todos os parâmetros da fotossíntese. A quantidade de biomassa de *G. tenuistipitata* não foi correlacionada a nenhuma das variáveis analisadas. Considerando os quatro carotenoides, apenas a luteína foi positivamente correlacionada com os demais, enquanto que as comparações dos totais dessas substâncias nas amostras de *G. tenuistipitata* expostas a diferentes doses e intensidades de radiação não resultaram em correlações significativas. Os totais de anteraxantina e zeaxantina foram negativamente correlacionados com os parâmetros da fotossíntese. Entretanto, a correlação entre Cla e zeaxantina não foi significativa. O rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) do aparato fotossintetizante dessa alga foi positivamente correlacionado com os demais parâmetros da fotossíntese (α , ETR_{Max} , I_k e NPQ), além do total de β -caroteno. As taxas de transporte de elétrons máximas foram positivamente correlacionadas com a eficiência fotossintetizante de *G. tenuistipitata*, e ambos os parâmetros foram correlacionados dessa mesma forma com o conteúdo de Cla e os valores de NPQ. Entretanto, os valores de irradiância de saturação das algas somente foi correlacionado significativamente e positivamente com os valores de ETR_{max} (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Correlações de Pearson entre os valores obtidos para as diferentes variáveis dependentes avaliadas em *Gracilaria tenuistipitata* no início ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR, PA e PAB. Valores de correlação de Pearson significativos estão marcados em negrito, com $p < 0,05$. N=30.

	ETR_{max}	α	Cla	Anterax.	Zeax.	Luteína	β -carot.	I_k	F_v/F_m	RNA	DNA	NPQ	MAAs
Biomassa	-0,04	-0,18	-0,23	-0,25	0,35	-0,31	-0,28	0,16	0,01	0,35	0,04	-0,21	0,01
ETR_{max}		0,78	0,57	-0,62	-0,58	-0,28	0,50	0,83	0,91	0,18	-0,23	0,60	-0,89
α			0,57	-0,60	-0,52	-0,18	0,39	0,33	0,83	0,10	-0,08	0,78	-0,74
Cla				-0,44	-0,22	-0,10	0,17	0,35	0,57	0,06	-0,21	0,42	-0,48
Anterax.					0,15	0,38	0,04	-0,44	-0,64	-0,25	0,08	-0,39	0,61
Zeax.						0,47	-0,21	-0,36	-0,49	-0,10	-0,09	-0,44	0,71
Luteína							0,37	-0,25	-0,23	-0,36	-0,23	-0,07	0,40
β -carot.								0,42	0,43	-0,02	-0,53	0,34	-0,27
I_k									0,71	0,19	-0,31	0,33	-0,71
F_v/F_m										0,15	-0,19	0,83	-0,85
RNA											0,13	0,00	-0,31
DNA												-0,02	0,04
NPQ													-0,57

3.3. Experimento 3 – Efeitos da radiação UV na fotoproteção e fotossíntese de *G. tenuistipitata* cultivada sob diferentes concentrações de NO_3^- .

Uma vez que foi feito o estudo de alguns dos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata* sob diferentes concentrações crescentes de NO_3^- (ver item 3.2), três diferentes tratamentos com NO_3^- foram selecionados para realizar-se um estudo mais aprofundado (ver Desenhos experimentais, item 2.7.3). O objetivo desta parte do trabalho foi verificar a interação entre o suprimento de N e distintos tratamentos com radiação UV (presença e ausência) sobre mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata* (Figura 3.27).

Figura 3.27: Esquema do experimento 3, visando analisar os efeitos da radiação e de diferentes concentrações de nitrato nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*. As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).

Considerando-se as variáveis dependentes (exceto o crescimento), foi realizada uma análise de variância multifatorial com amostras repetidas (ANOVA Repeated Measures), cujos resultados são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Resultados da análise multifatorial ANOVA com amostras repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas ou três variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em diferentes concentrações de nitrato e expostas a PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas 5 a 7.

Fonte de variação	gl	Variável	AC	C	N	C:N	PE	PC	Cla	PE/Cla	PC/Cla	PE/PC	PS	(PE+PC)/PS	F _v /F _m	MAAs	MAA/PS	RNA
[NO ₃ ⁻] (A)	2	<i>F</i>	24,95	1,37	32,84	50,79	10,23	16,40	12,62	3,06	1,13	15,45	515,46	5,64	3,72	19,43	1,46	7,21
		% V	36,87	12,59	10,17	5,46	2,46	4,53	15,08	3,17	2,23	7,05	21,54	5,11	1,62	5,65	0,47	13,50
		<i>p</i>	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,36	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,27	0,01
Radiação (B)	1	<i>F</i>	7,95	0,38	3,13	8,18	32,26	33,52	3,74	25,28	16,10	62,65	110,04	25,62	115,33	180,74	183,56	7,49
		% V	11,74	3,46	0,97	0,88	7,77	9,25	4,47	26,19	31,81	28,59	4,60	23,23	50,21	52,56	58,86	14,02
		<i>p</i>	0,02	0,55	0,10	0,01	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Tempo (C)	2	<i>F</i>	27,77	3,59	218,73	748,43	320,18	283,06	60,05	34,63	16,34	55,90	1388,5	42,01	42,26	51,95	66,1	27,99
		% V	41,03	32,99	67,75	80,45	77,10	78,13	71,77	35,88	32,27	25,51	58,02	38,09	18,40	15,11	21,20	52,42
		<i>p</i>	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A x B	2	<i>F</i>	0,02	0,29	0,03	0,20	0,92	2,84	0,81	0,14	1,06	14,54	54,63	1,02	7,32	8,52	0,60	1,17
		% V	0,04	2,70	0,01	0,02	0,22	0,78	0,97	0,14	2,09	6,63	2,28	0,93	3,19	2,48	0,19	2,18
		<i>p</i>	0,98	0,75	0,97	0,83	0,42	0,10	0,47	0,87	0,38	0,00	0,00	0,39	0,01	0,00	0,57	0,34
A x C	4	<i>F</i>	4,71	1,53	62,76	99,41	31,95	17,89	3,14	5,80	2,58	14,10	311,09	3,17	15,65	10,13	0,57	2,93
		% V	6,97	14,02	19,44	10,69	7,69	4,94	3,75	6,01	5,10	6,44	13,00	2,88	6,81	2,95	0,18	5,48
		<i>p</i>	0,01	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,69	0,04
B x C	2	<i>F</i>	2,20	3,58	4,90	22,97	16,82	8,20	1,36	21,11	10,48	42,23	0,79	31,08	38,37	60,85	58,74	2,50
		% V	3,24	32,85	1,52	2,47	4,05	2,26	1,62	21,87	20,70	19,27	0,03	28,19	16,70	17,70	18,84	4,68
		<i>p</i>	0,13	0,04	0,02	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
A x B x C	4	<i>F</i>	0,07	0,15	0,47	0,36	2,93	0,40	1,96	6,51	2,94	14,25	12,72	1,74	7,05	12,26	0,81	4,12
		% V	0,10	1,38	0,15	0,04	0,71	0,11	2,35	6,74	5,80	6,50	0,53	1,58	3,07	3,56	0,26	7,72
		<i>p</i>	0,99	0,96	0,76	0,83	0,04	0,81	0,13	0,00	0,04	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,53	0,01

Na ANOVA realizada para os dados deste experimento, o fator tempo teve efeito significativo na quantificação de variáveis internas de *G. tenuistipitata* (conteúdo pigmentar, nas proporções entre pigmentos, no total de PS, a proporção entre as ficobiliproteínas e o total de PS e no conteúdo interno de C e N) com valores de *F* variando de 3,59 para o total de C até 1388,5 para o conteúdo de proteínas solúveis. Os valores de *p* para todas essas variáveis foram iguais a zero. Esse fator tempo foi o principal responsável por essas variações nos totais desses parâmetros, aportando desde 25,51% de influência na proporção entre PE e PC até a influência de 80,45% na variação da proporção de C:N. No caso de pigmentos fotossintetizantes, esse parâmetro influenciou significativamente o total de PE, PC e Cla, num total de mais de 70% de influência significativa. (Tabela 3.8). Os efeitos das diferentes concentrações de nitrato foram significativos em variáveis como o conteúdo total de N, e consequentemente, a

proporção entre C:N, o conteúdo total de pigmentos fotossintetizantes (PE, PC e Cla), e ainda as proporções entre PE/PC e (PE+PC)/PS, mas não se refletiu nas proporções entre pigmentos acessórios e a Cla. Além disso, o suprimento de nitrogênio teve efeito significativo sobre o total de proteínas solúveis de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.8). Por fim, o terceiro fator analisado isoladamente foi a radiação, que teve efeito significativo na proporção C:N, no conteúdo de pigmentos acessórios, bem como na proporção entre pigmentos fotossintetizantes e no total de PS, além da proporção entre as ficobiliproteínas e essas proteínas solúveis. No caso dos pigmentos fotossintetizantes, considerando-se as proporções entre eles, foi verificada uma influência significativa de mais de 25% do tipo de radiação sobre os valores medidos durante o experimento (Tabela 3.8). A dupla interação entre concentração de NO_3^- e o tipo de radiação utilizado apresentou efeito significativo somente para a proporção entre PE e PC e o conteúdo de PS. Já a interação entre a disponibilidade de NO_3^- e o tempo de experimento foi significativa para todas as variáveis internas, com exceção do conteúdo total de C e para a proporção entre PC e Cla. E por fim, a terceira interação de fatores possível, entre o tipo de radiação e o tempo teve efeito significativo para o total de C e N, e a proporção entre eles, para o total de pigmentos acessórios, e as proporções entre os mesmos e entre esses pigmentos e a Cla. No caso do conteúdo de C e a relação entre ficobiliproteínas e PS, essa interação influenciou em mais de 25% das variações observadas (Tabela 3.8). A interação entre os três fatores analisados foi significativa entre os conteúdos pigmentares apenas para PE. Entretanto, as proporções entre os três tipos de pigmentos analisados foram afetadas, bem como o total de PS (Tabela 3.8).

O conteúdo pigmentar de *Gracilaria tenuistipitata* variou significativamente em relação aos diferentes tratamentos de concentração de NO_3^- e exposição aos diferentes tipos de radiação, conforme apresentado na Figura 3.28. Quando *G. tenuistipitata* foi cultivada em 0,5 mM de NO_3^- , o conteúdo pigmentar não variou ao longo do tempo, se mantendo constante o total de PE, PC e Cla (Figura 3.28). Esse aspecto refletiu-se nas proporções entre pigmentos, também constante, conforme a Tabela 3.9, para o tratamento com esse suprimento de NO_3^- . Uma leve tendência de redução no conteúdo pigmentar das algas após 7 dias experimentais, tratadas com PAB, refletiu-se em menores proporções dos pigmentos acessórios com relação à clorofila *a* (PE/Cla e PC/Cla) (Tabela 3.9). O cultivo das algas em menores concentrações de N (0 e 0,1 mM de NO_3^-) causou redução do conteúdo pigmentar ao longo do tempo. O total de PE foi o que sofreu maior redução após 7 dias de experimento, seguido do total de PC e

posteriormente, o total de *Cla*. Considerando os tratamentos aos diferentes tipos de radiação, as algas expostas à PAB apresentaram menores quantidades de PE do que aquelas cultivadas em PAR quando submetidas a 0 ou 0,1 mM de NO_3^- . Já o conteúdo de PC e *Cla* de algas tratadas com PAB e PAR foi similar, para algas amostradas no mesmo período (Figura 3.28). As diminuições de conteúdo pigmentar foram proporcionais, mesmo em algas cultivadas em menores concentrações de NO_3^- , uma vez que quase todas as proporções se mantiveram constantes, exceto PE/*Cla* e PE/PC, cujos valores diminuiram após 7 dias em algas expostas à PAB, comparando-se com amostras de 0 ou 3 dias, e com aquelas tratadas com PAR após 7 dias (Tabela 3.9). Além disso, pelos dados de proporção, é possível saber que as algas possuem, em média, mais PE do que PC e *Cla*, e maior quantidade de PC do que *Cla*, visto que os valores de proporções foram em quase sua totalidade maiores do que 1. Os dados de proporção pigmentar refletem a maior redução do conteúdo de PE do que dos demais pigmentos (Tabela 3.9).

Figura 3.28: Conteúdo pigmentar (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, *Cla*) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- com exposição à radiação PAR e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão dos gráficos representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 3.9: Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO₃⁻ e exposta à radiação PAR e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Proporção	Tempo (dias)	Radiação	[NO ₃ ⁻] (mM)		
			0	0,1	0,5
PE/Cla	0	PAR	1,76 ± 0,06 ab	1,96 ± 0,31 ab	1,97 ± 0,62 a
		PAB	2,23 ± 0,56 a	2,13 ± 0,26 ab	1,57 ± 0,24 a
	3	PAR	1,86 ± 0,29 ab	2,57 ± 0,21 a	2,44 ± 0,39 a
		PAB	1,23 ± 0,19 b	1,61 ± 0,39 ab	1,61 ± 0,22 a
	7	PAR	1,73 ± 0,34 ab	1,81 ± 0,31 bc	1,79 ± 0,39 a
		PAB	0,11 ± 0,16 c	0,59 ± 0,16 c	1,48 ± 0,41 a
PC/Cla	0	PAR	0,97 ± 0,11 ab	1,09 ± 0,14 a	1,15 ± 0,34 a
		PAB	1,28 ± 0,32 a	1,19 ± 0,11 a	0,95 ± 0,13 a
	3	PAR	1,01 ± 0,14 a	1,37 ± 0,11 a	1,21 ± 0,15 a
		PAB	0,86 ± 0,11 a	0,91 ± 0,18 ab	0,86 ± 0,08 a
	7	PAR	0,98 ± 0,18 ab	0,96 ± 0,05 ab	1,04 ± 0,12 a
		PAB	0,55 ± 0,07 b	0,60 ± 0,03 b	0,87 ± 0,12 a
PE/PC	0	PAR	1,82 ± 0,14 a	1,78 ± 0,09 a	1,71 ± 0,05 a
		PAB	1,74 ± 0,02 a	1,78 ± 0,07 a	1,66 ± 0,03 a
	3	PAR	1,84 ± 0,13 a	1,87 ± 0,02 a	2,01 ± 0,10 a
		PAB	1,43 ± 0,07 a	1,76 ± 0,09 a	1,86 ± 0,11 a
	7	PAR	1,75 ± 0,03 a	1,87 ± 0,25 a	1,71 ± 0,20 a
		PAB	0,21 ± 0,29 b	0,97 ± 0,22 b	1,69 ± 0,24 a

O conteúdo de proteínas solúveis de amostras de *G. tenuistipitata* apresentou uma variação similar àquela observada para o total de pigmentos fotossintetizantes: os menores totais de proteínas solúveis (PS), ao redor de 10 mg por g de massa seca de alga foram observados quando as algas foram cultivadas com menor quantidade de nitrogênio disponível. Não foram verificadas diferenças marcantes entre o conteúdo de PS para algas tratadas com PAR comparadas com aquelas submetidas à PAB, no mesmo momento experimental, cultivados sob a mesma quantidade de nitrogênio. Em alguns tratamentos, como para algas supridas com 0,5 mM de NO₃⁻, o total de PS foi maior em algas tratadas com PAR em comparação com aquelas tratadas com PAB. Por outro lado, com suprimento de 0,1 mM de NO₃⁻, o padrão de resposta foi invertido com maiores totais de PS para amostras sujeitas à PAB comparadas àquelas expostas à PAR (Figura 3.29).

Figura 3.29: Proteínas solúveis (PS) por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças encontradas entre os tratamentos. N=3.

Os totais de ficobiliproteínas de *G. tenuistipitata* corresponderam a valores entre 22,5 e 35,2% do total de proteínas solúveis dessa alga, quando mantidas sob tratamento com radiação PAR. Ao longo do tempo, não foram verificadas variações nessa proporção quando as algas foram tratadas em ausência de UV, independentemente do suprimento de N. Por outro lado, quando as algas não foram supridas de NO_3^- e receberam o tratamento de PAB, após 7 dias, os valores de PE+PC perfaziam um total de apenas 8,5% das PS de *G. tenuistipitata*. Um efeito do tempo foi observado nessa proporção em algas expostas à PAB, uma vez que após 7 dias, as ficobiliproteínas corresponderam a uma parte menor do conteúdo total de proteínas solúveis de *G.*

tenuistipitata, independentemente do suprimento de N. Essa redução proporcional foi mais acentuada em ausência de N do que quando as algas foram supridas com NO_3^- (Figura 3.30).

Figura 3.30: Proporção entre o total de ficobiliproteínas (PE+PC) e o conteúdo de proteínas solúveis (PS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças encontradas entre os tratamentos. N=3.

O conteúdo total de N e C de *G. tenuistipitata* apresentou respostas distintas aos tratamentos de radiação e suprimento de NO_3^- . O total de C não variou entre os diferentes tratamentos: nem com o tempo, nem com as diferentes radiações, e tampouco com o suprimento de NO_3^- . O total de C nos diferentes tratamentos variou de 0,279 a 0,332 mg de C por g de massa seca de alga (Figura 3.31). O total de N seguiu a disponibilidade de NO_3^- no meio de cultura ao longo do tempo: a quantidade de 0,5 mM de NO_3^- foi suficiente para que o conteúdo de N total das algas não fosse reduzido ao longo do tempo, como observado para amostras com 0 e 0,1 mM de NO_3^- . Os menores

valores de N foram observados em tratamentos com ausência de suprimento de NO_3^- após 7 dias, enquanto que os maiores valores de conteúdo de N foram reportados após 3 dias de suprimento das algas com 0,5 mM de NO_3^- . Vale ressaltar que após 7 dias de cultivo em PAR ou PAB com suprimento de 0,5 mM de NO_3^- , o total de N observado foi similar ao conteúdo observado no início dos experimentos. Não houve diferença com relação ao conteúdo de N e C comparando-se as diferentes amostras submetidas a tratamentos de radiação PAR com aquelas submetidas à PAB (Figura 3.31). Outro ponto a ser observado é que para 1 mg de amostra seca, ao redor de 0,27 mg correspondem a C e cerca de 0,025 mg compreende o total de N, que foi cerca de dez vezes menor.

Figura 3.31: Conteúdo de C e N em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com adição de diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

A proporção entre C e N para os diferentes tratamentos seguiu o mesmo padrão de influência principalmente da disponibilidade de NO_3^- . Nas amostras com baixa ou nenhuma disponibilidade de NO_3^- , o valor da proporção aumentou ao longo do tempo, atingindo os valores mais altos após 7 dias. Neste caso, diferenças entre amostras tratadas com PAR e aquelas expostas à PAB foram evidentes, com maiores proporções de C:N em algas expostas à PAR do que aquelas sujeitas à PAB. No tratamento de amostras com 0,5 mM de NO_3^- , ocorre uma redução da proporção após 3 dias, relacionada com o aumento de N assimilado após esse período, em relação ao total de C. Após 7 dias, esse valor volta a ser similar ao observado no início do experimento (Tabela 3.10).

Tabela 3.10: Proporção entre C e N de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- (0, 0,1 e 0,5 mM) e expostas à radiação PAR ou PAB. Letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tempo (dias)	Radiação	$[\text{NO}_3^-]$ (mM)	C:N
0	PAR	0	11,68 $\pm$ 0,96 ab
	PAB		11,80 $\pm$ 0,75 ab
3	PAR		16,94 $\pm$ 2,07 c
	PAB		15,43 $\pm$ 0,72 cg
7	PAR		22,46 $\pm$ 0,84 e
	PAB		19,84 $\pm$ 0,80 d
0	PAR	0,1	11,68 $\pm$ 0,96 ab
	PAB		11,80 $\pm$ 0,75 ab
3	PAR		14,20 $\pm$ 0,83 bg
	PAB		12,62 $\pm$ 0,77 ab
7	PAR		21,82 $\pm$ 0,98 e
	PAB		19,07 $\pm$ 0,91 d
0	PAR	0,5	11,68 $\pm$ 0,96 ab
	PAB		11,80 $\pm$ 0,75 a
3	PAR		9,11 $\pm$ 0,46 f
	PAB		8,42 $\pm$ 0,26 f
7	PAR		14,81 $\pm$ 0,86 cgh
	PAB		12,92 $\pm$ 1,75 abh

Considerando a análise estatística realizada com os dados de atividade de AC, houve um efeito significativo do tempo, da radiação e da concentração de NO_3^- na atividade específica dessa enzima, bem como a interação entre o tempo e a concentração de NO_3^- em relação a essa variável dependente. O suprimento de NO_3^- e o tempo foram os fatores responsáveis por mais de 35% das variações significativas da atividade de AC (Tabela 3.8). Embora esses efeitos significativos tenham sido detectados para a atividade específica da AC, não houve um padrão relacionando aumento de atividade de

AC e variação da concentração de N no teste *a posteriori* de Newman-Keuls. No tratamento com ausência de suprimento de N (0 mM de NO_3^-), apenas uma tendência de aumento ao longo do tempo foi observada, e o valor de atividade da AC de amostras tratadas com PAB foi maior do que o observado para as amostras desse tratamento no início do experimento. Não houve diferenças na atividade de AC comparando amostras expostas à PAR e PAB no mesmo tempo e suprimento de N. Quando as algas foram supridas com 0,1 mM de NO_3^- , verificou-se um aumento da atividade específica de AC já após 3 dias, a qual se manteve mais alta após 7 dias, independentemente da radiação. No caso das amostras que receberam 0,5 mM de NO_3^- , não houve variação significativa da atividade específica da AC (Figura 3.32).

Figura 3.32: Atividade específica (REA, “Relative Enzymatic Activity”, ou Atividade Específica Relativa) da enzima anidrase carbônica (AC) de *Gracilaria tenuistipitata* por mg de PS, no início, após 3 ou 7 dias de cultivo sob radiação PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB), recebendo diferentes concentrações de NO_3^- no início do cultivo. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre as amostras dos tratamentos. N=3.

A análise de variância feita com os dados de rendimento quântico máximo de *G. tenuistipitata* indicou que houve um efeito significativo do tempo e do tipo de radiação utilizados sobre a variação desse parâmetro. Além disso, as interações entre tempo e suprimento de N, tempo e tipo de radiação e suprimento de N e tipo de radiação também apresentaram efeitos significativos sobre os dados de F_v/F_m , bem como a interação tripla entre os três fatores. O tipo de radiação foi o fator que influenciou em mais da metade das variações significativas dos valores de rendimento quântico máximo (Tabela 3.8). O rendimento quântico máximo, refletindo o funcionamento máximo do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata*, foi estimado a partir dos dados de F_v/F_m , representados na Figura 3.33.

Figura 3.33: Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- , expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os valores iniciais de rendimento quântico máximo de um pouco mais de 0,6 são similares independentemente dos tratamentos, e se mantiveram constantes e maiores do que 0,6 ao longo do tempo, quando as algas foram expostas à PAR, independentemente do tratamento de NO_3^- fornecido. Já no caso das amostras submetidas à PAB, foi verificada uma redução nos valores de F_v/F_m após 3 dias de cultivo em 0 mM de NO_3^- , que se manteve nesse valor após 7 dias, menor do que o valor médio observado para as amostras tratadas com PAR tanto em 3 ou 7 dias. Já para as amostras tratadas com 0,1 mM de NO_3^- , apenas após 7 dias foi verificada uma redução significativa dos valores de F_v/F_m para dados próximos a 0,4 (Figura 3.33).

Por meio das análises dos aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *G. tenuistipitata* exposta aos diferentes tratamentos de NO_3^- e radiações PAR ou PAB, não foi possível obter uma separação completa dos picos dos cromatogramas resultantes da presença das diferentes MAAs. Dessa forma, optou-se neste caso em quantificar o total de MAAs (Figura 3.34), utilizando como coeficiente de extinção molar para a quantificação total o valor referente ao MAA porphyra-334, visto o fato que em experimentos posteriores quando foi possível a detecção e separação dos picos comparando-se com o padrão utilizado (ver adiante) esse MAA mostrou ser o majoritário em relação aos demais.

Os três fatores avaliados neste experimento (tempo, tipo de radiação e suprimento de NO_3^-) apresentaram efeitos significativos sobre o total de MAAs de *G. tenuistipitata*, seja considerando os fatores separadamente ou a análise das interações dupla e tripla entre eles. O tipo de radiação foi o fator que conferiu maior influência para as variações de MAAs de *G. tenuistipitata* neste experimento (Tabela 3.8). Foi observado um aumento substancial de MAAs totais de *G. tenuistipitata* quando exposta à radiação contendo UVA e UVB (PAB), enquanto que aquelas mantidas em PAR apresentaram sempre o mesmo total basal de MAAs independentemente do suprimento de N. Esse aumento foi detectado mesmo em amostras não supridas com N (0 mM), já após 3 dias de cultivo e se manteve após 7 dias de exposição à PAB. Já no caso em que as algas receberam adição de 0,5 mM NO_3^- , o total de MAA encontrado após 7 dias foi maior do que aquele observado após 3 dias (Figura 3.34).

Figura 3.34: Total de aminoácidos tipo microsporina (MAAs) por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A análise estatística de variância dos dados de proporção de MAAs por PS indicou que o tempo e o tipo de radiação foram os fatores que influenciaram a variação desse parâmetro. A radiação contribuiu com mais de 58,8% da influência significativa para variar os resultados de MAAs com respeito às proteínas solúveis. A interação entre esses dois fatores também teve influência significativa sobre esse parâmetro (Tabela 3.8). A manutenção dos cultivos de *G. tenuistipitata* sob tratamento com PAR e quaisquer suprimentos de N resultou em valores totais de MAAs equivalentes, os quais

compreenderam entre 1 a 2,5% do conteúdo de proteínas solúveis das algas. Entretanto, quando as algas foram submetidas ao tratamento com PAB, o conteúdo de MAAs aumentou muito em relação ao conteúdo proteico da alga (Figura 3.34). Após 3 dias, os MAAs perfaziam entre 8,8 e 9,9% do total de PS, e após 7 dias desse tratamento, as amostras cultivadas sob suprimento de 0,5 mM de NO_3^- e PAB contiveram cerca de 14,2% do seu conteúdo proteico no formato de MAAs (Figura 3.35).

Figura 3.35: Proporção entre o total de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) e o total de proteínas solúveis (PS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Algas mantidas por uma semana em PAR ou PAB foram expostas à uma intensidade maior de UVA e UVB (o dobro da intensidade) por 30 min, e em seguida mantidas em PAR por mais 120 min. Os valores de rendimento quântico efetivo das amostras advindas de exposição à PAR apresentaram maior redução dos valores de

rendimento, atingindo valores menores do que 0,2. As amostras mantidas em maior concentração de NO_3^- apresentaram menor redução dos valores de rendimento quando provenientes do tratamento anterior com PAB, e também uma recuperação mais acelerada atingindo valores similares aos iniciais, após 2 horas de recuperação em $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR. Nenhuma dessas amostras pré-expostas à PAR apresentou recuperação total do rendimento quântico após 24 min do período de recuperação. Entretanto, após 150 min, foi observada a recuperação quase que completa do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata*. As algas atingiram um valor médio de rendimento quântico efetivo correspondente a 82,4%, 90,9 e 93,95% dos valores obtidos antes da exposição à UV (Figura 3.36).

Por outro lado, as amostras que tinham sido expostas durante uma semana à PAB apresentaram restabelecimento completo dos valores de rendimento após 24 min em $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR, sendo obtidos valores de rendimento quântico efetivo maiores do que no início do período de exposição. As algas que estiveram nutridas com 0, 0,1 e 0,5 mM apresentaram a recuperação do aparato fotossintetizante além do dano causado pela exposição à UV, uma vez que o rendimento quântico efetivo após 120 min de recuperação em baixa irradiância de PAR foi equivalente a 126,6, 125,6 e 111,1% com respeito ao valor inicial (Figura 3.36). Adicionalmente, a redução dos valores de rendimento quântico nessas amostras foi muito menor do que aquela observada para as pré-tratadas com PAR. Mesmo as algas pré-expostas à PAB e sem suprimento de NO_3^- tiveram taxas de rendimento quântico efetivo maiores do que todas as amostras pré-tratadas com PAR independentemente do suprimento de nitrogênio (Figura 3.36).

Figura 3.36: Dano e recuperação do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata*, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, durante a exposição à PAR+UVA+UVB por 30 min, e recuperação em $60 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de PAR por 2 h após o período experimental de uma semana, na qual as algas foram tratadas com diferentes radiações (PAR e PAB) e concentrações de NO_3^- (0, 0,1 e 0,5 mM). As barras representam desvio padrão. Cada curva representa valores médios de três repetições.

Esse processo de fotoinibição também fica evidenciado ao analisar os gráficos de taxas de dano e recuperação (Figura 3.37). Não foram observadas diferenças significativas na recuperação do aparato fotossintetizante durante o processo de exposição das amostras ($F=1,19$; $p=0,32$). Entretanto, um efeito significativo dos tratamentos foi observado para as taxas de dano ($F=52,21$; $p=0$). As amostras

aclimatadas à PAR apresentaram taxas de dano maiores do que aquelas previamente expostas à PAB, independentemente do tratamento de NO_3^- realizado. Entre as amostras pré-expostas à PAB, houve maior taxa de dano naquelas que não tinham recebido suprimento de NO_3^- no decorrer do experimento (Figura 3.37).

Figura 3.37: Dano (k) e recuperação (r) durante o período de exposição de *Gracilaria tenuistipitata* por 30 min à PAR+UVA+UVB durante o experimento de exposição e recuperação do aparato fotossintetizante, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, após experimento de cultivo das algas em diferentes concentrações de NO_3^- e distintas radiações (PAR e PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão indicam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

De modo geral, o rendimento do RNA das amostras foi similar, após análise *a posteriori* de Newman-Keuls, mesmo que o resultado da ANOVA (Tabela 3.8) tenha apontado efeito significativo do tempo, suprimento de NO_3^- e tipo de radiação sobre a variação da quantidade de RNA de *G. tenuistipitata*. A única amostra que teve rendimento médio significativamente menor foi aquela na qual, durante 7 dias, as algas foram tratadas com PAR e sem adição de NO_3^- . Por outro lado, as algas submetidas à PAB e supridas com 0,1 mM de NO_3^- apresentaram maior rendimento de RNA após 3 dias de experimento. Entretanto, após 7 dias, o total de RNA dessas mesmas amostras voltou a ser similar à quantidade observada no início do experimento (Tabela 3.11).

Tabela 3.11: Quantidade de RNA de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com diferentes concentrações de NO_3^- e expostas à PAR e PAB. Diferentes letras ao lado de cada valor de quantidade de RNA indicam diferenças significativas entre as amostras. N=3.

Radiação (tipo)	$[\text{NO}_3^-]$ (mM)	Tempo (dias)	RNA (ng/ μL)	260/280	260/230
Inicial		0	128,61 $\pm$ 46,23 ab	1,99	1,08
PAR	0	3	128,76 $\pm$ 5,55 ab	2,01	0,87
PAB			157,95 $\pm$ 28,06 ab	1,94	1,04
PAR	0	7	63,38 $\pm$ 8,96 b	1,96	0,78
PAB			138,80 $\pm$ 34,94 ab	1,62	0,76
PAR	0,1	3	169,08 $\pm$ 67,47 ac	1,99	1,33
PAB			266,66 $\pm$ 66,42 d	1,98	1,40
PAR	0,1	7	118,39 $\pm$ 18,76 ab	1,76	0,95
PAB			124,84 $\pm$ 13,08 ab	1,92	1,26
PAR	0,5	3	250,64 $\pm$ 33,39 cd	2,04	1,50
PAB			199,49 $\pm$ 42,53 acd	2,05	1,39
PAR	0,5	7	106,57 $\pm$ 29,54 ab	1,96	1,12
PAB			173,50 $\pm$ 26,77 ab	1,93	1,10

As taxas de expressão do gene codificante para a fotoliase-32 de *Gracilaria tenuistipitata* foram quase todas menores do que 1, isto é, esses valores indicam uma redução da expressão ao longo do tempo com respeito ao tratamento calibrador (expressão do gene da fotoliase-32 no tempo 0 do experimento), constituído de amostras no início do experimento, que estavam pré-aclimatadas à PAR, e tinham sido nutridas por 0,5 mM de NO_3^- . Embora efeitos dos tratamentos realizados tenham sido verificados por meio da análise estatística, tanto para 3 dias ($F=30,62$; $p=0$) quanto para 7 dias de experimento ($F=47,72$; $p=0$), os testes *a posteriori* indicaram que estes efeitos não foram significativos. Após 3 dias, a taxa de expressão do gene codificante para a fotoliase-32 era ao redor do mesmo valor do calibrador para amostras tratadas com 0,5 mM de NO_3^- , independentemente da radiação utilizada, enquanto que os demais tratamentos apresentaram taxas de expressão menores. Já após 7 dias, todos os tratamentos tinham valores de expressão significativamente menores, de cerca de 0,4 vezes menos do que aqueles observados para o calibrador inicial, e as diferenças observadas foram entre amostras não comparáveis (considerando aquelas que foram expostas a duas radiações e duas concentrações de NO_3^- diferentes, por exemplo, PAR e 0,1 mM $\text{NO}_3^- <$ PAB e 0,5 mM NO_3^-) (Figura 3.38).

Figura 3.38: Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase 32 de *Gracilaria tenuistipitata* no início (■, nível de expressão do calibrador) ou após 3 e 7 dias de cultivo sob exposição à PAR (■) ou PAR+UVA+UVB (PAB, □), submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos realizados. N=3.

O crescimento de *G. tenuistipitata* foi afetado pelos diferentes tratamentos realizados neste experimento. O tipo de radiação ($F=64,91$; $p=0$), a concentração de nitrato ($F=139,59$; $p=0$) e o período de crescimento ($F=6,092$; $p=0,02$) apresentaram efeitos significativos sobre as taxas de crescimento (TC). As interações entre radiação e a disponibilidade de NO_3^- ($F=29,54$; $p=0$), e entre o período experimental e a disponibilidade de NO_3^- ($F=17,56$; $p=0$) apresentaram efeitos significativos, bem como a tripla interação entre os três fatores ($F=5,061$; $p=0,014$). A única interação não significativa foi aquela entre a radiação e a disponibilidade de NO_3^- ($F=0,81$; $p=0,456$). As variações de TC são apresentadas na Figura 3.39.

Figura 3.39: Taxas de crescimento (TC, em % de massa fresca por dia, %MF.dia⁻¹) de *Gracilaria tenuistipitata* exposta à radiação PAR ou PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- em dois períodos, do início até 3 dias e entre o terceiro dia e o sétimo dia. Diferentes letras sobre as barras implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

As TCs foram diferentes para as algas submetidas à PAR comparadas com aquelas em PAB no primeiro período (0 a 3 dias) analisado, tanto para algas não nutridas quanto para aquelas supridas com 0,1 mM de NO_3^- . Esse mesmo efeito foi verificado para as taxas entre 3 e 7 dias de experimento, em que as algas sujeitas à PAR apresentaram maiores TCs do que aquelas tratadas com PAB. Naquelas algas com algum suprimento de nitrogênio fornecido (0,1 e 0,5 mM de NO_3^-), as TCs foram similares para aquelas tratadas tanto com PAR quanto com PAB. As maiores TCs (ao redor de 15% de massa fresca por dia) foram registradas para algas supridas com 0,5 mM de NO_3^- , nos dois períodos quando expostas à PAR, e apenas no segundo período (3 a 7 dias) quando as algas foram expostas à PAB. Já a menor TC foi obtida em

amostras expostas à PAB e submetidas ao estresse pela ausência de suprimento de nitrogênio (0 mM de NO_3^-) (Figura 3.39).

As respostas fisiológicas e moleculares de *G. tenuistipitata* aos tratamentos efetuados neste experimento são correlacionadas na Tabela 3.12. Pode-se verificar que os compostos nitrogenados estão positivamente relacionados entre si, incluindo o total de N interno nas algas, o total de pigmentos fotossintetizantes (incluindo Cla, PE e PC, bem como as proporções entre eles) e o total de proteínas solúveis das algas. Além disso, o rendimento quântico ótimo da fotossíntese foi diretamente relacionado aos pigmentos (total absoluto e proporções) e proteínas solúveis. A relação entre C:N foi negativamente correlacionada a esses fatores acima (N, PS, PE, PC, Cla, proporções e F_v/F_m e RNA). Não houve correlação com o total de C e a atividade específica de anidrase carbônica, a qual foi negativamente correlacionada com os pigmentos fotossintetizantes, PS e F_v/F_m , e positivamente correlacionada com a proporção C:N, o total de MAAs e a proporção destes pelo conteúdo proteico. Já em relação a esse total de MAAs, uma correlação significativa e negativa foi observada deste fator com relação ao total de PE, PC (e a proporção dessas ficobiliproteínas com a Cla), e também com o rendimento quântico máximo da fotossíntese. Os MAAs foram correlacionados com o total de RNA e com a proporção de MAAs/PS. O total de RNA foi positivamente correlacionado com o total de PS e o total de N interno (Tabela 3.12).

Tabela 3.12: Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras de *Gracilaria tenuistipitata* utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no terceiro experimento deste trabalho. Dados com valores de correlação significativos estão em negrito. N=52. Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas 5 a 7.

	AC	C	N	C:N	PE	PC	Cla	PE/Cla	PC/Cla	PE/PC	PS	(PE+PC)/PS	F_v/F_m	MAAs	MAAs/PS	RNA
Biomassa	0,24	0,31	-0,20	0,31	-0,25	-0,25	-0,37	-0,03	-0,10	0,05	-0,25	-0,15	0,03	0,18	0,16	-0,01
AC		0,18	-0,50	0,57	-0,69	-0,74	-0,71	-0,41	-0,38	-0,42	-0,63	-0,53	-0,52	0,30	0,54	0,11
C			0,03	0,27	-0,21	-0,26	-0,25	-0,04	-0,13	0,08	-0,25	-0,04	-0,08	-0,07	-0,02	-0,02
N				-0,91	0,66	0,61	0,64	0,39	0,29	0,46	0,74	0,25	0,21	0,22	-0,06	0,52
C:N					-0,74	-0,73	-0,73	-0,44	-0,37	-0,45	-0,85	-0,28	-0,30	-0,20	0,10	-0,49
PE						0,94	0,77	0,79	0,71	0,73	0,83	0,75	0,71	-0,35	-0,63	0,20
PC							0,81	0,66	0,65	0,56	0,81	0,70	0,65	-0,38	-0,62	0,13
Cla								0,25	0,16	0,37	0,69	0,50	0,39	-0,18	-0,40	0,10
PE/Cla									0,95	0,85	0,61	0,71	0,79	-0,35	-0,63	0,16
PC/Cla										0,65	0,56	0,63	0,70	-0,40	-0,61	0,10
PE/PC											0,56	0,69	0,78	-0,19	-0,53	0,14
PS												0,30	0,55	-0,09	-0,39	0,31
(PE+PC)/PS													0,69	-0,53	-0,71	-0,09
F_v/F_m														-0,46	-0,73	-0,10
MAAs															0,89	0,47
MAAs/PS																0,32

3.4. Experimento 4 – Efeitos da radiação UVB na fotoproteção e fotossíntese de *G. tenuistipitata* cultivada sob diferentes concentrações de NO_3^-

Após estudar os efeitos da radiação UV nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*, nesse experimento, foram estudados os efeitos de UVA e UVB por meio de um tratamento contendo PAR e UVA, e outro tratamento com PAR, UVA e UVB em diferentes concentrações de NO_3^- . Por meio dos resultados deste experimento, foi possível detectar os principais efeitos da radiação UVB nas estratégias de fotoproteção de *G. tenuistipitata*. A Figura 3.40 apresenta um esquema do desenho experimental executado.

Figura 3.40: Esquema do experimento 4, visando analisar os efeitos da radiação (ausência de UVB) e de diferentes concentrações de nitrato nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*. As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).

