Nelso Patricio Navarro Martínez

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOLAR EM ALGAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA REGIÃO SUBANTÁRTICA DO
CHILE DURANTE A PRIMAVERA.**

EFFECTS OF SOLAR ULTRAVIOLET RADIATION ON ECONOMICALLY
IMPORTANT ALGAE FROM CHILEAN SUB-ANTARCTIC REGION DURING
SPRING

São Paulo 2011

Nelso Patricio Navarro Martínez

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOLAR EM ALGAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA REGIÃO SUBANTÁRTICA DO
CHILE DURANTE A PRIMAVERA.**

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: Estela Maria Plastino

Coorientador: Andrés Mansilla Muñoz

São Paulo 2011

Ficha Catalográfica

Navarro, Nelso

Efeitos da radiação ultravioleta solar em algas de importância econômica da região subantártica do Chile durante a primavera /Nelso Patricio Navarro Martínez. São Paulo: N.P. Navarro, 2011.
270pp

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2011

1. UV-B 2. MAAs 3. Estreito de Magallanes 4. Nitrato I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Estela Maria Plastino
(orientadora)

A minha família e aqueles que me apoiaram *incondicionalmente*.

quí, no me quiero esconder tras frases de eminencias de la ciencia ni ser como el común de los mortales que lo hacen. Aquí, quiero decir lo que pienso y siento.

Durante esta obra no alcancé el estatus de sabio o especialista que anhelaba, pero a diferencia de muchos aún tengo una mente abierta a nuevos desafíos y un largo camino para enfrentarlos. Hasta ahora he aprendido que: lo que leo, veo o escucho se me olvida, sin embargo, lo que hago, lo aprendo...

...por eso creo que no somos tan diferentes de los primates...

Aprendí que las respuestas no suelen encontrarse en lugares recónditos ni bajo el alero de eruditos...

...tengan especial cuidado con ellos!...

Dependiendo de quién, tus conclusiones así como tus ideas podrían ser sesgadas.

He aprendido también que las respuestas están siempre ante tus ojos. Así creo que el verdadero sabio es quien además de entender procesos complicados puede observar y entender la naturaleza. Además no es más sabio el que sabe, sino aquel que te lanza al vacío para que abras tus alas y tu mente.

A pesar del incesante viento patagónico y al calcinante sol tropical he llegado aquí....

...cerca de treinta años han pasado desde que fue sembrada la semilla que me dio origen. A los treinta, continuo con el sueño de aquellos amantes de la tierra y con los míos propios, y... así como ellos he comenzado a cosechar mis frutos, he aquí una prueba....

Nelso Navarro

Agradecimentos

Quero expressar minha mais sincera gratidão a todas as pessoas e instituições que de uma ou outra maneira me apoiaram na difícil tarefa de terminar esta tese. A compreensão, força, e os conselhos das pessoas ao meu redor e daquelas que incondicionalmente apoiaram meu trabalho merecem a minha gratidão. Se por algum acaso eu esqueço mencionar alguém, tenha a certeza que em algum momento a sua ajuda verá-se refletida numa palavra, frase ou idéia dentro deste trabalho.

Aos meus orientadores Dra. Estela Plastino e Dr. Andrés Mansilla, pela orientação, confiança, compreensão, consideração profissional e pela chance de desenvolver este trabalho.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología do Chile (CONICYT) por la beca “Gestión Propia” concedida para desarrollar este proyecto.

A la Universidad de Magallanes en la persona del señor Rector Dr. Victor Fajardo Morales, y del Decano de la Facultad de Ciencias, Dr. Victor Diaz, y del Director de Departamento de Ciencias e Recursos Naturales, MSc. Orlando Dollenz, por autorizar mi alejamiento de mis actividades académicas para cursar el programa de doctorado en el Instituto de Biociências de la USP. Al Director Centro de Cultivos Marinos Bahía Laredo (Universidad de Magallanes) Ing. Pablo Gallardo por disponibilizar el personal, infraestructura y espacio de ese centro para la realización de algunos experimentos. Al Director del centro de Horticultura de la Universidad de Magallanes Sr. Julio Yaguello, por permitir la instalación de algunos experimentos en las dependencias de ese centro. Especiales agradecimientos para el Dr. Claudio Casiccia e Lic. Roberta Viana, del Laboratorio de Ozono de la Universidad de Magallanes, por facilitar datos de radición UV e PAR y por el apoyo.