Neste caso, como fatores adicionais, foram medidos os parâmetros da fotossíntese a partir de curvas de ETR x irradiância, bem como a possível presença de dímeros de T no DNA das amostras. Os dados resultantes da ANOVA multifatorial com

medidas repetidas estão na Tabela 3.13, com os efeitos significativos dos fatores tempo, tipo de radiação e concentração de NO_3^- sobre as variáveis dependentes medidas em *G. tenuistipitata*.

Tabela 3.13: Resultados da análise multifatorial ANOVA com medidas repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas ou três variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em diferentes concentrações de nitrato e expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas 5 a 7.

Fonte de variação	[NO ₃ ⁻] (A)			Radiação (B)			Tempo (C)			A x B			A x C			B x C			A x B x C		
	gl			1			2			2			4			2			4		
Variável	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>	<i>F</i>	% Var.	<i>p</i>
C	2,11	12,77	0,13	6,58	39,75	0,01	1,79	10,84	0,18	1,85	11,16	0,17	0,41	2,45	0,80	1,68	10,15	0,20	2,13	12,88	0,94
N	22,79	34,94	0,00	0,47	0,72	0,50	24,42	37,45	0,00	2,58	3,96	0,09	13,63	20,91	0,00	0,71	1,09	0,50	0,61	0,93	0,66
C:N	39,38	9,44	0,00	0,18	0,04	0,68	281,72	67,55	0,00	0,12	0,03	0,89	91,21	21,87	0,00	4,39	1,05	0,02	0,07	0,02	0,99
PE	22,47	16,43	0,00	9,00	6,58	0,01	71,50	52,26	0,00	0,64	0,47	0,54	28,94	21,15	0,00	3,62	2,65	0,04	0,64	0,47	0,64
PC	22,39	14,28	0,00	6,30	4,02	0,02	104,44	66,63	0,00	0,33	0,21	0,72	21,65	13,81	0,00	0,87	0,56	0,43	0,76	0,49	0,56
Cla	4,16	3,85	0,00	0,10	0,09	0,76	85,06	78,73	0,00	0,20	0,19	0,82	7,04	6,51	0,00	10,25	9,49	0,00	1,24	1,15	0,32
PE/Cla	38,70	28,38	0,00	23,99	17,59	0,00	30,14	22,09	0,00	1,83	1,34	0,20	25,23	18,50	0,00	15,88	11,64	0,00	0,62	0,45	0,66
PC/Cla	18,46	34,44	0,00	10,36	19,32	0,01	9,39	17,52	0,00	0,36	0,68	0,70	6,53	12,18	0,00	7,66	14,29	0,00	0,85	1,58	0,51
PE/PC	36,34	18,95	0,00	21,33	11,12	0,00	65,04	33,91	0,00	5,21	2,72	0,02	40,10	20,91	0,00	22,29	11,62	0,00	1,48	0,77	0,23
F _v /F _m	22,32	19,79	0,00	13,69	12,14	0,00	57,11	50,64	0,00	0,03	0,03	0,97	12,33	10,93	0,00	5,87	5,20	0,01	1,42	1,26	0,25
ETR _{max}	26,13	28,32	0,00	11,66	12,64	0,00	38,06	41,26	0,00	0,27	0,29	0,77	13,93	15,10	0,00	1,25	1,35	0,30	0,97	1,05	0,44
α	202,77	80,94	0,00	14,64	5,84	0,00	16,77	6,69	0,00	4,97	1,98	0,02	9,16	3,66	0,00	0,77	0,31	0,47	1,45	0,58	0,24
I _k	25,43	78,95	0,00	0,24	0,75	0,63	1,04	3,24	0,37	1,14	3,54	0,35	3,90	12,12	0,01	0,08	0,25	0,92	0,37	1,16	0,83
NPQ	10,84	27,57	0,00	13,18	33,50	0,00	10,03	25,50	0,00	0,10	0,25	0,91	1,91	4,87	0,13	2,43	6,17	0,10	0,84	2,14	0,51
Anteraxantina	6,27	12,52	0,01	0,18	0,37	0,67	24,88	49,67	0,00	2,32	4,63	0,13	14,55	29,05	0,00	0,25	0,50	0,78	1,64	3,27	0,19
Zeaxantina	7,06	30,24	0,01	0,47	2,03	0,50	9,33	40,00	0,00	0,45	1,92	0,65	2,09	8,94	0,11	2,66	11,39	0,09	1,28	5,48	0,30
β-caroteno	28,67	25,89	0,00	2,19	1,97	0,16	60,63	54,74	0,00	1,59	1,43	0,24	13,46	12,16	0,00	3,13	2,83	0,06	1,09	0,99	0,38
Luteína	35,25	53,81	0,00	6,18	9,43	0,03	12,10	18,46	0,00	2,66	4,06	0,10	7,61	11,61	0,00	1,49	2,27	0,24	0,23	0,35	0,92
Shinorina	2,64	8,39	0,11	5,62	17,88	0,03	2,26	7,20	0,12	0,69	2,21	0,52	13,63	43,35	0,00	4,97	15,80	0,01	1,63	5,17	0,20
P-334	21,81	13,76	0,00	30,12	19,01	0,00	26,67	16,83	0,00	1,36	0,86	0,29	57,30	36,16	0,00	19,97	12,60	0,00	1,23	0,78	0,32
Asterina	1,99	5,99	0,17	7,61	22,95	0,02	15,58	46,98	0,00	2,25	6,78	0,14	5,60	16,88	0,00	0,04	0,11	0,96	0,10	0,31	0,80
Palitina	9,20	8,39	0,00	37,86	34,52	0,00	47,54	43,34	0,00	2,37	2,16	0,13	7,98	7,27	0,00	1,89	1,72	0,17	2,85	2,60	0,04
Palitinol	2,86	4,93	0,09	16,19	27,95	0,00	29,75	51,38	0,00	1,61	2,77	0,24	2,78	4,80	0,05	4,42	7,64	0,02	0,31	0,53	0,87
MAAs	16,50	8,90	0,00	39,66	21,39	0,00	45,62	24,60	0,00	0,71	0,38	0,51	60,42	32,58	0,00	20,49	11,05	0,00	2,02	1,09	0,12
DNA	68,63	86,53	0,00	0,00	0,01	0,95	1,86	2,34	0,16	0,38	0,47	0,69	5,94	7,48	0,00	0,67	0,84	0,52	1,84	2,32	0,13
RNA	6,16	28,26	0,01	0,03	0,16	0,86	5,10	23,39	0,01	0,35	1,61	0,71	6,96	31,90	0,00	1,86	8,52	0,17	1,34	6,16	0,28

O tempo, a radiação e o suprimento de NO_3^- apresentaram influência significativa na variação do conteúdo pigmentar de *G. tenuistipitata*, considerando também as proporções entre os pigmentos (PE/Cla, PC/Cla e PE/PC). A única exceção foi o conteúdo de Cla, que não foi afetado pelo tipo de radiação utilizado. O fator tempo foi responsável por mais de 50% da variação do conteúdo de PE, PC e Cla. Por outro lado, o suprimento de N teve mais efeitos significativos sobre as proporções entre ficobiliproteínas e a clorofila *a*, de modo que a radiação não foi o fator principal para afetar as variações destes parâmetros relacionados ao conteúdo pigmentar. A dupla interação entre o tipo de radiação e a concentração de NO_3^- utilizada somente teve interferência sobre a proporção entre PE/PC, e ainda assim, essa influência foi menor do que dos outros fatores. As outras interações duplas (do fator tempo com o tipo de

radiação e com a disponibilidade de NO_3^-) foram efetivas nas variáveis relacionadas aos pigmentos de *G. tenuistipitata*. Nenhuma delas conferiu influência maior de 25% sobre a variação desses conteúdos e proporções. A única exceção foi o total de PC, que não foi afetado pela interação entre tempo e tipo de radiação. A interação tripla entre os fatores estudados não teve interferência significativa na variação dos pigmentos de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.13).

O conteúdo pigmentar de *G. tenuistipitata* variou ao longo do tempo e com a concentração de NO_3^- disponibilizada às amostras nos cultivos. Adicionalmente, em alguns tratamentos, foram verificadas também diferenças entre as amostras expostas às duas radiações utilizadas neste experimento. O conteúdo dos três tipos de pigmentos analisados (PE, PC e Cla) se manteve constante ao longo do tempo quando as algas foram tratadas com 0,5 mM de NO_3^- , independentemente da radiação utilizada. Os conteúdos de PE e PC apresentaram uma redução ao longo do tempo para as amostras que não receberam suprimento total de NO_3^- , tanto para as amostras tratadas com PA quanto àquelas expostas a PAB. No sétimo dia de experimento, o total de PE das algas não supridas com NO_3^- atingiu o valor médio de 0,25 mg por g de massa seca, o qual foi o mais baixo entre todas as amostras. Além disso, as amostras tratadas com PA apresentaram uma tendência a possuírem mais PE e PC do que aquelas expostas à PAB, comparando-se nos mesmos tempos e tratamentos de NO_3^- . Entretanto, essa diferença foi significativa somente nas amostras tratadas com 0,1 mM de NO_3^- após 7 dias. As reduções no conteúdo de Cla foram detectadas nas amostras submetidas a 0 ou 0,1 mM de NO_3^- apenas após 7 dias experimentais. Os valores mais altos de conteúdo pigmentar foram reportados para as amostras do início do experimento. O total médio de Cla variou entre 1,19 e 2,39 mg por g de massa seca, e o conteúdo médio de PC variou de 1,40 a 4,94 mg por g de massa seca considerando todas as amostras analisadas (Figura 3.41).

A proporção entre os diferentes pigmentos permitiu detectar que as PE são os compostos majoritários, seguidos do total de PC e posteriormente da quantidade de Cla de *G. tenuistipitata*. Por meio dos diferentes tratamentos, foi detectada uma redução na proporção de PE/Cla com o tempo quando as amostras foram tratadas com 0 e 0,1 mM de NO_3^- . Adicionalmente, em ambos os casos, após sete dias, a relação PE/Cla foi sempre menor em algas expostas à PAB do que aquelas submetidas à PA (Tabela 3.14). Para os dados de proporção de PC/Cla, observou-se o mesmo tipo de relação, após sete dias e nas amostras com déficit de NO_3^- no meio, com proporções menores do que no

início e após três dias experimentais. Entretanto, não houve diferenças entre tratamentos com distintas radiações. Por fim, a proporção entre PE/PC variou da mesma maneira que a de PE/Cla em tratamentos com menos NO_3^- . Para as amostras submetidas a 0,5 mM de NO_3^- , poucas variações foram detectadas: apenas um aumento na relação PE/Cla e PE/PC em algas expostas à PA, após 7 dias (Tabela 3.14).

Figura 3.41: Conteúdo pigmentar em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 3.14: Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e três concentrações de nitrato (0, 0,1 ou 0,5 mM de NO₃⁻). Diferentes letras ao lado de cada valor representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

Proporção	Tempo (dias)	Radiação	[NO ₃ ⁻] (mM)		
			0	0,1	0,5
PE/Cla	0	PA	3,27 ± 0,20 a	3,70 ± 0,55 ab	2,83 ± 0,69 a
		PAB	3,16 ± 0,19 ab	3,77 ± 0,74 ab	3,67 ± 0,12 a
	3	PA	2,78 ± 0,98 b	3,98 ± 0,20 a	3,68 ± 0,54 a
		PAB	1,95 ± 0,19 bc	2,77 ± 0,33 ab	3,35 ± 0,13 a
	7	PA	1,52 ± 0,57 c	2,33 ± 0,42 b	4,96 ± 0,75 b
		PAB	0,20 ± 0,23 d	0,48 ± 0,32 c	3,39 ± 0,90 a
PC/Cla	0	PA	1,72 ± 0,25 a	2,10 ± 0,21 a	1,72 ± 0,29 a
		PAB	1,61 ± 0,26 a	2,19 ± 0,41 a	2,05 ± 0,07 a
	3	PA	1,69 ± 0,40 a	2,24 ± 0,03 a	1,93 ± 0,18 a
		PAB	1,43 ± 0,25 ab	1,92 ± 0,26 a	1,74 ± 0,12 a
	7	PA	1,39 ± 0,10 ab	1,79 ± 0,22 ab	2,29 ± 0,21 a
		PAB	1,06 ± 0,11 b	1,25 ± 0,32 b	1,75 ± 0,30 a
PE/PC	0	PA	1,92 ± 0,16 a	1,75 ± 0,09 a	1,63 ± 0,19 a
		PAB	1,99 ± 0,22 a	1,72 ± 0,07 ab	1,79 ± 0,06 ab
	3	PA	1,63 ± 0,25 ab	1,78 ± 0,11 a	1,90 ± 0,16 ab
		PAB	1,39 ± 0,26 bc	1,45 ± 0,03 ab	1,93 ± 0,07 ab
	7	PA	1,11 ± 0,48 c	1,29 ± 0,08 b	2,16 ± 0,21 b
		PAB	0,17 ± 0,21 d	0,36 ± 0,18 c	1,92 ± 0,28 ab

A quantidade de C de *G. tenuistipitata* foi afetada significativamente apenas pelo fator radiação (Tabela 3.13). Entretanto, os efeitos significativos foram menores, uma vez que na análise *a posteriori* de Newman-Keuls nenhuma diferença entre os tratamentos foi detectada. Os valores médios de conteúdo de C da espécie durante e depois de submetida aos diferentes tratamentos variaram entre 0,36 e 0,48 mg de C por mg de massa seca de alga (Figura 3.42). O tempo e a concentração de NO₃⁻ (isoladamente e em interação) apresentaram efeitos significativos no total de N. Isoladamente, esses dois fatores foram responsáveis por cerca de 35% da variação do conteúdo de N interno (Tabela 3.13). Após 3 e 7 dias de experimento, o conteúdo interno de N foi menor nas amostras supridas com menores concentrações de NO₃⁻ (0 e 0,1 mM) do que naquelas enriquecidas com 0,5 mM de NO₃⁻. Não houve diferenças significativas comparando-se os tratamentos de PA com os de PAB no mesmo intervalo de tempo e considerando-se o mesmo suprimento de N. Adicionalmente, os ápices de *G. tenuistipitata* tratados com 0 e 0,5 mM de NO₃⁻ possuíram ao final do experimento (7 dias) valores de N similares àqueles observados no início. Apenas em amostras supridas com 0,1 mM de NO₃⁻, houve uma redução significativa da quantidade desse elemento

ao longo do tempo. O valor máximo de N foi encontrado em amostras do início do experimento (vindas de um pré-tratamento com 0,5 mM de NO_3^-) e que foram posteriormente cultivadas em PA e supridas com 0,1 mM, resultando num total de 0,058 mg de N por mg de massa fresca de alga. Já os menores valores absolutos de N foram verificados para as amostras que foram cultivadas em água do mar não-enriquecida com NO_3^- . Tanto para aquelas expostas à PA quanto para aquelas cultivadas em PAB, o total de N observado após 7 dias nessas condições foi de 0,02 mg de N por mg de massa seca (Figura 3.42).

Figura 3.42: Conteúdo de C e N em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com adição de diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

Foi observado efeito significativo do tempo (causador de mais de 67% da variação) e da concentração de NO_3^- (isoladamente e em interação) na proporção de C:N, a qual também foi afetada pela interação entre o tempo e o tipo de radiação (Tabela 3.13). Uma vez que os valores de quantidade de C foram constantes entre os

diferentes tratamentos, as variações na proporção C:N são principalmente referentes à diferentes quantidades de N em cada amostra. Porém, por meio desses dados, uma resposta mais integrada pôde ser alcançada. As amostras de *G. tenuistipitata* cultivadas em 0 mM de NO_3^- apresentaram os maiores valores de proporção entre C:N: 21,78 e 20,06, para aquelas expostas à PA e PAB, respectivamente. As algas submetidas a 0 mM de NO_3^- apresentaram um aumento ao longo do tempo dos valores de C:N, já detectado após 3 dias, e ainda observado após 7 dias. Já naquelas tratadas com 0,1 mM de NO_3^- , apenas após 7 dias foi detectado um aumento na proporção C:N, enquanto que nas algas submetidas a 0,5 mM de NO_3^- , os valores dessa proporção permaneceram constantes ao longo do tempo. Isto foi verificado independentemente da radiação utilizada (Tabela 3.15).

Tabela 3.15: Proporção entre C e N de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de nitrato (0, 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^-) e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tempo (dias)	Radiação	$[\text{NO}_3^-]$ (mM)	C:N 0
0	PA	0	10,66 $\pm$ 3,22 a
	PAB	0	10,71 $\pm$ 0,61 a
3	PA	0	14,79 $\pm$ 3,04 b
	PAB	0	14,54 $\pm$ 1,22 b
7	PA	0	21,78 $\pm$ 3,52 d
	PAB	0	20,06 $\pm$ 1,18 cd
0	PA	0,1	8,26 $\pm$ 0,38 a
	PAB	0,1	9,14 $\pm$ 0,80 a
3	PA	0,1	11,37 $\pm$ 0,79 a
	PAB	0,1	11,49 $\pm$ 0,21 a
7	PA	0,1	18,42 $\pm$ 0,75 c
	PAB	0,1	17,68 $\pm$ 0,96 c
0	PA	0,5	9,98 $\pm$ 0,90 a
	PAB	0,5	10,43 $\pm$ 1,00 a
3	PA	0,5	8,04 $\pm$ 0,29 a
	PAB	0,5	7,97 $\pm$ 0,35 a
7	PA	0,5	9,90 $\pm$ 1,54 a
	PAB	0,5	8,92 $\pm$ 1,10 a

O rendimento quântico do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* variou de acordo com o suprimento de NO_3^- , e efeitos significativos também foram detectados com os diferentes tratamentos de radiação, além da presença de efeito significativo do tempo (Tabela 3.13). As interações duplas envolvendo esse fator (com o tipo de radiação e com a concentração de NO_3^-) também influenciaram no resultado de F_v/F_m (Tabela 3.13). Ao longo do período experimental, houve uma diminuição do valor de

F_v/F_m para as amostras tratadas com 0 e 0,1 mM de NO_3^- , após 7 dias experimentais em comparação com os dados do início do experimento. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as amostras expostas à PA e aquelas expostas à PAB, mesmo que os valores absolutos médios tenham sido de 0,32 e 0,16 respectivamente, para as algas tratadas com 0 mM e 0,41 e 0,24, respectivamente, para as amostras que receberam 0,1 mM de NO_3^- , após 7 dias de experimento. Para as amostras tratadas com suprimento total de NO_3^- , os valores de F_v/F_m não se alteraram com relação àqueles observados no início do experimento, em torno de 0,5 a 0,6 (Figura 3.43).

Figura 3.43: Rendimento quântico ótimo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- , expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

O aparato fotossintetizante também foi avaliado por meio de alguns parâmetros, os quais sofreram influência significativa da concentração de NO_3^- e de sua interação

com o tempo. O tempo e o tipo de radiação também influenciaram o resultado de ETR_{max} e os valores de α , enquanto que a interação entre esses fatores somente interferiu na variação da eficiência fotossintetizante. Os valores de NPQ por sua vez foram alterados de forma similar por influência do tempo, concentração de N e o tipo de radiação (Tabela 3.13).

As curvas de taxa de transporte de elétrons no início do experimento apresentaram-se com aspecto similar, independentemente do tratamento recebido. Ao longo do tempo, as curvas das amostras tratadas com 0 mM de NO_3^- se distinguiram das demais, e após 7 dias, três padrões de curvas puderam ser observados, diretamente relacionados ao tratamento de NO_3^- ao qual as algas foram submetidas (Figura 3.44). Os dados desses gráficos refletem-se nos parâmetros fotossintetizantes calculados e apresentados na Tabela 3.16. Em amostras que receberam suprimento de 0,5 mM de NO_3^- , o valor de α (também representante da eficiência fotossintetizante) permaneceu ao redor de 0,05 para as amostras independentemente do tempo ou do tratamento de radiação recebido. Os maiores valores de ETR_{max} também foram reportados para essas amostras, variando de 4,7 a 6,2 $\mu\text{mol de elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo todos estatisticamente similares. Entretanto, quando as amostras foram tratadas com menores concentrações de NO_3^- , o valor de ETR_{max} e α após 7 dias foram menores do que aqueles registrados para o início do experimento (Tabela 3.16). O menor valor médio registrado de ETR_{max} foi de $2,85 \pm 0,14 \mu\text{mol de elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para amostras tratadas com PAB e 0 mM de NO_3^- , porém estatisticamente similar aos de amostras tratadas com PA e também aquelas submetidas a 0,1 mM de NO_3^- . Quanto aos valores de irradiância de saturação, os resultados mostram que as amostras submetidas a situações de estresse nutricional (baixo suprimento de NO_3^-) apresentaram valores absolutos maiores, entre 143 e 205,2 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ao passo que aquelas amostras supridas com NO_3^- tiveram a saturação da fotossíntese atingida já em valores absolutos menores de irradiância. Entretanto, esses valores foram estatisticamente semelhantes entre si, apenas uma tendência pôde ser detectada (ver coluna de I_k , na Tabela 3.16).

Figura 3.44: Curvas de fotossíntese de *Gracilaria tenuistipitata*, com os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) para distintas irradiâncias. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras cultivadas em 0, 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^- , e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados ajustados a partir de três réplicas de séries de dados.

Tabela 3.16: Parâmetros fotossintetizantes (α , eficiência fotossintetizante; ETR_{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; I_k , irradiância de saturação da fotossíntese; e NPQ, dissipação não-fotoquímica) de *Gracilaria tenuistipitata*, obtidos a partir das curvas fotossintetizantes da figura 3.44. As amostras foram cultivadas em 0, 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^- , expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

Tipo de radiação	[NO ₃ ⁻] (mM)	Tempo (dias)	Parâmetros da Fotossíntese			
			α	ETR_{max}	I_k	NPQ
PA	0	0	0,031 ± 0,008 a	5,23 ± 0,52 a	177,56 ± 52,64 ac	0,74 ± 0,17 ac
		3	0,023 ± 0,002 ab	3,93 ± 1,05 ab	170,73 ± 44,30 abc	0,54 ± 0,36 ac
		7	0,016 ± 0,001 b	3,23 ± 0,54 bd	205,15 ± 30,76 a	0,58 ± 0,01 abc
PAB	0	0	0,031 ± 0,005 a	4,99 ± 0,02 a	162,90 ± 30,63 cb	0,71 ± 0,1 ac
		3	0,023 ± 0,004 ab	3,28 ± 0,36 b	143,40 ± 20,96 b	0,33 ± 0,09 abc
		7	0,015 ± 0,003 b	2,85 ± 0,14 bd	189,56 ± 37,99 b	0 ± 0 bc
PA	0,1	0	0,056 ± 0,003 d	6,59 ± 0,30 a	117,32 ± 4,66 a	0,89 ± 0,16 a
		3	0,049 ± 0,003 cd	5,18 ± 0,47 abc	106,18 ± 10,74 a	1,01 ± 0,11 a
		7	0,036 ± 0,007 c	3,80 ± 0,45 cde	106,87 ± 9,98 ab	0,63 ± 0,14 ac
PAB	0,1	0	0,048 ± 0,005 cd	6,01 ± 0,40 ab	124,48 ± 4,61 ab	0,92 ± 0,03 a
		3	0,043 ± 0,003 cde	4,73 ± 0,09 bc	110,22 ± 4,92 ab	0,66 ± 0,04 ac
		7	0,024 ± 0,001 b	3,11 ± 0,49 d	128,06 ± 25,45 b	0,21 ± 0,02 bc
PA	0,5	0	0,047 ± 0,002 de	5,29 ± 1,16 a	113,08 ± 21,27 a	1,06 ± 0,4 a
		3	0,050 ± 0,003 d	6,25 ± 0,27 a	124,24 ± 8,80 a	0,91 ± 0,1 a
		7	0,051 ± 0,009 de	5,59 ± 0,33 ae	110,69 ± 13,50 a	0,89 ± 0,18 a
PAB	0,5	0	0,050 ± 0,005 de	5,15 ± 1,04 a	103,81 ± 18,50 ab	0,93 ± 0,16 a
		3	0,037 ± 0,009 e	4,70 ± 0,44 ab	131,97 ± 30,79 ab	0,56 ± 0,11 abc
		7	0,051 ± 0,010 de	5,13 ± 0,59 a	103,15 ± 14,43 ab	0,76 ± 0,26 ac

As curvas de dissipação não fotoquímica (NPQ) de *G. tenuistipitata* após o experimento com PA e PAB apresentaram variação de perfil ao longo do tempo. No início do experimento, todas as curvas foram similares, conforme aumentou a irradiância. Após três dias experimentais, não foi possível diferenciar um padrão de resposta relacionado a cada um dos distintos tratamentos combinados entre radiação e suprimentos de NO_3^- . Porém, após sete dias, enquanto que as curvas de algas tratadas com PA em quaisquer concentrações de NO_3^- apresentaram perfil similar, aquelas submetidas à PAB e algum tipo de déficit de NO_3^- foram bastante diferenciadas em relação às algas submetidas à PAB e 0,5 mM de NO_3^- . Com o aumento da irradiância, os valores de NPQ não aumentaram, indicando que o aparato fotossintetizante dessas amostras pode estar alterado pela carência de N e pelo tratamento com radiação incluindo radiação UVB (Figura 3.45). Na Tabela 3.16, são apresentados os dados de NPQ na irradiância mais elevada ($676 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), e se pode detectar que houve uma redução significativa nos valores desse parâmetro quando as algas receberam PAB após 7 dias, em tratamento com déficit de NO_3^- .

Figura 3.45: Curva de dissipação não fotoquímica (NPQ) x Irradiância de *Gracilaria tenuistipitata*. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras cultivadas em 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados ajustados a partir de três séries de dados.

Conforme observado no primeiro experimento, foram encontrados quatro diferentes tipos de carotenoides em *G. tenuistipitata*: anteraxantina, zeaxantina, luteína

e β -caroteno. Os fatores que apresentaram efeitos significativos sobre o conteúdo dos carotenoides de *G. tenuistipitata* foram o tempo e a concentração de NO_3^- . A radiação foi responsável por parte da variação somente do total de luteína, enquanto que apenas o conteúdo de zeaxantina não foi alterado por causa da interação entre tempo e concentração de NO_3^- (Tabela 3.13). O carotenoide predominante foi zeaxantina, seguido de luteína e anteraxantina, sendo o β -caroteno minoritário (Figuras 3.46 a 3.49). Ainda que efeitos significativos tenham sido detectados causados pelos fatores tempo e concentração de NO_3^- , apenas no caso de β -caroteno foi possível detectar um padrão constante de variação nas concentrações desse carotenoide, sendo encontradas menores quantidades em amostras tratadas com menores concentrações de NO_3^- após 3 ou 7 dias de experimento (Figura 3.49). Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos de exposição à PA ou à PAB, quando os dados comparados eram aqueles nos mesmos tempos e concentrações de NO_3^- (Figuras 3.46 a 3.49).

Considerando o total de anteraxantina, uma redução foi observada após 3 dias para algas tratadas com PA ou PAB em relação ao total inicial, quando cultivadas em 0 mM de NO_3^- . Entretanto, após 7 dias, a quantidade desse pigmento foi similar aos valores no início do experimento, e também similar às quantidades encontradas nos cultivos com adição de NO_3^- . Para as algas submetidas a 0,1 mM de NO_3^- , esse padrão foi observado também, porém somente para aquelas tratadas com PA, comparando-se as amostras do início e de 3 dias de cultivo. Para todas as demais comparações possíveis nessa concentração de NO_3^- , os totais de anteraxantina foram similares. Esse mesmo tipo de observação pode ser feita com relação ao material tratado com 0,5 mM de NO_3^- (Figura 3.46).

Figura 3.46: Conteúdo de anteraxantina em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Figura 3.47: Conteúdo de zeaxantina em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

O conteúdo de zeaxantina atingiu valores ao redor de 0,3 mg por g de massa seca. Esse total foi similar em todos os tratamentos realizados. Somente as amostras expostas à PA, no início do experimento, que foram tratadas com 0 mM de NO_3^- apresentaram quantidade menor de zeaxantina do que aquelas ao início e em 3 dias de tratamento com 0,1 mM de NO_3^- . Entretanto, essa diferença foi pontual, uma vez que ao final do experimento, o total de zeaxantina com valores entre 0,25 e 0,34 mg por g de massa seca de alga foi similar nos tratamentos realizados (Figura 3.47).

O total de luteína das amostras de *G. tenuistipitata* variou entre 0,009 e 0,026 mg por g de massa seca. O valor mais alto foi reportado para a amostra inicial para o tratamento com PA e 0 mM de NO_3^- , enquanto que o valor mais baixo foi relatado para o inicial de PAB e 0,5 mM de NO_3^- . Entretanto, apenas o primeiro valor foi maior que os demais, enquanto que todos os outros dados de luteína, incluindo este valor menor, independentemente do tempo e do suprimento de nitrato ou tratamento com radiações distintas foram similares estatisticamente. Uma redução com respeito aos dados iniciais, após 7 dias de cultivo, foi verificada para as amostras não supridas com NO_3^- (Figura 3.48).

Por fim, o quarto carotenoide encontrado em *G. tenuistipitata* respondeu de maneira mais evidente aos distintos tratamentos com suprimentos variados de NO_3^- . As amostras tratadas com déficit de NO_3^- (0 e 0,1 mM) apresentaram redução do conteúdo de β -caroteno após 3 dias, atingindo total médio de 0,002 a 0,003 mg de β -caroteno por g de massa seca. Esses dados se mantiveram menores do que os dados iniciais ainda após 7 dias, independentemente do tratamento de radiação que as algas tenham recebido. Não houve diferenças entre amostras tratadas com PA com aquelas que

receberam PAB, considerando o mesmo instante de tempo e o mesmo tratamento de suprimento de NO_3^- (Figura 3.49).

Figura 3.48: Conteúdo de luteína em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Figura 3.49: Conteúdo de β-caroteno em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e diferentes concentrações de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A resposta da totalidade dos MAAs variou com os fatores tempo, radiação e concentração de NO_3^- , e também com as interações duplas do tempo com o tipo de radiação e com a concentração de NO_3^- (Tabela 3.13). Esses fatores influenciaram de uma forma equilibrada sobre o conteúdo desses compostos de fotoproteção. A radiação e o tempo, além a interação entre tempo e concentração de NO_3^- foram responsáveis por mais de 75% das variações (Tabela 3.13). Os tratamentos com as menores concentrações de NO_3^- resultaram numa tendência de que as amostras expostas à PAB apresentassem maiores quantidades de MAAs do que aquelas submetidas à PA. No tratamento de 0,5 mM de NO_3^- , isso foi estatisticamente distinguido. Um aumento da quantidade tanto nas amostras que foram expostas à PA quanto naquelas sujeitas à PAB foi detectado, e este aumento já foi verificado tanto após 3 dias de experimento e

continuou progressivamente até o final do experimento, quando o total de MAAs de amostras submetidas à PAB foi maior do que aquele observado para as algas tratadas com PA. O máximo de MAAs observado foi de 3,4 mg de MAAs por g de massa seca de alga, o que representou um aumento de 5 vezes em relação ao conteúdo inicial das algas expostas a este tratamento. Para as amostras submetidas à PA, também foi detectado um aumento, porém menor, de 4,6 vezes do total de MAAs após 7 dias, em relação ao valor inicial medido nessas amostras (Figura 3.50). Vale ressaltar que o total de MAAs seguiu um padrão de resposta semelhante ao que foi observado para o MAA majoritário, isto é, porphyrin-334 (Figura 3.51).

Figura 3.50: Total de aminoácidos tipo microsporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em três diferentes concentrações de NO_3^- e expostas às radiações de PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

Cinco diferentes aminoácidos tipo micosporina (MAAs) foram identificados em *G. tenuistipitata* após este experimento: porphyra-334 (P-334), palitina, asterina, shinorina e palitinol. Considerando a análise de cada MAA separadamente, pode-se notar que os diferentes tipos responderam de maneira distinta aos tratamentos realizados, com as suas concentrações variando de acordo com distintos fatores.

A radiação foi significativa para o total de todos os cinco tipos de MAAs, sendo responsável por mais de 25% da variação do conteúdo de palitina e palitinol, enquanto que o tempo afetou significativamente o total de P-334, asterina, palitina e palitinol. No caso dos três últimos, esse fator influenciou em mais de 46% na ocorrência de variações. Já a concentração de NO_3^- teve influência significativa na variação de P-334 e palitina. A dupla interação do tempo com a concentração de NO_3^- foi significativa para a variação de todos os MAAs, exceto palitinol. Esse último MAA, ao lado de shinorina e P-334 também foi influenciado pela interação entre o tipo de radiação e o tempo (Tabela 3.13).

No caso de shinorina, foi verificada uma tendência, na qual os valores encontrados para algas expostas a PAB eram maiores do que aquelas submetidas à PA, para as três concentrações de NO_3^- . Um aumento do conteúdo desse MAA foi verificado apenas para algas submetidas à PAB e 0,5 mM, após 7 dias de experimento, saindo de 0,03 para 0,19 mg por g de massa seca de alga. Para amostras submetidas a menores concentrações de NO_3^- , o total de shinorina não variou significativamente, na comparação dos tratamentos ao longo do tempo e entre os distintos tipos de radiação fornecida. Uma análise detalhada mostra que nenhuma das outras MAAs (P-334, asterina, palitina e palitinol) teve um aumento de quantidade ao longo do tempo quando as algas foram cultivadas sob 0 mM de NO_3^- . Entretanto, o palitinol, que não tinha sido detectado para as amostras iniciais que foram submetidas à PA nesse tratamento com NO_3^- , passou a ser detectado já após três dias, ainda que em quantidades pequenas (até no máximo 0,05 mg de palitinol por g de massa seca de alga). Além disso, nessas algas cultivadas sem adição de NO_3^- , foi detectada uma tendência de aumento para o conteúdo de palitina, ainda que não significativa (Figura 3.51).

Quando o material foi cultivado em 0,1 mM de NO_3^- , a mesma situação de aumento nas quantidades de MAAs foi detectada nas amostras submetidas à PAB, em comparação àquelas expostas à PA. Porém, para o caso de palitina, isso se mostrou efetivamente uma diferença entre os dois tratamentos, já após três dias de cultivo e mantida após 7 dias. Cerca de 0,5 mg de palitina por g de massa seca de amostra foram detectados nesses tratamentos.

Para amostras cultivadas em 0,5 mM de NO_3^- , um aumento ao longo do tempo foi verificado para o total de palitina e asterina já após 3 dias e se manteve maior do que o inicial após 7 dias de experimento. Entretanto, os valores obtidos para amostras tratadas com PA foram mais similares entre si do que aqueles das algas expostas à PAB. No caso de palitinol, esse aumento ao longo do tempo somente foi detectado em amostras tratadas com PAB, mas mesmo assim, os totais eram similares aos das algas sujeitas à PA. Por fim, o MAA majoritário (P-334) foi aquele com um padrão de resposta mais evidente: as algas expostas à PAB apresentaram maior quantidade deste MAA já após 3 dias quando comparadas àquelas expostas à PA. Essa diferença se manteve após 7 dias, porém um aumento na quantidade dessa substância foi detectada tanto para as algas tratadas com PA quanto aquelas submetidas à PAB. Um total de 2,5 mg de P-334 foram detectados nessas algas sujeitas a essa segunda radiação, o que corresponde a um aumento de mais de 5 vezes em comparação com o total de P-334 apresentado pelas algas ao início do período experimental, antes de serem expostas à radiação PAB (Figura 3.51).

Gracilaria tenuistipitata apresentou diferente abundância de MAAs, de acordo com esta ordem desde o mais abundante até o menos representativo quantitativamente: porphyrina-334, palitina, asterina, shinorina e palitinol. Inclusive, algumas amostras não chegaram a apresentar palitinol, enquanto que outras apresentaram mais de 70% do seu total de MAAs como sendo do tipo porphyrina-334, sendo este o aminoácido tipo micosporina majoritário em quaisquer tratamentos realizados, mesmo aqueles nos quais não houve estímulo à síntese desses compostos (Figura 3.52). Alterações nas proporções relativas de MAAs foram verificadas em algas tratadas com menores concentrações de NO_3^- . O percentual de shinorina e P-334 apresentou uma tendência a diminuir com relação ao total, ao passo que a palitina, asterina e palitinol passaram a ser mais representativos nessas amostras, comparando-se tratamentos no início, após 3 ou 7 dias de experimento. Este resultado foi verificado independentemente do tipo de radiação ao qual a alga foi exposta. Para as amostras cultivadas em 0,5 mM de NO_3^- , as proporções relativas de cada tipo de MAA com relação ao total foram similares, comparando-se os tratamentos ao longo do tempo, tanto as algas expostas à PA quanto aquelas submetidas à PAB (Figura 3.52).

Figura 3.51: Quantidade (em mg por g de massa seca de alga) dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata* [shinorina, porphyr-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol] no início e após 3 ou 7 dias de tratamento com diferentes concentrações de NO₃⁻ e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos distintos. N=3.

Figura 3.52: Proporção dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias do período experimental de cultivo em três concentrações de NO_3^- , e expostas à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os dados são representados com respeito ao total de 100% identificado em cada tratamento. N=3.

Os dados do experimento de dano e recuperação do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* indicam que todos os tratamentos apresentaram redução do rendimento quântico efetivo até um determinado valor mínimo, ao longo dos 30 minutos de exposição à intensidade de radiação PAB mais alta, independentemente do tratamento preliminar e tampouco do valor inicial obtido na curva (representando o rendimento quântico ótimo ao final do experimento anterior). Entretanto, o valor médio de rendimento desse valor mínimo não foi menor do que 0,14 em nenhum dos tratamentos. As algas pré-cultivadas em PA apresentaram perfis de curvas de danos e recuperação similares, independentemente da concentração de NO_3^- utilizada no experimento. Entretanto, analisando a porcentagem de recuperação do rendimento quântico efetivo, após 120 min de recuperação, as amostras que eram provenientes de tratamentos com PA ou PAB e ausência de N apresentaram um percentual de 123,15% e 131,7%, respectivamente, com relação ao valor inicial de antes do período de exposição. No caso das amostras tratadas com PA e supridas com 0,1 ou 0,5 mM de NO_3^- , o rendimento quântico após a recuperação correspondeu a cerca de 86% do valor inicial. Já no caso de amostras pré-tratadas com PAB, e já aclimatadas à essa radiação, o rendimento quântico efetivo ao final da recuperação sob PAR foi correspondente a 98 e 99% do inicial para

amostras submetidas a 0,1 e 0,5 mM NO_3^- . Consequentemente, as algas que tinham rendimento quântico inicial baixo se recuperaram até valores similares aos encontrados no início, ou atingiram rendimentos maiores do que os iniciais (Figura 3.53).

Figura 3.53: Dano e recuperação do aparato fotossintetizante de *Gracilaria tenuistipitata*, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, durante a exposição à PAR+UVA+UVB por 30 min, e recuperação em 60 $\mu\text{mol s}^{-1}$ de PAR por 2 h após o período experimental de uma semana, na qual as algas foram tratadas com diferentes radiações (PA ou PAB) e concentrações de NO_3^- (0, 0,1 ou 0,5 mM). As barras representam desvio padrão. Cada curva representa valores médios de três repetições.

Os tratamentos realizados apresentaram efeito significativo muito baixo sobre o reparo das amostras ($F=3,11$, $p=0,042$). Entretanto, não foram observadas diferenças nas comparações possíveis entre os tratamentos. Essa recuperação foi similar entre as amostras, e a taxa de dano foi influenciada significativamente pelos tratamentos ($F=9,32$, $p=0$). Isso ocorreu porque houve um valor de taxa de dano maior nas amostras tratadas com PAB e 0,1 mM de NO_3^- comparadas com aquelas sem suprimento de

nitrato, ou com aquelas que receberam a mesma quantidade de NO_3^- , mas foram expostas à PA. Outro exemplo consistiu em amostras submetidas à PA e 0,5 mM de NO_3^- , que apresentaram maior taxa de dano do que aquelas tratadas com menos NO_3^- (Figura 3.54).

Figura 3.54: Dano e recuperação durante o período de exposição de *Gracilaria tenuistipitata* a 30 min de PAR+UVA+UVB durante o experimento de exposição e recuperação do aparato fotossintetizante, estimado por meio do rendimento quântico efetivo, após experimento de cultivo das algas em diferentes concentrações de NO_3^- e distintas radiações (PA ou PAB). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão indicam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.

A quantidade de DNA extraído de *G. tenuistipitata* foi afetada significativamente somente pelo conteúdo de NO_3^- (responsável por mais de 86% da variação obtida) e a sua interação com o tempo (Tabela 3.13). As algas expostas a déficit de NO_3^- (0 mM), apresentaram menores quantidades de DNA do que aquelas tratadas com algum suprimento de NO_3^- , tanto após 3 quanto após 7 dias de experimento. Não foram detectadas diferenças significativas entre tratamentos compostos por diferentes tipos de radiação (comparando PA x PAB) (Figura 3.55). A análise imunológica com os anticorpos resultou em ausência de ocorrência de danos no DNA das algas quando submetidas a essas três diferentes concentrações de NO_3^- e tratadas com essas intensidades e doses de PA e PAB. A marcação pela fluorescência do ECL não detectou a ocorrência de formação de nenhuma banda nos tratamentos realizados.

Figura 3.55: Quantidade de DNA extraído de *Gracilaria tenuistipitata*, com amostras obtidas no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes concentrações de NO_3^- e exposição à PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão nos gráficos representam as diferenças significativas entre os tratamentos realizados. N=3.

O total de RNA extraído nas diferentes amostras de *G. tenuistipitata* tratadas com diferentes concentrações de NO_3^- e distintas radiações foi similar em todas as comparações possíveis entre as amostras, ainda que efeitos significativos dos fatores tempo e concentração de NO_3^- , bem como da interação entre eles, tenham sido detectados, sendo essa influência bem dividida entre os dois fatores e sua interação (Tabela 3.13). A única amostra com quantidade maior de RNA foi aquela na qual as algas foram expostas à PAB e cultivadas em 0,5 mM de NO_3^- , atingindo valores de 266 ng por µL de amostra. Os valores de rendimento das extrações apontaram valores

médios entre 138,05 e 220,6 ng de RNA por μL de amostra. Outro aspecto a ser ressaltado é a pureza das extrações, evidenciada pelos valores obtidos na proporção de 260/280, com todos os valores próximos de 2,0 (Tabela 3.17).

Tabela 3.17: Quantidade de RNA total obtido a partir de amostras de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias em cultivo sob diferentes concentrações de NO_3^- (0, 0,1 ou 0,5 mM) e expostas à radiação PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores de RNA representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

Radiação (tipo)	$[\text{NO}_3^-]$ (mM)	Tempo (dias)	RNA (ng/ μL)	260/280	260/230
Inicial		0	201,64 $\pm$ 45,25 ab	2,05	1,24
PA	0	3	213,14 $\pm$ 27,13 ab	1,98	1,13
PAB			174,56 $\pm$ 62,61 a	2,05	1,07
PA	0	7	154,36 $\pm$ 14,03 a	1,89	0,78
PAB			170,03 $\pm$ 32,84 ab	2,03	0,92
PA	0,1	3	138,16 $\pm$ 27,91 a	2,03	1,26
PAB			150,26 $\pm$ 22,39 a	2,01	1,25
PA	0,1	7	150,44 $\pm$ 27,25 a	1,87	0,88
PAB			138,05 $\pm$ 18,85 a	2,17	0,75
PA	0,5	3	220,63 $\pm$ 40,06 ab	2,07	1,43
PAB			181,25 $\pm$ 44,64 ab	2,10	1,35
PA	0,5	7	201,60 $\pm$ 39,18 ab	2,08	1,50
PAB			266,86 $\pm$ 83,40 b	2,10	1,42

A análise da expressão gênica da fotoliase-32 foi realizada por uma ANOVA unifatorial, considerando os fatores concentração de nitrato e tipo de radiação combinados, sendo feita uma análise para cada tempo, ambas com relação ao fator de calibração, isto é, a taxa de expressão gênica das amostras no início do experimento, para o tempo zero. Dessa forma, o fator analisado foi designado como “tratamento”, e teve efeito significativo sobre as taxas de expressão gênica relativas da fotoliase-32 em ambos os tempos analisados. Para 3 dias de experimento, os valores decorrentes da ANOVA unifatorial foram $F=7,14$ e $p=0,001$. Para 7 dias, o efeito significativo foi demonstrado pelo valor de $F=3,99$ e $p=0,012$.

Apesar dos efeitos significativos dos tratamentos, em nenhum dos tempos analisados houve diferenças significativas da expressão gênica da fotoliase-32 em comparação com a taxa observada na amostra calibradora (antes de receber quaisquer tratamentos de nitrato e radiação UV). A única diferença observada aos 3 dias de experimento foi vista comparando-se as taxas de expressão dessa fotoliase, que, após tratada com 0 mM de NO_3^- em qualquer uma das radiações utilizadas (PA e PAB), foram maiores do que aquelas observadas em amostras submetidas a tratamentos de suprimento de NO_3^- . Já com 7 dias experimentais, outra vez todas as amostras

apresentaram taxas de expressão da fotoliase-32 similares ao controle calibrador. Comparando as amostras entre si, as algas tratadas com PAB e sem adição de NO_3^- apresentaram maiores taxas de expressão dessa fotoliase do que aquelas supridas com NO_3^- na mesma radiação (Figura 3.56).

Figura 3.56: Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase-32 em relação ao total de expressão reportado no início do experimento (■, nível de expressão do calibrador) de *Gracilaria tenuistipitata* após 3 ou 7 dias de cultivo sob exposição à PAR+UVA (PA, ■) ou PAR+UVA+UVB (PAB, □), para amostras submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=3.

Gracilaria tenuistipitata apresentou taxas de crescimento (TCs) influenciadas pela disponibilidade de NO_3^- na água do mar ($F=9,215$, $p=0,002$) e pelo tempo ($F=50,205$, $p=0$), além do efeito verificado pela interação entre os dois fatores ($F=13,131$, $p=0$). O fator radiação ($F=2,712$) e a interação deste com as demais variáveis independentes analisadas (radiação x disponibilidade de NO_3^- , $F=0,555$; radiação x tempo, $F=3,49$ e a tripla interação entre os fatores analisados, $F=0,862$) não apresentaram efeitos significativos (todos valores de $p>0,05$) sobre o crescimento de *G. tenuistipitata*.

Esses resultados da análise de variância refletiram-se nas comparações entre os tratamentos. Não foi observada nenhuma diferença entre as TCs de algas expostas à PA comparadas com aquelas cultivadas em PAB, considerando-se as comparações feitas entre os mesmos tempos e concentrações de NO_3^- . Entretanto, considerando amostras supridas com menos NO_3^- (0 e 0,1 mM), entre o terceiro e o sétimo dia, as TCs foram menores do que aquelas observadas do início até o terceiro dia. No segundo período analisado, as TCs foram menores em amostras submetidas a 0 mM de NO_3^- em comparação com aquelas que receberam suprimento de 0,5 mM. Entretanto, as algas sujeitas a 0,5 mM de NO_3^- não tiveram seu crescimento diminuído no segundo período em comparação ao primeiro (do início até o terceiro dia do período experimental) (Figura 3.57).

Figura 3.57: Taxas de crescimento (TCs, em % de massa fresca por dia, %MF.dia⁻¹) de *Gracilaria tenuistipitata* exposta à radiação PA e PAB e cultivadas em diferentes concentrações de NO_3^- em dois períodos, do início até 3 dias e entre o terceiro dia e o sétimo dia. Diferentes letras sobre as barras implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os dados de correlação de Pearson para as variáveis dependentes analisadas neste segundo experimento são mostrados na Tabela 3.18. A relação C:N foi negativamente correlacionado com muitas variáveis, incluindo todos parâmetros da fotossíntese, quase todos pigmentos analisados (principais e acessórios), exceto o total de zeaxantina e luteína. Além disso, a C:N foi negativamente correlacionada com dois dos MAAs: shinorina e P-334. Alguns fatores foram positivamente correlacionados entre si: o total de N, o conteúdo de PE, PC e Cla, e as proporções de pigmentos, além dos três parâmetros da fotossíntese e de anteraxantina e β -caroteno. A quantidade de zeaxantina foi positivamente correlacionada com três dos MAAs (P-334, palitina e palitinol) e o total de MAAs. O conteúdo de MAAs, incluindo os cinco diferentes tipos e o total deles, foram todos correlacionados entre si, com uma exceção: o total de shinorina não esteve correlacionado com palitina, asterina e palitinol (Tabela 3.18).

Tabela 3.18: Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas no experimento 4. Dados em negrito indicam correlação significativa, com $p < 0,05$. $N=52$.

	C	N	C:N	PE	PC	Cl α	PE/Cl α	PC/Cl α	PE/PC	Anterax.	Zeax.	Luteína	β -carot.	α	ETRmax	Fv/Fm	Shinor.	P-334	Palitina	Asterina	Palitinol	MAAs
Biomassa	-0,06	-0,31	0,29	-0,26	-0,38	-0,52	-0,06	-0,04	-0,14	-0,09	0,35	-0,28	-0,29	-0,03	-0,22	-0,22	0,04	0,34	0,54	0,68	0,46	0,41
C		0,14	0,18	-0,21	-0,23	-0,22	-0,15	-0,14	-0,09	-0,22	0,07	-0,01	-0,13	-0,20	-0,23	-0,27	0,07	0,07	0,21	0,01	0,20	0,10
N			-0,84	0,73	0,72	0,65	0,62	0,47	0,64	0,51	0,20	-0,11	0,51	0,61	0,70	0,59	0,68	0,50	-0,08	-0,15	0,01	0,42
C:N				-0,87	-0,85	-0,77	-0,78	-0,59	-0,79	-0,57	-0,18	0,09	-0,60	-0,72	-0,79	-0,79	-0,50	-0,49	0,14	0,05	-0,01	-0,40
PE					0,95	0,73	0,92	0,75	0,88	0,59	0,07	-0,02	0,67	0,75	0,84	0,85	0,34	0,26	-0,32	-0,15	-0,22	0,16
PC						0,77	0,83	0,77	0,73	0,52	0,09	-0,07	0,60	0,76	0,83	0,83	0,30	0,16	-0,34	-0,27	-0,26	0,06
Cl α							0,44	0,20	0,58	0,45	0,08	0,06	0,52	0,49	0,61	0,64	0,30	0,14	-0,41	-0,26	-0,30	0,04
PE/Cl α								0,88	0,90	0,51	0,05	-0,06	0,59	0,74	0,78	0,83	0,31	0,29	-0,21	-0,03	-0,11	0,21
PC/Cl α									0,63	0,35	0,07	-0,14	0,41	0,69	0,67	0,68	0,19	0,14	-0,11	-0,10	-0,07	0,09
PE/PC										0,49	0,02	0,09	0,60	0,62	0,71	0,81	0,35	0,33	-0,30	0,00	-0,15	0,23
Anteraxantina											0,04	0,02	0,82	0,40	0,57	0,49	0,35	0,38	-0,06	0,10	-0,12	0,32
Zeaxantina												-0,01	-0,31	0,12	-0,04	-0,07	0,24	0,42	0,37	0,30	0,40	0,44
Luteína													-0,02	-0,38	-0,10	-0,06	0,06	-0,17	-0,16	-0,14	-0,24	-0,17
β -caroteno														0,51	0,66	0,63	0,28	0,22	-0,24	-0,02	-0,25	0,14
α															0,80	0,81	0,35	0,31	-0,08	0,00	0,00	0,26
ETRmax																0,87	0,39	0,22	-0,27	-0,19	-0,22	0,14
Fv/Fm																	0,26	0,13	-0,36	-0,16	-0,28	0,04
Shinorina																		0,70	0,37	0,20	0,30	0,71
P-334																			0,55	0,54	0,63	0,98
Palitina																				0,65	0,76	0,69
Asterina																					0,58	0,63
Palitinol																						0,71

3.5. Experimento 5 – Aclimação de *G. tenuistipitata* a diferentes tipos de radiação: efeitos na fotossíntese, crescimento e nos mecanismos de fotoproteção

Esta parte do trabalho pode ser dividida em dois blocos: o primeiro contendo a aclimação de *G. tenuistipitata* às diferentes radiações, e o segundo com as respostas em curto prazo das algas à alteração de tratamento de tipo de radiação (Figura 3.58). O desenho experimental está detalhado no item 2.7.5.

Figura 3.58: Esquema do experimento 5, no qual *Gracilaria tenuistipitata* foi cultivada uma semana em três distintas radiações (primeira parte do experimento), e em seguida foi submetida a dois dias de novos tratamentos (segunda parte do experimento). As legendas desta figura estão representadas na Figura 3.5 (página 130).

3.5.1. Aclimação de *G. tenuistipitata* a diferentes qualidades de radiação

Pretendeu-se nesta parte do trabalho observar os efeitos da radiação UV nos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata*, separando-se a radiação entre PAR, PAR+UVA e PAR+UVA+UVB, utilizando-se a concentração de 0,5 mM de NO_3^- . Os efeitos desses três tipos de radiação nas variáveis internas (incluindo pigmentos fotossintetizantes e conteúdo de C e N), bem como na fotossíntese e nos mecanismos de fotoproteção foram analisados. Além disso, esta parte teve como objetivo prover amostras para o experimento seguinte, que alterou o tipo de radiação em algas aclimatadas à PAR, PA ou PAB. Os dados resultantes da ANOVA multifatorial com medidas repetidas estão presentes na Tabela 3.19, com os efeitos significativos dos fatores tempo e tipo de radiação sobre as variáveis dependentes medidas em *G. tenuistipitata*, incluindo a porcentagem de contribuição de cada um desses fatores isoladamente e em interação para a variabilidade dos parâmetros medidos.

Considerando os pigmentos fotossintetizantes, poucos efeitos significativos foram verificados na ANOVA de medidas repetidas. O tipo de radiação foi responsável por pouco mais do que 36% das variações no conteúdo de PC. O conteúdo dos pigmentos analisados variou com a interação entre tempo e tipo de radiação, considerando-se o total de PC e Cla, a qual foi responsável por mais de 25% das variações encontradas no conteúdo desses dois pigmentos (Tabela 3.19). O conteúdo de PE das amostras de *G. tenuistipitata* cultivadas em diferentes radiações não variou. Em média, considerando todos os tratamentos, *G. tenuistipitata* conteve $7,51 \pm 1,27$ mg de PE por g de massa seca. Para PC, foi observado que, em radiação PAB, o total desse pigmento foi menor do que aquele observado para algas tratadas em PAR, mas similar àquelas submetidas à PA, seja após 3 ou 7 dias de experimento. As demais diferenças observadas no conteúdo pigmentar de *G. tenuistipitata* foram pontuais (Figura 3.59). No caso do total de Cla, foi verificada uma redução do total desse pigmento para as amostras tratadas com PA, comparando as algas submetidas a 3 e 7 dias com aquelas do início do experimento. As demais comparações contemplando amostras submetidas a diferentes radiações no mesmo intervalo de tempo não resultaram em diferenças entre o total de Cla presente no talo dessas algas (Figura 3.59).

Tabela 3.19: Resultados da análise multifatorial ANOVA com medidas repetidas para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados e interações entre duas variáveis independentes. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em 0,5 mM de NO₃⁻ e expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os efeitos significativos dos fatores são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito; gl, graus de liberdade. Para cada variável, foi calculada também a porcentagem de contribuição para as variações nos resultados (% Var). Os valores de % de influência na variabilidade que foram maiores do que 25% estão sublinhados. Para as abreviaturas das variáveis, ver páginas 5 a 7.

Fonte de variação		Radiação (A)			Tempo (B)			A x B		
gl		2			2			4		
Variável	<i>F</i>	% Var	p	<i>F</i>	% Var	p	<i>F</i>	% Var.	p	
C	2,42	65,09	0,14	0,79	21,24	0,47	0,25	6,84	0,90	
N	1,22	36,95	0,34	0,48	14,67	0,00	0,80	24,19	0,54	
C/N	0,13	0,47	0,88	23,53	85,38	0,00	1,95	7,08	0,15	
PE	3,22	28,88	0,09	3,18	28,58	0,07	2,37	21,27	0,09	
PC	4,78	36,34	0,04	0,38	2,86	0,69	4,00	30,40	0,02	
Cla	2,68	9,23	0,12	1,67	5,74	0,22	12,34	42,51	0,00	
PE/Cla	1,05	6,78	0,39	6,45	41,72	0,01	3,98	25,75	0,02	
PC/Cla	1,62	14,03	0,25	2,39	20,75	0,12	3,76	32,61	0,02	
PE/PC	0,02	0,18	0,98	7,71	64,83	0,00	2,08	17,50	0,13	
F _v /F _m	33,72	69,54	0,00	4,71	9,71	0,02	5,03	10,37	0,01	
ETR _{max}	11,59	76,17	0,00	0,51	3,38	0,61	1,56	10,23	0,23	
α	6,66	54,68	0,02	2,49	20,43	0,11	1,52	12,44	0,24	
I _k	0,20	2,94	0,82	5,52	81,47	0,01	0,53	7,79	0,72	
NPQ	4,74	49,01	0,04	2,70	27,97	0,09	1,11	11,51	0,38	
Anteraxantina	6,92	59,38	0,02	4,02	34,49	0,04	0,36	3,06	0,84	
Zeaxantina	4,16	30,34	0,05	7,74	56,52	0,00	0,90	6,57	0,48	
β-caroteno	6,22	48,84	0,02	3,81	29,94	0,04	1,35	10,61	0,29	
Luteína	0,30	14,72	0,75	1,26	61,92	0,31	0,24	11,68	0,91	
Shinorina	22,14	13,72	0,00	66,42	41,17	0,00	36,39	22,56	0,00	
P-334	54,65	23,26	0,00	96,59	41,10	0,00	41,87	17,82	0,00	
Asterina	3,89	7,23	0,06	23,38	43,45	0,00	13,27	24,66	0,00	
Palitina	3,64	6,16	0,07	22,51	38,03	0,00	16,51	27,90	0,00	
Palitinol	7,07	18,70	0,01	5,30	14,01	0,02	12,72	33,65	0,00	
MAAs	61,00	18,85	0,00	133,43	41,23	0,00	64,62	19,96	0,00	
DNA	0,19	2,06	0,83	6,25	67,66	0,04	1,40	15,14	0,25	
RNA	0,66	6,16	0,54	4,49	41,93	0,03	2,78	25,95	0,06	

Um efeito significativo do fator tempo foi observado para a proporção entre PE/Cla e entre PE e PC. Além disso, a primeira variável também foi influenciada significativamente pela interação do tempo com o tipo de radiação. Somente essa interação causou efeitos significativos na proporção entre PC e Cla (Tabela 3.19). Por meio das proporções entre pigmentos, percebeu-se que PE foi o pigmento majoritário, seguido de PC e posteriormente, Cla, uma vez que as proporções entre PE/Cla apresentaram valores absolutos maiores do que PC/Cla e, em ambos os casos, maiores

do que 1, indicando maior quantidade desses pigmentos do que o total de Cla. Somente variações pontuais foram verificadas para as proporções entre os pigmentos fotossintetizantes. A relação PE/Cla aumentou após 7 dias de tratamento em PA, em comparação com as amostras expostas a essa mesma radiação no início e após 3 dias. Apesar dos efeitos significativos da interação entre radiação e tempo, o teste *a posteriori* indicou que a relação entre PC/Cla foi constante em todos os tratamentos com valores médios entre 1,72 e 2,29. Por fim, a relação PE/PC das amostras tratadas com PA após 7 dias de experimento foi maior do que aquela observada no início. As outras comparações possíveis resultaram em similaridades entre os tratamentos para esta variável (Tabela 3.20).

Figura 3.59: Conteúdo pigmentar (PE, PC, Cla) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início e após 3 ou 7 dias de cultivo em radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB), e submetidas a 0,5 mM de NO₃⁻. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão indicam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Tabela 3.20: Proporções entre diferentes tipos de pigmentos (ficoeritrina, PE; ficocianina, PC; e clorofila *a*, Cla) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias de cultivo em diferentes tipos de radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB), totalizando diferentes doses de radiação, submetidas a 0,5 mM de NO₃⁻. Diferentes letras ao lado de cada valor representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.

Tempo (dias)	Dose de radiação (KJ.m ⁻²)	Radiação	Proporções		
			PE/Cla	PC/Cla	PE/PC
0	0	PAR	3,24 ± 0,79 a	1,82 ± 0,35 a	1,78 ± 0,27 ab
3	2095		4,09 ± 0,33 ab	2,06 ± 0,10 a	1,99 ± 0,19 ab
7	4888		4,18 ± 1,00 ab	2,17 ± 0,37 a	1,90 ± 0,15 ab
0	0	PA	2,83 ± 0,69 a	1,72 ± 0,29 a	1,63 ± 0,19 a
3	3067		3,68 ± 0,54 a	1,93 ± 0,18 a	1,90 ± 0,16 ab
7	7157		4,96 ± 0,75 b	2,29 ± 0,21 a	2,16 ± 0,21 b
0	0	PAB	3,67 ± 0,12 ab	2,05 ± 0,07 a	1,79 ± 0,06 ab
3	3227		3,35 ± 0,13 a	1,74 ± 0,12 a	1,93 ± 0,07 ab
7	7529		3,39 ± 0,90 ab	1,75 ± 0,30 a	1,92 ± 0,28 ab

A única variável independente com algum efeito no conteúdo interno de C ou N de *G. tenuistipitata* foi o tempo. Foi observado efeito significativo desse fator no conteúdo de N e na proporção entre C:N de *G. tenuistipitata*, e somente nesta segunda variável que houve influência de mais de 80% na variação dos totais da proporção entre C e N (Tabela 3.19). Consequentemente, o conteúdo de C de *G. tenuistipitata* foi estatisticamente similar nos diferentes tratamentos, atingindo valores entre 0,37 e 0,42 mg por mg de massa seca. O mesmo pode ser dito para o total de N presente nas amostras tratadas com PAR, PA e PAB: esses valores variaram na amplitude de 0,03 a 0,05 mg por mg de massa seca de alga. Ainda que um efeito significativo do tempo tenha sido detectado sobre o conteúdo de N, após a análise *a posteriori* de Newman-Keuls, todos os dados foram estatisticamente semelhantes. Por fim, considerando a relação entre C:N, os dados foram similares comparando-se os tratamentos com distintas radiações no mesmo intervalo de tempo. Entretanto, após 3 dias, os valores de C:N diminuíram com respeito aos iniciais para os três tratamentos de radiação, com o valor médio mínimo de 7,5 observado nas algas tratadas com PAR. Porém, após 7 dias, os valores dessa proporção eram novamente similares àqueles encontrados no início do experimento (Figura 3.60).

Figura 3.60: Conteúdo e proporção elementar (C e N, C:N) em 1 mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.

Efeitos significativos do tempo e do tipo de radiação, bem como a interação entre ambos, foram observados para os valores de rendimento quântico máximo de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.19). O tipo de radiação foi o fator que acarretou em 69,5% da variação dos valores de F_v/F_m medidos nessa alga. Esse parâmetro foi menor após três dias de experimento, para as algas expostas à PAB, em comparação com aquelas tratadas com PAR ou PA. Essa diferença se manteve após 7 dias. Entretanto, aos 7 dias

de experimento, os dados de F_v/F_m dessas algas já era similar ao observado no início do experimento, considerando os tratamentos com PAB. Não houve variações com relação ao F_v/F_m de algas expostas à PAR ou PA ao longo do tempo (Figura 3.61).

Figura 3.61: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.

Os efeitos significativos do tempo sobre os valores de irradiância de saturação e NPQ medido a $676 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e do tipo de radiação verificados para os parâmetros ETR_{max} e α da fotossíntese (Tabela 3.19) não se evidenciaram nos testes *a posteriori* de Newman-Keuls, considerando as comparações pertinentes entre as amostras. Foi verificada uma redução nos valores de α e ETR_{max} após cultivo de *G. tenuistipitata* por 3 dias em PAB, em comparação com os dados iniciais. Entretanto, já após 7 dias, esses valores voltaram a ser similares aos do início do experimento. Os dados de I_k obtidos com *G. tenuistipitata* submetida às diferentes radiações ao longo do tempo não apresentaram diferenças significativas nas comparações entre os tratamentos, com variação entre $103,1$ e $131,9 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 3.21). Essa similaridade dos parâmetros fotossintetizantes se reflete no padrão de curva obtido para os diferentes tratamentos, os quais também foram semelhantes entre si (Figura 3.62). O mesmo se pode dizer em relação às curvas de dissipação não-fotoquímica (NPQ) de *G. tenuistipitata*. Somente as amostras que receberam PAB após 3 dias tiveram uma curva com perfil distinto das demais. Porém, após 7 dias, as algas que foram tratadas com essa

qualidade de radiação apresentaram curvas de NPQ similares às demais algas, sejam irradiadas com PAR ou PA, ainda que para irradiâncias menores do que 200 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram observados valores menores (em termos absolutos) de NPQ nessas amostras tratadas com PAB (Figura 3.63). As diferenças entre os valores obtidos de NPQ estão reportadas na Tabela 3.21.

Figura 3.62: Curvas de fotossíntese de *Gracilaria tenuistipitata*, com os dados de taxa de transporte de elétrons (ETR) para distintas irradiâncias. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras expostas às radiações PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . As curvas foram ajustadas a partir de três séries de dados.

Tabela 3.21: Parâmetros fotossintetizantes (α , eficiência fotossintetizante; ETR_{max} , taxa de transporte de elétrons máxima; I_k , irradiância de saturação da fotossíntese; e NPQ, dissipação não-fotoquímica) de *Gracilaria tenuistipitata*, obtidos a partir das curvas de fotossíntese da Figura 3.62 e 3.63. As amostras foram expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores, apresentados com seu desvio padrão, representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

Tipo de radiação	Tempo (dias)	Parâmetros da Fotossíntese			
		α	ETR_{max}	I_k	NPQ
PAR	0	0,053 $\pm$ 0,005 a	6,26 $\pm$ 0,45 a	118,20 $\pm$ 10,69 a	0,88 $\pm$ 0,174 ab
	3	0,051 $\pm$ 0,003 a	6,42 $\pm$ 0,19 ab	126,86 $\pm$ 6,97 a	0,789 $\pm$ 0,4 ab
	7	0,056 $\pm$ 0,006 a	5,97 $\pm$ 0,42 ab	108,20 $\pm$ 13,40 a	1,058 $\pm$ 0,162 a
PA	0	0,047 $\pm$ 0,002 a	5,29 $\pm$ 1,16 a	113,08 $\pm$ 21,27 a	1,061 $\pm$ 0,212 a
	3	0,050 $\pm$ 0,003 a	6,25 $\pm$ 0,27 ab	124,24 $\pm$ 8,80 a	0,909 $\pm$ 0,098 ab
	7	0,051 $\pm$ 0,009 ab	5,59 $\pm$ 0,33 ab	110,69 $\pm$ 13,50 a	0,895 $\pm$ 0,115 ab
PAB	0	0,050 $\pm$ 0,005 a	5,15 $\pm$ 1,04 a	103,81 $\pm$ 18,50 a	0,935 $\pm$ 0,09 ab
	3	0,037 $\pm$ 0,009 b	4,70 $\pm$ 0,44 b	131,97 $\pm$ 30,79 a	0,561 $\pm$ 0,178 b
	7	0,051 $\pm$ 0,010 ab	5,13 $\pm$ 0,59 ab	103,15 $\pm$ 14,43 a	0,761 $\pm$ 0,255 ab

Figura 3.63: Curva de dissipação não-fotoquímica (NPQ) x irradiância de *Gracilaria tenuistipitata*. Os dados foram coletados no início, após 3 ou 7 dias de experimento, considerando amostras expostas às radiações PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . As curvas foram ajustadas a partir de três séries de dados.

O resultado da ANOVA de amostras repetidas realizada para a variação do conteúdo de carotenoides de *G. tenuistipitata* indicou que o total de anteraxantina e β -caroteno teriam sido influenciados significativamente pelos fatores tempo e radiação,

enquanto que o conteúdo de zeaxantina teria respondido em relação à variável independente tempo (Tabela 3.19). Entretanto, após a análise *a posteriori* de Newman-Keuls, detectou-se que esses efeitos foram pouco representativos, uma vez que as amostras apresentaram conteúdo similar de carotenoides comparando-se os tratamentos de PAR, PA e PAB. O total de anteraxantina atingiu valores entre 0,010 e 0,016 mg por g de massa seca. Já a zeaxantina, que foi o carotenoide majoritário, variou de 0,211 a 0,374 mg por g de massa seca. O conteúdo médio de luteína e de β -caroteno (carotenoide minoritário) variou entre 0,009 e 0,012, e 0,004 e 0,007 mg por g de massa seca de alga (Figura 3.64).

Figura 3.64: Conteúdo de carotenoides (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.

Figura 3.65: Total de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias de cultivo com exposição à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB) e submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=3.

A ANOVA de amostras repetidas considerando o total de MAAs indicou efeitos significativos unifatoriais do tempo e da radiação, bem como o efeito significativo da interação entre estes fatores, sendo que o fator tempo foi responsável por 41,23% da variação do conteúdo desses compostos fotoprotetores de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.19). Observando o gráfico com o total de MAAs, é evidente um aumento do conteúdo dessas substâncias em algas que receberam UV, e um aumento ainda maior naquelas que foram tratadas com os dois tipos de radiação UV (UVA e UVB) em comparação ao aumento, também progressivo com o tempo, do total de MAAs das algas tratadas com PA (Figura 3.65).

A quantidade de MAAs variou de acordo com o tratamento de radiação executado (Figura 3.66) havendo um efeito significativo do tempo (e também de sua interação com o tipo de radiação) em todos os tipos de MAAs. Além disso, a radiação causou variação significativa no conteúdo de shinorina, P-334 e palitinol (Tabela 3.19). Quando as algas receberam PAR, não houve muitas diferenças entre o conteúdo de nenhum MAA, seja pela análise separada ou em relação ao total de MAAs. Somente o total de palitinol diminuiu com o tempo para amostras submetidas à PAR. Além disso, uma redução do total de MAAs com respeito ao valor inicial foi verificada nesse tratamento (Figura 3.66).

Figura 3.66: Quantidade dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micoposporina de *Gracilaria tenuistipitata* [shinorina, porphyra-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol] no início e após 3 ou 7 dias de tratamento com diferentes tipos de radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos. N=3.

Quando as algas foram submetidas à PA ou PAB, um aumento ao longo do tempo foi verificado para todos os MAAs avaliados. Um aumento gradual foi observado no total de shinorina e P-334, com a quantidade após 7 dias maior do que aquela verificada em 3 dias de experimento. O estímulo à síntese dessas substâncias foi maior para as algas tratadas com PAB do que aquelas expostas à PA, enquanto que o total de asterina, palitina e palitinol foi aumentado após 7 dias de forma similar para amostras tratadas com PA ou PAB (Figura 3.66).

Como já verificado no quarto experimento, os cinco diferentes tipos de MAAs foram identificados nas amostras tratadas com PAR, PA e PAB. P-334 foi o aminoácido tipo micoposporina predominante nas amostras independentemente do tratamento realizado e do período de análise. O segundo MAA mais abundante nas diferentes amostras foi a palitina. Menos de 10% do total de MAAs correspondeu à asterina e o

mesmo se pode dizer em relação ao total de shinorina. Essa última foi o MAA mais constante em termos de porcentagem nas amostras. Palitina foi o MAA menos abundante nos diferentes tratamentos realizados (Figura 3.67).

Figura 3.67: Proporção dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micoporfina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata*, no início, após 3 ou 7 dias do período experimental de cultivo de algas expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Os dados são representados com respeito ao total de 100% identificado em cada tratamento. N=3.

Ainda que tenha sido verificado um efeito significativo do tempo sobre o conteúdo de DNA de *G. tenuistipitata* (Tabela 3.19), o total de DNA obtido por meio das extrações para análise de formação de dímeros de pirimidina foi similar entre as amostras, independentemente do tempo e do tipo de radiação utilizados. Foram obtidos valores médios de 58,6 a 87,5 ng de DNA por μL de extrato (Figura 3.68). A partir desse DNA extraído de amostras expostas à PAR, PA e PAB, não foi detectada a ocorrência de dímeros de pirimidina em nenhuma das amostras.

Figura 3.68: Quantidade de DNA extraído de *Gracilaria tenuistipitata*, com amostras obtidas no início, após 3 ou 7 dias de cultivo de algas expostas à PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos. N=4.

Houve um efeito significativo do fator tempo sobre a quantidade de RNA obtida, mas sem efeitos da radiação ou de sua interação com o tempo (Tabela 3.19). Esse efeito foi detectado somente em uma amostra, tratada com PAB, que após 7 dias apresentou maior quantidade de RNA do que aquelas tratadas com PAR e PA (Tabela 3.22). Os outros tratamentos apresentaram rendimentos similares das extrações, resultando em totais de RNA entre 178,5 e 220 ng por μL de extrato.

A análise de expressão gênica do gene codificante para a fotoliase-32, feita a partir do cDNA obtido desse RNA, mostrou efeitos significativos somente da radiação, mas não tão intensos de modo que causassem algum tipo de alteração detectável no teste *a posteriori* de Newman-Keuls. Todos os tratamentos resultaram em diminuição em termos absolutos da expressão gênica da fotoliase-32 em relação ao calibrador, apesar de que essa aparente diferença não foi detectada estatisticamente (Figura 3.69).

Tabela 3.22: Quantidade de RNA total obtido a partir de amostras de *Gracilaria tenuistipitata* no início, após 3 ou 7 dias em cultivo sob radiação PAR, PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Diferentes letras ao lado dos valores de RNA representam as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos. N=4.

Radiação (tipo)	Tempo (dias)	RNA (ng/ μL)	260/280	260/230
PAR	0	178,50 $\pm$ 14,06 a	2,06	1,42
PA		195,80 $\pm$ 4,16 ab	1,98	1,26
PAB		182,98 $\pm$ 15,27 ab	2,01	1,21
PAR	3	184,98 $\pm$ 38,14 a	2,04	1,33
PA		220,63 $\pm$ 40,06 ab	2,07	1,43
PAB		181,25 $\pm$ 44,64 ab	2,10	1,35
PAR	7	207,66 $\pm$ 15,01 a	1,99	1,28
PA		201,60 $\pm$ 39,18 a	2,08	1,50
PAB		266,86 $\pm$ 83,40 b	2,10	1,42

Figura 3.69: Taxas de variação de expressão gênica da fotoliase-32 em relação ao total de expressão reportado no início do experimento (■, nível de expressão do calibrador) de *Gracilaria tenuistipitata* após 3 (barras de cores sólidas) ou 7 dias (barras marcadas em linhas diagonais) de cultivo sob exposição à PAR, PAR+UVA ou PAR+UVA+UVB, para amostras submetidas a 0,5 mM de NO_3^- . O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças significativas observadas entre os tratamentos. N=4.

Durante a aclimação, o crescimento de *G. tenuistipitata* não foi afetado pelos fatores tempo ($F=0,052$, $p=0,823$) e radiação ($F=2,63$, $p=0,125$), quando cultivadas em 0,5 mM de NO_3^- e três diferentes tipos de radiação: PAR, PA e PAB. Em média, as TCs de *G. tenuistipitata* consistiram de valores ao redor de 15,7% de massa fresca por dia (Figura 3.70).

Figura 3.70: Taxas de crescimento (% de massa fresca por dia, $\%MF \cdot dia^{-1}$) de *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em radiação PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e submetida a 0,5 mM de NO_3^- , em dois períodos, do início até 3 dias (3) e entre o terceiro dia e o sétimo dia (7). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão implicam em diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

A análise de correlação entre as variáveis dependentes após exposição à PAR, PA e PAB está indicada na Tabela 3.23. Poucas correlações foram observadas. As principais foram referentes ao conteúdo de aminoácidos tipo micosporina. Todos estiveram positivamente correlacionados entre si, e também com o total. Além disso, uma correlação negativa de algumas dessas substâncias (shinorina, P-334 e o total de MAAs) foi observada com o total de PC e o rendimento quântico máximo. Esses mesmos MAAs foram positivamente correlacionados com o conteúdo de zeaxantina. Dois MAAs foram correlacionados positivamente com a biomassa, que também esteve ligada positivamente às variações de zeaxantina e das proporções pigmentares que contivessem PE. As outras correlações observadas foram pontuais: o conteúdo de PE relacionado com o total de PC e as proporções desses dois pigmentos com *Cl_a*, bem como essas proporções (PE/*Cl_a* e PC/*Cl_a*) entre si. Por fim, o F_v/F_m foi positivamente correlacionado com os parâmetros NPQ, α e ETR_{max} (Tabela 3.23).

Tabela 3.23: Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas na primeira parte do experimento 5 (aclimação). Dados em negrito são aqueles nos quais a correlação foi significativa, com $p < 0,05$. $N=35$.

	C	N	C:N	PE	PC	Cla	PE/Cla	PC/Cla	PE/PC	Anterax.	Zeax.	Luteína	β -carot.	α	ETR _{max}	F _v /F _m	NPQ	Shinor.	P-334	Palitina	Asterina	Palitinol	MAAs
Biomassa	-0,04	-0,13	0,19	0,30	0,15	0,00	0,42	0,33	0,38	0,31	0,40	0,33	0,10	0,23	0,06	0,09	0,11	0,33	0,29	0,38	0,45	0,15	0,33
C		0,80	-0,37	0,19	0,17	-0,22	0,17	0,18	0,16	0,19	0,17	-0,10	0,00	-0,17	0,05	-0,11	-0,15	0,14	0,17	0,19	0,01	-0,15	0,16
N			-0,84	0,29	0,20	-0,09	0,20	0,11	0,31	0,21	0,32	0,04	-0,15	-0,25	0,09	-0,25	-0,34	0,24	0,30	0,21	-0,10	0,01	0,27
C:N				-0,29	-0,19	-0,06	-0,18	-0,06	-0,31	-0,20	-0,38	-0,17	0,22	0,24	-0,10	0,32	0,36	-0,28	-0,34	-0,19	0,17	-0,19	-0,31
PE					0,88	0,07	0,83	0,74	0,66	0,25	0,12	0,25	0,14	0,34	0,40	0,39	0,22	-0,25	-0,21	-0,09	-0,29	-0,28	-0,22
PC						0,06	0,57	0,67	0,23	0,06	0,03	0,30	0,06	0,29	0,35	0,48	0,37	-0,51	-0,46	-0,36	-0,52	-0,53	-0,48
Cla							0,14	0,15	0,10	0,04	0,13	0,24	-0,07	0,07	0,21	-0,08	0,02	0,00	-0,01	0,00	0,02	0,26	0,00
PE/Cla								0,89	0,80	0,37	0,09	0,08	0,25	0,36	0,38	0,32	0,18	0,05	0,03	0,25	0,12	-0,02	0,07
PC/Cla									0,45	0,26	-0,04	0,07	0,27	0,37	0,38	0,43	0,36	-0,15	-0,16	0,08	0,01	-0,22	-0,13
PE/PC										0,43	0,23	0,07	0,16	0,17	0,26	0,02	-0,13	0,29	0,29	0,39	0,21	0,23	0,31
Anterax.											0,04	0,05	0,70	-0,03	0,04	-0,25	-0,10	0,46	0,41	0,54	0,39	0,43	0,45
Zeax.												0,61	-0,60	-0,19	-0,34	-0,37	-0,19	0,41	0,49	0,28	0,24	0,30	0,46
Luteína													-0,28	0,10	-0,07	-0,09	0,05	0,06	0,12	-0,03	-0,06	0,04	0,09
β -carot.														0,28	0,26	0,22	0,18	0,04	-0,05	0,18	0,18	0,10	0,00
α															0,56	0,80	0,55	-0,23	-0,26	-0,10	-0,05	-0,12	-0,24
ETR _{max}																0,59	0,46	-0,31	-0,36	-0,13	-0,22	-0,15	-0,33
F _v /F _m																	0,68	-0,61	-0,66	-0,43	-0,31	-0,51	-0,64
NPQ																		-0,45	-0,46	-0,34	-0,20	-0,31	-0,45
Shinor.																			0,96	0,86	0,74	0,82	0,98
P-334																				0,76	0,65	0,75	0,99
Palitina																					0,80	0,75	0,83
Asterina																						0,66	0,73
Palitinol																							0,80

3.5.2. Mecanismos de fotoproteção, fotossíntese e expressão gênica de *G. tenuistipitata* após transferência de algas a diferentes tipos de radiação

Esta última parte do trabalho teve como objetivo analisar as respostas dos mecanismos de fotoproteção de *G. tenuistipitata* em um período mais curto (no máximo dois dias), utilizando as algas que foram aclimatadas previamente a três tipos de radiação (PAR, PA e PAB). Essas algas foram submetidas a novos tratamentos de radiação, incluindo a exposição à PAR+UVB (ver item 2.7.5). O desenho experimental desta segunda parte está esquematizado na Figura 3.56.