Ao Departamento de Botânica e ao Laboratório de Algas Marinhas “Edison de Paula” (LAM) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por permitir me desenvolver este projeto. Ao coordenador do Centro de Microscopia Eletrônica do IB/USP Dr. Alberto Gonçalves de Freitas pelo uso dos equipamentos do laboratório. Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/USP, Irwandro, Marcio e Valdir.

Al Departamento de Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile en nombre de la Dra. Bety Matsuhira por permitirme desenvolver parte de este trabajo relacionado a la

extracción, cuantificación y caracterización de polisacáridos. Además, agradezco los almuerzos siempre alegres junto a la Dra. Matsuhira y su equipo de trabajo y alumnos.

Al Departamento de Ecología da Facultad de Ciencias da Universidad de Málaga (España) en la persona del Dr. Félix López Figueroa por permitirme la estadía en esa institución. Agradezco a todo el equipo humano y técnico del Dr. Figueroa, en especial a la Dra. Nathalie Korbee por guiarme en la extracción y cuantificación de MAAs, así como por los innumerables consejos. También agradezco la posibilidad de haber realizado la cuantificación elemental (C:N:H). No puedo dejar de mencionar a Roberto, Belém, Cristina, Paqui y Eugenia.

Aos professores Eurico Cabral de Oliveira, Mariana Cabral de Oliveira, Flavio Berchez, Mutue T. Fujii, Silvia Pita, Nair Yokoya, Zenilda Bouzon, Fanly Fungyi pelo apoio e pelos comentários e discussões científicas sempre proveitosas. Agradeço ainda ao Rosário Petti por todo o suporte eficiente dentro do LAM.

A todos (antigos e novos) amigos do LAM, em especial ao meu caro amigo José pelas gratificantes discussões.

A mis amigos puntarenenses que me apoyaron logísticamente: Mauricio Palacios e Natalia Osorio. También, especial agradecimiento al “profesor” y amigo César Cárdenas.

Quiero agradecer en forma especial a Félix por no sólo enseñarme fisiología sino por apoyarme contra viento y marea.

A mi familia... "Gracias por enseñarme el significado del verdadero amor, por guiarme en los caminos oscuros y nebulosos, por darme siempre la claridad necesaria para ver la verdad y mi norte. Por la esperanza nunca muerta, por la paciencia y el saber transmitir sin palabras, solo con la mirada, el buen camino. Espero nunca desistir..."

Finalmente, muy importantes en este camino recorrido doy gracias a mi familia puntarenense: Guakiki, Pollotón, Emi-Tokoto, Pancho y en especial a mi querida esposa Jocelyn Jofre... gracias por apoyarme incondicionalmente en aquellos días difíciles. Gracias por todo.

Índice

Lista de Abreviações.....	12
Capítulo 1. Introdução Geral.....	14
1. Radiação solar e seu impacto em organismos fotossintetizantes.....	14
1.1 Radiação solar e camada de Ozônio.....	14
1.2 A radiação que chega à Terra.....	19
2. Efeitos da radiação ultravioleta em organismos fotossintetizantes.....	20
2.1 Efeitos diretos da UV-B.....	20
2.2 Efeitos da UV-B na em pigmentos fotossintetizantes.....	26
2.3 Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	30
2.4 Mecanismos de defesa: fotoproteção e reparação.....	32
2.5 Reparação do DNA.....	33
2.6 Sistema Antioxidante (neutralizadores de ROS).....	35
2.7 Compostos fotoprotetores.....	39
2.8 Efeitos indiretos: processos fisiológicos afetados pela UV-.....	46
2.9 Efeitos da UV-B e no metabolismo de carbono e nitrogênio.....	51
2.10 Efeitos ultraestruturais da UV-B.....	53
2.11 Efeitos da UV-B na morfologia.....	56
2.12 Efeitos da UV-B no crescimento.....	57
3. Abordagens experimentais em estudos sobre os efeitos da UV-B em organismos fotossintetizantes.....	60
4. Importância dos estudos da radiação UV-B em algas.....	62
5. Justificativa.....	64
6. Objetivos.....	66
6.1. Objetivos específicos.....	66
7. Materiais e Métodos Gerais.....	68
7.1. Material biológico e cultivo.....	68
7.2. Água do mar.....	70
7.3. Tipos de filtros utilizados para os cultivos.....	70
7.4. Radiação solar.....	71
7.5. Análise estatística.....	74

Capítulo 2:

Efeitos da concentração de NO₃ em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivados sob radiação solar: crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, aminoácidos tipo micospirinas, conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio, e rendimento de carragenanas.