Neste experimento, somente foi possível realizar a análise estatística separadamente para cada bloco de dados. Enquanto que os parâmetros medidos após 48h (ou 50h) de exposição foram analisados com uma ANOVA unifatorial (efeito do tipo de radiação) (Tabela 3.24), os fatores analisados ao longo do tempo em diferentes radiações foram submetidos à ANOVA de amostras repetidas bifatorial, com o tempo e o tipo de radiação como fatores analisados. Esse tipo de análise foi feita com o total de MAAs, tanto considerando cada tipo de MAA separadamente quanto considerando eles em grupo (Tabela 3.25).

Tabela 3.24: Resultados das análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da variável independente radiação. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* pré-aclimatadas a diferentes radiações (PAR, PA e PAB), logo após exposição à PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB) ou PAR+UVB (PB) durante 48 (C, N e C:N) ou 50 h (Cla, carotenoides, parâmetros da fotossíntese). Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito; gl, graus de liberdade.

Fonte de variação	Radiação	
gl=8		
Variável	<i>F</i>	<i>p</i>
C	0,88	0,55
N	2,47	0,04
C:N	35,12	0,00
Cla	2,34	0,05
Anteraxantina	5,13	0,00
Zeaxantina	10,58	0,00
β-caroteno	1,62	0,17
Luteína	4,28	0,00
F_v/F_m	41,39	0,00
ETR _{max}	161,41	0,00
α	24,08	0,00
I _k	7,83	0,00

Tabela 3.25: Resultados das análises multifatoriais ANOVA com medidas repetidas para cada aminoácido tipo micoporina (variável dependente), com resultados de efeitos das variáveis independentes radiação e tempo, bem como da interação entre elas. Estes dados foram obtidos para *Gracilaria tenuistipitata* pré-aclimatadas a diferentes radiações (PAR, PA e PAB) e expostas durante 48 h à PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB) ou PAR+UVB (PB), com dados coletados no início, e após 2, 6, 12, 24 e 48h. Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de *F* e *p* em negrito; gl, graus de liberdade.

Fonte de variação		Radiação (A)		Tempo (B)		A x B	
Variável	Radiação prévia	gl		5		10	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Shinorina	PAR	141,39	0,00	13,15	0,00	26,87	0,00
	PA	8,32	0,01	66,29	0,00	6,03	0,00
	PAB	4,52	0,04	59,67	0,00	0,99	0,46
P-334	PAR	51,14	0,00	4,50	0,00	14,13	0,00
	PA	5,52	0,03	32,02	0,00	3,82	0,00
	PAB	2,25	0,16	58,36	0,00	0,42	0,93
Palitina	PAR	37,41	0,00	13,63	0,00	8,61	0,00
	PA	3,29	0,08	39,60	0,00	3,07	0,00
	PAB	6,62	0,02	7,24	0,00	1,06	0,41
Asterina	PAR	46,35	0,00	16,31	0,00	9,31	0,00
	PA	4,18	0,05	58,29	0,00	3,94	0,00
	PAB	5,78	0,02	27,83	0,00	1,51	0,17
Palitinol	PAR	24,17	0,00	8,12	0,00	12,21	0,00
	PA	3,29	0,08	8,11	0,00	3,94	0,00
	PAB	13,68	0,01	9,62	0,00	1,53	0,17

O conteúdo de *Cla* das amostras após a transferência de radiação não apresentou alterações significativas, em quaisquer dos tratamentos realizados (Tabela 3.24). Os valores apresentaram a variação de $1,28 \pm 0,19$ até $1,72 \pm 0,38$ mg de *Cla* por g de massa seca de alga (Figura 3.71).

Figura 3.71: Conteúdo total de clorofila *a* (Cla) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco indicam as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

O conteúdo de N e a proporção de C:N foram influenciados pelo efeito da nova radiação de exposição para as algas (Tabela 3.24). Apesar dos efeitos significativos da transferência de radiações sobre o conteúdo de N, não foram verificadas diferenças entre o conteúdo elementar das amostras depois de exposição a quaisquer dos tipos de radiação utilizados, na análise pelo teste *a posteriori* de Newman-Keuls. O total de C variou de 0,37 a 0,46 para cada mg de massa seca de alga, e para o elemento N, esse valor esteve entre 0,034 a 0,049 mg por mg de massa seca. Essas variações analisadas pela proporção de elementos mostraram-se significativas, sendo as proporções de C:N das amostras tratadas com radiação PB maiores do que as demais, independentemente do tratamento prévio (com PAR, PA e PAB). A menor proporção entre esses elementos foi observada para as amostras aclimatadas à PAR que foram expostas à PAB ($8,27 \pm 0,31$) (Figura 3.72).

Figura 3.72: Quantificação e proporção de elementos C e N em mg por mg de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Os parâmetros relacionados à fotossíntese também foram influenciados pelas distintas radiações (Tabela 3.24). O rendimento quântico máximo do aparato fotossintetizante antes da troca de radiações está apresentado na Figura 3.73. As algas aclimatadas à PAR e PA apresentaram valores de F_v/F_m maiores do que as algas aclimatadas à PAB, no início do período experimental de 48 h (Figura 3.73).

Figura 3.73: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* aclimatadas à PAR, PA e PAB antes da exposição das algas aos tratamentos com distintas radiações. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Ao final do período de exposição, os valores de rendimento quântico ótimo variaram de acordo com os tratamentos executados. As amostras aclimatadas à PAR mantidas nessa radiação (controle) apresentaram valores de F_v/F_m maiores do que aquelas expostas à PAB ou PB, e entre as tratadas com radiação UV, as que foram expostas à PAB possuíam maior rendimento quântico ótimo do que aquelas expostas à PB. O mesmo perfil foi verificado para o caso em que as algas foram aclimatadas à PA, isto é, valores de rendimento maiores no controle (PA) do que nas amostras tratadas com PAB, e estes por sua vez maiores também que aqueles dados obtidos para algas tratadas com PB. As algas aclimatadas à PAB e transferidas para PAR tiveram maiores valores de F_v/F_m do que aquelas mantidas nessa radiação. E, tal como verificado para os outros tratamentos com algas aclimatadas, o tratamento com PB resultou em valores de F_v/F_m mais baixos do que aqueles observados para as mantidas no controle (PAB) (Figura 3.74).

Figura 3.74: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Os valores de rendimento quântico efetivo, amostrados após 2, 6, 12, 24 e 48 h variaram nos distintos tratamentos conforme representado na Figura 3.75. No caso de amostras aclimatadas à PAR, a transferência para tratamentos com PAB ou PB causou uma redução dos valores de rendimento quântico efetivo ao longo do tempo, em comparação com os valores medidos para as que foram mantidas no controle com PAR. Ao final das 48h de experimento, as algas expostas à PB possuíram os valores mais baixos de rendimento quântico efetivo ($0,05 \pm 0,01$), seguidas daquelas expostas à PAB ($0,23 \pm 0,1$). Além disso, nota-se que a redução do rendimento quântico efetivo de amostras tratadas com PB foi maior no período após 24 e 48h de exposição. Esse mesmo padrão de resposta foi verificado para as amostras aclimatadas em PA. Neste caso, o controle foi a manutenção das amostras em PA, e os tratamentos, com transferência de algas para PAB e PB acarretaram em redução nos valores de rendimento. As amostras transferidas de PA para PAB apresentaram uma redução inicial e depois uma estabilização dos valores de rendimento, ao final das 48 h de exposição atingindo $0,29 \pm 0,1$. As algas tratadas com PB neste caso também apresentaram padrão de resposta similar àquelas que haviam recebido esta mesma radiação, porém aclimatadas à PAR, atingindo valores menores que 0,1 de rendimento quântico efetivo ($0,04 \pm 0,03$). Considerando o terceiro conjunto de material aclimatado, desta vez à PAB, os valores de rendimento das amostras transferidas para PAR resultaram maiores do que aqueles verificados para os tratamentos controle (PAB) e

com PB. Novamente, as amostras tratadas com radiação PB apresentaram valores baixos de rendimento quântico efetivo, diminuindo ao longo do tempo até atingir o total de $0,04 \pm 0,009$, após 48 h de exposição (Figura 3.75).

Figura 3.75: Rendimento quântico efetivo de *Gracilaria tenuistipitata* durante 48 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB. As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações. Cada gráfico representa as algas aclimatadas a um dos três tipos de radiação. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=8.

As curvas de fotossíntese (taxa de transporte de elétrons, ETR x irradiância) resultantes das amostras tratadas com PAR, PA, PAB ou PB de acordo com cada caso, estão representados na Figura 3.76. Um aspecto que se nota claramente é que as amostras tratadas com PB, independentemente da radiação inicial, não apresentaram transferência de elétrons em seus aparatos fotossintetizantes, e os valores obtidos para esse parâmetro com o aumento da irradiância estiveram próximos de zero (Figura 3.77).

A partir das curvas de fotossíntese da Figura 3.76, foram obtidos os parâmetros fotossintetizantes apresentados na Figura 3.77. As algas tratadas com diferentes tipos de radiação apresentaram o mesmo padrão de resposta tanto para os valores de ETR_{max} quanto os de α . As amostras pré-aclimatadas à PAR e expostas à PAR apresentaram valores médios desses parâmetros maiores do que as algas transferidas para PAB ou PB (ETR_{max} PAR = $5,87 \pm 0,45 \mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\alpha = 0,049 \pm 0,005$). Além disso, as amostras tratadas com PB tiveram dados de ETR_{max} e α menores do que aquelas expostas à PAB. No caso das algas aclimatadas à PA ou PAB, o tratamento com PB também resultou em menores valores desses parâmetros do que aqueles observados quando as algas foram expostas à PA e PAB ou PAB e PAR, respectivamente (aclimatadas à PA: $ETR_{max} = 0,054 \pm 0,08$ e $\alpha = 0,003 \pm 0,003$; aclimatadas à PAB: $ETR_{max} = 0,13 \pm 0,23$ e $\alpha = 0,007 \pm 0,003$) (Figura 3.77). Os maiores valores para esses parâmetros foram observados nos tratamentos controle quando as algas estavam aclimatadas à PAR e PA, e no tratamento com PAR quando as algas foram aclimatadas à PAB (Figura 3.77).

A irradiância de saturação (I_k) das amostras aclimatadas à PAR foi maior quando estas foram expostas à PAB, em comparação a amostras tratadas com PAR ou PB, sendo observado o valor médio de $235 \mu\text{mol fôtons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Quando o material biológico foi aclimatado à PA, os valores de I_k foram similares, em quaisquer dos tratamentos de radiação realizados (PA, PAB ou PB). Por outro lado, quando a aclimação foi feita em PAB, o tratamento com PB resultou em valores de I_k menores do que aqueles verificados para as amostras tratadas com PAB ou PAR (Figura 3.77).

Figura 3.76: Curvas de fotossíntese estimadas como ETR por irradiância para *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB. Cada gráfico representa as algas aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novos tratamentos de radiação. Por meio dessas curvas se calcularam os parâmetros fotossintetizantes α , ETR_{max} e I_k . $N=4$.

Figura 3.77: Parâmetros fotossintetizantes (α , ETR_{max} e I_k) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Gracilaria tenuistipitata apresentou quatro diferentes carotenoides após a transferência de radiação: zeaxantina, anteraxantina, luteína e β -caroteno (Figura 3.78). O carotenoide majoritário nessas algas foi a zeaxantina, seguida de anteraxantina, e por

fim, a luteína e o β -caroteno. Efeitos significativos foram observados com os tratamentos de radiação distintos sobre o total de anteraxantina, zeaxantina e luteína (Tabela 3.24).

Considerando o total de zeaxantina, as amostras aclimatadas à PAR que foram expostas à PAB apresentaram maiores quantidades desse carotenoide do que aquelas expostas ao controle (PAR) ou a PB. A manutenção das algas em PAB após a aclimação semanal nessa radiação também resultou maiores quantidades desse pigmento, em comparação com o material exposto à PAR ou PB. E por fim, quando as amostras foram aclimatadas à PA, o total de zeaxantina foi similar para os três tratamentos, com PA, PAB ou PB (Figura 3.78). Os valores médios de quantidade desse pigmento acessório variaram entre $0,13 \pm 0,04$ e $0,36 \pm 0,01$ mg por g de massa seca de alga (Figura 3.78).

O total de anteraxantina de *G. tenuistipitata* foi pouco variável quando as amostras submetidas aos distintos tratamentos foram comparadas. Considerando as algas aclimatadas à PAR, aquelas que foram expostas à PB tiveram quantidade de anteraxantina significativamente menor do que aquelas expostas à PAB, e as que se mantiveram em PAR tiveram uma quantidade de anteraxantina intermediária e similar aos dois tratamentos com radiação UV. Por outro lado, se as algas foram aclimatadas à PA ou PAB, o padrão de resposta foi similar no que se refere à quantidade de anteraxantina, isto é, o conteúdo desse carotenoide foi similar para os três tratamentos em cada caso. Porém, pode-se observar uma tendência na qual o total de anteraxantina foi menor em valores médios absolutos com a exposição do material de cultivo à PB em comparação com o controle PA e o tratamento PAB para as pré-aclimatadas à PA, e em comparação com o controle PAB e o tratamento em PAR para as aclimatadas à PAB (Figura 3.78). Os valores médios desse pigmento variaram entre $0,011 \pm 0,001$ e $0,015 \pm 0,003$ mg por g de massa seca de *G. tenuistipitata*, analisando-se todas as amostras dos nove tratamentos.

Figura 3.78: Carotenoides em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* após 50 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). Cada carotenoide (zeaxantina, anteraxantina, luteína e β-caroteno) está representado em um gráfico. As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Os outros dois carotenoides detectados em *G. tenuistipitata* foram minoritários e apresentaram menor variação na comparação entre as amostras tratadas com distintos tipos de radiação. Considerando o total de luteína, a interferência significativa do tratamento de radiação detectado pela análise multifatorial de variância (Tabela 3.24) foi evidenciada apenas porque o total desse carotenoide foi maior no caso de algas aclimatadas em PAB que foram mantidas nessa radiação ($0,0056 \pm 0,001$ mg de luteína por g de massa seca de alga) em comparação com aquelas transferidas para PB ou PAR, bem como com o total observado em todos outros seis tratamentos. Exceto esse valor diferenciado, os demais totais de luteína de *G. tenuistipitata* exposta a distintos tipos de radiação por 50 h variaram entre $0,0028 \pm 0,001$ e $0,0038 \pm 0,0009$ mg por g de massa seca de material biológico (Figura 3.78). Já para o β -caroteno, não foram verificadas diferenças significativas entre os totais obtidos após os distintos tratamentos de radiação realizados. Os valores médios desse carotenoide foram de $0,005542 \pm 0,00034$ a $0,0077 \pm 0,0016$ mg para cada g de massa seca algal (Figura 3.78).

O conteúdo total de MAAs de *G. tenuistipitata* foi influenciado pelo fator radiação, independentemente do tipo de radiação de aclimação prévia do material (aclimatadas à PAR: $F=62,53$; $p=0$; aclimatadas à PA: $F=8,79$; $p=0,01$ e aclimatadas à PAB, $F=6,47$; $p=0,02$). O fator tempo também foi determinante para as diferenças verificadas no conteúdo total desses compostos, seja para as algas aclimatadas à PAR ($F=3,16$; $p=0,01$), à PA ($F=41,57$; $p=0$) e à PAB ($F=57,98$; $p=0$). Entretanto, a interação entre esses dois fatores (radiação e tempo) foi significativa apenas para as amostras aclimatadas à PAR ($F=17,47$; $p=0$) ou PA ($F=5,69$; $p=0$).

Por meio do teste *a posteriori*, se pôde detectar que para as amostras que foram cultivadas em PAB durante as 48 h experimentais, independentemente do tipo de radiação prévia de aclimação, houve um aumento do total de MAAs em comparação com os demais tratamentos dentro do mesmo grupo de aclimação (Figura 3.79). No caso das amostras aclimatadas à PAR, a manutenção nessa radiação ou a transferência das mesmas para PB resultaram nas menores quantidades de MAAs. Já para aquelas transferidas para PAB, após 24 h, foi observado o total de $1,57 \pm 0,28$ mg de MAAs por g de massa seca de alga (Figura 3.79). No caso de amostras pré-aclimatadas à PA, a transferência para a radiação de PAB também causou um aumento no total de MAAs, comprovado ao final do período experimental, sendo que esse valor ($1,84 \pm 0,2$ mg por g de massa seca) foi maior do que aquele verificado para as algas tratadas com PA ou PB. As algas expostas à PB apresentaram redução dos valores de MAAs totais ao longo do

tempo, resultando em total menor do que aquele observado para as mantidas na radiação de aclimação (PA) (Figura 3.79). Por fim, as algas aclimatadas à PAB que deixaram de ser submetidas a essa radiação (expostas à PAR ou PB) tiveram uma redução de seu total de MAAs, atingindo totais menores ($0,99\pm0,06$ e $0,85\pm0,05$ mg de MAAs por g de massa seca) do que o observado para as que foram mantidas em PAB ($1,47\pm0,31$ mg por g de massa seca de alga) (Figura 3.79).

Figura 3.79: Total de mg de aminoácidos do tipo microsporina (MAAs) por massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata*, medidos ao início e após 2, 6, 12, 24 e 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB. Cada gráfico representa as algas aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB, e em seguida, transferidas para novos tratamentos de radiação. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

No decorrer do experimento de exposição de *G. tenuistipitata* a diferentes tipos de radiação, foram observados cinco diferentes aminoácidos tipo microsporina (MAAs): shinorina, porphyr-334, palitina, asterina e palitinol. Na Tabela 3.25, estão referidos os resultados da análise de variância multifatorial com análise da interferência do tempo e da radiação, bem como a interação entre estes fatores, no conteúdo dos diferentes tipos de MAAs, separadamente. Nota-se que o fator tempo teve influencia significativa sobre a variação do conteúdo de todas as MAAs identificadas para *G. tenuistipitata* após a transferência de algas aclimatadas para quaisquer novos tipos de radiação (Tabela 3.25). Além disso, a alteração de radiação foi significativa para o total de qualquer uma das cinco MAAs em amostras aclimatadas à PAR. Considerando o conteúdo de shinorina, as algas aclimatadas à PA e PAB também apresentaram efeito da radiação para a produção dessa substância. Já o total de P-334 foi influenciado pelo fator radiação, considerando as algas aclimatadas à PA. O efeito do fator radiação também foi observado para o conteúdo das outras três MAAs (palitina, asterina e palitinol), quando as algas estavam pré-cultivadas em PAB (Tabela 3.25). Por fim, o efeito da interação

entre tempo e radiação foi verificado para o conteúdo de todos os MAAs, somente quando as algas estiveram aclimatadas previamente à PAR e PA (Tabela 3.25).

As amostras de *G. tenuistipitata* aclimatadas à PAR e transferidas para PAB apresentaram um aumento do total de cada uma das diferentes cinco MAAs ao longo do tempo. Os totais de shinorina, P-334, palitina, asterina e palitinol aumentaram com o tempo, e ao final das 48 h de experimento, as amostras submetidas à esta condição tinham maior quantidade desses compostos do que aquelas que permaneceram em PAR ou foram cultivadas em PB. Já após 24 h de exposição à PAB dessas amostras, foi observado o total de shinorina de $0,108 \pm 0,02$ mg por g de MS de alga. Os outros tipos de MAA apresentaram suas maiores quantidades ao final do período experimental, sendo $0,96 \pm 0,26$ mg de P-334, $0,11 \pm 0,02$ mg de palitina, $0,15 \pm 0,02$ mg de asterina e $0,03 \pm 0,01$ de palitinol por g de MS de alga. Não houve um aumento do conteúdo dessas substâncias com o tempo quando o cultivo foi feito nas radiações PAR e PB. Os totais de shinorina, P-334, asterina e palitinol das amostras expostas à PB foram similares ao daquelas mantidas em PAR. Somente o total de palitina de algas tratadas com PAR ($0,007 \pm 0,002$ mg por g de MS) foi menor do que aquele observado para as cultivadas em PB ($0,04 \pm 0,02$ mg por g de MS de alga) (Figura 3.80).

Da mesma maneira que foi observado para as amostras aclimatadas à PAR, aquelas aclimatadas à PA e que foram transferidas para PAB apresentaram uma redução do total de shinorina ao final do período experimental, comparando-se a quantidade desse MAA no início e no final do período, considerando o mesmo tratamento de radiação. Entretanto, ao final, foi possível detectar que as algas tratadas com PAB possuíam maior quantidade de shinorina do que aquelas mantidas em PA ou transferidas para PB, e que estas últimas tinham menos quantidade de shinorina do que aquelas do controle em PA. O total de P-334 das amostras que foram transferidas para PAB se manteve similar ao registrado no início do experimento ($1,15 \pm 0,18$ mg de P-334 por g de MS de *G. tenuistipitata*). Entretanto, no caso daquelas que se mantiveram em PA ou foram cultivadas em PB, houve uma redução desse total, resultando em valores menores ($0,55 \pm 0,09$ e $0,31 \pm 0,04$ mg de P-334, respectivamente, para tratamentos com PA e PB) do que no início ($1,21 \pm 0,43$ mg de P-334 por g de MS de alga). Quando se considerou o total de palitina ou asterina, foi verificado o mesmo padrão de resposta: as algas aclimatadas em PA que se mantiveram em PA ou foram expostas à PB tiveram uma redução do total dessa substância ao final do experimento (tratamento com PA, $0,17 \pm 0,03$ mg de palitina e $0,15 \pm 0,02$ mg de asterina por g de MS; tratamento com PB:

0,15±0,02 mg de palitina e 0,11±0,007 mg de asterina para cada g de MS de alga) em comparação com a quantidade ao início do experimento, enquanto que aquelas transferidas para PAB mantiveram um total similar dessas substâncias (0,25±0,03 mg de palitina e 0,21±0,03 mg de asterina) ao já verificado logo após a aclimação à PA. Comparando esses totais ao final do período, verificou-se que algas expostas à PAB tinham mais palitina ou asterina do que as cultivadas sob PA ou PB. E, além disso, o total de palitina das algas expostas à PA foi similar ao das amostras submetidas à PB. No caso de asterina, o total para as mantidas no controle de PA foi maior do que daquelas expostas à PB. O quinto MAA analisado, palitinol, teve sua quantidade aumentada quando as algas foram transferidas de PA para PAB, comparando-se o total dessa substância ao início (0,04±0,008 mg de palitinol por g de MS) e ao final do período de exposição (0,12±0,01 mg de palitinol por g de MS de alga). Quando as algas foram mantidas em PA ou transferidas para PB, o total desse composto se manteve similar após 48 h de cultivo em comparação ao quantificado no início da exposição. O total de palitinol das algas expostas à PAB foi maior do que das algas mantidas em PA ou transferidas para PB, após 48 h de experimento (Figura 3.80).

As amostras aclimatadas à PAB apresentaram dois tipos de variação da quantidade das MAAs após permanecerem 48 h em PAB, PB ou PAR. O total de shinorina, P-334 e asterina diminuiu nas amostras comparando-se o total no início e ao final do experimento, independentemente dos tipos de radiação aos quais as algas foram expostas. Por outro lado, no caso de palitina e palitinol, o total observado após 48 h de tratamento com quaisquer das radiações foi similar ao valor observado no início do experimento (0,25±0,06 mg de palitina e 0,13±0,04 mg de palitinol por g de MS de alga). As algas aclimatadas à PAB que foram mantidas em PAB apresentaram o total de 0,06±0,01 mg de shinorina após 48 h de exposição, e este valor foi maior do que aquele observado quando as algas foram transferidas para PB ou PAR. Da mesma maneira, quando as algas foram mantidas em PAB, o total de P-334 também foi maior (0,80±0,12 mg) do que aqueles observados para amostras expostas à PB ou PAR, após 48 h de cultivo. O mesmo perfil de resposta foi ainda detectado para o total de asterina e palitinol após 48 h, isto é, as algas mantidas em PAB também apresentavam maior quantidade desses compostos (0,22±0,009 mg de asterina e 0,14±0,03 mg de palitinol por g de MS de alga) do que aquelas cultivadas em PB ou PAR. As quantidades desses MAAs detectados nas algas expostas a estas duas radiações foram estatisticamente similares (Figura 3.80).

Figura 3.80: Aminoácidos tipo micoporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de *Gracilaria tenuistipitata* durante 48 h de cultivo em PAR, PA, PAB ou PB. As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações. Cada gráfico representa as algas aclimatadas a um dos três tipos de radiação, para os diferentes tipos de MAA: shinorina, porphyrina-334 (P-334), palitina, asterina e palitinol. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

Independentemente do tratamento, após 48 h de exposição, P-334 foi o MAA majoritário, correspondendo a mais de 50% do total observado nas amostras. Palitinol e shinorina foram os MAAs minoritários, sendo que em alguns tratamentos, como nas amostras aclimatadas e mantidas em PAR, o palitinol não foi detectado. Os totais de shinorina corresponderam a um total de cerca de 5% dos MAAs observados. Os totais de palitina e P-334 foram complementares, isto é, o aumento de porcentagem de um deles correspondeu numa redução do outro (Figura 3.81)

Figura 3.81: Porcentagens do total de aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria tenuistipitata* após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas à PA e as barras representadas com fundo branco são as pré-cultivadas em PAB. N=4.

As extrações de DNA de *G. tenuistipitata* resultaram em rendimento muito similar para todas as amostras, independentemente do tratamento, mesmo que efeitos significativos tenham sido detectados para o fator radiação ($F=4,19$; $p=0$) e o fator tempo ($F=6,19$; $p=0,01$) de forma isolada ou a interação entre eles ($F=2,68$; $p=0,01$). As diferenças pontuais entre as amostras estão apresentadas na Tabela 3.26.

Tabela 3.26: Quantidade de DNA (em ng/ μ L) extraído de *Gracilaria tenuistipitata*, com amostras aclimatadas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB), no início e após 48 h de cultivo com exposição de algas à PAR, PA, PAB e PB, de acordo com o caso. Diferentes letras ao lado do valor de quantificação representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados. N=4.

Período	Radiação prévia	Radiação tratamento	Quantidade (ng/ μ L)	260/280	260/230
Início	PAR	PAR	51,77 $\pm$ 13,36 abc	1,81	1,07
		PAB	49,39 $\pm$ 11,07 abc	1,90	1,38
		PB	58,58 $\pm$ 22,48 abc	1,99	1,86
	PA	PA	65,83 $\pm$ 4,29 abc	1,82	1,46
		PAB	104,14 $\pm$ 23,51 abc	2,03	1,53
		PB	66,34 $\pm$ 38,91 abc	2,09	1,08
	PAB	PAB	40,48 $\pm$ 28,97 b	2,10	1,33
		PB	67,87 $\pm$ 9,94 abc	1,96	1,60
		PAR	76,05 $\pm$ 16,86 abc	1,91	1,62
48 h	PAR	PAR	22,55 $\pm$ 10,74 a	1,92	0,84
		PAB	77,12 $\pm$ 73,25 abc	2,04	1,13
		PB	42,47 $\pm$ 10,35 ab	2,10	1,15
	PA	PA	114,75 $\pm$ 28,98 bc	1,94	1,57
		PAB	116,82 $\pm$ 58,39 bc	1,82	1,60
		PB	62,08 $\pm$ 22,07 abc	1,80	1,20
	PAB	PAB	126,65 $\pm$ 31,05 bd	2,17	1,68
		PB	63,29 $\pm$ 7,40 abc	2,06	1,19
		PAR	131,49 $\pm$ 24,72 cd	2,19	1,61

O ensaio imunológico para detectar a formação de dímeros de pirimidina em *G. tenuistipitata* resultou na detecção e quantificação do dano no DNA, os quais estão sumarizados na Figura 3.82. Foram detectadas amostras com a formação dos CPDs (dímeros de ciclobutano-pirimidina) para algas que estiveram submetidas a tratamentos com PB, após 48 h de exposição a essa radiação. Esse resultado foi observado para amostras aclimatadas à PAR, PA ou PAB. As algas aclimatadas à PA e transferidas para PB foram as que apresentaram maior formação de CPDs, seguidas daquelas aclimatadas à PAR e por fim, as aclimatadas à PAB (Figura 3.82).

Figura 3.82: Presença e variação de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) de *Gracilaria tenuistipitata* após 48 h de cultivo em PAR, PA PAB ou PB (eixo das abscissas). As algas foram aclimatadas por uma semana à PAR, PA ou PAB. Em seguida, transferidas para novas radiações, conforme a figura: o fundo cinza-escuro agrupa as amostras aclimatadas à PAR, aquelas sob fundo cinza-claro foram aclimatadas a PA e as barras representadas com fundo branco são as amostras previamente cultivadas em PAB. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=4.

As extrações de RNA total de *G. tenuistipitata* produziram as quantidades referidas na Tabela 3.27. Houve uma influência significativa do fator radiação para as amostras aclimatadas a PAR ($F=19,31$; $p=0$), PA ($F=29,30$; $p=0$) e PAB ($F=63,03$; $p=0$). As amostras aclimatadas à PAR e transferidas à PB apresentaram menor quantidade de RNA do que aquelas expostas à PAR ou PAB. O mesmo tipo de resposta foi verificado para as amostras que estiveram aclimatadas à PA, isto é, o material transferido para PB teve menor quantidade de RNA do que os outros dois tratamentos (PA e PAB). No caso das algas pré-aclimatadas à PAB, o total de RNA após 48 h de cultivo, foi maior em amostras expostas à PAR, seguido daquelas cultivadas em PB e por fim, as expostas a PAB (Tabela 3.27). A amostra com maior rendimento da extração foi proveniente da manutenção das algas aclimatadas à PAR nessa mesma radiação ($339,49 \pm 38,27$ ng/ μ L), e a que teve menor rendimento consistiu no material exposto à PB, após aclimação a PA ($32,97 \pm 8,09$ ng/ μ L).

Tabela 3.27: Quantidade de RNA (em ng/μL) extraído de *Gracilaria tenuistipitata*, com amostras aclimatadas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB), no início e após 48 h de cultivo com exposição de algas à PAR, PA, PAB e PB, de acordo com o caso. Diferentes letras ao lado do valor de quantificação representam as diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados. N=4.

Tempo	Radiação			RNA (ng/μL)		260/280	260/230
0h	PAR	241,66	±	48,33	a	1,94	1,20
	PAR	339,49	±	38,27	b	2,05	1,64
	PAB	283,87	±	46,08	ab	2,19	1,15
	PB	126,55	±	28,77	c	2,19	0,73
48h	PA	216,98	±	56,00	a	2,09	1,43
	PA	254,92	±	65,86	ab	2,15	1,44
	PAB	311,18	±	19,44	b	2,12	1,33
	PB	32,97	±	8,09	c	2,25	0,51
0h	PAB	254,20	±	37,93	a	2,04	1,56
	PAB	46,17	±	8,74	b	2,68	0,73
	PAR	234,79	±	13,44	a	2,23	1,14
	PB	122,79	±	21,10	c	2,20	1,01

As análises de expressão gênica apresentaram resultados de variação significativa de acordo com os tratamentos realizados. Considerando a variação de expressão relativa dos genes codificantes para a fotoliase-32, houve efeito significativo da alteração de radiação quando as amostras foram aclimatadas à PA ($F=18,34$; $p=0$) e PAB ($F=9,82$; $p=0,001$). No caso das amostras aclimatadas à PAR, não ocorreu variação significativa nas taxas de expressão relativa do gene codificante para a fotoliase-32 (Figura 3.83). Entretanto, com as algas aclimatadas à PA, houve um aumento de expressão relativa desse gene com a manutenção das amostras em PA e a transferência para PAB. As amostras transferidas para PB mantiveram taxas de expressão similares ao calibrador (Figura 3.83). Para o outro conjunto de algas aclimatadas neste caso à PAB, houve um estímulo a maior expressão gênica relativa desse gene quando as algas foram expostas à PAR ou PB, em comparação ao calibrador. Já as algas mantidas em PAB apresentaram as taxas de expressão similares ao calibrador e também às amostras expostas à PAR (Figura 3.83).

Figura 3.83: Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para fotoliase-32 de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A análise da expressão gênica relativa do gene codificante para ascorbato peroxidase (APX) resultou em efeitos do tratamento de transferência de radiação significativos em algas aclimatadas à PA ($F=14,26$; $p=0$) e PAB ($F=60,51$; $p=0$). Não houve efeitos dos tratamentos quando as algas estavam aclimatadas à PAR ($F=2,66$; $p=0,09$). Em decorrência dessa análise, os dados do teste *a posteriori* das comparações envolvendo as amostras de algas aclimatadas à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas à PAB e PB apresentaram variações na taxa de expressão relativa do gene codificante para APX similares ao calibrador e entre si (Figura 3.84). No caso de algas aclimatadas à PA, houve um aumento de mais de 10 vezes na taxa de expressão dos genes codificantes para APX de talos mantidos em PA ou expostos à PAB, em comparação com a amostra do calibrador. Já o material transferido para PB apresentou valores de expressão do gene codificante para APX semelhantes ao calibrador (Figura 3.84). Os talos de algas aclimatadas à PAB e tratados com essa mesma radiação ou com PAR e PB apresentaram aumento na taxa relativa de expressão do gene codificante para APX, em comparação com a amostra do calibrador. Entretanto, as algas mantidas em PAB apresentaram aumento de mais de 10 vezes em comparação ao calibrador, e um aumento maior do que o reportado para as algas tratadas com PAR e PB, que por sua vez apresentaram aumentos semelhantes entre si, em comparação com o calibrador (Figura 3.84).

Figura 3.84: Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para ascorbato peroxidase (APX) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A expressão relativa do gene codificante para glutathiona peroxidase foi influenciada pelos diferentes tratamentos de transferência das amostras aclimatadas às três radiações (PAR: $F=9,69$; $p=0,001$; PA: $F=7,06$; $p=0,005$ e PAR: $F=7,44$; $p=0,004$). As algas aclimatadas à PAR e mantidas nessa radiação por 48 h apresentaram redução na taxa de expressão do gene codificante para GPX. Quando amostras foram transferidas de PAR para PAB ou PB, a taxa de expressão relativa desses genes codificantes para GPX foi semelhante àquela observada para a amostra-calibrador (Figura 3.85). No caso de *G. tenuistipitata* aclimatada à PA ou PAB, a exposição de amostras por 48 h a diferentes radiações resultou em aumentos de mais de 5 vezes das taxas relativas de expressão do gene codificante para GPX em comparação com os calibradores, independentemente se as algas foram tratadas com PA, PAB e PB (para as aclimatadas à PA) ou se foram tratadas com PAB, PAR e PB (para algas aclimatadas à PAB) (Figura 3.85).

Figura 3.85: Taxas de variação de expressão gênica do gene codificante para glutatona peroxidase (GPX) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas às radiações de PAR, PAR+UVA (PA), PAR+UVA+UVB (PAB). A taxa de expressão gênica do gene-alvo com relação ao controle endógeno das amostras pré-aclimatadas às três radiações foi usada como calibrador. Os gráficos representam as variações de expressão, após 48 h, das amostras aclimatadas: i, à PAR e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAB ou PB; ii, à PA e mantidas em PA ou transferidas para PAB ou PB; e iii, à PAB e mantidas nessa radiação ou transferidas para PAR ou PB. O controle endógeno foi um gene codificante para uma actina. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Após a aclimação das algas a diferentes radiações, analisando todas as amostras conjuntamente, houve um efeito significativo do tempo e do tipo de radiação aos quais as amostras foram submetidas ($F=6,37$; $p=0$ e $F=156,62$; $p=0$) sobre as TCs. Da mesma forma, a interação entre as duas variáveis também foi significativa ($F=6,30$; $p=0$). Esse resultado foi similar na análise separada para cada um dos três conjuntos de dados de acordo com o tratamento prévio (PAR, PA e PAB). As amostras aclimatadas à PAR e PAB foram influenciadas pela radiação (PAR: $F=6,66$; $p=0,016$, PAB: $F=12,19$; $p=0,002$) e pelo tempo (PAR: $F=30,97$; $p=0$, PAB: $F=51,91$; $p=0$). Para as amostras aclimatadas à PA, um efeito somente da radiação isoladamente não foi verificado ($F=1,25$; $p=0,331$), mas o tempo influenciou nas diferenças significativas entre os tratamentos ($F=99,32$; $p=0$), bem como a interação entre tempo e radiação ($F=12,13$; $p=0$). Essa interação também foi significativa para as amostras pré-tratadas com PAR ($F=2,35$; $p=0,037$) e PAB ($F=11,92$; $p=0$).

Por meio do teste *a posteriori* de Newman-Keuls, foi possível detectar que as taxas de crescimento (TC) no primeiro intervalo (de 0 a 2h) experimental foram maiores do que nos outros períodos, independentemente do tratamento prévio. Entretanto, a dinâmica de variação de crescimento das amostras diferiu de acordo com o tratamento ao qual foram submetidas. Para os talos aclimatados à PAR, ao final do período experimental, as TC foram maiores com a manutenção do tratamento com PAR do que

aquelas tratadas com PAB ou PB. Além disso, as algas submetidas à PAB apresentaram maiores TC do que aquelas cultivadas em PB (Figura 3.86).

Figura 3.86: Taxas de crescimento (TC, em %MF.h⁻¹) de *Gracilaria tenuistipitata*. As algas foram aclimatadas por uma semana nas radiações prévias PAR, PA e PAB, e em seguida, cultivadas em PAR, PA, PAB ou PB, de acordo com o caso, durante 48 h. As barras nos gráficos representam desvio padrão. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão, na última série de dados, representam diferenças significativas entre as amostras. N=4.

Quando a radiação prévia utilizada foi PA, um padrão de resposta similar foi verificado, sendo que as algas mantidas no controle (PA) apresentaram também as

maiores TC ao final do período experimental. Já aquelas cultivadas em PB tiveram dados de TC negativos, menores também daqueles verificados para amostras expostas à PAB (Figura 3.86). A transferência de algas aclimatadas à PAB para tratamentos com PAR resultou em maiores TC do que aquelas que permaneceram em PAB, ao passo que ambos os tratamentos resultaram em TC maiores do que as obtidas para algas expostas à PB, que apresentaram valores negativos de TC após 48 h (Figura 3.86).

As análises de correlação de Pearson foram feitas com os valores ao final do experimento, obtidos após 48 ou 50 h. A proporção C:N foi negativamente correlacionada com quase todos os parâmetros medidos, incluindo o total de N e de Cla, bem como o rendimento quântico efetivo e as TC. Além disso, houve correlação negativa entre C:N e os MAAs analisados (exceto palitina), e com o total de anteraxantina e zeaxantina de *G. tenuistipitata*, após o cultivo sob diferentes tipos de radiação. Os parâmetros da fotossíntese (ETR_{max} , α , F_v/F_m e rendimento quântico efetivo) foram positivamente correlacionados entre si e com as TC. Além disso, outra correlação positiva foi observada para os diferentes MAAs, entre si isoladamente e também com o total de MAAs. Por fim, o total de anteraxantina e zeaxantina foram positivamente correlacionados entre si, e com os distintos tipos de MAAs. Enquanto zeaxantina foi correlacionada com todos MAAs, anteraxantina foi positivamente correlacionada com shinorina, P-334, asterina e o total de MAAs. O total de luteína foi correlacionado positivamente com o conteúdo de palitinol e de zeaxantina (Tabela 3.28).