Abstract/Resumo.....	75
1. Introdução.....	76
2. Materiais e Métodos.....	78
2.1. Material biológico.....	78
2.2. Água do mar e meio de cultivo.....	78
2.3. Desenho experimental.....	78
2.4. Radiação solar.....	80
2.5. Amostragem e parâmetros avaliados.....	81
2.6. Análises estatísticas.....	86
3. Resultados.....	87
3.1. Radiação solar (PAR e UV).....	87
3.2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos.....	89
4. Discussão.....	104
4.1. Radiação solar (PAR e UV).....	104
4.2. Efeito das diferentes concentrações de NO ₃	105

Capítulo 3

Efeitos da UV solar em tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta): crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, aminoácidos tipo micosporinas, conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio, e rendimento de carragenanas.

Abstract/Resumo.....	108
1. Introdução.....	110
2. Material e Métodos.....	114
2.1. Material biológico.....	114
2.2. Água do mar e meio de cultivo.....	114
2.3. Radiação solar.....	114
2.4. Desenho experimental.....	114
2.5. Análises estatísticas.....	117
3. Resultados.....	118
3.1. Variáveis ambientais.....	118
3.2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos.....	121
4. Discussão.....	147
4.1. Radiação solar (PAR e UV).....	147
4.2. Efeitos da UV-B em <i>Mazzaella laminarioides</i>	148
4.3. Variação intraespecífica.....	153

Capítulo 4

Variação diária na concentração de MAAs em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) expostos à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

Abstract/Resumo.....	157
1. Introdução.....	159
2. Material e Métodos.....	161
2.1. Material biológico.....	161
2.2. Água do mar e meio de cultivo.....	161
2.3. Radiação solar.....	161
2.4. Desenho experimental.....	161
2.5. Análises estatísticas.....	163
3. Resultados.....	164
3.1. Radiação solar (PAR e UV).....	164
3.2. Conteúdo de MAAs.....	166
3.3. Tipos de aminoácidos tipo micosporinas.....	168
4. Discussão.....	175

Capítulo 5

Variação diária na concentração de MAAs em *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) exposta à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

Abstract/Resumo.....	181
1. Introdução.....	183
2. Material e Métodos.....	186
2.1. Material biológico.....	186
2.2. Água do mar e meio de cultivo.....	186
2.3. Radiação solar.....	186
2.4. Desenho experimental.....	186
2.5. Análises estatísticas.....	189
3. Resultados.....	190
3.1. Radiação solar (PAR e UV).....	190
3.2. Conteúdo de MAAs.....	192
3.3. Tipos de aminoácidos tipo micosporinas.....	196

4.	Discussão.....	201
----	----------------	-----

Capítulo 6

Ultraestrutura de *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) exposta à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

	Abstract/Resumo.....	207
1.	Introdução.....	209
2.	Material e Métodos.....	211
2.1.	Material biológico.....	211
2.2.	Água do mar e meio de cultivo.....	211
2.3.	Radiação solar.....	211
2.4.	Desenho experimental.....	211
3.	Resultados.....	215
4.	Discussão.....	219

Capítulo 7

	Discussão Geral e Conclusões.....	232
	Abstract/Resumo.....	242
	Referências Bibliográficas.....	244
	Biografia.....	269