Tabela 3.28: Valores de correlação de Pearson obtidos entre as amostras utilizadas para análise de diferentes variáveis avaliadas na segunda parte do experimento 5. Dados em negrito são aqueles nos quais a correlação foi significativa, com $p < 0,05$. Yield, rendimento quântico efetivo. N=36.

	N	C:N	Cla	F_v/F_m	ETR _{max}	α	TC	Yield	Shinor.	P-334	Palitina	Asterina	Palitinol	MAAs	Anterax.	Zeax.	Luteína	β -carot.
C	0,81	0,03	0,07	0,00	0,08	0,04	0,06	0,15	0,09	-0,11	0,10	0,20	0,09	-0,03	0,05	-0,08	-0,10	-0,04
N		-0,55	0,32	0,19	0,31	0,14	0,36	0,36	0,43	0,28	0,26	0,48	0,31	0,33	0,45	0,29	-0,02	0,14
C:N			-0,42	-0,39	-0,48	-0,27	-0,59	-0,47	-0,59	-0,64	-0,29	-0,53	-0,41	-0,59	-0,69	-0,62	-0,11	-0,30
Cla				0,07	0,10	0,09	0,08	0,15	0,25	0,33	0,08	0,31	0,09	0,28	0,33	0,39	0,02	0,07
F_v/F_m					0,96	0,97	0,90	0,94	0,00	-0,14	-0,17	-0,09	0,01	-0,13	0,14	0,07	-0,02	0,38
ETR _{max}						0,91	0,93	0,94	0,05	-0,06	-0,14	0,01	0,07	-0,06	0,24	0,16	-0,01	0,31
α							0,81	0,93	-0,09	-0,22	-0,24	-0,19	-0,07	-0,22	-0,02	0,04	-0,01	0,27
TC								0,86	0,08	0,00	-0,16	0,05	0,09	-0,01	0,40	0,17	-0,01	0,43
Yield									0,11	-0,02	-0,11	0,03	0,10	-0,01	0,09	0,22	0,04	0,18
Shinorina										0,90	0,89	0,89	0,87	0,95	0,47	0,64	0,27	-0,07
P-334											0,74	0,82	0,74	0,98	0,50	0,66	0,18	-0,10
Palitina												0,87	0,90	0,86	0,38	0,53	0,36	-0,09
Asterina													0,89	0,91	0,52	0,62	0,34	-0,08
Palitinol														0,85	0,40	0,67	0,50	-0,14
MAAs															0,51	0,68	0,27	-0,10
Anteraxantina																0,45	0,08	0,52
Zeaxantina																	0,72	-0,27
Luteína																		-0,38

4. Discussão

4.1. Antecedentes e contribuições deste trabalho

Os ápices do tetrasporófito de *G. tenuistipitata* utilizado neste trabalho foram coletados no início da década de 90, e esse material permaneceu durante quase 20 anos em laboratório, sendo utilizado para estudos moleculares e fisiológicos (ex. Macchiavello *et al.*, 1998; 1999; Hagopian *et al.*, 2004). É importante notar que todos os cultivos feitos dessa alga foram feitos sob condições de radiação PAR, em ausência de radiação UV. Entretanto, mesmo apesar do longo tempo de cultivo sem incidência de radiação UV, as respostas observadas neste trabalho quando *G. tenuistipitata* foi exposta à UV (em intensidades proporcionalmente elevadas considerando a radiação PAR em comparação com circunstâncias do ambiente natural) implicam na ocorrência de fotoaclimação, com o estímulo a compostos fotoprotetores, a evidência da existência de sistemas antioxidantes, além de sistemas eficazes de reparo de DNA e ainda a síntese de MAAs estimulada quando *G. tenuistipitata* recebeu radiações PAR e UVA, ou PAR, UVA e UVB. Neste trabalho, foram adotadas intensidades de UVB e UVA proporcionais tal como observado no ambiente em altas montanhas, principalmente quando as algas foram submetidas a tratamentos com a lâmpada Q-Panel UVA340 (Tabela 4.1). Considerando que em altas montanhas a quantidade de radiação UV é maior do que na superfície do mar, é justificada a escolha dessa proporção para este trabalho no sentido de prever possíveis respostas de *G. tenuistipitata* numa condição de incremento de UV, prevista para as zonas tropicais (Hegglin & Shepherd, 2009). Além disso, os valores adotados neste trabalho para as radiações UV são similares aos observados no ambiente (F.L. Figueroa, com. pes.), e repetem valores usados em trabalhos com *Porphyra* spp. (ex. Korbee-Peinado *et al.*, 2004). Figueroa & Gómez (2001) apresentam valores de doses diárias de radiação usadas em trabalhos realizados diretamente no campo.

Tabela 4.1: Proporção entre as radiações UVB e UVA utilizadas no trabalho nos distintos experimentos com as lâmpadas Q-Panel e TL-12 (para mais detalhes, ver Material e métodos) em comparação com dados obtidos na natureza, no Hemisfério Norte, no nível do mar e em região de alta montanha (Figuerola, F.L. comunic. pes.).

Proporção UVB/UVA	Radiação artificial		Radiação natural	
	Q-Panel	TL-12	nível do mar	alta montanha
UVB ₂₈₀₋₃₁₅ /UVA ₃₁₅₋₄₀₀	0,04	0,51	0,03	0,04
UVB ₂₉₅₋₃₁₅ /UVA ₃₁₅₋₄₀₀	0,04	0,39	0,03	0,04
UVB ₂₈₀₋₃₂₀ /UVA ₃₂₀₋₄₀₀	0,07	0,68	0,05	0,07
UVB ₂₉₅₋₃₂₀ /UVA ₃₂₅₋₄₀₀	0,07	0,55	0,05	0,07

O cultivo de macroalgas em tratamentos compostos por combinações entre suprimentos de distintas concentrações de N e diferentes tipos e intensidades de radiação UV consiste numa abordagem recente na literatura. Os primeiros trabalhos foram feitos com *Porphyra* spp. por Korbee *et al.* (2005a) e Korbee-Peinado *et al.* (2004). Em seguida, Huovinen *et al.* realizaram abordagem similar com *Grateloupia lanceola* (Huovinen *et al.*, 2006), e ainda Figuerola *et al.* (2008) expuseram *Asparagopsis armata* a tratamentos em tanques sob suprimento crescente de N. Além disso, em uma macroalga parda (*Laminaria saccharina*) também foi feito um trabalho com esse tipo de abordagem (Davison *et al.*, 2007). E por fim, Zheng & Gao (2009) analisaram o crescimento e a fotossíntese de *Gracilaria lemaneiformis*, bem como a variação de substâncias absorventes de UV em tratamentos com distintas concentrações de N e expostas à PAR, PA e PAB. Esses trabalhos estimaram a síntese de compostos fotoprotetores (MAAs), e também analisaram o rendimento do aparato fotossintetizante dessas algas. Entretanto, nenhum deles verificou efeitos dessa interação dos dois fatores sob o DNA e tampouco observaram a expressão gênica diferencial de genes possivelmente relacionados com respostas de fotoproteção. Nesta tese, em diferentes tratamentos com *G. tenuistipitata*, foram adotadas estas abordagens em alguns dos experimentos, os quais foram planejados para a detecção dos níveis de saturação de suprimento de N na síntese de pigmentos e substâncias fotoprotetoras, além de estudos com doses e intensidades de radiação UV, analisando os efeitos da reciprocidade de tratamentos de radiação UV na fotossíntese e estímulo a MAAs de *G. tenuistipitata*. Outra abordagem foi feita para análise da aclimação de *G. tenuistipitata* a diferentes tipos de radiação em períodos curtos de até 48 h. Os resultados observados neste trabalho permitiram uma análise aprofundada e abordando diferentes estratégias na fotoproteção de *G. tenuistipitata*, com relação ao metabolismo de C e N, às substâncias filtradoras de radiação, aos possíveis sistemas antioxidantes, aos danos no DNA e ainda

às respostas integradas com relação à fotossíntese e ao crescimento dessa macroalga rodófito tropical.

4.2. Saturação do suprimento de N em *G. tenuistipitata*

O tratamento de *G. tenuistipitata* com concentrações crescentes de suprimento de N resultou num valor de K_m para o total de Cla de 0,016 mM de NO_3^- . Em suprimento de 0,03 mM de NO_3^- já seria obtida a saturação desse pigmento, o qual não apresentou variação com maior suprimento de N. Os valores entre 1,64 e 1,84 mg de Cla por g de massa seca de alga obtidos sob tratamentos com pelo menos 0,25 mM de NO_3^- resultam em um valor médio de 1,74 mg de Cla, similar ao valor obtido com o ajuste de Michaelis-Menten, que indicou $V_{\max}$ valendo 1,76 mg de Cla por g de massa seca de alga. Outras algas também apresentaram o padrão conservado desse pigmento sob tratamentos com radiação UV e N, como o caso de *Grateloupia lanceola*, cujos totais de Cla variaram ao redor de 1 mg por g de MS de alga, e somente em situações com suprimento de 0 mM de NH_4^+ , houve redução do total de Cla após 10 dias, independentemente do tratamento de radiação (Huovinen *et al.*, 2006). No caso de *Porphyra* spp., o conteúdo de clorofila foi praticamente constante em tratamentos com diferentes suprimentos de N, se mantendo entre 1,06 e 2,21 mg por g de MS no caso de *P. leucosticta* e entre 2,64 e 3,49 mg por g de MS no caso de *P. umbilicalis* (Korbee *et al.*, 2005a). Apenas quando essas algas foram tratadas com 0 mM de NH_4^+ o total de clorofila foi menor do que o observado para as algas supridas com 0,3 mM de NH_4^+ . Para uma terceira espécie de *Porphyra* (*P. columbina*), foi observado que o tratamento com diferentes radiações não afetou o conteúdo de Cla dessa alga mantida em 0,3 mM de NH_4^+ , a qual apresentou valores entre 0,5 e 1,5 mg de pigmento por g de MS (Korbee-Peinado *et al.*, 2004).

Gracilaria tenuistipitata cultivada sob diferentes condições nutricionais sob tratamento PAB apresentou os carotenoides anteraxantina, zeaxantina, β -caroteno e luteína, sendo que a zeaxantina sempre foi o carotenoide majoritário. Os resultados observados neste trabalho diferem do observado por Carnicas *et al.* (1999), que não encontraram a presença de anteraxantina nessa mesma espécie em experimentos com aclimação a altas e baixas intensidades de irradiância PAR. A presença de anteraxantina passou a ser reportada em algas vermelhas após o trabalho de Brown & McLachlan (1982), e a hipótese da presença de um ciclo das xantofilas nessas macroalgas rodófitas passou a ser considerada desde então. Entretanto, apesar de ter

sido observada a presença de três diferentes xantofilas (antheraxantina, zeaxantina e violaxantina) em diferentes espécies do gênero *Gracilaria* (Schubert *et al.*, 2006), a ocorrência de um ciclo de xantofilas foi evidenciado somente em *G. birdiae* por Ursi *et al.* (2003), uma vez que nesse trabalho foram feitos experimentos que permitiram a detecção da interconversão entre os três tipos de carotenoides nessa alga. No caso de *G. tenuistipitata*, não foi observada a ocorrência de violaxantina, o que impede que um ciclo de xantofilas completo possa ser sugerido para essa espécie. Entretanto, é possível que as condições dos tratamentos não privilegiassem a epoxidação da zeaxantina para violaxantina, de modo que esse composto não fosse observado. Ou então, é possível que *G. tenuistipitata* possua um ciclo de xantofilas truncado, com a presença apenas de epoxidação e de-epoxidação entre antheraxantina e zeaxantina, tal como sugerido para *G. gracilis* (Rmiki *et al.*, 1996).

A relação dos carotenoides e o suprimento de N apontou que os diferentes tipos responderam de maneira distinta: enquanto que zeaxantina (majoritário) não variou com diferentes suprimentos de N, os outros três carotenoides observados em *G. tenuistipitata* tiveram seu conteúdo diminuído com os tratamentos em concentrações de NO_3^- menores do que 0,25 mM. O valor de K_m para o conteúdo de zeaxantina foi de 0,01 mM de NO_3^- , enquanto que no caso de antheraxantina e luteína, a concentração de NO_3^- referente a metade da saturação foi de 0,05 mM NO_3^- . É interessante considerar que quando expostas a 0,5 mM NO_3^- , as algas apresentaram já a produção de valores máximos de conteúdos de carotenoides.

O suprimento de N causou uma clara alteração no aparato fotossintetizante, evidenciada por variações do rendimento quântico ótimo em diferentes concentrações de N, para algas expostas à PAB. Nas concentrações menores de 0,5 mM NO_3^- , após 7 dias, os valores de rendimento estiveram menores do que no início, e os valores de rendimento para suprimentos maiores ou iguais a 0,5 mM de N foram similares entre os diferentes tratamentos. Este resultado implica que na ausência de N, sob tratamento de PAB, possivelmente ocorre a degradação ou inativação de centros de reação (CRs), sem alterar propriamente as estruturas dos mesmos. Isso pode ser dito uma vez que o parâmetro F_v/F_m reflete o potencial máximo de capacidade de transferência de elétrons do conjunto de CRs desse aparato fotossintetizante. Houve um reflexo nos valores de eficiência fotossintetizante, embora a irradiância de saturação não tenha variado, e a amplitude de variação de ETR_{max} foi menor do que a da eficiência fotossintetizante. A menor variação nos valores de ETR_{max} pode ter resultado do funcionamento quase que

pleno dos CRs que restaram. A degradação de alguns CRs pode ser relacionada com a degradação dos pigmentos acessórios (carotenoides que tiveram menores concentrações como observado acima, e possivelmente PE, que seria alocada como fonte de N), que resultaria em menos energia transferida para o CR, ainda que o potencial de ETR_{max} de cada CR tenha sido mantido. Essa idéia de degradação do aparato fotossintetizante com a ausência de N também provém dos resultados de NPQ, uma vez que a capacidade de dissipar energia diminuiu conforme foi reduzido o aporte de N para as algas, refletindo a presença de menos CR em algas submetidas a tratamentos com menos NO_3^- .

O estímulo à síntese de MAAs por radiação UV teve total relação com a disponibilidade de N no meio de cultivo para *G. tenuistipitata*. Quando cultivada sob concentrações crescentes de N e PAB, o total de MAAs após 7 dias foi maior do que a quantidade basal de algas pré-aclimatadas à PAR somente para amostras que receberam concentração de NO_3^- na água do mar maior ou igual do que 0,1 mM. Entretanto, o grande aumento no total de MAAs foi detectado para algas supridas com no mínimo 0,25 mM de NO_3^- . O maior total de MAAs foi detectado após 7 dias de cultivo de *G. tenuistipitata* em 0,5 mM de NO_3^- . Uma dependência da presença de N também foi verificada para *Asparagopsis armata* cultivada em tanques (Figuerola *et al.*, 2008). Porém, nesta macroalga, o suprimento foi feito com fluxo de amônio, e os maiores totais de MAAs (numericamente similares ao observado para *G. tenuistipitata*) foram obtidos em algas expostas a fluxos de até 0,1 mM de NH_4^+ . Fluxos maiores desse composto resultaram em diminuição progressiva da síntese de MAAs, em um possível efeito inibitório do excesso de N para a síntese dessas substâncias em *A. armata*. Além disso, a redução de MAAs com essas concentrações crescentes de NH_4^+ foi acompanhada de aumento no total de rendimento de ágar em *A. armata* (Figuerola *et al.*, 2008).

É interessante notar que os totais de MAAs de *G. tenuistipitata* estiveram dentro de uma variação de dados similares ao observado para as algas de região entremarés, incluindo *G. chilensis* (Huovinen *et al.*, 2004). Dessa forma, é possível que o período de permanência elevado em laboratório não tenha afetado a capacidade de síntese de MAAs de forma significativa em *G. tenuistipitata*, e que, portanto, seus totais de MAAs sejam próximos ao observado em talos advindos da natureza, ainda que essa hipótese permaneça aberta, passível de ser testada.

Gracilaria tenuistipitata faz parte do segundo grupo fisiológico referido por Hoyer *et al.* (2001), isto é, é uma macroalga com a presença já de MAAs basais, os

quais podem ser estimulados de acordo com as condições fisiológicas. Outras macroalgas como *Grateloupia lanceola* e *Porphyra* spp., fazem parte do primeiro grupo, que contém quantidades elevadas iniciais de MAAs, que não são estimuladas por radiação UV (Huovinen *et al.*, 2006; Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a). De acordo com Hoyer *et al.* (2002), ainda podem ser designados dentro desse grupo os organismos que sejam sensíveis à radiação como fator estimulante à síntese de MAAs. *Gracilaria tenuistipitata* tem seu total de MAAs aumentado por tratamentos contendo radiação PAB, conferindo uma resposta do tipo “a”, conforme Hoyer *et al.* (2002). O estímulo à síntese de MAAs também foi observado para *Devalerae ramentaceae*, quando exposta à PAB (Karsten *et al.*, 1999), relacionando essa síntese à profundidade da alga na coluna de água. Entretanto, esses autores ressaltam que a variação de MAAs é espécie específica, inclusive porque outras algas tiveram seus MAAs aumentados por tratamento contendo apenas PAR, como o caso de *Chondrus crispus* (Karsten *et al.*, 1998), ou então não foram afetados pela presença de radiação UV (Sinha *et al.*, 2000).

Desta forma, em virtude dos resultados obtidos para os produtos analisados (clorofila, carotenoides e MAAs), foi decidido por manter os cultivos posteriores sob tratamentos de 0, 0,1 e/ou 0,5 mM NO₃⁻. A primeira situação compreende a ausência de suprimento de N, no segundo já se forneceu uma concentração na qual os máximos de alguns carotenoides (anteraxantina e luteína) poderiam ser obtidos, e ainda foi o valor de K_m observado para o total de MAAs e para o total de β-caroteno. Já a terceira concentração é aquela na qual os cultivos prévios vinham sendo feitos com a alga, na qual também já foi registrado o valor máximo de produção de MAAs, carotenoides e clorofila, e o rendimento quântico ótimo.

4.3. Doses e intensidades: reciprocidade em *G. tenuistipitata*

Este é o primeiro trabalho que relata efeitos de doses e intensidades de radiação UV para uma macroalga. As abordagens presentes na literatura se referem à *Thalassiosira pseudonana* (Cullen & Lesser, 1991) e a outras diatomáceas (Rech *et al.*, 2005).

Os cultivos de *G. tenuistipitata* sob diferentes tratamentos de doses e intensidades de radiação UV, em condições ótimas de suprimento de N, não resultaram em alterações significativas no total de Cla. Esse resultado evidencia que dentre os pigmentos fotossintetizantes de *G. tenuistipitata*, a clorofila poderia ser aquele mais estável em comparação com os pigmentos acessórios PE e PC. Estes dois pigmentos

acessórios compõem o ficobilissomo (Grossman *et al.*, 1993) e poderiam atuar na proteção da clorofila. O trabalho de Rech *et al.* (2005) com diferentes diatomáceas tratadas sob a mesma dose de UV obtida por exposição a tempos diferentes de intensidades distintas de radiação UV também indicou a ausência de sensibilidade da clorofila às doses e intensidades de radiação UV (Rech *et al.*, 2005).

O aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata* pareceu responder a curto prazo (3 dias) à intensidade de radiação disponibilizada, uma vez que os valores de rendimento quântico ótimo, α e ETR_{max} foram menores em algas que receberam intensidade “4i” de PAB em comparação com as que foram irradiadas com “2i” dessa radiação. Não foram verificados efeitos das doses e intensidades de PA ou PAR no F_v/F_m de *G. tenuistipitata*, mas os valores de ETR_{max} em amostras tratadas com PA foram menores do que os verificados em tratamentos com PAR. Além disso, após 7 dias, os valores de ETR_{max} foram maiores com maiores intensidades de radiação, como consequência da aclimação do aparato fotossintetizante. Após 7 dias, os valores de F_v/F_m das amostras expostas a PAB foram similares aos obtidos em tratamentos com PA, os quais por sua vez foram similares aos obtidos em PAR, como efeitos da aclimação. Esse efeito de redução do F_v/F_m após 3 dias se refletiu na diminuição da capacidade da alga exposta à PAB de dissipar excesso de energia, visto que os valores de NPQ nas amostras tratadas com essa radiação foram menores do que os observados para amostras que receberam intensidades e doses de PAR e PA. Após 7 dias, a capacidade de dissipar energia já foi similar em todos tratamentos, independentemente da dose e da intensidade de radiação. A aclimação de *G. tenuistipitata* foi observada já em 7 dias, enquanto que no caso de *Ulva rigida* foi observada a aclimação após 20 dias do crescimento sob tratamentos contendo radiação UV (Altamirano *et al.*, 2003a).

Uma abordagem em diatomáceas feita por Rech *et al.* (2005) mostrou que o tempo de exposição à de radiação foi responsável por reduzir o crescimento em diatomáceas, sendo que o menor crescimento foi reportado quando as diatomáceas permaneceram maior tempo em contato com a radiação UV, mesmo que em intensidade menor. O rendimento quântico ótimo foi afetado de acordo com a espécie analisada, e de modo geral, as diatomáceas tiveram seu aparato fotossintetizante protegido contra a radiação UV, apesar dos efeitos nocivos de tal radiação no PSII. Em *G. tenuistipitata*, uma tendência geral de diminuição dos parâmetros fotossintetizantes foi observada com a presença de PAB, com maior redução em tratamentos com maior intensidade de radiação, independentemente do tempo de exposição diário. Uma resposta similar foi

observada para a diatomácea *Thalassiosira pseudonana* por Cullen & Lesser (1991). Para doses similares de UVB, a exposição em menos tempo a uma intensidade mais alta dessa radiação causou mais danos à fotossíntese dessa diatomácea do que a exposição de uma intensidade menor por mais tempo. Adicionalmente, esses autores ainda verificaram que essa diatomácea exposta a cultivos limitados em NO_3^- foram mais sensíveis à radiação UVB do que quando supridas com NO_3^- , num padrão de resposta similar ao observado para *G. tenuistipitata* (ver discussão a respeito de limitação de nutrientes abaixo). Quando o efeito da radiação UV se dá independentemente da intensidade, relacionado à dose, os resultados podem ser generalizados, sem preocupar-se com o tempo de exposição. Para as respostas obtidas na fotossíntese de *G. tenuistipitata*, a resposta também foi relacionada com a intensidade em vez da dose, como observado em *T. pseudonana* por Cullen & Lesser (1991).

O estímulo da síntese de MAAs de *G. tenuistipitata*, considerando a sua totalidade, foi bastante evidente na análise de doses e intensidades de UV. O experimento de reciprocidade corroborou os resultados encontrados nos demais experimentos, com estímulo maior por radiação PAB e PA do que PAR, e ainda que as algas que receberam espectro completo tiveram mais MAAs do que aquelas que somente receberam PA. Porém, essa resposta ficou bem evidente com o aumento da dose diária recebida de UVA e UVB pelas algas. Quando cultivadas em PAB durante 3 dias, o valor de MAAs foi maior do que os demais tratamentos, seja essa dose diária de PAB obtida por intensidade “2i” ou “4i” durante 12 ou 6 h respectivamente. Esse efeito permaneceu similar após 7 dias experimentais, evidenciando que a dose acumulada de radiação não teve efeitos para o estímulo adicional de MAAs em *G. tenuistipitata*. Esse resultado confirmou que a dose diária maior de PAB foi responsável pelo estímulo de MAAs. Tal efeito cumulativo de radiação pode ter sido eficaz no caso de tratamentos com PA, uma vez que o total de MAAs para algas submetidas à maior dose de PA (obtidos com intensidade “2i” durante 12h) foi similar aos maiores conteúdos que foram verificados em PAB. Essa síntese de MAAs dependente da qualidade de luz e da dose total diária de radiação (independentemente da intensidade) é descrita pela primeira vez em uma macroalga na literatura. Houve claramente um efeito de reciprocidade para estimular a síntese de MAAs em *G. tenuistipitata*, conforme discutido por Cullen & Lesser (1991).

O conteúdo de carotenoides de *G. tenuistipitata* submetida a diferentes doses e intensidades de radiação UV apresentou poucas variações. O conteúdo de anteraxantina

e luteína se mantiveram similares em todos tratamentos, comparando-se os resultados em três dias. Este foi o único experimento que mostrou resposta diferencial dos carotenoides à UV para *G. tenuistipitata*, indicando que após 3 dias, a radiação PAB causou aumento na quantidade de zeaxantina em comparação com PA ou PAR, e houve um estímulo à síntese dessa substância a valores que atingiram mais de 0,3 mg de zeaxantina por g de MS. É possível que o estímulo à síntese de zeaxantina que foi verificado nas amostras tratadas com PA ou PAB, esteja relacionado ao processo de fotoaclimação ou fotoproteção das algas a estes tratamentos. Infelizmente, a perda dos dados das amostras após 7 dias impede que isto seja efetivamente concluído. Carnicas *et al.* (1999) propuseram a existência de dois pools de zeaxantina, um relacionado com a captação de luz e o outro com a fotoproteção (dissipação do excesso de energia). Considerando que a fotossíntese (um indicador do estado fisiológico geral da alga) foi recuperada até atingir valores similares ao início do experimento, algumas possibilidades com respeito ao total de zeaxantina após 7 dias poderiam ser consideradas: i, é possível que o total de zeaxantina permanecesse elevado para sustentar a eficiência do processo, com a utilização do pool relacionado à absorção de luz; ii, este aumento de zeaxantina tenha sido referente ao pool de fotoproteção contra radiação UV (em 3 dias), e como aos 7 dias outras substâncias (MAAs) foram produzidas para a fotoproteção, altas quantidades desse carotenoide seriam desnecessárias e seu total voltaria aos níveis basais; ou iii, que o total de zeaxantina permanecesse elevado e estivesse atuando em sinergia positiva com os MAAs.

4.4. Efeitos integrados do suprimento de N e a radiação UV no metabolismo e fotoproteção de *G. tenuistipitata*

Nesta parte do trabalho, uma análise mais profunda da interação entre o suprimento de N e o tratamento com distintas qualidades de radiação pôde ser realizada. Numa parte das análises, foi considerada uma abordagem sobre o metabolismo de carbono de *G. tenuistipitata*. Esse processo parece ser um processo altamente protegido de quaisquer danos pelos tratamentos de radiação UV realizados, principalmente quando a radiação UVA está incluída nos tratamentos. Num primeiro momento, são consideradas as análises de composição de elementos internos em *G. tenuistipitata*, sendo ausentes quaisquer variações dos conteúdos de C dessa alga. Os valores de C:N de *G. tenuistipitata* evidenciaram condições de limitação de N, tal como sugerido por García-Sánchez *et al.* (1993), que consideram os valores de C:N maiores que 15 como

indicadores de carência de N, e, consequentemente, além de diminuição no total de N interno, também ocorre diminuição no total de proteínas solúveis. No presente trabalho, a proporção entre esses elementos excedeu 15 somente em tratamentos com limitação de N, independentemente da radiação à qual as algas tenham sido expostas. Quando o suprimento de N foi de 0,5 mM NO_3^- , o total de C, N e a proporção C:N foram constantes, seja em tratamento PAR, PA ou PAB. Neste caso, os valores de C:N estiveram variando entre 7 e 10.

A outra forma de análise relativa ao carbono em *G. tenuistipitata* consistiu em verificar a incorporação desse elemento por meio da atividade específica da AC. Essa atividade não foi alterada de forma consistente pela presença de radiação PAR e PAB ou pela limitação por N. Já foi reportado que *G. tenuistipitata* possui tanto AC externa quanto interna (Haglund *et al.*, 1992), mas neste trabalho somente foi possível obter a medida da atividade total dessa enzima, cujos valores foram similares aos verificados por Haglund & Pedersén (1992) quando as algas foram incubadas em aeração com ar constante, como feito neste trabalho. Esses autores observaram que quando a fonte de C é incrementada, há também uma redução da atividade específica de AC, e quando o ar usado para a aeração estava isento de CO_2 , a atividade de AC aumentou. Consequentemente, a concentração de CO_2 influencia a atividade de AC em *G. tenuistipitata*. Os efeitos do suprimento de CO_2 integrados ao tratamento com radiação UV ainda não foram estudados em *G. tenuistipitata*, mas Figueroa & Viñegla (2001) sugerem que a variação na atividade de AC poderia ser resultante de suprimento ou não de esqueletos de carbono para a formação de substâncias internas em macroalgas, como compostos absorventes de UV ou mesmo proteínas do PSII. Entretanto, como não houve estímulo à atividade de AC em *G. tenuistipitata* por PAR ou PAB, é possível que os esqueletos internos já existentes tenham sido suficientes para prover de proteínas e aminoácidos ao sistema de fotoproteção da espécie (como, por exemplo, a indução da síntese de MAAs por PAB).

Os trabalhos realizados considerando a atividade de AC em diferentes espécies de macroalgas expostas a tratamentos com UV apontam uma variação espécie-específica da atividade de AC (Huovinen *et al.*, 2007). A incorporação de C poderia influenciar a incorporação de N, como visto por Figueroa & Viñegla (2001) para três algas distintas. Entretanto, a modulação desse processo por UV (considerando as doses deste trabalho) parece não ocorrer em *G. tenuistipitata*. Esse parâmetro pode ser analisado a partir da atividade de AC e a consequente quantidade de C e N

incorporados. O efeito do suprimento de N na atividade de AC ainda não foi reportado na literatura para *G. tenuistipitata*. Porém, como foi verificado um efeito sobre o conteúdo de PS do suprimento de N, é bem possível que as diferenças observadas entre os tratamentos (aumento em cultivos sob 0,1 mM NO₃⁻ após 3 e 7 dias, independentemente da radiação utilizada, ou mesmo o aumento sob 0 mM NO₃⁻ em algas expostas a PAB) seja decorrente da variação de PS e não da atividade em si da enzima AC em *G. tenuistipitata*.

O efeito de redução de PS em *G. tenuistipitata* submetida a distintas concentrações de NO₃⁻ foi verificado anteriormente por García-Sánchez *et al.* (1993), sendo que as algas expostas a menores concentrações de N (0,1 mM NO₃⁻) tiveram menores conteúdos dessas proteínas por MF do que as cultivadas em 1 mM de NO₃⁻. Tal como observado por esses autores, neste trabalho o total de PS foi constante em cultivo sob concentração suficiente de N (0,5 mM NO₃⁻) durante os 7 dias experimentais, e também foi detectada uma queda no total dessas proteínas já após 3 dias e pronunciada após 7 dias, tanto quando as algas receberam menos NO₃⁻ (0,1 mM) quanto quando não receberam suprimento deste nutriente. Essa variação acompanhou o pool interno de N, como já fora sugerido por García-Sánchez *et al.* (1993).

Durante os experimentos desta tese, as algas foram submetidas à aeração contínua e intensa, de modo que sempre estivessem circulando dentro do frasco e pudesse ocorrer o suprimento suficiente de CO₂ para a fotossíntese de *G. tenuistipitata*, de modo a não consistir num fator limitante. Outro aspecto a considerar-se é a unidade da atividade de AC. No caso de *G. tenuistipitata*, quando a atividade específica foi calculada, foram detectados efeitos dos fatores isoladamente (tempo, concentração de N e tipo de radiação), enquanto que no caso em que foi considerada a atividade pela massa fresca, foi observado efeito apenas do tempo e da concentração de N. Este trabalho optou por apresentar os dados em REA por mg de PS, e os valores encontrados foram de acordo com Haglund *et al.* (1992). Os trabalhos que comparam os efeitos da radiação UV sobre a atividade de AC apresentam os dados em REA por MF de algas. No caso de *G. tenuistipitata*, os dados de atividade de AC nessa unidade também não apresentaram variações consistentes em decorrência da ausência de N ou tratamento com PAR ou PAB, de modo que se preferiu apresentar os valores por mg de PS, tal como realizado por Haglund *et al.* (1992).

O conteúdo pigmentar relacionado ao suprimento de N já foi investigado em *G. tenuistipitata* previamente. García-Sánchez *et al.* (1993) estudaram os efeitos do cultivo

dessa alga sob concentração alta (1 mM) e baixa (0,1 mM) de NO_3^- suprido no meio de cultura. Entretanto, esses autores não investigaram os efeitos integrados do suprimento de N com a radiação UV. Houve um efeito muito evidente do suprimento de N no conteúdo pigmentar de *G. tenuistipitata*, sendo que o pigmento preponderante foi PE, seguido de PC e depois, por Cla (García-Sánchez *et al.*, 1993). Esse mesmo tipo de resultado foi verificado neste trabalho, com diminuição do conteúdo de PE, seguido do conteúdo de PC, e posteriormente, o conteúdo de Cla, quando as algas receberam menos N (0,1 mM) ou foram cultivadas em ausência de suprimento de NO_3^- . Efeitos adicionais da radiação UV (PAB) foram verificados para o conteúdo de PE nessas algas tratadas com essas concentrações de NO_3^- , uma vez que após 7 dias de experimento, o total desse pigmento nas algas que receberam PAB foi menor do que naquelas expostas a PAR. Um aspecto adicional na análise dos pigmentos em *G. tenuistipitata* submetida a distintas concentrações de N e radiações pode ser ressaltado na Tabela 4.2. Pela proporção entre o total de pigmentos no final (Tempo 7) em relação ao início do experimento (Tempo 0), pode-se verificar que nos tratamentos com 0 ou 0,1 mM de NO_3^- , houve redução a mais da metade do valor inicial de PE, PC e PS (valores de proporção menores do que 0,5). Em contrapartida, os parâmetros de proporção do final em relação ao inicial foram sempre maiores do que 0,6 (e ao redor de 1) para algas nutridas com 0,5 mM de NO_3^- , sendo que, no caso das ficobiliproteínas, os tratamentos com PAB sempre causaram proporção menor do que os com PAR ou PA (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Proporção entre os valores médios de C:N, dos pigmentos fotossintetizantes e do total de PS de *Gracilaria tenuistipitata*. Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.

Variável	Radiação	Tempo 7 / Tempo 0			[0,5 mM]/[0 mM]		
		[NO_3^-] (mM)			Tempo (dias)		
		0	0,1	0,5	0	3	7
C:N	PA	2,04	2,23	0,99	0,94	0,54	0,45
	PAB	1,87	1,94	0,86	0,97	0,55	0,44
PE	PAR	0,39	0,48	0,76	0,94	1,55	1,85
	PAB	0,03	0,15	0,65	0,79	1,74	15,62
PE	PA	0,28	0,35	1,29	0,96	1,60	4,48
	PAB	0,04	0,07	0,93	1,13	1,94	24,92
PC	PAR	0,40	0,45	0,89	1,00	1,43	2,24
	PAB	0,26	0,28	0,63	0,83	1,34	1,99
PC	PA	0,46	0,47	0,97	1,13	1,40	2,40
	PAB	0,45	0,34	0,85	1,24	1,40	2,33
PS	PAR	0,42	0,46	0,89	1,02	1,69	2,15
	PAB	0,38	0,37	1,08	0,81	1,51	2,32
Cla	PA	0,56	0,55	0,72	1,12	1,22	1,44
	PAB	0,68	0,60	1,01	0,97	1,14	1,44

Outra abordagem analisada na Tabela 4.2 consiste na proporção entre o total de pigmentos ou PS quando as algas foram supridas com N (0,5 mM NO_3^-) em relação a quando não houve adição de NO_3^- . O resultado mais destacável nessa análise conjunta foi o total de PE. Em amostras submetidas à PAB, em quaisquer dos experimentos realizados quando supridas de 0,5 mM de NO_3^- , houve uma mobilização de N para a formação desse pigmento, sendo o total de PE 15 vezes maior em algas tratadas com 0,5 mM do que naquelas que não receberam NO_3^- . No outro experimento, esse valor atingiu cerca de 25 vezes mais PE em algas supridas com N do que naquelas que não receberam esse suprimento. Mesmo no caso de algas tratadas com PA, já houve um aporte de formação de cerca de 4,5 vezes mais PE em algas supridas por 0,5 mM de NO_3^- do que naquelas que estiveram cultivadas sob 0 mM NO_3^- . Esses dados permitem concluir que em condições com alto suprimento de N e em presença de UVB, a redução do conteúdo de PE é relativamente muito menor do que em condições de limitação de N. Além disso, a radiação UV estimulou o direcionamento de N para a formação de PE, que, além de antena da fotossíntese, teria um papel de fotoproteção contra radiação UV, e em um nível maior quando as algas foram tratadas com PAB. É possível ainda que em presença de UVB e sob 0 mM de NO_3^- , tenha ocorrido uma destruição mais rápida dos compostos celulares, e dessa forma o N das PE poderia ser direcionado para a

manutenção da homeostase celular. Nesse caso, a PE poderia estar atuando como dissipador de excesso de energia, tal como sugerido por Sinha *et al.* (1995). O papel da ficoeritrina como composto fotoprotetor contra radiação UVB foi sugerido por Ayres (2009). No caso das algas não supridas com N, esse pigmento poderia estar sendo degradado por causa da radiação UV no lugar de outras substâncias mais essenciais para a célula. É possível também que quando as algas não foram supridas com N, a PE seja fonte de N para síntese de outros compostos mais eficazes para a fotoproteção, como possíveis MAAs, visto que houve correlação negativa entre o conteúdo de ficobiliproteínas e o total de MAAs em *G. tenuistipitata*, quando exposta a diferentes suprimentos de N. García-Sánchez *et al.* (1993) sugeriram que as PE tenham sido utilizados como fontes de N para *G. tenuistipitata* exposta a tratamento com déficit de N, antes mesmo do que a Rubisco.

É possível ainda que a radiação UVB tenha um efeito de empacotamento nos pigmentos de *G. tenuistipitata*, tal como reportado para PE de *Porphyra umbilicalis* (Aguilera *et al.*, 1999). Esses autores sugerem ainda que a radiação UVA tenha causado um relaxamento desse empacotamento, permitindo uma melhor absorção da radiação por parte dos mesmos. Porém os pigmentos de *P. umbilicalis* não variaram em quantidade, o que foi observado para *G. tenuistipitata* sob tratamentos com radiação UVB.

Outros fatores também apresentaram efeitos significativos no conteúdo de PE, PC e Cla. O déficit de fósforo e o suprimento de C causaram variação no conteúdo desses pigmentos (García-Sánchez *et al.*, 1993; García-Sánchez *et al.*, 1994). O efeito do C nos pigmentos fotossintetizantes foi de estímulo à síntese dos mesmos quando as algas receberam aporte menor de C, enquanto que a limitação de P causou diminuição do total dos mesmos. A variação nos pigmentos fotossintetizantes esteve diretamente relacionada à variação dos parâmetros da fotossíntese, como sugerido por García-Sánchez *et al.* (1996b), que observaram maiores eficiências da fotossíntese em situações de conteúdo alto de ficobiliproteínas e Cla. Efeitos da qualidade de luz (entre 400 e 700 nm) foram verificados sob o conteúdo de Cla dessa alga quando exposta à radiação azul, a qual causou uma redução nesse montante em comparação com amostras expostas à radiação branca (Mercado *et al.*, 2002). Entretanto, os demais pigmentos acessórios não variaram em quantidade. Nesse experimento, os autores observaram uma diminuição na fotossíntese máxima de algas tratadas com radiação azul, possivelmente em consequência de alteração no fluxo de elétrons no aparato fotossintetizante ou

alteração de relação espacial entre os dois fotossistemas, sem relacionar diretamente essa diminuição na taxa de fotossíntese com o conteúdo pigmentar, que se manteve inalterado sob tais tratamentos. Mas essa redução da fotossíntese resultou em taxas de crescimento 75% menores em algas expostas à radiação azul do que para aquelas cultivadas sob radiação branca (Mercado *et al.*, 2002). Por outro lado, os pigmentos podem estar envolvidos em respostas de ajuste do aparato fotossintetizante, como observado em *Palmaria decipiens*, que teve distintas respostas de tratamentos com UV para seus pigmentos, sendo PE o primeiro alvo da radiação UV, antes da clorofila *a*. Além disso, a degradação de PE se deu em paralelo com a de PC, porque as proporções desses pigmentos não se alteraram (Pope *et al.*, 2002).

Huovinen *et al.* (2006) constatou que os pigmentos fotossintetizantes variaram de forma diferencial em *Grateloupia lanceola*, de modo que PE foi o pigmento mais afetado, seguido de PC e posteriormente Cla pelos tratamentos de combinação de UV e N (Huovinen *et al.* 2006). Porém, os autores desse trabalho observaram que a alta irradiância de PAR ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) acoplada a tratamentos de déficit de NH_4^+ foram suficientes para diminuir o conteúdo de PE (para 0 ou 0,1 mM NH_4^+), e de PC ou Cla em ausência de suprimento de NH_4^+ . Além disso, a presença adicional de radiação UV não resultou em aumento da degradação de PE como foi observado em *G. tenuistipitata*. Um aspecto adicional que Huovinen *et al.* (2006) testaram foi a capacidade de recuperação do conteúdo pigmentar de *G. lanceola* após 10 dias em baixa intensidade de PAR. Um aumento do total dos pigmentos dessa macroalga foi detectado apenas quando supridas com 0,3 mM NH_4^+ . As quantidades de pigmentos permaneceram baixas quando *G. lanceola* foi suprida com concentrações menores de NH_4^+ (Huovinen *et al.*, 2006). Esta resposta evidenciou o efeito do suprimento de N mais do que da quantidade de radiação que as algas tenham recebido para alterar a quantidade de pigmentos.

Outros trabalhos que apontam efeitos do suprimento de N no conteúdo pigmentar de macroalgas são os de Korbee-Peinado *et al.* (2004), Korbee *et al.* (2005a) e Davison *et al.* (2007). Em *Porphyra columbina*, foi detectada também uma redução no total de PE, PC e Cla em algas tratadas sob déficit de NH_4^+ (0 e 0,05 mM) em radiação PAB (Korbee-Peinado *et al.*, 2004). Em *P. leucosticta* e *P. umbilicalis*, a diminuição se deu principalmente no total de PE e PC, após 7 dias de exposição à PAB sob ausência de suprimento de NH_4^+ (Korbee *et al.*, 2005a). Em *Laminaria saccharina*, foi verificada redução de pigmentos fotossintetizantes em condições de déficit de N, sem efeito

adicional da radiação UV (Davison *et al.*, 2007). Esse efeito do suprimento de N também foi evidente em *G. tenuistipitata*, embora não tenha sido realizado um experimento posterior de recuperação em ausência de radiação UV (como feito por Huovinen *et al.*, 2006), e a intensidade de PAR aplicada foi cerca de três vezes menor. O trabalho de Korbee *et al.* (2005a) utilizou totais de irradiância UV similares ao observado neste trabalho, e o resultado de dano somente nos pigmentos acessórios foi similar. É possível que a intensidade maior de radiação usada seja responsável por degradar a integridade do ficobilissomo, enquanto que sob intensidades menores (cerca de $300 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), se nota a suscetibilidade dos pigmentos acessórios, sendo a clorofila mais protegida e conservada.

Nos experimentos realizados com *G. tenuistipitata*, é possível que os efeitos da radiação UV sobre a fotossíntese não tenham alterado a taxa de produção de ATP, uma vez que a captação de NO_3^- depende dessa substância. Há de se ressaltar, entretanto, que a captação direta de NO_3^- e a fixação de C não foram medidas, e essa observação acima resulta dos dados de rendimento quântico e N total interno. Esse tipo de efeito foi observado para uma comunidade de fitoplâncton por Fauchot *et al.* (2000). Uma variação na captação de NO_3^- poderia ser detectada em caso que o total interno de N diminuísse quando as algas receberam suprimento de $0,5 \text{ mM NO}_3^-$, o que não foi o caso neste trabalho com *G. tenuistipitata*.

O parâmetro de rendimento quântico máximo foi suscetível à ausência de N em *G. tenuistipitata*, tal como observado por Davison *et al.* (2007) em *Laminaria saccharina*, porém não houve redução desse parâmetro quando as algas foram expostas a altas concentrações de N. Adicionalmente, em *G. tenuistipitata*, a redução desse parâmetro ocorreu somente quando as amostras foram tratadas com radiação UV, considerando as comparações dos tratamentos em PAR x PAB e os tratamentos em PA x PAB. No tratamento sob condições ótimas de N ($0,5 \text{ mM}$), comparando tratamentos com as três qualidades de radiação (PAR, PA e PAB), somente houve redução significativa dos valores de F_v/F_m quando as algas foram expostas à PAB. Isso indica que possivelmente tenha ocorrido um dano nos centros de reação, como comentado acima e como sugerido para *L. saccharina* em limitação de N (Davison *et al.*, 2007). Esses autores ainda comentam que poucos estudos têm verificado a interação entre UV e N, e em microalgas, ocorre uma fotoinibição seguida de recuperação mais lenta do aparato fotossintetizante quando as algas estiveram limitadas por N (Litchmann *et al.*, 2002). Nas macroalgas *Macrocystis pyrifera*, *Chondrus crispus* e *Ulva lactuca*, ocorreu

redução de valores de rendimento quântico sob tratamentos com radiação UV, porém a recuperação em meio suprido de N foi completa após 5 dias (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2000).

O uso de interação de variáveis na investigação do dano ao aparato fotossintetizante de macroalgas tem aumentado nos últimos anos. Hanelt desenvolveu um modelo para explicar a fotoinibição dinâmica de macroalgas árticas, que foram expostas à alta intensidade de PAR por 2h e submetidas à recuperação em intensidades de 10 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A fotoinibição foi maior conforme maior a profundidade de ocorrência das algas analisadas, e a recuperação foi mais rápida em algas da zona mais rasa, relacionando a profundidade com o grau de fotoinibição e recuperação das algas (Hanelt, 1998). Resposta similar fora detectada por Dring *et al.* (1996) em um varrido de 13 espécies de macroalgas vermelhas. Um dos primeiros trabalhos a analisar dano e recuperação do aparato fotossintetizante em exposição à UV foi o de Gómez *et al.* (2001), no qual foi analisada a interação da temperatura com a radiação UV. Houve um efeito da alta intensidade de PAR para causar fotoinibição em *Gelidium pulchellum*, independentemente da presença da radiação UV. A fotoinibição foi maior em baixas temperaturas, e os autores explicam que a menor regulação da ativação da proteína D1 do PSII seria responsável por essa maior fotoinibição, e adicionalmente, não foi verificada recuperação completa em algas tratadas com baixo PAR em seguida à exposição a alta intensidade de PAR ou PAR+UV (Gómez *et al.*, 2001). Dring *et al.* (2001) analisaram a capacidade de fotoinibição em macroalgas e concluíram que a radiação PAR foi responsável por causar os danos no aparato fotossintetizante mais do que a radiação UV, diferentemente do que observado para *G. tenuistipitata* neste trabalho, na qual a fotoinibição maior ou menor dependeu do tipo de radiação à qual a alga esteve aclimatada previamente ao experimento de exposição à PAB e também ao suprimento de N, embora a exposição para causar dano não tenha sido feita com diferentes composições de radiação, apenas com PAB.

Além da temperatura atuando como reguladora da fotoinibição da fotossíntese, alguns trabalhos consideraram a integração entre N e UV para analisar esse parâmetro em experimentos de dano e recuperação do aparato fotossintetizante. As estratégias de resposta à radiação UV em algas indica que distintas respostas podem ocorrer, tanto de aumento ou redução de sensibilidade à radiação UV. A sensibilidade à radiação UV foi aumentada em dinoflagelados expostos à déficit de N (Litchmann *et al.*, 2002), enquanto que *Dunaliella tertiolecta* teve seu sistema de reparo ativado sob condições de

limitação de N combinada com tratamento de radiação UV (Shelly *et al.*, 2002). A exposição de *Grateloupia lanceola* à maiores intensidades de PAR e de PAR+UV resultou em fotoinibição dinâmica no caso de amostras supridas com N (0,3 mM NH₄⁺), ao passo que nas amostras com déficit de N, seja por exposição à alta intensidade de PAR ou PAR+UV, não houve recuperação do rendimento quântico dessas algas (Huovinen *et al.*, 2006). Esses autores observaram que a recuperação foi maior quando as algas estavam pré-aclimatadas à PAR+UV, sugerindo um impacto positivo da radiação UV no sistema de fotoproteção dessa alga quando nutrida adequadamente. No caso de *G. tenuistipitata*, as algas estiveram adaptadas por 7 dias à PAR, PA ou PAB e diferentes suprimentos de NO₃⁻, e o tratamento com o dobro de intensidade de PAB por meia hora causou uma redução consistente do rendimento quântico de *G. tenuistipitata*. A extensão do dano dependeu do tipo de radiação de aclimação e também da quantidade de N disponível, bem como do estado fisiológico dos CR de *G. tenuistipitata* no momento do experimento.

De modo geral, essa exposição ao dobro de PAB causou uma fotoinibição dinâmica do aparato fotossintetizante disponível no momento da exposição. As algas aclimatadas à PAR e PA tiveram redução similar no rendimento quântico efetivo independentemente do suprimento de N, porém a recuperação do aparato fotossintetizante em baixa intensidade de PAR foi mais acelerada em algas supridas com N do que naquelas com déficit de N.

O material aclimatado à PAB que foi exposto ao dobro de PAB já estava fotoinibido ao início do experimento, com CR inativos, sendo maior a fotoinibição inicial em algas com menos N. Mesmo assim, as algas já aclimatadas à PAB tinham o sistema de fotoproteção estimulado, e o dano foi menor, bem como a recuperação foi mais rápida, voltando aos mesmos níveis de rendimento de antes do início da exposição, o que indica que os CR inicialmente fotoinibidos não foram recuperados. Somente os CR inibidos pela exposição de meia hora foram recuperados no período subsequente de 2 h de permanência em baixa intensidade de PAR. O padrão de resposta das algas aclimatadas à PAB se repetiu nos dois experimentos em que essa resposta de dano e recuperação foi estimada. Em duas horas de recuperação sob baixa intensidade de PAR, os CR de *G. tenuistipitata* retornaram ao estado preliminar antes da exposição. Desta forma, é possível concluir que o estado preliminar das algas antes da exposição à alta intensidade de PAB permitiu que distintos padrões de resposta fossem obtidos, sendo que as algas aclimatadas à PAB foram as que menos se danificaram e mais depressa se

recuperaram (proporcionalmente em relação ao rendimento no início do experimento, que em alguns casos já era baixo). Possivelmente as algas sofreram aclimação à radiação PAB, desenvolvendo um mecanismo de defesa ao longo do tempo, como observado por Bischof *et al.* (1999) para *Alaria esculenta*, que teve redução no grau de inibição do aparato fotossintetizante após vários ciclos de exposição à UV e recuperação em baixa irradiância PAR. Os resultados cumulativos sobre os complexos antena de algas foram mais evidentes ao longo do tempo, causando um dano crônico, como sugerido por Bischof *et al.* (2000), em estudo com *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus*, nas quais houve redução dos valores de ETR_{max} com exposição das algas à UVB. Esse dano crônico seria reportado em *G. tenuistipitata* exposta à PAB, cujo valor de F_v/F_m foi menor após 7 dias, e, mesmo após a exposição à alta intensidade de PAB e recuperação sob baixa irradiância de PAR, não houve recuperação dos valores de rendimento a valores maiores do que os já inicialmente baixos.

A presença de N aumentou a resistência do aparato fotossintetizante de *G. tenuistipitata*, uma vez que os valores de ETR_{max} , α e F_v/F_m diminuíram após 7 dias de cultivo a 0 ou 0,1 mM de NO_3^- , quando cultivada sob PA ou PAB, sendo o efeito similar dessas duas radiações sobre o ETR_{max} e a eficiência fotossintetizante. Esses dados são resumidos na Tabela 4.2, na qual se observa que a manutenção das algas em PA ou PAB e em condições limitantes de N causou valores abaixo de 0,7 quando o valor dos parâmetros obtidos após 7 dias (tempo 7) foi dividido pelo valor médio obtido no início dos experimentos (Tempo 0). A irradiância de saturação da taxa de transporte de elétrons se manteve constante independentemente do suprimento de radiação ou N fornecido (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes de *Gracilaria tenuistipitata*. Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.

Variável	Radiação	Tempo 7 / Tempo 0			[0,5 mM]/[0 mM]		
		[NO_3^-] (mM)			Tempo (dias)		
		0	0,1	0,5	0	3	7
F_v/F_m	PAR	0,95	0,96	1,03	0,96	0,94	1,04
	PAB	0,58	0,60	0,96	0,95	1,16	1,59
F_v/F_m	PA	0,60	0,68	0,98	1,12	1,47	1,81
	PAB	0,30	0,41	0,88	1,12	1,38	3,30
α	PA	0,51	0,64	1,10	1,51	2,19	3,25
	PAB	0,49	0,51	1,02	1,59	1,60	3,29
ETR_{max}	PA	0,62	0,58	1,06	1,01	1,59	1,73
	PAB	0,57	0,52	1,00	1,03	1,43	1,80
I_k	PA	1,16	0,91	0,98	0,64	0,73	0,54
	PAB	1,16	1,03	0,99	0,64	0,92	0,54

Essa variação na eficiência da fotossíntese e na capacidade de transporte de elétrons do aparato fotossintetizante se refletiu também na menor capacidade de dissipar energia via NPQ pelo mesmo, quando as algas não receberam suprimento de N, após 7 dias. Esse efeito foi mais proeminente no NPQ de algas tratadas com PAB do que naquelas expostas à PA. No caso em que as algas receberam suprimento suficiente de N (0,5 mM NO_3^-), não ocorreram variações nos valores de ETR_{max} , α e I_k , sem efeitos da radiação UV. Entretanto, algum efeito no processo de dissipação de energia de *G. tenuistipitata* pode ter ocorrido sob PAB após 7 dias nessas condições, uma vez que os dados de NPQ foram menores nessa condição do que os observados para PAR e PA. Resultados similares de aumento de resistência de macroalgas sob tratamentos com suprimento de N otimizados foram reportados para *Porphyra umbilicalis*, *P. leucosticta* (Korbee *et al.* 2005a) e *P. columbina* (Korbee-Peinado *et al.*, 2004). Esses autores sugerem que o alto conteúdo de MAA ou outro processo envolvendo enzimas nitrogenadas esteja atuando para capacitar as algas a sobreviverem em condições de exposição à UV sob suprimento suficiente de N. O potencial dos MAAs para proteger o aparato fotossintetizante já foi sugerido por Karsten *et al.* (1999) em *Devalerae ramentaceae*, e também em *Gracilaria lemaneiformis* por Zheng & Gao (2009).

Os mesmos carotenoides verificados para a análise de saturação do suprimento de N e no experimento de doses e intensidades de UV foram observados nos cultivos de *G. tenuistipitata* sob três tratamentos de NO_3^- e em combinação com três tipos de

radiação (PAR, PA e PAB): anteraxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno. Quando foi feito o cultivo com distintos suprimentos de NO_3^- e diferentes qualidades de radiação, se detectou que o suprimento de NO_3^- somente interferiu para a diminuição do total de β -caroteno, após 3 dias e que essa quantidade permaneceu reduzida após 7 dias experimentais. Novamente, a violaxantina não esteve presente, o que sustenta que caso *G. tenuistipitata* possua um ciclo de xantofilas, este seria incompleto, relacionando apenas anteraxantina e zeaxantina. Somente em um tratamento houve variação complementar desses dois carotenoides, com aumento de zeaxantina em detrimento à diminuição de anteraxantina: com ausência de N e exposição das algas à PAB. O total de zeaxantina em 7 dias era 1,64 vezes maior do que no início, enquanto que um decréscimo de 20% foi observado para o total de anteraxantina após 7 dias (Tabela 4.4). Seguindo esse indício, a verificação da complementaridade entre anteraxantina e zeaxantina (epoxidação e depoxidação, um ciclo das xantofilas truncado) poderia ser feita com experimentos seguindo variações de intensidades de PAB ou mesmo a manutenção das algas em escuro.

A fim de uma verificação final da existência de um ciclo de xantofilas completo, *G. tenuistipitata* poderia ser cultivada em condições de baixa intensidade de PAR seguido de exposição às altas intensidades dessa radiação poderia auxiliar na detecção (ainda que em quantidades baixas) ou não de violaxantina, conforme o que foi realizado por Ursi *et al.* (2003) para *Gracilaria birdiae*. O presente trabalho já detectou anteraxantina em *G. tenuistipitata*, diferentemente do que foi observado por Carnicas *et al.* (1999). É possível que as condições utilizadas esses autores não tenham sido favoráveis ao acúmulo desse carotenoide. É interessante ainda considerar que o total dos demais carotenoides que foram encontrados por Carnicas *et al.* (1999) foi muito menor de maneira geral neste trabalho.

Tabela 4.4: Proporção entre os valores médios dos carotenoides de *Gracilaria tenuistipitata*. Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir do experimento 4.

Variável	Radiação	Tempo 7 / Tempo 0			[0,5 mM]/[0 mM]		
		[NO_3^-] (mM)			Tempo (dias)		
		0	0,1	0,5	0	3	7
Anteraxantina	PA	0,55	0,75	1,34	0,63	1,62	1,54
	PAB	0,80	0,67	1,15	1,02	2,54	1,47
Zeaxantina	PA	0,91	1,02	1,21	0,95	1,13	1,26
	PAB	1,64	0,91	1,60	1,14	1,19	1,11
Luteína	PA	0,65	0,65	1,06	0,39	0,54	0,63
	PAB	0,70	0,82	1,19	0,49	0,66	0,83
β -caroteno	PA	0,47	0,55	1,21	0,70	2,42	1,83
	PAB	0,42	0,34	0,95	0,97	1,79	2,23

Os MAAs de *G. tenuistipitata* foram estudados quimicamente por Cardozo (2007) e Cardozo *et al.* (2006). Esses autores reportaram a ocorrência de seis MAAs nessa espécie: palitina, asterina, palitinol, P-334, shinorina, e paliteno/usujireno. O presente trabalho foi capaz de detectar cinco destes MAAs: shinorina, P-334, palitina, asterina e palitinol, sendo que palitinol foi o MAA minoritário e em algumas condições não foi detectado. É possível que o sexto tipo (caso seja usujireno, que é derivado de porphyra-334, ver Figura 4.1 adiante) também estivesse presente no material usado neste trabalho, porém talvez em quantidades mínimas, o que tenha dificultado sua detecção pelo método de cromatografia em HPLC. Infelizmente, a qualidade da separação dos picos não foi sempre eficaz entre os diferentes experimentos. Nesses casos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de P-334 para a quantificação do total de MAAs, visto o fato que, quando houve separação eficiente dos picos, este MAA foi o majoritário em quaisquer condições que as algas tenham sido mantidas. *G. tenuistipitata* apresentou um total de MAAs basal, que foi estimulado pela presença de radiação UV. Este é o primeiro trabalho que trata com o estímulo à síntese de MAAs em radiação UV em uma macroalga tropical. O perfil de conteúdo dos diferentes tipos de MAAs de *G. tenuistipitata* foi similar ao observado para amostras de outra espécie do mesmo gênero (*Gracilaria chilensis*) por Huovinen *et al.* (2004), usando amostras coletadas diretamente do ambiente.

Os MAAs de *G. tenuistipitata* de modo geral foram estimulados pela presença de radiação UV no tratamento, tal como fora sugerido por Karsten *et al.* (1998) em

distintas macroalgas de diferentes regiões do globo terrestre e por Karsten *et al.* (1999) em estudo detalhado com *Devaleraea ramentaceae*. Um estímulo à síntese dessas substâncias em *G. tenuistipitata* foi observado com a presença de PAR e UVA, e foi incrementado com a presença adicional de UVB a esse tratamento.

Entretanto, cada tipo de MAA pode responder de uma maneira diferente às distintas radiações. Enquanto que shinorina de *Chondrus crispus* foi estimulada por UV, outros MAAs foram induzidos pela presença de PAR (Karsten *et al.*, 1998). Essa resposta (estímulo por PAR) não foi detectada em *G. tenuistipitata*, porém o efeito de cada radiação sobre o conteúdo de MAAs separadamente foi distinto. A radiação PA causou aumento no total de shinorina, P-334, palitina, asterina e palitinol em comparação com as algas que receberam PAR, e o mesmo foi verificado como o tratamento de PAB. Entretanto, o tratamento de PAB causou um aumento ainda maior somente no total de shinorina e no de P-334 após 7 dias de tratamento.

Figura 4.1: Esquema da síntese dos MAAs. Aqueles encontrados neste trabalho estão marcados com o tracejado. Figura modificada a partir de Carreto *et al.*, 2005.

A relação da radiação UV e da disponibilidade de N foi comprovada nos experimentos realizados com MAAs de *G. tenuistipitata*. Essa dependência é evidenciada quando se analisa as vias de síntese dessas substâncias (Figura 4.1). Os cinco MAAs encontrados em *G. tenuistipitata* possuem dois N em sua estrutura, e são formados a partir de um precursor comum, a micosporina-glicina, com a adição de glicina (ou aminação direta), treonina ou serina para a formação de palitina, porphyra-334 e shinorina. O palitinol é derivado da shinorina e a partir destes dois, se pode formar a asterina-330 (Figura 4.1).

Quando tratada com suprimento de N suficiente (0,5 mM NO_3^-), foi possível detectar o padrão discutido acima, de efeito integrado de radiação UVA e UVB para estímulo à síntese dessas substâncias. Esse aspecto é ressaltado quando se analisa a proporção de aumento de MAAs totais no tempo 7 em relação ao tempo 0 nos dois experimentos (Tabela 4.5). Entretanto, a ausência ou diminuição de N (0 ou 0,1 mM NO_3^-) alterou o comportamento de estímulo à síntese. No experimento comparando a exposição à PAR e PAB, foi detectado algum aumento da síntese de MAAs totais no tratamento de PAB, em cerca de 3,3 vezes desde o início até o dia 7 no suprimento de 0,1 mM NO_3^- e 1,9 vezes mais MAAs em PAB comparando o final do experimento em relação ao início (Tabela 4.5). Esse aumento foi menor do que o verificado para o tratamento com suprimento total de N. Já no outro experimento, comparando algas com déficit de N em PA e PAB, o padrão de estímulo à síntese de MAAs foi praticamente ausente em ambas as radiações. Entretanto, há de se ressaltar que a presença de algum suprimento de N (em 0,1 mM) já foi suficiente para estimular a síntese de MAAs em algas expostas à PAB (1,5 vezes mais MAAs no final do experimento do que no início, Tabela 4.5). Pelos dados da proporção entre o total de MAAs nas amostras cultivadas com 0,5 mM de NO_3^- em relação àquelas que não receberam N, se nota que há, já após cerca de 7 dias, o dobro de MAAs quando foi fornecido N independentemente do tratamento de radiação (Tabela 4.5). Isso evidencia o direcionamento do N para a formação de MAAs em quaisquer que sejam as radiações, embora o estímulo à síntese tenha sido detectado apenas em algas expostas à PA e PAB.

Tabela 4.5: Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes de *Gracilaria tenuistipitata*. Duas proporções foram obtidas: entre o total ao final dos experimentos (Tempo 7) pelo total no início (Tempo 0) nos cultivos sob 0, 0,1 e 0,5 mM de NO_3^- , ou a proporção entre os valores medidos nas amostras supridas por 0,5 mM de NO_3^- por aqueles das algas cultivadas em 0 mM NO_3^- , no início, após 3 e 7 dias. Dados obtidos a partir dos experimentos 3 e 4.

Variável	Radiação	Tempo 7 / Tempo 0			[0,5 mM]/[0 mM]		
		[NO_3^-] (mM)			Tempo (dias)		
		0	0,1	0,5	0	3	7
MAA	PAR	0,50	0,83	0,58	1,78	2,51	2,06
	PAB	1,93	3,31	6,17	0,89	1,88	2,85
MAAs	PA	0,47	0,51	4,66	0,48	1,97	4,70
	PAB	0,89	1,51	5,01	0,52	1,93	2,93
Shinorina	PA	0,18	0,10	3,27	0,41	1,97	7,58
	PAB	0,47	0,52	5,03	0,30	1,43	3,19
P-334	PA	0,29	0,33	4,28	0,47	2,54	7,07
	PAB	0,76	1,26	5,60	0,55	2,29	4,03
Asterina	PA	1,32	3,54	4,94	0,51	0,77	1,90
	PAB	0,94	2,47	2,22	1,11	1,13	2,61
Palitínol	PA	0,00	0,00	3,26	0,00	1,53	3,88
	PAB	3,47	11,32	11,95	0,43	1,17	1,47
Palitina	PA	1,92	1,62	13,67	0,33	1,15	2,34
	PAB	1,39	2,46	4,17	0,36	1,25	1,09

A separação dos tipos de MAAs foi possível no experimento comparando PA e PAB. Notou-se que a resposta de estímulo por PA e PAB no cultivo com suprimento de 0,5 mM de NO_3^- foi evidente para P-334, palitina e asterina, com maiores quantidades dessas substâncias após 7 dias em comparação ao valor inicial. O estímulo por PAB foi evidente em relação ao valor inicial também para shinorina e palitínol. A redução do N disponível (em 0 ou 0,1 mM NO_3^-) foi determinante para que o tratamento com PA não resultasse em aumento de nenhum dos MAAs. O tratamento composto pela radiação PAB somente estimulou a síntese de palitina e palitínol. Esses resultados evidenciam a completa dependência do suprimento de N para que o estímulo à síntese de MAAs ocorra sob os tratamentos com radiação UV. Esse resultado difere do observado para *Grateloupia lanceola*, na qual não houve padrões claros de relação do total de MAAs com a irradiância usada (Huovinen *et al.* 2006). Por outro lado, os resultados de *G. tenuistipitata* corroboram o observado por Korbee-Peinado *et al.* (2004) com *Porphyra columbina* e os resultados de Korbee *et al.* (2005a) com *P. leucosticta*. Esses autores observaram também um estímulo à síntese de MAAs em tratamento com suprimento de 0,3 mM de NH_4^+ após 6 dias para *P. columbina* e 7 dias para *P. leucosticta* expostas a PAB. Adicionalmente, Korbee-Peinado *et al.* (2004) verificaram também um papel preponderante da radiação UVA no estímulo à síntese de MAAs de *P. columbina*, como

já discutido acima para *G. tenuistipitata*. Entretanto, um aspecto a ser considerado consiste no pré-tratamento: enquanto *P. columbina* foi aclimatada à condições de ausência de N no início do experimento, *G. tenuistipitata* foi pré-cultivada sob suprimento de N. Essa estratégia se deveu por conta da diferença no total basal de MAAs das duas espécies, sendo que *P. columbina* possui níveis basais de MAAs maiores do que os verificados para *G. tenuistipitata*, mas ambas espécies responderam de forma similar ao suprimento de N para a síntese de MAAs. No caso de *P. umbilicalis*, também foi verificada a resposta integrada entre o suprimento de N e o tratamento com PAB. Nessa alga, os valores iniciais de MAAs eram bastante elevados, e o suprimento de N simplesmente evitou a diminuição do total de MAAs como observado quando esse nutriente foi disponibilizado em concentrações menores (0 e 0,1 mM NH_4^+) (Korbee *et al.*, 2005a).

O crescimento foi escolhido como um parâmetro geral de avaliação da resposta de *G. tenuistipitata*, tal como observado em *Ulva rigida* por Altamirano *et al.* (2000). Pang *et al.* (2001) observaram que a radiação PAB causou diminuição nas TC de *Delesseria sanguinea*, em nível mais intenso do que verificado para a diminuição causada por PA em comparação com o controle em PAR (Pang *et al.*, 2001). Entretanto, apesar dos efeitos negativos da radiação UVB no crescimento, os resultados encontrados neste experimento com *G. tenuistipitata* seguem o observado por Grobe & Murphy (1998) para *Ulva expansa*, isto é, há uma dependência da disponibilidade de nutrientes. As TC de *U. rigida* foram estimuladas em mais de 50% na ausência de UVB, após 7 dias. Porém, após 20 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos contendo ou não radiação UV. Essa resposta evidencia uma adaptação rápida ao crescimento em novas condições (Altamirano *et al.*, 2000). No caso de *G. tenuistipitata*, essa aclimação rápida também foi observada, num período ainda menor do que o usado em *U. rigida*. As TC no primeiro período (entre o início e o terceiro dia) foram menores em amostras expostas à PAB do que aquelas expostas à PAR, independentemente do suprimento de N. Entretanto, no período do terceiro até o sétimo dia, as TC foram similares para as amostras expostas à PAR e PAB, sendo maiores as TC de algas expostas em maiores concentrações de N. Isso diferiu do que foi observado por Zheng & Gao (2009) em *Gracilaria lemaneiformis*, na qual as TC sempre foram maiores em tratamentos com PAR do que naqueles com PAB, independentemente do suprimento de N. No caso de *G. tenuistipitata*, isso pode ser explicado pelo aumento de MAAs obtido durante o primeiro período, e sustentado no segundo período sob

tratamento com PAB. Comparando os tratamentos de PA e PAB, não foram observadas diferenças referentes à radiação, e sim um efeito evidente da ausência de N para reduzir as TC no segundo período (entre os dias 3 e 7). Isso também se explica pela presença de MAAs, uma vez que as algas em PA também induziram a síntese dessas substâncias. Um aspecto adicional é que a redução de N teve um papel preponderante nas reduções de TC de *G. tenuistipitata*, uma vez que quando as algas receberam 0,5 mM de NO_3^- , as TC não variaram entre os tratamentos de PAR, PA e PAB, com valores similares no primeiro período (0 a 3 dias) e no segundo período (3 a 7 dias). Esses resultados mostram que *G. tenuistipitata* foi capaz de ajustar seu metabolismo para prover o crescimento em situações nas quais recebeu distintas radiações, porém, essa regulação não foi eficaz em condições de déficit de N. Outras algas (como *G. lemaneiformis*) podem direcionar o nitrogênio absorvido em funções complementares: ou a alga se fotoprotege ou ela cresce (Zheng & Gao, 2009). No caso de *G. tenuistipitata*, os MAAs atuaram sinergicamente em pró do crescimento. *Gracilaria tenuistipitata* é relatada na literatura como uma alga altamente tolerante a diferentes tratamentos com salinidades, irradiâncias e temperaturas (Macchiavello *et al.*, 1998). Essa capacidade de lidar com um ambiente altamente variável e manter o crescimento por ajuste do seu metabolismo foi comprovado neste trabalho, por síntese de compostos de fotoproteção.

4.5. Aclimação de *G. tenuistipitata* e a sua plasticidade fenotípica: efeitos da radiação UVB em ausência de UVA

No experimento em que *G. tenuistipitata* foi aclimatada a distintas radiações, todas as amostras tratadas com PAR e UVB apresentaram aumento da proporção C:N, ainda que o total de N e o total de C, analisados separadamente, tenham sido estatisticamente similares para todos os tratamentos. Mas esse resultado de distinção da proporção C:N para valores maiores pode ser em decorrência de algum dano no metabolismo desses componentes em *G. tenuistipitata*. A ausência da radiação UVA causou algum desequilíbrio metabólico em *G. tenuistipitata* (por conta do aumento de C:N). A radiação UVA poderia regular as enzimas do metabolismo de N e C em *G. tenuistipitata*, como sugerido para *Fucus spiralis* e *Ulva olivascens* por Viñegla *et al.* (2006).

Os cultivos de *G. tenuistipitata* sob diferentes tratamentos de radiação UV, em condições ótimas de suprimento de N, não resultaram em alterações significativas no total de Cla. Esses resultados foram obtidos em algas aclimatadas em diferentes

qualidades de radiação e submetidas à PAR, PA, PAB ou PB, indicando que a clorofila a é o pigmento mais conservado e protegido nesta alga.

Han *et al.* (2003b) propuseram que o PSII seja um dos principais alvos da radiação UVB em macroalgas, após analisar a sensibilidade diferencial de *Ulva pertusa* em diferentes partes do talo. Altamirano *et al.* (2000) observaram que os valores para os parâmetros da fotossíntese de *Ulva rigida* foram maiores quando a espécie foi tratada sem radiação UVB, o que também traz consistência à ideia de que a radiação UVB cause danos no aparato fotossintetizante das macroalgas. No caso de *G. tenuistipitata*, quando o sistema de fotoproteção não foi eficiente (em tratamentos com PAR+UVB), se notou que a taxa de transporte de elétrons praticamente cessou, independentemente do tratamento preliminar com PAR, PA ou PAB. O valor de ETR_{max} registrado para amostras tratadas com PAR que se mantiveram nessa radiação foi mais de 90 vezes maior do que o valor desse parâmetro obtido em algas expostas à PB. Já no caso das tratadas com PA e mantidas nessa radiação, o valor de ETR_{max} foi cerca de 50 vezes maior do que aquele obtido em amostras expostas à UVB, enquanto que as algas advindas de PAB e mantidas em PAB tiveram ETR_{max} cerca de 20 vezes maiores do que as cultivadas sob PB (Tabela 4.6). Houve também uma queda do rendimento quântico do aparato fotossintetizante nas algas tratadas apenas com PB, após 24 h de exposição, período no qual o sistema de fotoproteção existente nessas algas foi completamente saturado, e nas 24 h seguintes, resultando da saturação ou degradação desse sistema, o rendimento quântico despencou a valores muito menores do que em quaisquer outros tratamentos realizados (com PAR, PA ou PAB). Além disso, a presença de UVB (mesmo acompanhada de UVA) após 48 h resultou em menores valores de rendimento quântico efetivo comparando-se com as algas transferidas para PAR ou mantidas em PA, de acordo com o caso. Isso se refletiu na análise dos parâmetros α e ETR_{max} de *G. tenuistipitata*, que foram maiores em tratamentos sem UVB. A eficiência da fotossíntese foi mais de 10 vezes maior quando as algas receberam PAR, PA ou PAB em comparação com o material exposto a PB proveniente da mesma radiação prévia (Tabela 4.6), e foi ainda 2,2 e 4,1 vezes maior em amostras tratadas sem UVB (PAR e PA) comparadas com aquelas que receberam UVA e UVB. Tal variação se refletiu também de forma similar no rendimento quântico ótimo de *G. tenuistipitata*, com os valores finais de F_v/F_m sempre maiores quando as algas não receberam UVB, 9 vezes maior em amostras tratadas com PAR, 8 vezes maior em algas expostas a PA e 4,4 vezes maior rendimento em algas tratadas com PAB em comparação com as que

receberam PB (Tabela 4.6). A saturação ou degradação do sistema de fotoproteção de *G. tenuistipitata* resultou em formação de dímeros de CPD no DNA, e este processo, acoplado ao não-funcionamento do sistema fotossintetizante, acarretou em valores negativos de crescimento dessas algas após 48 h de exposição à PB.

Tabela 4.6. Proporção entre os valores médios dos parâmetros fotossintetizantes, carotenoides e MAAs totais de *Gracilaria tenuistipitata*. Foi obtida a proporção entre o tratamento controle (PAR, PA e PAB) e os tratamentos contendo radiação UVB (PAB e PB), além da relação entre os produtos das amostras expostas a PAB em relação às que foram submetidas em seguida a PAR. Dados obtidos a partir do experimento 5.

	PAR/PB	PA/PB	PAB/PB	PAR/PAB	PA/PAB	PAB/PAR
F_v/F_m	9,04	7,95	4,43	3,01	2,05	0,54
ETR_{max}	86,49	49,20	19,81	1,65	1,38	0,56
α	16,03	14,71	10,24	4,10	2,20	0,51
MAAs	0,65	1,56	1,48	0,12	0,54	1,71
Anterax.	1,26	1,29	1,28	0,80	1,04	1,04
Zeaxantina	1,36	1,57	1,82	0,57	0,97	1,65
Luteína	1,09	1,05	1,63	0,82	1,07	1,92
β -caroteno	1,05	1,28	1,01	1,00	1,25	0,73

Dois mecanismos possíveis de ação da radiação no aparato fotossintetizante foram propostos por Aguirre-von-Wobeser *et al.* (2000): i, ocorrência de dano direto no PSII, e ii, dano no mecanismo de reparo do complexo fotossintetizante. No caso da fotoinibição dinâmica observada nos experimentos de dano e recuperação de *G. tenuistipitata* (ver discussão no item anterior) é possível que o dano seja do segundo tipo, que na ausência de UV subsequente, as algas possam recuperar o sistema de correção do aparato fotossintetizante. No caso de exposição de *G. tenuistipitata* à PAB, é possível que a síntese de MAAs seja estimulada para que essas substâncias atuem como um escudo no aparato fotossintetizante contra UV, e no caso que as algas tenham sido tratadas com PB, o dano seria direto e irreversível (somente com síntese *de novo*) no aparato fotossintetizante, diretamente no PSII, como sugerido por Han *et al.* (2003b).

Não foi detectado um efeito diferencial de PAR, PA e PAB no conteúdo de carotenoides de *G. tenuistipitata*. Os mesmos carotenoides discutidos anteriormente foram detectados: anteraxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno. O papel desses compostos como fotoprotetores contra a radiação UV nessa alga seria secundário, uma vez que somente pequenas variações foram observadas no tratamento mais prejudicial (com PB), que causou redução no total de anteraxantina da alga, independentemente do tratamento preliminar. O resultado dos carotenoides se torna evidente pela Tabela 4.6,

na qual os tratamentos contendo quaisquer radiações (PAR, PA e PAB) sempre tiveram mais carotenoides do que as amostras tratadas com PB, visto que a proporção entre esses pigmentos produzidos com PAR, PA e PAB em relação à produção em PB sempre foi maior do que 1. Experimentos adicionais com a adição de tratamentos de escuro poderiam complementar os resultados, inclusive testando os dois pools de zeaxantina que foram propostos por Carnicas *et al.* (1999).

O cultivo sob PAR e UVB sem a presença de UVA resultou em redução dos tipos de MAAs ao longo do tempo. Esses resultados apontam o papel fundamental da presença de UVA para estimular a síntese de MAAs em *G. tenuistipitata*, e comparando os tratamentos ao final que tinham radiação UVA (PA e PAB) com as algas provenientes de PB, o total de MAAs foi ao menos 1,5 vezes maior com a presença de UVA. A presença de UVA e UVB no mesmo tratamento causou um acréscimo ainda maior (1,7 vezes) em comparação ao tratamento no qual essas qualidades de radiação estavam ausentes. Isso já evidencia a ocorrência de um efeito aditivo causado pela combinação de UVA e UVB para a síntese de MAAs (Tabela 4.6).

Os MAAs têm sido relatadas como fotoestáveis à degradação (Conde *et al.*, 2000; Whitehead & Hedges, 2005), bem como tolerantes ao calor e à radiação UVB (Sinha *et al.* 2000). Esse último trabalho foi feito em uma alga do mesmo gênero, *Gracilaria cornea*, e é possível que os MAAs de *G. tenuistipitata* também sejam estáveis ao calor e tolerem a presença de radiação UV. Porém, diferentemente do observado para *G. cornea*, no caso de *G. tenuistipitata* houve um estímulo à síntese de MAAs por PA e PAB. A tolerância à radiação UVB sem a UVA foi observada no experimento em que as algas foram aclimatadas a diferentes radiações e expostas à PB. Essa exposição à UVB sem a presença de UVA não estimulou as MAAs de *G. tenuistipitata*, porém não causou diminuição a valores menores do que os basais reportados para os tratamentos em PAR.