LISTA DE ABREVIÇÕES

AA	Acido Ascórbico
AC	Anidrase Carbônica
AHO	do inglês: Antarctic Ozone Hole: “buraco” na camada de ozônio
AFC	Aloficocianina
ANOVA	Análise de Variância e
ATP	Adenosina Tri Fosfato
APX	Ascorbato Peroxidase
CAT	Catalase
Cl <i>a</i>	Clorofila a
CFC's	Cloro Fluoro Carbonos
CPD's	Dímeros de Ciclobutano Pirimidinas
D1	Proteína D1
D2	Proteína D2
DHAR	Dehidroascorbato Reductase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons
FE	Ficoeritrina
FC	Ficocianina
GPX	Glutatione Peroxidase
GR	Glutatione Reductase
GSH	Glutatione Reduzida
GSSG	GSH Oxidada
G3PDH	Gliceraldeido-3-Fosfato Deidrogenase
LHC	Complexo Coletor de Luz (
MAAs	Aminoácidos Tipo Micosporinas
MDHAR	Mono-Dehidroascorbato Reductase
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
nm	nanometros
NH ₄ ⁺	Amônio
NO ₃	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NR	Nitrato Redutase
PAR	Radiação Fotosinteticamente Ativa
P	PAR
PA	PAR+UVA
PAB	PAR+UVA+UVB
PSCs	nuvens polares estratosféricas
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
Qa	Plastoquinona a
Q _b	Plastoquinona b
RE	Retículo Endoplásmico
ROS	do inglês, Reactive Oxygen Species: espécies reativas de oxigênio
Rubisco	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxidase
SOD	Superoxido Dismutase

TOMS	Total Ozone Mapping Spectrometer
UD	Unidades Dobson
UVR	Radiação Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta A (315 nm - 400 nm)
UV-B	Ultravioleta B (280 nm - 315 nm)
UV-C	Ultravioleta C (100 nm - 280 nm)
VdEP	Violaxantina de-Epoxidase
WMO	World Meteorological Organization
μm	micrometros
μmol	micro moles
λ	Comprimento de onda

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Radiação solar e seu impacto em organismos fotossintetizantes

1.1. Radiação solar e camada de Ozônio

O sol irradia energia em um espectro eletromagnético amplo de comprimentos de onda que vão desde os raios gama até ondas de radio, embora esse espectro eletromagnético seja definido como infinito. A faixa mais importante desse espectro para a vida na Terra é a que denominamos como luz visível ou radiação fotossinteticamente ativa (em inglês PAR, 400 até 700 nm).

A radiação ultravioleta faz parte do espectro eletromagnético e compreende ondas eletromagnéticas mais energéticas com comprimentos de 100 a 400 nm. É classificada pela Comissão Internacional de Iluminação em três tipos: UV-C (190-280 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm) (OKUNO *et al.*, 1996). Porém, muitos fotobiologistas ambientais aceitam 320 nm como o limite entre a radiação UV-A e UV-B (FRANKLIN & FORSTER, 1997).

A energia característica de cada comprimento de onda é determinada pela relação:

$$E = hc / \lambda$$

onde, h é a constante de Planck ($6.6 \cdot 10^{-34} \text{ W.s}^{-2}$), c a velocidade da luz ($3 \cdot 10^{17} \text{ nm.s}^{-1}$) e λ o comprimento de onda. Quando se trata de sistemas biológicos ou químicos, a unidade mais comumente usada é o mol de fótons, o qual contém N fótons (onde N é o número de Avogadro $= 6,023 \times 10^{23}$). A energia de um mol de fótons é definida pela seguinte equação:

$$E = hc / \lambda = 1.19629 \times 10^8 \text{ J} / \lambda$$

Assim, a energia de um mol de fóton varia inversamente com o comprimento de onda. Por exemplo, a energia de um mol de fóton a 300 nm é 398 kJ. Entretanto, a energia de um mol de fóton a 700 nm é somente 171 kJ. Essa relação tem implicações químicas e biológicas importantes quando estamos considerando sistemas sob mudanças na distribuição espectral solar (WHITEHEAD *et al.*, 2000)

Em termos gerais, a distribuição espectral solar fora da atmosfera corresponde a 51% de radiação infravermelha, 41% de PAR e 8% de UV (WHITEHEAD *et al.*, 2000).

Durante a passagem através da atmosfera, a radiação está sujeita à absorção e dispersão (por parte de gases e nuvens e partículas) reduzindo sua intensidade aproximadamente em 35% antes de atingir a superfície da Terra. Como resultado do processo de dispersão e absorção, a distribuição espectral que atinge a superfície da Terra é diferente daquela registrada na borda da atmosfera.

A radiação UV-C é fortemente mutagênica e letal para muitos organismos, mas, é completamente absorvida antes de atingir a superfície da Terra por partículas e gases presentes na atmosfera, como o oxigênio (O_2) e o ozônio (O_3). A radiação UV-B é parcialmente absorvida pela camada de ozônio. Porém, os níveis de PAR e UV-A são relativamente insensíveis às mudanças na concentração de ozônio.