Além disso, o efeito aditivo de PAB em relação ao estímulo prévio com PA foi detectado em curto prazo (até 48h) quando as algas aclimatadas à PA foram expostas à PAB. Ao final do experimento, sempre o total de cada um dos MAAs foi maior em tratamento com PAB do que no controle (algas que permaneceram em PA ou PAR). Com esses resultados, se pode levantar a hipótese de que o estímulo de MAAs envolva a atuação de dois fotorreceptores, um para UVA e outro para UVB, como sugerido por Kräbs *et al.* (2002). O fotorreceptor para UVB poderia ser similar à pterina sugerida para *Chlorogloopsis* PCC 6912 por Portwich & Garcia-Pichel (2000). A radiação UVA

poderia ser um sinalizador primário e fundamental para a síntese de MAAs, o que poderia ser realizado via um fotorreceptor para UVA, e o estímulo causado pela radiação UVB se daria de maneira complementar a essa via, possivelmente por meio de um fotorreceptor adjacente, dependente da atividade do fotorreceptor de UVA. Caso contrário, o estímulo adicional provido pela UVB não seria observado, o que se comprova porque se detectou redução (quando advindas de condição de estímulo em PA ou PAB) ou ausência de estímulo (para algas aclimatadas a PAR) em todos os MAAs expostos a PAR e UVB (sem UVA), independentemente do tratamento preliminar. Esses resultados indicam uma dependência espectral para a síntese de MAAs em *G. tenuistipitata*, como foi observado para *C. crispus* por Kräbs *et al.* (2002). Porém, o sistema de *C. crispus* envolve estímulo aos MAAs por radiação azul e UVA (conforme observado por Franklin *et al.* 2001), tal como também observado por Korbbee *et al.* (2005b) em *Porphyra leucosticta*. O fotorreceptor de UVA em *C. crispus* estaria envolvido na síntese de shinorina, com picos de absorção em 320, 340 e 400 nm (Kräbs *et al.*, 2004). É possível que um fotorreceptor similar esteja ativo em *G. tenuistipitata*, porém regulando todos os MAAs, e o segundo fotorreceptor para UVB poderia ativar a via de síntese adicional de shinorina e P-334. Esse aspecto permanece a ser testado em *G. tenuistipitata*.

O sistema de defesa por meio de antioxidantes em *G. tenuistipitata* foi testado aclimatando previamente as algas à PAR, PA e PAB. Considerando a existência de sequências de ESTs codificantes para as proteínas atuantes como antioxidantes e a obtenção de primers para a amplificação desses fragmentos em tempo real, os genes codificantes para APX e para GPX foram utilizados. Infelizmente, não foi obtida sequência de EST eficiente que codificasse para a SOD, que é um dos primeiros sistemas enzimáticos dentro da defesa antioxidante. Um controle qualitativo da radiação poderia estar ativo para a síntese e atividade de SOD em *G. tenuistipitata*, tal como foi verificado para *Gracilariopsis tenuifrons* (Rossa *et al.*, 2002), na qual essa enzima esteve regulada por radiação azul. Porém, considerando que SOD converte os radicais livres de oxigênio para o formato de H₂O₂, e esta substância é o alvo da atividade dos sistemas enzimáticos complementares (incluindo CAT, GPX e o ciclo do ascorbato-glutationa), se há um aumento da síntese de enzimas referentes à detoxificação de H₂O₂, se pode supor que a enzima formadora dessa substância (a SOD) também tenha tido seu nível de expressão aumentado.

Neste estudo, foi obtida uma medida relativa de estímulo à expressão do gene codificante para dois sistemas antioxidantes enzimáticos que detoxificam H_2O_2 (APX e GPX), principalmente em tratamentos contendo radiação UVA. Esse resultado não implica em concreto estímulo da radiação UV à atividade dessas enzimas. Um experimento complementar poderia medir a atividade específica dessas enzimas, tal como feito por Aguilera *et al.* (2002), com diferentes macroalgas submetidas a tratamentos com distintas qualidades de radiação, incluindo UV.

A expressão desses genes observada neste trabalho é um indicativo de que essas enzimas estejam atuando em algas aclimatadas com algum tipo de radiação que contivesse UVA. Não houve estímulo à expressão gênica das sequências codificantes para APX e GPX em um período de 48 h, uma vez que não houve alteração de expressão nas algas aclimatadas em PAR e que receberam radiação PAB (contendo UVA) ou mesmo PB. É possível, portanto, que o estímulo à atividade de sistemas antioxidantes enzimáticos desempenhe um papel secundário na fotoproteção de *G. tenuistipitata*, exigindo um tempo maior do que dois dias para estar em atividade ou que esse estímulo seja mais rápido em questão de poucas horas. Aguilera *et al.* (2002) sugerem que a redução da atividade de GR e SOD em *Acrosiphonia penicilliformis* no tratamento contendo somente PAR indica que o estresse oxidativo nessa situação seja menor e por isso os sistemas enzimáticos podem diminuir o seu grau de atividade. Entretanto, esses autores consideram que o sistema de defesa antioxidante seja espécie-específico.

Um aspecto adicional em relação à resposta contra o stress oxidativo em *G. tenuistipitata* consiste no papel dos MAAs nesse sentido. Esse tipo de substância possivelmente atuou nesse sentido em duas algas vermelhas, de acordo com a distribuição vertical dessas espécies no ambiente marinho (Lee & Shiu, 2009). Esses autores observaram que *Pterocladia capilacea* (que ocorre em zonas mais rasas da coluna de água) teve um conteúdo mais alto de MAAs do que *Gelidium amansii*, uma alga encontrada em regiões de infra-litoral. Essas substâncias estariam atuando como filtros de UVB e adicionalmente, reduziriam a formação de espécies reativas de oxigênio de forma indireta. Além disso, a espécie de regiões mais rasas foi mais eficiente no processo de detoxificar H_2O_2 utilizando APX e GR do que *G. amansii*. Quando a defesa via MAAs falhou, a alga estimulou a síntese de carotenoides. No caso de *G. tenuistipitata*, houve o estímulo à síntese de MAAs pelos tratamentos contendo PA e PAB. Porém, quando a condição de dano era intensa (tratamento com PB) nem

esses MAAs e tampouco os carotenoides apresentaram variação no sentido de aumento de conteúdo para proporcionar um mecanismo eficaz de defesa.

O papel dos MAAs como antioxidantes foi proposto por Dunlap & Yamamoto (1995), e posteriormente, comprovado em extratos de macroalgas por De la Coba *et al.* (2009). Estes últimos autores estudaram o papel de extratos de MAAs para dissipação de radicais hidrossolúveis, sua atividade antioxidante em meio lipídico e a capacidade de dispersar radicais de superóxido. No caso das primeiras substâncias, os extratos de alguns MAAs (micosporina-glicina extraída de um líquen e um composto de asterina + palitina proveniente de *Gelidium corneum*) foram eficazes na sua remoção, de maneira dose-dependente, enquanto que P-334 e shinorina (provenientes de *Porphyra rosengurttii*) tiveram baixa atividade antioxidante nesse tipo de substância. O composto de asterina e palitina de *G. corneum* inibiram mais de 70% da oxidação de β -caroteno e a remoção de radicais superóxido, enquanto que P-334 e shinorina tiveram atividade de inibição de mais de 50% da oxidação de β -caroteno e cerca de 40% de inibição da formação de radicais superóxido. Como *G. tenuistipitata* teve seu conteúdo principalmente composto por P-334, e em seguida por asterina, palitina e shinorina (em quantidades bem menores), é possível que além de desempenharem o papel de filtração da radiação UV, esses imino-MAAs (cujos extratos possivelmente têm maior atividade como antioxidantes) tenham executado um papel secundário como antioxidantes, conforme as funções sugeridas por De la Coba *et al.* (2009). A fim de comprovar efetivamente esta hipótese, se sugere a realização de um tratamento com radiação UV (contendo UVA ou UVA+UVB), seguido da extração e purificação dos MAAs e um teste de atividade antioxidante dessas substâncias, como feito por De la Coba *et al.* (2009).

Esta tese é o primeiro trabalho a detectar dímeros de CPD em uma macroalga de águas tropicais. Os trabalhos existentes na literatura foram feitos para algas de ambiente ártico e temperado (Pakker *et al.*, 2000a; Pakker *et al.*, 2000b; van de Poll *et al.*, 2001; van de Poll *et al.*, 2002). Foi observado que os dímeros de pirimidina foram formados em tratamentos contendo PAR e UVB, em espectro resultante do tratamento com a lâmpada TL-12, que emite comprimentos de onda mais curtos e praticamente não possui emissão na faixa da radiação UVA. Ainda que a intensidade de UVB tenha sido a mesma nos tratamentos com PAB e PB, os comprimentos de onda que compõem tal intensidade e produzem a mesma dose ao longo do tempo são diferentes, o que é evidenciado pelo cálculo da irradiância efetiva para dano no DNA e na fotoinibição. Foi

observado um valor cerca de dez vezes mais de intensidade efetiva para danificar o DNA (com o uso do espectro de ação de Setlow, 1974), resultando na dose total efetiva de $0,34 \text{ KJ.m}^{-2}$ de UVB após 48 h no tratamento PB, e dose efetiva de $0,03 \text{ KJ.m}^{-2}$ com o uso da lâmpada Q-Panel UVA340 no tratamento PAB. Essa diferença nos comprimentos de onda que compõem a radiação UVB foi responsável pelas respostas diferentes com respeito ao dano no DNA. Uma dependência do comprimento de onda foi observada por Buma *et al.* (1997) em *Cyclotella* sp., que formou dímeros no DNA com tratamentos em comprimentos de onda menores do que 302 nm. Entretanto, nesse trabalho foi feito um estudo policromático, isto é, os comprimentos de onda foram separados em pequenas porções pelo uso de diversos filtros de corte.

Um objetivo posterior seria verificar a fotorreativação, isto é, transferir as algas para tratamentos sem UV com PAR ou no escuro após o período de exposição à radiação UV, para saber se os dímeros de CPD seriam removidos intermediados por uma fotoliase ou não, como realizado para *Rhodymenia pseudopalmata* (Pakker *et al.*, 2000a). Entretanto, as doses efetivas do trabalho de Pakker *et al.* (2000a) foram muito maiores do que as utilizadas neste estudo, obtidas a partir da mesma fonte de radiação (lâmpada TL-12 e lâmpada de PAR). É possível que *G. tenuisipitata* não sobrevivesse a um tratamento de intensidade maior de UVB, inclusive porque as taxas de crescimento ao final do experimento já estavam muito baixas, inclusive chegando a ser negativas (resultado de alguma fotodegradação) em tratamentos com PB. É possível que o dano no DNA tenha sido responsável pela inibição completa no crescimento de *G. tenuisipitata*, tal como verificado por van de Poll *et al.* (2001) em *Polyneura hilliea* e *Phycodrys rubens*. Esses autores sustentam que um sistema eficiente de reparo de danos no DNA é fundamental para o crescimento otimizado sob condições de UV, o que pareceu ser o caso de *G. tenuisipitata* nos tratamentos sem UV ou contendo UVA. Além disso, os processos de reparo podem ser temperatura-dependentes, como verificado por Pakker *et al.* (2000b) em *Palmaria palmata*, para os dois tipos de dano, e dessa forma, é possível que a temperatura utilizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) não seja a ótima para proceder a remoção de dímeros CPDs nos tratamentos com PB em *G. tenuisipitata*.

Outro aspecto que pode explicar a ausência de dímeros nos demais tratamentos é a presença da radiação UVA nos tratamentos com PAB, a qual poderia estar estimulando a atividade de enzimas corretoras de dano, como as fotolases. *G. tenuisipitata* apresentou pelo menos duas fotolases diferentes (advindas do clone-29 e do clone-32). É possível ainda que ambas sirvam para corrigir danos diferentes, uma

vez que a fotoliase-32 que foi analisada em termos de expressão gênica não foi estimulada pelos tratamentos em combinação de radiação UV e suprimentos de N. Além disso, a fotoliase-29 apresentou homologia com tipos de fotoliasas de organismos diferentes do que observado para a fotoliase-32. Enquanto que a fotoliase-29 teve maior homologia com um gene para fotoliase de uma bactéria (*Heliobacter* sp.), a fotoliase-32 apresentou maior homologia à uma fotoliase da planta da mamona, *Ricinus communis*.

Um efeito da radiação UV no aumento de expressão gênica de uma fotoliase foi verificada por Isely *et al.* (2009), para uma espécie de ouriço marinho (*Sterechinus neumayeri*), sendo expressa de forma constitutiva em todos estágios de desenvolvimento. A fotoliase-32 de *G. tenuistipitata* também apresentou expressão constitutiva, sendo que a maioria dos experimentos realizados com distintas qualidades de radiação não resultou em estímulo à expressão diferencial da mesma. A presença de um ligante FAD foi detectada por Isely *et al.* (2009) com 300 pb, bem como a porção codificante para a um cromóforo das fotoliasas (cerca de 1200 pb). No caso de *G. tenuistipitata*, os tamanhos dos fragmentos foram distintos, enquanto que o domínio FAD da fotoliase-29 teve 699 pb, a fotoliase-32 possui a sequência de 264pb responsável por codificar tal ligante. A sequência que codifica para a fotoliase-32 apresentou a parte referente ao ligante FAD possivelmente truncada, de modo que isso poderia explicar a ausência de estímulo à expressão gênica dessa sequência. Infelizmente, os pares de primers desenhados para a sequência fotoliase-29 (que foi detectada em sua integridade) não funcionaram. Ambas as sequências de *G. tenuistipitata* possuem uma parte codificante para um domínio proteico fotoliase, de tamanhos similares (507 pb para a fotoliase-29 e 558 pb para a fotoliase-32).

Somente no experimento em que foi observada a ocorrência de danos no DNA, houve algum estímulo à expressão gênica da fotoliase-32. Porém, esse produto de expressão não foi completamente eficaz para diminuir o dano no DNA. Por outro lado, em algas pré-aclimatadas à PA, houve estímulo à expressão dessa fotoliase em tratamentos com PA e PAB, de acordo com o que se conhece em relação ao estímulo de fotoliasas por UVA (Britt, 1995). É possível que a fotoliase-32 sirva para corrigir outro tipo de dano, possivelmente um fotoproduto (6-4). Porém, para certificar-se dessa hipótese, um ensaio imunológico com anticorpos para detecção desse dano poderia ser realizado. Uma série de fatores deve ser tomada em conta para conseguir realizar a análise de RT-PCR, e mesmo assim, o fato de um gene estar mais ou menos expresso não significa que a proteína sintetizada esteja ativa em determinada circunstância.

Portanto, os próximos passos referentes à correção de danos do DNA de *G. tenuistipitata* implicam na purificação e otimização de um ensaio enzimático para medir a atividade específica de fotoliasas, atentando ao fato de que essa alga possui pelo menos duas fotoliasas diferentes.

Além dos comprimentos de onda mais longos e da presença de UVA, outra hipótese para a ausência de danos no DNA de *G. tenuistipitata* com o tratamento sob PAB é o estímulo da síntese de MAAs nessas condições, e, de acordo com Misonou *et al.* (2003), os MAAs podem ter um efeito fotoprotetor diretamente filtrando o excesso de energia que danificaria o DNA. Notou-se que nenhum dos tipos de MAAs observados em *G. tenuistipitata* neste experimento foi estimulado pela presença apenas da radiação UVB, e a redução dessas substâncias a níveis baixos explicaria a não-filtração da energia excessiva da radiação UVB que pôde causar o dano no DNA. Entretanto, é possível que doses maiores ou diferentes intensidades de UV possam causar efeitos para os quais o sistema de fotoproteção não é eficiente, como evidenciado pelas menores TC observadas nos tratamentos com PB, independentemente do tipo de radiação à qual a alga estivesse aclimatada.

4.6. Implicações biotecnológicas e ecológicas

Gracilaria tenuistipitata tem sido referida na literatura como uma alga eficaz para seu aproveitamento como agarófita (Rebello *et al.*, 1997; Macchiavello *et al.*, 1999). Foi feita uma análise de produção de substâncias de possível interesse biotecnológico que estão presentes nessa espécie e foram obtidas no decorrer dos experimentos desta tese. A Tabela 4.7 aponta o rendimento do total de MAAs, PE e zeaxantina em *G. tenuistipitata* após os distintos períodos experimentais de 48h, 3 dias ou 7 dias. Quando supridas com N, as algas também foram capazes de sintetizar PE, sendo a maior taxa observada quando as algas foram cultivadas com PAR ($1,478 \pm 0,14$ mg de PE por dia por L de água do mar enriquecida com nutrientes). Já no caso de zeaxantina, os maiores rendimentos foram estimados em $0,077 \pm 0,003$ mg/dia/L ou $0,071 \pm 0,014$ mg de zeaxantina por dia por L de água do mar enriquecida após exposição das algas à PAR ou PAB durante um total de 7 dias, seguidos de 48 h de PAB, respectivamente. Os maiores rendimentos de MAAs foram obtidos em algas supridas com $0,5$ mM de NO_3^- que passaram uma semana expostas à PAB, atingindo $0,413 \pm 0,05$ mg ou $0,427 \pm 0,05$ mg de MAAs por dia por L em cada um dos dois experimentos nos quais esta condição esteve presente (Tabela 4.7). Esses valores de rendimento

resultaram no total bruto de cerca de 2,9 mg de MAAs. Por meio desses valores de rendimento, podem ser obtidos totais de MAAs que podem ser considerados altos, e, ainda que menores que os obtidos para *Porphyra* spp. (Korbee-Peinado *et al.*, 2004; Korbee *et al.*, 2005a), eles provém de uma alga que é mais facilmente cultivada em laboratório, com a sua fase adulta perene (seja os gametófitos ou o tetrasporófito). Desta forma, esta tese propõe que, dados os resultados de alta produtividade de MAAs, *G. tenusitipitata* possa ser utilizada com essa finalidade aplicada de obtenção de um extrato bruto de MAAs, ainda que sua estabilidade e pureza devam ser rigorosamente testadas. Esse extrato poderia ser obtido de algas supridas com 0,5 mM de NO_3^- em radiação PAB. O único trabalho que considera a produção em larga escala de MAAs é o de Figueroa *et al.* (2008), que cultivaram *Asparagopsis armata* em tanques, em sistemas de biofiltração de efluentes. Porém, nesse caso a fonte de N foi o total de efluentes do peixe *Sparus aurata*.

Tabela 4.7. Rendimento estimado (média $\pm$ desvio padrão) das substâncias de interesse econômico (MAAs, PE e zeaxantina) em mg por tempo por volume de água enriquecida com nutrientes, produzidas por *Gracilaria tenuistipitata* no decorrer dos diferentes experimentos. Esses valores foram obtidos respeitando-se os tratamentos executados nesta tese, bem como a proporção de 2g de MF por L de água do mar enriquecida com VS. Diferentes letras ao lado dos valores representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Radiação prévia	Tratamento Radiação	[N] (mM)	mg MAAs/dia/L			mg PE/dia/L	mg Zeaxantina/dia/L		
			<i>Após 7 dias</i>			<i>Após 7 dias</i>			
PAR	PAB	0	0,034	$\pm$	0,003	a	0,026	$\pm$	0,002 a
PAR	PAB	0,03	0,051	$\pm$	0,002	ab	0,024	$\pm$	0,001 a
PAR	PAB	0,075	0,083	$\pm$	0,018	b	0,027	$\pm$	0,000 a
PAR	PAB	0,1	0,083	$\pm$	0,002	b	0,031	$\pm$	0,001 b
PAR	PAB	0,25	0,273	$\pm$	0,007	c	0,034	$\pm$	0,003 bc
PAR	PAB	0,5	0,353	$\pm$	0,009	d	0,036	$\pm$	0,001 cd
PAR	PAB	0,75	0,325	$\pm$	0,049	d	0,036	$\pm$	0,002 cd
PAR	PAB	1	0,320	$\pm$	0,017	d	0,047	$\pm$	0,003 e
PAR	PAB	1,5	0,233	$\pm$	0,021	c	0,039	$\pm$	0,001 d
PAR	PAB	2	0,255	$\pm$	0,033	c	0,037	$\pm$	0,001 cd
			<i>Após 7 dias</i>			<i>Após 3 dias</i>			
PAR	PAR	0,5	0,060	$\pm$	0,006	a	0,044	$\pm$	0,004 a
PAR	PA i - 12h	0,5	0,133	$\pm$	0,007	b	0,056	$\pm$	0,004 b
PAR	PA 2i - 6h	0,5	0,111	$\pm$	0,012	b	0,035	$\pm$	0,004 c
PAR	PA 2i - 12h	0,5	0,289	$\pm$	0,024	c	0,060	$\pm$	0,003 bd
PAR	PA 4i - 6h	0,5	0,130	$\pm$	0,016	bd	0,034	$\pm$	0,002 c
PAR	PAB i - 12h	0,5	0,227	$\pm$	0,027	ce	0,059	$\pm$	0,004 bd
PAR	PAB 2i - 6h	0,5	0,183	$\pm$	0,050	def	0,049	$\pm$	0,004 a
PAR	PAB 2i - 12h	0,5	0,259	$\pm$	0,041	c	0,065	$\pm$	0,006 d
PAR	PAB 4i - 6h	0,5	0,239	$\pm$	0,051	cf	0,043	$\pm$	0,004 a
			<i>Após 7 dias</i>			<i>Após 7 dias</i>			
PAR	PAR	0	0,013	$\pm$	0,002	a	0,194	$\pm$	0,060 a
PAR	PAB	0	0,094	$\pm$	0,020	b	0,013	$\pm$	0,019 b
PAR	PAR	0,1	0,041	$\pm$	0,012	ab	0,250	$\pm$	0,040 a
PAR	PAB	0,1	0,155	$\pm$	0,050	c	0,066	$\pm$	0,012 b
PAR	PAR	0,5	0,042	$\pm$	0,019	ab	0,558	$\pm$	0,093 c
PAR	PAB	0,5	0,413	$\pm$	0,055	d	0,305	$\pm$	0,100 a
			<i>Após 7 dias</i>			<i>Após 7 dias</i>			
PAR	PA	0	0,050	$\pm$	0,027	a	0,204	$\pm$	0,136 a
PAR	PAB	0	0,107	$\pm$	0,028	a	0,025	$\pm$	0,029 ab
PAR	PA	0,1	0,081	$\pm$	0,038	b	0,380	$\pm$	0,067 a
PAR	PAB	0,1	0,225	$\pm$	0,022	a	0,070	$\pm$	0,035 b
PAR	PA	0,5	0,339	$\pm$	0,081	c	1,276	$\pm$	0,192 c
PAR	PAB	0,5	0,427	$\pm$	0,048	d	0,789	$\pm$	0,184 d
			<i>Após 7 dias</i>			<i>Após 7 dias</i>			
PAR	PAR	0,5	0,107	$\pm$	0,024	a	1,478	$\pm$	0,140 a
PAR	PA	0,5	0,339	$\pm$	0,081	b	1,276	$\pm$	0,192 a
PAR	PAB	0,5	0,427	$\pm$	0,048	b	0,789	$\pm$	0,184 b
			<i>Após 48h</i>			<i>Após 48h</i>			
PAR	PAR	0,5	0,034	$\pm$	0,005	a	0,041	$\pm$	0,014 ac
PAR	PAB	0,5	0,280	$\pm$	0,075	b	0,071	$\pm$	0,014 b
PAR	PB	0,5	0,052	$\pm$	0,007	a	0,030	$\pm$	0,011 a
PA	PA	0,5	0,215	$\pm$	0,010	c	0,058	$\pm$	0,009 bcd
PA	PAB	0,5	0,392	$\pm$	0,048	d	0,060	$\pm$	0,010 bcd
PA	PB	0,5	0,212	$\pm$	0,102	e	0,037	$\pm$	0,007 ad
PAB	PAB	0,5	0,310	$\pm$	0,078	b	0,077	$\pm$	0,003 b
PAB	PAR	0,5	0,208	$\pm$	0,015	c	0,045	$\pm$	0,003 ac
PAB	PB	0,5	0,191	$\pm$	0,008	ce	0,046	$\pm$	0,012 ac

Portanto, utilizando condições de cultivo apresentadas nesta tese, inserindo as algas em tanques de 1000 L de água enriquecidos com N, seria possível produzir, diariamente, considerando a ausência de perda de absorção da radiação pelas algas com o incremento da massa e do volume, um montante de cerca de 0,45 g/dia de MAAs extraídos de *G. tenuistipitata*.

De acordo com os modelos de predição de variações da radiação UV incidente sobre o planeta no decorrer deste século, espera-se que as regiões temperadas do planeta apresentem uma recuperação da camada de ozônio a montantes maiores do que os observados na década de 80, de modo que se espera, por exemplo, uma redução de 9% do índice de UV no Hemisfério Norte (Hegglin & Shepherd, 2009). Entretanto, essa recuperação da camada de ozônio dessas zonas se dará com o transporte de O₃ dos trópicos em direção as zonas temperadas (Li *et al.*, 2009), o que implica em aumento da incidência de radiação UV na zona tropical do planeta. Desta forma, *Gracilaria tenuistipitata*, que é uma macroalga tropical, efetivamente foi capaz de ajustar seu sistema de fotoproteção por meio do acúmulo de MAAs (na presença de N e da radiação UVA), apresentou fotoinibição dinâmica da fotossíntese acoplada aos sistemas de fotoproteção e ainda expressou genes associados ao sistema de enzimas antioxidantes. A capacidade de fotoinibição dinâmica já foi reportada para esta mesma espécie por Hanelt (1992), em um trabalho executado diretamente no campo. Outras macroalgas (no Mediterrâneo) apresentaram fotoinibição da fotossíntese causada por PAR+UV maior do que aquela causada por PAR, porém ao longo de um dia verificou-se a recuperação em diversas das espécies, como revisado por Figueroa & Gómez (2001). Esses autores apontam que essa habilidade em tolerar a radiação UV pode ser vista como uma vantagem para manter a produtividade com variações da radiação no ambiente. No caso desta tese, essas respostas foram observadas em condições de suprimento de N e exposição à radiação UV.

Entretanto, quando o N esteve ausente, o sistema de fotoproteção não foi estimulado da mesma maneira. Pode-se estipular que, caso as macroalgas respondam de forma similar à *G. tenuistipitata* (dependendo de N para ativar seus sistemas de fotoproteção) aquelas de ambientes oligotróficos poderão sofrer maiores consequências negativas da radiação UV. Com esse maior impacto, espera-se maior mortalidade das algas nessas zonas, e consequentemente, uma menor assimilação de C e maiores alterações climáticas em nível global.

5. Conclusões

As hipóteses apresentadas no início desta tese foram corroboradas pelos resultados encontrados. É possível concluir que a maior disponibilidade de nitrogênio inorgânico favorece a fotoproteção de *Gracilaria tenuistipitata* contra a radiação UV, por meio de estímulo à síntese de compostos nitrogenados (MAAs) e por maior atividade fotossintetizante (o que implica em mais energia disponível para acionar sistemas de fotoproteção). A síntese de MAAs e outros compostos nitrogenados foi regulada pela presença de radiação UVA em um primeiro momento, para a qual se especula o papel de um fotorreceptor não-fotossintetizante, e acoplado a este, se propõe que outro fotorreceptor para radiação UVB seja ativado para incrementar a síntese dos MAAs e compostos nitrogenados, de forma sinérgica. A radiação UVA também apresenta um papel evidente na regulação de enzimas reparadoras de dano no DNA, porém a fotoliase selecionada para análise molecular neste trabalho não respondeu de forma contundente aos tratamentos com N e UV efetuados.

Este trabalho ainda apresenta evidências da ação de sistemas antioxidantes sob tratamentos contendo radiação UVA (embora a atividade específica das enzimas não tenha sido demonstrada). O crescimento foi uma variável eficaz para refletir o balanço entre a síntese de substâncias fotoprotetoras e os danos causados pela radiação UV em *G. tenuistipitata*. Condições ótimas de suprimento de N em cultivos *in vitro* de *G. tenuistipitata* foram obtidas, com o fornecimento de 0,5 mM de NO_3^- durante uma semana, a qual é suficiente para a síntese de compostos nitrogenados e para o funcionamento eficiente da fotossíntese.

Podem-se resumir as principais conclusões deste trabalho nos seguintes itens:

1. Existe uma interação entre o suprimento de N e o tipo de radiação para conferir estratégias de fotoproteção em *G. tenuistipitata*.
2. As algas que estiveram mantidas durante cerca de 20 anos em laboratório apenas com radiação PAR não perderam sua capacidade de estímulo de seu sistema de defesa frente à radiação UV.

3. Os parâmetros da fotossíntese de *G. tenuistipitata* são afetados negativamente pela intensidade de radiação após 3 dias. Essas diferenças deixam de ocorrer após 7 dias, indicando que essa espécie se aclimata em pouco tempo a diferentes tratamentos de UV.
4. Houve uma relação positiva entre a dose diária de radiação (incrementado com a presença de UVB e UVA) e a síntese de MAAs em *G. tenuistipitata*.
5. Sob PAB, as ficoeritrinas de *G. tenuistipitata* desempenham um papel no processo de fotoproteção. É possível que esse papel se refira à dissipação do excesso de energia da radiação UV. Foi observado um total de 15 a 25 vezes mais PE em algas cultivadas com suprimento de 0,5 mM de NO_3^- do que naquelas que receberam 0 mM de NO_3^- .
6. As algas possuem alta plasticidade fenotípica para tolerar incrementos de radiação UVA+UVB, pois quando os tratamentos preliminares incluíram UV, o aparato fotossintetizante das algas estava já ajustado para tolerar incrementos dessa radiação. Quando as algas foram expostas à intensidades crescentes de PAB, em 3 dias o rendimento quântico ótimo diminuiu. Porém, após 7 dias, esse efeito foi ausente, evidenciando uma fotoinibição dinâmica. Por outro lado, quando tratados com PB, os ápices de *G. tenuistipitata* não apresentaram a fotossíntese eficaz, uma vez que os valores de ETR obtidos foram praticamente nulos, como consequência de uma fotoinibição crônica, reduzindo o crescimento.
7. *Gracilaria tenuistipitata* possui anteraxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno. A presença de duas xantofilas implica na possível dissipação de excesso de energia por meio de conversão de anteraxantina para zeaxantina. Entretanto essa regulação não esteve ativada no decorrer dos experimentos realizados. Este trabalho propõe a existência de um ciclo parcial de xantofilas em *G. tenuistipitata*.

8. A radiação UVA esteve envolvida na síntese de compostos de fotoproteção, e os resultados obtidos permitem propor a existência de um fotorreceptor de UVA em *G. tenuistipitata*, acoplado a um fotorreceptor de UVB. A ativação do primeiro implica em aumento da síntese de MAAs, e o segundo fotorreceptor somente pode ser ativado quando o primeiro já tenha sido estimulado, numa reação concatenada. A ativação posterior do fotorreceptor de UVB permite que ocorra um estímulo adicional da síntese de MAAs em *G. tenuistipitata*.
9. Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos de UV e N sobre os parâmetros relacionados ao metabolismo de C, indicando o caráter estável e protegido desses processos.
10. O DNA de *G. tenuistipitata* foi danificado apenas com a presença de radiação UVB sem UVA. Este trabalho alerta da necessidade de se conhecer o efeito biológico das diferentes radiações aplicadas.
11. *Gracilaria tenuistipitata* possui pelo menos duas fotoliasas diferentes. O gene codificante para a fotoliase 32 aumentou sua expressão apenas com a presença de UVA no experimento 5. É possível que a expressão e síntese dessas enzimas sejam realizadas em curto prazo (poucas horas), de modo que o montante de enzimas decorrentes desse estímulo seja suficiente para proteger a alga de quaisquer danos.
12. *Gracilaria tenuistipitata* produz, sob radiação UVA e UVB e 0,5 mM NO_3^- , quantidades elevadas de MAAs, as quais perfazem ao redor de 15% do total de proteínas solúveis da espécie após 7 dias de tratamento. Esse aspecto permite que a alga seja alvo de experimentos de biofiltração, removendo N do meio e promovendo a produção de MAAs, tal como verificado para *Asparagopsis armata* por Figueroa *et al.* (2008). Esta tese propõe que *G. tenuistipitata*, além de agarófita, seja utilizada para a produção de extratos de MAAs.

13. O uso desse organismo modelo para algas vermelhas para análise das respostas de fotoproteção contra a radiação UV sugere que organismos em ambientes oligotróficos poderão sofrer mais consequências negativas da radiação UV. Essa radiação tende a aumentar nas regiões tropicais do planeta nas próximas décadas.

6. Referências bibliográficas

- Aguilera, J.; Dummermuth, A.; Karsten, U.; Schriek, R. & Wiencke, C. 2002. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.* 25:432-441.
- Aguilera, J.; Jiménez, C.; Figueroa, F.L.; Lebert, M. & Häder, D-P. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 48:75-82.
- Aguirre-von-Wobeser, E.; Figueroa, F.L. & Cabello-Pasini, A. 2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *J. Appl. Phycol.* 12:159-168.
- Algarra, P. & Rüdiger, W. 1993. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant, Cell Environm.* 16:149-159.
- 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*. *Bot. Mar.* 43:119-126.
- Altamirano, M.; Flores-Moya, A. & Figueroa, F.L. 2003b. Effects of UV radiation and temperature on growth of germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquatic Bot.* 75:9-20.
- Altamirano, M.; Flores-Moya, A.; Kuhlenskamp, R. & Figueroa, F.L. 2003a. Stage-dependent sensitivity to ultraviolet radiation in zygotes of the brown alga *Fucus serratus*. *Zygote* 11:101-106.
- Andria, J.R.; Vergara, J. & Pérez-Llorens, J.L. 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur. J. Phycol.* 34:497-504.
- Aparicio, P.J. & Quiñones, M.A. 1991. Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant. Physiol.* 95:374-378.
- Ayres, L.M. 2009. *Efeitos da radiação UVB em variantes cromáticas de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura*. Dissertação de mestrado. Univ. S. Paulo. 146 p.
- Badger, M.R. & Price, G.D. 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:369-392.
- Bandaranayake, W.M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat. Prod. Rep.* 15:159-172.

- Barros, M.P.; Pinto, E.; Colepicolo, P. & Pedersén, M. 2001. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe^{2+} -loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288:225-232.
- Barufi, J.B.; Oliveira, E.C.; Plastino, E.M. & Oliveira, M.C. 2009. Life history, morphological variability and growth rates of the life phases of *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta) *in vitro*. *Sci. Mar.* (aceito).
- Beer, S. & Eshel, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36:785-792.
- Bellorín, A.M. 2002. *Sistemática e filogenia molecular de algas gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta)*. Tese de doutorado. Univ. S. Paulo. 193 p.
- Bidwell, R.G.S. & McLachlan, J. 1985. Carbon nutrition of seaweeds: photosynthesis, photorespiration and respiration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86:15-46.
- Bird, K.T.; Habig, C. & DeBusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18:344-348.
- Bischof, K.; Gómez, I.; Molis, M.; Hanelt, D.; Karsten, U.; Lüder, U.; Roleda, M.Y.; Zacher, K. & Wiencke, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5:141-166.
- Bischof, K.; Hanelt, D. & Wiencke, C. 1999. Acclimation of maximal quantum yield of photosynthesis in the brown alga *Alaria esculenta* under high light and UV radiation. *Plant Biol.* 1:435-444.
- Bischof, K.; Hanelt, D.; Tüg, H.; Karsten, U.; Brouwer, P.E.M. & Wiencke, C. 1998. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.* 20:388-395.
- Bischof, K.; Kräbs, G.; Hanelt, D. & Wiencke, C. 2000. Photosynthetic characteristics and mycosporine-like amino acids under UV radiation: a competitive advantage of *Mastocarpus stellatus* over *Chondrus crispus* at the Helgoland shoreline? *Helgol. Mar. Res.* 54:47-52.
- Björk, M.; Haglund, K.; Ramazanov, Z. & Pedersén, M. 1993. Inducible mechanisms for HCO_3^- utilization and repression of photorespiration in protoplasts and thalli of three species of *Ulva* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 29:166-173.
- Björn, L.O. 2007. Stratospheric ozone, ultraviolet radiation, and cryptogams. *Biol. Conserv.* 135:326-333.
- Björnsäter, B.R. & Wheeler, P.A. 1990. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth and tissue composition of *Ulva fenestrata* and *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 26:603-611.
- Blankenship, R.E. 2002. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. First Edition. Blackwell Science, Oxford. 321 p.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.
- Britt, A.B. 1995. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol.* 108:891-896.
- Britt, A.B. 2004. Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynth. Res.* 81:105-112.
- Brown, L.M. & McLachlan, J. 1982. Atypical carotenoids for the Rhodophyceae in the genus *Gracilaria*. *Phycologia* 21:9-16.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W. & Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. Plant Physiol., USA. 1367 p.
- Buma, A.G.J.; Engelen, A.H. & Gieskes, W.W.C. 1997. Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153 :91-97.
- Butchart, N.; Scaife, A.A. ; Bourqui, M.; Grandpré, J.; Hare, S.H.E.; Kettleborough, J.; Langematz, U.; Manzini, E.; Sassi, F.; Shibata, K.; Shindell, D. & Sigmond, M. 2006. Simulations of anthropogenic change in the strength of the Brewer-Dobson circulation. *Clim. Dyn.* 27:727-741.
- Cardozo, K.H.M. 2007. *Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)*. Tese de doutorado. Univ. S. Paulo. 168 p.
- Cardozo, K.H.M.; Carvalho, V.M.; Pinto, E. & Colepicolo, P. 2006. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20:253-258.
- Carell, T.; Burgdorf, L.T.; Kundu, L.M. & Cichon, M. 2001. The mechanism of action of DNA photolyases. *Current Opinion Chem. Biol.* 5:491-498.
- Carnicas, E.; Jiménez, C. & Niell, F.X. 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 50:149-158.
- Carreto, J.I.; Carignan, M.O. & Montoya, N.G. 2005. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Mar. Biol.* 146:237-252.
- Chang, C.F. & Xia, B.M. 1976. Studies on Chinese species of *Gracilaria*. *Stud. Mar. Sin.* 12:91-163 + 2 pl.

- Chaoyuan, W.; Li, R.; Lin, G.; Wen, Z.; Dong, L.; Zhang, J.; Huang, X.; Wei, S. & Lan, G. 1993. Some aspects of the growth of *Gracilaria tenuistipitata* in pond culture. *Hydrobiologia* 260/261:339-343.
- Chiang, Y-M. & Lin, J-L. 1989. Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. *Jpn. J. Phycol.* (Sôrui) 37:187-193.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162:156-159.
- Choo, K-S.; Snoeijs, P. & Pedersén, M. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298:111-123.
- Clendennen, S.K.; Zimmerman, R.C.; Powers, D.A. & Alberte, R.A. 1996. Photosynthetic response of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) to ultraviolet radiation. *J. Phycol.* 32:614-620.
- Cóllen, J. & Davison, I.R. 1999a. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell Environ.* 22:1143-1151.
- Cóllen, J. & Davison, I.R. 1999b. Reactive oxygen production and damage in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35:54-61.
- Cóllen, J. & Davison, I.R. 1999c. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35:62-69.
- Conde, F.R.; Churio, M.S. & Previtali, C.M. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 56:139-144.
- Conde, F.R.; Churio, M.S. & Previtali, C.M. 2004. The deactivation pathways of the excited-states of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyra-334 in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:960-967.
- Critchley, A.T. 1993. *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta): an economically important agarophyte. In: Ohno, M. & Critchley, A.T. (eds). *Seaweed cultivation and marine ranching*. Japan International Cooperation Agency. pp. 89-112.
- Critchley, C. & Russell, A.W. 1994. Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*: the role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plantarum* 92:188-196.
- Cullen, J.J. & Lesser, M.P. 1991. Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for a marine diatom. *Mar. Biol.* 111:183-190.
- Cunningham, F.X. & Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:557-83.

- Czeczuga, B. 1985. Studies on phycobiliproteins in Algae. VI. Light-harvesting phycobiliprotein pigments in some Rhodophyta from the Adriatic Sea. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 54:443-448.
- D'Elia, C.F. & DeBoer, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. *J. Phycol.* 14:266-272.
- Davison, I.R.; Jordan, T.L.; Fegley, J.C. & Grobe, C.W. 2007. Response of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) growth and photosynthesis to simultaneous ultraviolet radiation and nitrogen limitation. *J. Phycol.* 43:636-646.
- De la Coba, F.; Aguilera, J.; Figueroa, F.L.; Gálvez, M.V. & Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.* 21:161-169.
- DeBoer, J.A.; Guigli, H.J.; Israel, T.L. & D'Elia, C.F. 1978. Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. *J. Phycol.* 14:261-266.
- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1020:1-24.
- Döhler, G.; Hagmeier, E. & David, C. 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ^{15}N ammonium and ^{15}N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 30:179-187.
- Dring, M.J.; Wagner, A.; Boeskov, J. & Lüning, K. 1996. Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: influence of collection depth and season, and length of irradiation. *Eur. J. Phycol.* 31:293-302.
- Dunlap, W.C. & Yamamoto, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B:105-114.
- Dunlap, W.C.; Chalker, B.E. & Oliver, J.K. 1986. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 104:239-248.
- Edwards, P. 1970. Illustrated guide to seaweeds and seagrasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contr. Mar. Sc. Austin.* 15:1-228.
- Egelhoff, T. & Grossman, A. 1983. Cytoplasmic and chloroplast synthesis of phycobilisome polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3339-3343.
- Ekman, P.; Lignell, Å. & Pedersén, M. 1989. Localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Gracilaria secundata* (Rhodophyta) and its role as nitrogen storage pool. *Bot. Mar.* 32:527-534.

- Esteban, R.; Martínez, B.; Fernández-Marín, B.; Becerril, J.M. & García-Plazaola, J.I. 2009. Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *Eur. J. Phycol.* 44:221-230.
- Eswaran, K.; Mairh, O.P. & Rao, P.V.S. 2002. Inhibition of pigments and phycocolloid in a marine red alga *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. *Biol. Plantarum* 45:157-159.
- Eyring, V.; Waugh, D.W.; Bodeker, G.E.; Cordero, E.; Akiyoshi, H.; Austin, J.; Beagley, S.R.; Boville, B.A.; Braesicke, P.; Brühl, C.; Butchart, N.; Chipperfield, M.P.; Dameris, M.; Deckert, R.; Deushi, M.; Frith, S.M.; Garcia, R.R.; Gettleman, A.; Giorgetta, M.A.; Kinnison, D.E.; Mancini, E.; Manzini, E.; Marsh, D.R.; Mathes, S.; Nagashima, T.; Newman, P.A.; Nielsen, J.E.; Pawson, S.; Pitari, G.; Plummer, D.A.; Rozanov, E.; Schraner, M.; Scinocca, J.F.; Semeniuk, K.; Shepherd, T.G.; Shibata, K.; Steil, B.; Stolarski, R.S.; Tian, W. & Yoshiki, M. 2007. Multimodel projections of stratospheric ozone in the 21st century. *J. Geophys. Res.* 112 :D16303, doi :10.1029/2006JD008332.
- Falcão, V.R. 2006. *Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha Gracilaria tenuistipitata (Rhodophyta): sequenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro*. Tese de doutorado. Univ. S. Paulo. 121p.
- Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. 2008. RNA isolation method for polysaccharide rich algae: agar producing *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 20:9-12.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 2007. *Aquatic photosynthesis*. 2nd Ed. Princeton University Press, Princeton, NJ. USA.
- Fauchot, J.; Gosselin, M.; Levasseur, M.; Mostajir, B.; Belzile, C.; Demers, S.; Roy, S. & Villegas, P.Z. 2000. Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *J. Phycol.* 36:484-496.
- Faugeron, S.; Valero, M.; Destombe, C.; Martínez, E.A. & Correa, J.A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 37:705-716.
- Favre-Bonvin, J.; Bernillon, J.; Salin, N. & Arpin, N. 1987. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 26:2509-2514.
- Figuerola, F.L. & Gómez, I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: a review. *J. Appl. Phycol.* 13:235-248.
- Figuerola, F.L. & Viñegla, B. 2001. Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. *Revta. Chil. Hist. Natl.* 74:237-249.

- Figuerola, F.L.; Aguilera, J.; Jiménez, C.; Vergara, J.; Robles, M.D. & Niell, F.X. 1995. Growth, pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59:9-20.
- Figuerola, F.L.; Bueno, A.; Korbee, N.; Santos, R.; Mata, L. & Schuenhoff, A. 2008. Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *J. World Aquaculture Soc.* 39:692-699.
- Figuerola, F.L.; Conde-Álvarez, R. & Gómez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photos. Res.* 75:259-275.
- Figuerola, F.L.; Salles, S.; Aguilera, J.; Jiménez, C.; Mercado, J.; Viñegla, B.; Flores-Moya, A. & Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151:81-90.
- Flameling, I.A. & Kromkamp, J. 1998. Light dependence of quantum yield for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol. Oceanogr.* 43:284-297.
- Flores-Moya, A.; Gómez, I.; Viñegla, B.; Altamirano, M.; Pérez-Rodríguez, E.; Maestre, C.; Caballero, R.M. & Figuerola, F.L. 1998. Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: photosynthetic performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol.* 139:673-683.
- Flores-Moya, A.; Hanelt, D.; Figuerola, F.L.; Altamirano, M.; Viñegla, B. & Salles, S. 1999. Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 49:129-35.
- Franklin, L.A. & Forster, R.M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32:207-232.
- Franklin, L.A.; Kräbs, G. & Kühlenkamp, R. 2001. Blue light and UVA radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *J. Phycol.* 37:257-270.
- Franklin, L.A.; Yakovleva, I.; Karsten, U. & Lüning, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *J. Phycol.* 35:682-693.
- García-Pichel, F. & Castenholz, R.W. 1993. Occurrence of UV-absorbing mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Envir. Microbiol.* 59:163-169.

- García-Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plantarum* 88:631-637.
- García-Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1994. Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 194:55-61.
- García-Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1996a. The influence of inorganic carbon concentration on the photosynthetic acclimation of *Gracilaria tenuistipitata*. *Sci. Mar.* 60(Supl.1):223-226.
- García-Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1996b. Photosynthetic response of P-deficient *Gracilaria tenuistipitata* under two different phosphate treatments. *Physiol. Plantarum* 96:601-606.
- Geider, R.J.; LaRoche, J.; Greene, R.M. & Olaizola, M. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29:755-766.
- Genty, B.; Briantais, J-M.; & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990:87-92.
- Gerard, V.A. 1997. The role of nitrogen nutrition in high-temperature tolerance of the kelp, *Laminaria saccharina* (Chromophyta). *J. Phycol.* 33:800-810.
- Gleason, D.F. 1993. Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *Limnol. Oceanog.* 38:1452-1463.
- Gómez, I.; Figueroa, F.L.; Sousa-Pinto, I.; Viñegla, B.; Pérez-Rodríguez, E.; Maestre, C.; Coelho, S.; Felga, A. & Pereira, R. 2001. Effects of UV radiation and temperature on photosynthesis as measured by PAM fluorescence in the red alga *Gelidium pulchellum* (Turner) Kützinger. *Bot. Mar.* 44:9-16.
- Gómez, I.; Pérez-Rodríguez, E.; Viñegla, B.; Figueroa, F.L. & Karsten, U. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 47:46-57.
- Gordillo, F.J.L.; Niell, F.X. & Figueroa, F.L. 2001. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta* 213:64-70.
- Grobe, C.W. & Murphy, T.M. 1994. Inhibition of growth of *Ulva expansa* (Chlorophyta) by ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 30:783-790.

- Grobe, C.W. & Murphy, T.M. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Stech.) S. & G. (Chlorophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 225:39-51.
- Gröniger, A.; Sinha, R.P.; Klisch, M. & Häder, D-P. 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae – a database. *J. Photochem Photobiol. B. Biol.* 58:115-122.
- Grossman, A.R.; Schaefer, M.R.; Chiang, G.G. & Collier, J.L. 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* 57:725-749.
- Grzyski, J.; Johnsen, G. & Sakshaug, E. 1997. The significance of intracellular self-shading on the biooptical properties of brown, red and green macroalgae. *J. Phycol.* 33:408-414.
- Häder, D-P. & Figueroa, F.L. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem. Photobiol.* 66:1-14.
- Haglund, K. & Pedersén, M. 1992. Growth of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* at high pH. Influence of some environmental factors and correlation to an increased carbonic-anhydrase activity. *Bot. Mar.* 35:579-585.
- Haglund, K.; Björk, M.; Ramazanov, Z.; García-Reina, G. & Pedersén, M. 1992. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 187:275-281.
- Hagopian, J.C.; Nyvall, P. & Oliveira, M.C. 2002. Purification of plastid DNA from an enriched rhodoplast fraction of the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20:399-406.
- Hagopian, J.C.; Reis, M.; Kitajima, J.P.; Bhattacharya, D. & Oliveira, M.C. 2004. Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *J. Mol. Evol.* 59:464-477.
- Han, T. & Kain (Jones), J.M. 1993. Blue light photoreactivation in ultraviolet-irradiated young sporophytes of *Alaria esculenta* and *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 29:79-81.
- Han, T.; Han, Y-S.; Kain, J.M. & Häder, D-P. 2003b. Thallus differentiation of photosynthesis, growth, reproduction, and UV-B sensitivity in the green alga *Ulva pertusa* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 39:712-721.
- Han, T.; Han, Y-S.; Kim, K-Y.; Kim, J-H.; Shin, H-W.; Kain, J.M.; Callow, J.A. & Callow, M.E. 2003a. Influences of light and UV-B on growth and sporulation of the green alga *Ulva pertusa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 290:115-131.
- Han, Y-S. & Han, T. 2005. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41:523-530.

- Hanelt, D. 1992. Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88:199-206.
- Hanelt, D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* 131:361-369.
- Hanelt, D.; Wiencke, C. & Nultsch, W. 1997. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 38:40-47.
- He, L-H.; Wu, M.; Qian, P-Y. & Zhu, M-Y. 2002. Effects of co-culture and salinity on the growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 20:365-370.
- Hearst, J.E. 1995. The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair. *Science* 268:1858-1859.
- Hegglin, M.I. & Sheperd T.V. 2009. Large climate-induced changes in ultraviolet index and stratospheric- to troposphere ozone flux. *Nature Geoscience*, published on line 6 september 2009 DOI 1010381.INGE0604.
- Henry, B.E. & van Alstyne, K.L. 2004. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.* 40:527-533.
- Hólosy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33:179-197.
- Hoyer, K.; Karsten, U. & Wiencke, C. 2001. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Mar. Biol.* 141:619-627.
- Hoyer, K.; Karsten, U.; Sawall, T. & Wiencke, C. 2002. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211:117-129.
- Huovinen, P.; Gómez, I. & Orostegui, M. 2007. Patterns and UV sensitivity of carbon anhydrase and nitrate reductase activities in South Pacific macroalgae. *Mar. Biol.* 151:1813-1821.
- Huovinen, P.; Gómez, I.; Figueroa, F.L.; Ulloa, N.; Morales, V. & Lovegreen, C. 2004. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Bot. Mar.* 47:21-29.
- Huovinen, P.; Matos, J.; Pinto, I.S. & Figueroa, F.L. 2006. The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Bot.* 24:308-316.
- Huovinen, P.; Oikari, A.O.J.; Soimasuo, M.R. & Cherr, G.N. 2000. Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) gametophytes. *Photochem. Photobiol.* 72:308-313.

- Isely, N.; Lamare, M.; Marshall, C. & Barker, M. 2009. Expression of the DNA repair enzyme, photolyase, in developmental tissues and larvae, and in response to ambient UV-R in the antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Photochem. Photobiol.* 85:1168-1176.
- Israel, A.; Martinez-Gross, M. & Friedlander, M. 1999. Effect of salinity and pH on growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* in laboratory and outdoor cultivation. *J. Appl. Phycol.* 11:543-549.
- Iwasaki, H. 1967. Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. II. Nutrition of *conchocelis*. *J. Phycol.* 3:30-34.
- Jaque, F.; Tocho, J.O.; Da Silva, L.F.; Bertuccelli, G.; Crino, E.; Cussó, F.; Laurentis, M.A.; Hormaechea, J.L.; Lifante, G.; Nicora, M.G.; Ranea-Sandoval, H.F.; Valderrama, V. & Zoja, G.D. 1994. Ground-based ultraviolet-radiation measurements during springtime in the southern hemisphere. *Europhysics Lett.* 28:289-293.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167:191-194.
- Jenkins, G.I.; Christie, J.M.; Fuglevand, G.; Long, J.C. & Jackson, J.A. 1995. Plant responses to UV and blue light: biochemical and genetic approaches. *Plant Science* 112:117-138.
- Jones, L.W. & Kok, B. 1966. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiol.* 41:1037-1043.
- Kanai, S.; Kikuno, R.; Toh, H.; Ryo, H. & Todo, T. 1997. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* 45:535-548.
- Kao, J-S.; Wu, M. & Chiang, Y-M. 1990. Cloning and characterization of chloroplast ribosomal protein-encoding genes *rpl16* and *rps3*, of the marine macro-algae *Gracilaria tenuistipitata*. *Gene* 90:221-226.
- Kao, N-S. & Wu, M. 1990. The sequence of the plastid encoded *rpl22* protein in marine macroalgae, *Gracilaria tenuistipitata*. *Nucleic Acid Res.* 18:3067.
- Kao, Y-T.; Saxena, C.; Wang, L.; Sancar, A. & Zhong, D. 2005. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:16128-16132.
- Karsten, U. 2002. Effects of salinity and ultraviolet radiation on the concentration of mycosporine-like amino acids in various isolates of the benthic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Phycol. Res.* 50:129-134.

- Karsten, U.; Bischof, K.; Hanelt, D.; Tüg, H. & Wiencke, C. 1999. The effect of ultraviolet radiation on photosynthesis and ultraviolet-absorbing substances in the endemic Arctic macroalga *Devaleraea ramentacea* (Rhodophyta). *Physiol. Plantarum* 105:58-66.
- Karsten, U.; Franklin, L.A.; Lüning, K. & Wiencke, C. 1998c. 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.
- Karsten, U.; Sawall, T. & Wiencke, C. 1998b. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycol. Res.* 46:271-279.
- Karsten, U.; Sawall, T.; Hanelt, D.; Bischof, K.; Figueroa, F.L.; Flores-Moya, A. & Wiencke, C. 1998a. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. Mar.* 41:443-453.
- Kendrick, R.E. & Frankland, B. 1981. *Fitocromo e crescimento vegetal*. Coleção Temas de Biologia, Vol. 25. E.P.U./Edusp. São Paulo. 76 p.
- Kim, J.K.; Kraemer, G.P.; Neefus, C.D.; Chung, I.K. & Yarish, C. 2007. Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. *J. Appl. Phycol.* 19:431-440.
- Kim, S-T.; Malhotra, K.; Ryo, H.; Sancar, A. & Todo, T. 1996. Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase. *Mutat. Res.* 363:97-104.
- Klisch, M. & Häder, D-P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 55:178-182.
- Kohen, R. 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – new approaches for their evaluation. *Biomed. & Pharmacother.* 53:181-192.
- Kok, B. 1956. On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochim. Biophys. Acta* 21:234-244.
- Korbee, N.; Figueroa, F.L. & Aguilera, J. 2005b. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 80:71-78.
- Korbee, N.; Figueroa, F.L. & Aguilera, J. 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revta. Chil. Hist. Natl.* 79:119-132.

- Korbee, N.; Huovinen, P.; Figueroa, F.L.; Aguilera, J. & Karsten, U. 2005a. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 146:645-654.
- Korbee-Peinado, N.; Díaz, R.T.A.; 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. *J. Phycol.* 40:248-259.
- Kräbs, G.; Bischof, K.; Hanelt, D.; Karsten, U. & Wiencke, C. 2002. Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* under natural solar radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268:69-82.
- Kräbs, G.; Watanabe, M. & Wiencke, C. 2004. A monochromatic action spectrum for the photoinduction of the UV-absorbing mycosporine-like amino acid shinorine in the red alga *Chondrus crispus*. *Photochem. Photobiol.* 79:515-519.
- Kubitzki, K. 1987. Phenylpropanoid metabolism in relation to land plant origin and diversification. *J. Plant. Physiol.* 131:17-24.
- Lapointe, B.E. & Duke, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20:488-495.
- Lee, T-M. & Chang, Y-C. 1999. An increase of ornithine δ -aminotransferase-mediated proline synthesis in relation to high-temperature injury in *Gracilaria tenuistipitata* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 35:84-88.
- Lee, T-M. & Shiu, C-T. 2009. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia capillacea* and *Gelidium amansii*. *Mar. Environ. Res.* 27:8-16.
- Lee, T-M. 1998. Changes in activities and properties of biosynthetic enzymes in relation to high-temperature-induced proline accumulation in *Gracilaria tenuistipitata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Phycologia* 37:433-438.
- Lee, T-M.; Chang, Y-C. & Lin, Y-H. 1999. Differences in physiological responses between winter and summer *Gracilaria tenuistipitata* (Gigartinales, Rhodophyta) to varying temperature. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 49:93-100.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68:253-278.
- Lesser, M.P.; Cullen, J.J. & Neale, P.J. 1994. Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance to damage and repair. *J. Phycol.* 30:183-192.

- Li, F.; Stolarski, R.S. & Newman, P.A. 2009. Stratospheric ozone in the post-CFC era. *Atmos. Chem. Phys.* 9:2207-2213.
- Lignell, A. & Pedersén, M. 1989. Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 32:219-227.
- Litchman, E.; Neale, P.J. & Banaszak, A.T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* 47:86-94.
- Liu, J.; Dong, S.; Liu, X. & Ma, S. 2000. Responses of the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Rhodophyta) to iron stress. *J. Appl. Phycol.* 12:605-612.
- Liu, J-W. & Dong, S-L. 2001. Comparative studies on utilizing nitrogen capacity between two macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* (Rhodophyta) and *Ulva pertusa* (Chlorophyta). II. Feedback controls of intracellular nitrogen pools on nitrogen uptake. *J. Environ. Sci.* 13:323-327.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 163-209.
- Lopes, P.F.; Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 33:225-231.
- Lopes, P.F.; Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. 2002. Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 295:50-54.
- López-Figueroa, F. & Niell, F.X. 1989. Red-light and blue-light photoreceptors controlling chlorophyll *a* synthesis in the red alga *Porphyra umbilicalis* and in the green alga *Ulva rigida*. *Physiol. Plantarum* 76:391-397.
- López-Figueroa, F. & Niell, F.X. 1991. Photocontrol of chlorophyll and biliprotein synthesis in seaweeds: possible photoreceptors and ecological considerations. *Sci. Mar.* 55:519-527.
- López-Figueroa, F. & Rüdiger, W. 1991. Stimulation of nitrate net uptake and reduction by red and blue light and the reversion by far-red light in the green alga *Ulva rigida*. *J. Phycol.* 27:389-394.
- López-Figueroa, F. 1993. Photoregulation of nitrogen metabolism and protein accumulation in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Z. Naturforsch.* 48c:788-794.
- Macchiavello, J.; Paula, E.J. & Oliveira, E.C. 1998. Growth rate responses of five commercial strains of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales) to temperature and light. *J. World Aquaculture Soc.* 29:259-266.

- Macchiavello, J.; Saito, R.; Garófalo, G. & Oliveira, E.C. 1999. A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown *in vitro*. *Hydrobiologia* 398/399:397-400.
- Maegawa, M.; Kunieda, M. & Kida, W. 1993. Difference of the amount of UV absorbing substance between shallow- and deep-water red algae. *Jpn. J. Phycol.* 41:351-354.
- Mairh, O.P.; Ramavat, B.K. & Rao, P.S. 1990. Nutrition, growth and tetraspore induction of *Gelidiella acerosa* (Forssk.) Feld. et Hamel (Gelidiaceae, Rhodophyta) in culture. *Bot. Mar.* 33:133-141.
- McConnell, J.C. & Jin, J.J. 2008. Stratospheric ozone chemistry. *Atmosphere-Ocean* 46:69-92.
- McHugh, D. 2003. *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 105 p.
- McKenzie, R.L.; Aucamp, P.J.; Bais, A.F.; Björn, O. & Ilyas, M. 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6:218-231.
- McLachlan, J. 1982. Inorganic Nutrition of marine macro-algae in culture. In: Srivastava, L.M. (Ed.). *Synthetic and degradative processes in marine macrophytes*. Walter de Gruyter & Co. Berlin. pp. 71-98.
- Meindl, U. & Lütz, C. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 36:285-292.
- Mercado, J.M.; Figueroa, F.L.; Niell, F.X. & Axelsson, L. 1997. A new method for estimating external carbonic anhydrase activity in macroalgae. *J. Phycol.* 33:999-1006.
- Mercado, J.M.; Sánchez, P.; Carmona, R. & Niell, F.X. 2002. Limited acclimation of photosynthesis to blue light in the seaweed *Gracilaria tenuistipitata*. *Physiol. Plantarum* 114:491-498.
- Mercado, J.M.; Viñegla, B.; Figueroa, F.L. & Niell, F.X. 1999. Isoenzymic forms of carbonic anhydrase in the red macroalga *Porphyra leucosticta*. *Physiol. Plantarum* 106:69-74.
- Merril, J.F.; Mimuro, M.; Aruga, Y. & Fujita, Y. 1983. Light-harvesting for photosynthesis in four strains of the red alga *Porphyra yezoensis* having different phycobilin contents. *Plant Cell Physiol.* 24:261-266.
- Middleton, E.M. & Teramura, A.H. 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol.* 103:741-752.

- Misonou, T.; Saitoh, J.; Oshiba, S.; Tokimoto, Y.; Maegawa, M.; Inoue, Y.; Hori, H. & Sakurai, T. 2003. UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Mar. Biotechnol.* 5:194-200.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS Plant Sci.* 7:405-410.
- Moisan, T.A. & Mitchell, B.G. 2001. UV absorption by mycosporine-like amino acids in *Phaeocystis antarctica* Karsten induced by photosynthetically available radiation. *Mar. Biol.* 138:217-227.
- Murano, E. 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7:245-254.
- Nakayama, T.; Todo, T.; Notsu, S.; Nakazono, M. & Zaitso, K. 2004. Assay method for *Escherichia coli* photolyase activity using single-strand *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer DNA as substrate. *Analyt. Biochem.* 329:263-268.
- Navarro, N.P. 2004. *Efeitos da radiação UVB em Iridaea cordata (Gigartinales, Rhodophyta)*. Dissertação de mestrado. Univ. S. Paulo. 87 p.
- Navarro, N.P.; Mansilla, A. & Palacios, M. 2008. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. *J. Appl. Phycol.* 20:897-906.
- Navarro-Angulo, L. & Robledo, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia* 398/399:315-320.
- Neale, P.J.; Banaszak, A.T. & Jarriel, C.R. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.* 34:928-938.
- Nyvall-Cóllen, P.; Camitz, A.; Hancock, R.D.; Viola, R. & Pedersén, M. 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 40:305-314.
- Ó Carra, P. & Ó hEocha, C. 1976. Algal biliproteins and phycobilins. In: Goodwin, T.W. (Ed.). *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press. pp. 328-376.
- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1994. Gracilariaceae. In: Akatsuka, I. (Ed). *Biology of economic algae*. SPB Academic Publishing. pp 185-226.
- Oliveira, E.C. 1998. The seaweeds resources of Brazil. In: Critchley, A.T. & Ohno, M. (Eds.). *Seaweeds resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka. pp. 366-371.

- Oliveira, E.C.; Alveal, K. & Anderson, R.J. 2000. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. *Rev. Fish. Sci.* 8:345-377.
- Pakker, H.; Beekman, C.A.C. & Breeman, A.M. 2000b. Efficient photoreactivation of UVBR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodomenia pseudopalmata* (Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 35:109-114.
- Pakker, H.; Martins, R.S.T.; Boelen, P.; Buma, A.G.J.; Nikaido, O. & Breeman, A.M. 2000a. Effect of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36:334-341.
- 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. *Eur. J. Phycol.* 36:207-216.
- Pavia, H.; Cervin, G.; Lindgren, A. & Aberg, P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57:139-146.
- Pérez-Rodríguez, E.; Aguilera, J. & Figueroa, F.L. 2003. Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *J. Exp. Bot.* 54:1093-1100.
- Pérez-Rodríguez, E.; Aguilera, J.; Gómez, I. & Figueroa, F.L. 2001. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Mar. Biol.* 139:633-639.
- Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Leitão, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D. & Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39:1008-1018.
- Platt, T.; Gallegos, C.L. & Harrison, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38:687-701.
- 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. *Bot. Mar.* 45:253-261.
- Poppe, F.; Schmidt, R.A.M.; Hanelt, D. & Wiencke, C. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.* 51:11-19.
- Portwich, A. & García-Pichel, F. 1999. Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.* 172:187-192.
- Portwich, A. & García-Pichel, F. 2003. Biosynthetic pathway of mycosporines (mycosporine-like amino acids) in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. strain PCC 6912. *Phycologia* 42:384-392.

- Ramirez, J.M. 1992. The carotenoid pigments of photosynthetic membranes. *In*: Barber, J. (Ed.). *Trends in photosynthesis research*. Intercept Ltd. Newcastle-upon-type, England. pp 383-398.
- Rebello, J.; Ohno, M.; Ukeda, H.; Kusunose, H. & Sawamura, M. 1997. 3,6 anhydrogalactose, sulphate and methoxyl contents of commercial agarophytes from different geographical origins. *J. Appl. Phycol.* 9:367-370.
- Rech, M.; Mouget, J.-L.; Morant-Manceau, A.; Rosa, P. & Tremblin, G. 2005. Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms. *Bot. Mar.* 48:407-420.
- Riebesell, U. 2000. Carbon fix for a diatom. *Nature* 407:959-960.
- Rmiki, N.; Brunet, C.; Cabioch, J. & Lemoine, Y. 1996. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiologia* 326/327:407-413.
- Roleda, M.Y.; Wiencke, C.; Hanelt, D.; van de Poll, W.H. & Gruber, A. 2005. Sensitivity of Laminariales zoospores from Helgoland (North Sea) to ultraviolet and photosynthetically active radiation: implications for depth distribution and seasonal reproduction. *Plant Cell Environ.* 28:466-479.
- Roleda, M.Y.; van de Poll, W.H.; Hanelt, D. & Wiencke, C. 2004. PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 281:37-50.
- Rossa, M.M.; Oliveira, M.C.; Okamoto, O.K.; Lopes, P.F. & Colepicolo, P. 2002. Effect of visible light of superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 14:151-157.
- Rüdiger, W. & López-Figueroa, F. 1992. Yearly review: photoreceptors in algae. *Annu. Rev. Photochem. Photobiol.* 55:949-954.
- Russell, W.A.; Critchley, C.; Robinson, S.A.; Franklin, L.A.; Seaton, G.G.R.; Chow, W.S.; Anderson, J.M. & Osmond, C.B. 1995. Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in *Arabidopsis* leaves during photosynthesis and photoinhibition. *Plant Physiol.* 107:943-952.
- Sancar, A.; Smith, F.W. & Sancar, G.B. 1984. Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* 259:6028-6032.
- Sancar, G.B. & Sancar, A. 2006. Purification and characterization of DNA photolyases. *Methods Enzymol.* 408:121-156.
- Schauffler, S.M.; Heidt, L.E.; Pollock, W.H.; Gilpin, T.M.; Vedder, J.F.; Solomon, S.; Lueb, R.A. & Atlas, E.L. 1993. Measurements of halogenated organic compounds near the tropical tropopause. *Geophys. Res. Lett.* 20:2567-2570.

- Schnettger, B.; Critchley, C.; Santore, U.J.; Graf, M. & Krause, G.H. 1994. Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. *Plant Cell Environ.* 17:55-64.
- Schreiber, U.; Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E-D. & Caldwell, M.M. (Eds.). *Ecophysiology of photosynthesis, ecological studies*. Vol. 100. SpringerVerlag, Berlin Heidelberg. pp. 49-70.
- Schreiber, U.; Schliwa, U. & Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10:51-62.
- Schubert, N.; García-Mendoza, E. & Pacheco-Ruiz, I. 2006. Carotenoid composition of marine red algae. *J. Phycol.* 42:1208-1216.
- Setlow, R.B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:3363-3366.
- Shelly, K.; Heraud, P. & Beardall, J. 2002. Nitrogen limitation in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) leads to increased susceptibility to damage by ultraviolet-B radiation but also increased repair capacity. *J. Phycol.* 38:713-720.
- Shick, J.M.; Romaine-Lioud, S.; Ferrier-Pagès, C. & Gattuso, J-P. 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 44:1667-1682.
- 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*. *J. Exp. Bot.* 56:2851-2865.
- Sinha, R.P.; Klisch, M. & Häder, D-P. 1999. Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 52:59-64.
- Sinha, R.P.; Klisch, M.; Gröniger, A. & Häder, D-P. 1998. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 47:83-94.
- Sinha, R.P.; Klisch, M.; Gröniger, A. & Häder, D-P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea* – effects of UV and heat. *Environ. Exp. Bot.* 43:33-43.
- Sinha, R.P.; Klisch, M.; Helbling, E.W. & Häder, D-P. 2001. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 60:129-135.

- Sinha, R.P.; Lebert, M.; Kumar, A.; Kumar, H.D. & Häder, D-P. 1995. Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobiliproteins of *Anabaena* sp. and *Nostoc carmum*. *Bot. Acta* 108:87-92.
- Sinha, R.P.; Sinha, J.P.; Gröniger, A. & Häder, D-P. 2002. Polychromatic action spectrum for the induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Anabaena* sp. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 66:47-53.
- Sivalingam, P.M.; Ikawa, T.; Yokohama, Y. & Nisizawa, K. 1974. Distribution of a 334 UV-absorbing-substance in algae, with special regard of its possible physiological roles. *Bot. Mar.* 17:23-29.
- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol.* 16:245-262.
- Sültemeyer, D. 1998. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis. *Can. J. Bot.* 76:962-972.
- Swanson, A.K. & Druehl, L.D. 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Bot.* 73:241-253.
- Takano, S.; Uemura, D. & Hirata, Y. 1978. Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* 26:2299-2300.
- Talarico, L. & Maranzana, G. 2000. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 56:1-11.
- Talarico, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptative responses to light. *Sci. Mar.* 60(supl. 1):205-222.
- Tandeau de Marsac, N. 2003. Phycobiliproteins and phycobilisomes; the early observations. *Photosynth. Res.* 76:197-205.
- Teixeira, V.L. 2002. Produtos naturais marinhos. In: Soares-Gomes, A. & Pereira, R.C. (Eds.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Interciência. pp. 249-279.
- Tischner, R. & Hüttermann, A. 1978. Light-mediated activation of nitrate reductase in synchronous *Chlorella*. *Plant Physiol.* 62:284-286.
- Todo, T.; Takemori, H.; Ryo, H.; Ihara, M.; Matsunaga, T.; Nikaido, O.; Sato, K. & Nomura, T. 1993. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature* 361:371-374.
- Tonon, A.P. 2009. *Adaptação celular e molecular de Gracilaria tenuistipitata exposta à cádmio e cobre*. Tese de doutorado. Univ. S. Paulo. 148 p.
- Tsujino, I.; Yabe, K. & Sekekawa, I. 1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* 23:65-68.

- Ursi, S.; Pedersén, M.; Plastino, E.M. & Snoeijs, P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 142:997-1007.
- Van de Poll, W.H.; Eggert, A.; Buma, A.G.J. & Breeman, A. 2001. Effects of UV-B-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-related differences in UV-B tolerance. *J. Phycol.* 37:30-37.
- Van de Poll, W.H.; Hanelt, D.; Hoyer, K.; Buma, A.G.J. & Breeman, A. 2002. Ultraviolet-B-induced cyclobutane-pyrimidine dimmer formation and repair in Arctic marine macrophytes. *Photochem. Photobiol.* 76:493-500.
- Villafañe, V.E.; Sundbäck, K.; Figueroa, F.L. & Helbling, E.W. 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In: Helbling, E.W. & Zagarese, H. (Eds.). *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 357-397.
- Viñegla, B.; Segovia, M. & Figueroa, F.L. 2006. Effect of artificial UV radiation on carbon and nitrogen metabolism in the macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. *Hydrobiologia* 560:31-42.
- Vink, A.A.; Henegouwen, J.B.A.B.; Nikaido, O.; Baan, R.A. & Roza, L. 1994. Removal of UV-induced DNA lesions in mouse epidermis soon after irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 24:25-31.
- Vitousek, P.M. 1994. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75:1861-1876.
- Von Glasow, R. 2008. Sun, sea and ozone destruction. *Nature* 453:1195-1196.
- Wanderley, A. 2009. *Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta)*. Dissertação de mestrado. Univ. S. Paulo. 140p.
- Wängberg, S.-A.; Persson, A. & Karlson, B. 1997. Effects of UV-B radiation on synthesis of mycosporine-like amino acid and growth in *Heterocapsa triquera* (Dinophyceae). *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 37:141-146.
- Webb, W.L.; Newton, M. & Starr, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia* 17:281-291.
- Wehrmeyer, W. 1990. Phycobilisomes: structure and function. In: Wiessner, W.; Robinson, D.G. & Starr, R.C. (Eds.). *Cell walls and surfaces, reproduction and photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 158-172.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-313.

- Whitehead, K. & Hedges, J.I. 2005. Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 80:115-121.
- Wiencke, C.; Gómez, I.; Pakker, H.; Flores-Moya, A.; Altamirano, M.; Hanelt, D.; Bischof, K. & Figueroa, F.L. 2000. Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197:217-229
- Wisniewska, A. & Subczynski, W.K. 1998. Effects of the polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1368:235-246.
- World Meteorological Organization. 2006. Global Ozone Research and Monitoring Project—Report No. 50. Scientific assessment of ozone depletion.
- Wu, H.Y.; Zou, D.H. & Gao, K.S. 2008. Impacts of increased atmospheric CO₂ concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 51:1144-1150.
- Xiong, F.; Komenda, J.; Kopecký, J. & Nedbal, L. 1997. Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plantarum* 100:378-388.
- Yokoya, N.S.; West, J.A. & Luchi, A.E. 2004. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 52:244-254.
- Zemke-White, W.L. & Ohno, M. 1999. World seaweed utilisation: an end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.* 11:369-376.
- Zhao, X.; Liu, J.; Hsu, D.S.; Zhao, S.; Taylor, J-S. & Sancar, A. 1997. Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *J. Biol. Chem.* 272:32580-32590.
- Zheng, Y. & Gao, K. 2009. Impacts of solar UV radiation on the photosynthesis, growth, and UV-absorbing compounds in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different nitrate concentrations. *J. Phycol.* 45:314-323

7. Anexos

7.1. Anexo 1

Espectro de ação da radiação UV para dano no DNA e fotoinibição utilizados nesta tese, de acordo com Setlow (1974) e Jones & Kok (1966), respectivamente. Os dados estão normalizados a 300 nm.

λ (nm)	DNA	Fotoinibição	λ (nm)	DNA	fotoinibição	λ (nm)	DNA	fotoinibição
280	19,043	1,702	324	0,000	0,492	368	0,000	0,179
281	18,045	1,653	325	0,000	0,491	369	0,000	0,178
282	17,001	1,606	326	0,000	0,479	370	0,000	0,176
283	15,915	1,560	327	0,000	0,467	371	0,000	0,174
284	14,796	1,516	328	0,000	0,467	372	0,000	0,173
285	13,650	1,472	329	0,000	0,467	373	0,000	0,171
286	12,489	1,472	330	0,000	0,456	374	0,000	0,161
287	11,324	1,430	331	0,000	0,439	375	0,000	0,159
288	10,168	1,390	332	0,000	0,433	376	0,000	0,157
289	9,034	1,350	333	0,000	0,422	377	0,000	0,153
290	7,937	1,312	334	0,000	0,416	378	0,000	0,145
291	6,889	1,312	335	0,000	0,384	379	0,000	0,145
292	5,902	1,240	336	0,000	0,375	380	0,000	0,143
293	4,989	1,205	337	0,000	0,366	381	0,000	0,140
294	4,156	1,171	338	0,000	0,341	382	0,000	0,139
295	3,411	1,139	339	0,000	0,333	383	0,000	0,138
296	2,757	1,107	340	0,000	0,326	384	0,000	0,137
297	2,193	1,077	341	0,000	0,318	385	0,000	0,134
298	1,716	1,047	342	0,000	0,311	386	0,000	0,133
299	1,321	1,018	343	0,000	0,298	387	0,000	0,131
300	1,000	1,000	344	0,000	0,291	388	0,000	0,130
301	0,745	0,974	345	0,000	0,285	389	0,000	0,128
302	0,547	0,920	346	0,000	0,279	390	0,000	0,128
303	0,395	0,895	347	0,000	0,273	391	0,000	0,128
304	0,282	0,870	348	0,000	0,273	392	0,000	0,128
305	0,199	0,846	349	0,000	0,269	393	0,000	0,127
306	0,139	0,801	350	0,000	0,268	394	0,000	0,125
307	0,096	0,774	351	0,000	0,268	395	0,000	0,124
308	0,066	0,774	352	0,000	0,262	396	0,000	0,130
309	0,045	0,755	353	0,000	0,257	397	0,000	0,124
310	0,031	0,712	354	0,000	0,252	398	0,000	0,122
311	0,021	0,693	355	0,000	0,242	399	0,000	0,120
312	0,014	0,675	356	0,000	0,237	400	0,000	0,119
313	0,010	0,639	357	0,000	0,233			
314	0,007	0,620	358	0,000	0,224			
315	0,005	0,606	359	0,000	0,220			
316	0,003	0,575	360	0,000	0,216			
317	0,002	0,560	361	0,000	0,214			
318	0,002	0,560	362	0,000	0,201			
319	0,001	0,545	363	0,000	0,197			
320	0,001	0,531	364	0,000	0,191			
321	0,000	0,518	365	0,000	0,187			
322	0,000	0,518	366	0,000	0,183			
323	0,000	0,504	367	0,000	0,182			

7.2. Anexo 2

Artigos publicados

1. Título: Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea*

J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory

Ano: 2006

Autores: Ferreira, L.B.; **Barufi, J.B.** & Plastino, E.M.

Revista: Revista Brasileira de Botânica, 29(1):187-192.

2. Título: The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain)

Ano: 2009

Autores: Figueroa, F.L.; Korbee, N.; Carrillo, P.; Medina-Sánchez, J.; Mata, M.;

Bonomi, J. & Sánchez-Castillo, P.M.

Revista: Journal of Limnology, 68(2):1-11.

3. Título: Life history, morphological variability and growth rates of life phases of *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta) *in vitro*.

Ano: 2010

Autores: **Barufi, J.B.**; Oliveira, E.C.; Plastino, E.M. & Oliveira, M.C.

Revista: Scientia Marina. Aceito, manuscrito SM 2920

Artigos previstos:

4. Título: Nitrate reduces the negative effect of UV radiation on photosynthesis and pigmentation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) by accumulation of mycosporine-like amino acids.

Autores: **Barufi, J.B.**; Mata, M.T.; Oliveira, M.C. & Figueroa, F.L

Revista: Physiologia Plantarum

Data de envio: fevereiro de 2010

5. Título: Photoprotection against UV radiation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) grown under increasing nitrate supply.

Autores: **Barufi, J.B.**; Oliveira, M.C.; Korbee, N. & Figueroa, F.L

Revista: Journal Plant Physiology

Data de envio: março de 2010

6. Título: The accumulation of Mycosporine-like amino acids is related to the daily integrated irradiance in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): implications on photoinhibition and photoprotection.

Autores: **Barufi, J.B.**; Oliveira, M.C.; Korbee, N.; Momoli, M.M. & Figueroa, F.L.

Revista: Journal Experimental Botany

Data de envio: abril de 2010

7. Título: Effects of UVB radiation on photosynthesis and photoprotection in *Gracilaria tenuistipitata* grown under different nitrate concentrations: role of carotenoids versus mycosporine like amino acids

Barufi, J.B.; Oliveira, M.C.; Korbee, N.; Momoli, M.M. & Figueroa, F.L.

Revista: Journal of Phycology

Data de envio: maio de 2010

8. Título: The photoacclimation capacity of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) to UV radiation is related to previous the light quality grow conditions: DNA damage, mycosporine like aminoacid accumulation and antioxidant gen expression.

Barufi, J.B.; Oliveira, M.C.; Korbee, N.; Momoli, M.M.; Márquez, E. & Figueroa, F.L.

Revista: Plant Physiology

Data de envio: junho de 2010