O ozônio compõe a atmosfera em quantidades mínimas (uma molécula de O_3 para cada 2,5 milhões de moléculas presentes na atmosfera), concentrando-se principalmente na estratosfera, entre 15 e 40 km acima da superfície terrestre. Essa região é conhecida como ozonoesfera, sendo responsável pela absorção de parte da radiação UV solar incidente, sendo fundamental para a manutenção da vida na superfície terrestre. Existe ozônio também no nível do solo, 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).

O ozônio é formado constantemente na estratosfera e corresponde à união química de uma molécula de O_2 com um átomo de oxigênio, este último proveniente da fotodissociação do O_2 por um fóton de radiação UV-C, com comprimento de onda inferior a 242nm. O ozônio, por sua vez, pode também ser dissociado em $O_2 + O$ por um fóton de radiação UV-B com comprimento de onda inferior a 320nm. Desta forma, a camada de O_3 funciona como um filtro de parte da radiação ultravioleta, principalmente da radiação UV-B e UV-C (OKUNO, 1996), mantendo assim, os níveis de ozônio estratosférico através do balanço dinâmico entre a produção e destruição fotoquímica.

O ozônio não está uniformemente distribuído ao redor da Terra. Intuitivamente, seria lógico encontrar maior concentração de ozônio estratosférico nas baixas latitudes (exemplo, no Equador) e em maiores altitudes onde as irradiâncias são mais elevadas. Contrariamente, os níveis de ozônio são mais altos na estratosfera média em altas latitudes e menores sobre o Equador (WMO, 2002). De fato, o nível de ozônio sobre o equador é relativamente constante em 260 Unidades Dobson (UD), entretanto, os níveis de ozônio nas altas latitudes no hemisfério sul podem atingir 350 UD (uma camada de ozônio de 1 mm de espessura a 0°C e 1 atmosfera de pressão corresponde a 100 UD).

Uma alta produção de ozônio ocorre sobre o equador e os trópicos, mas os ventos estratosféricos transportam esse gás para as regiões polares aumentando sua concentração em altas latitudes (WHITEHEAD *et al.*, 2000). Por outro lado, a variação em altitude da camada de ozônio resulta da lenta circulação que leva o ar pobre em O₃ da troposfera até a estratosfera. Uma vez que esse ar sobe lentamente nos trópicos, o ozônio é produzido pela fotólise das moléculas de oxigênio. Posteriormente, o ar rico em ozônio é transportado desde a estratosfera media das regiões tropicais para a estratosfera inferior nas latitudes mais altas. A alta concentração de ozônio nas altas latitudes é devido ao acúmulo desse composto a menores altitudes (Fig. 1).

Fig. 1. Produção e circulação de ozônio desconsiderando-se a influência da diminuição da camada de ozônio (modificado de STOLARSKI, 1988 e WHITEHEAD *et al.*, 2000).

O ciclo natural do ozônio pode ser perturbado pela interação com compostos antropogênicos, comumente chamados CFC's (WMO, 1994). Os íons de cloro (Cl⁻) transportados pelos CFCs e os óxidos nítricos (NO_x) são apontados como os principais responsáveis pela redução da camada de O₃ (MOLINA *et al.*, 1987; BORNMAN, 1996). Após 50 anos da introdução dos CFC's, suas concentrações têm aumentado na atmosfera. Os CFC's são estáveis e inertes na troposfera, mas quando se encontram na estratosfera, esses compostos são expostos à UV com suficiente energia para quebrar as ligações carbono-cloro. O íon cloro, quando exposto à radiação ultravioleta, apresenta elevada reatividade com as moléculas de ozônio de acordo com as seguintes reações, causando a destruição das mesmas (MOLINA *et al.*, 1987):

Essas reações podem ocorrer em qualquer parte na estratosfera, mas as taxas de ocorrência não são suficientemente rápidas para explicar o grande “buraco” na camada de ozônio que tem sido observado em cada primavera austral na Antártica desde meados dos anos 80 (FARMAN *et al.*, 1985; STOLARSKI *et al.*, 1986).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a redução na camada de ozônio parece depender também de uma série de processos químicos iniciados pela formação de nuvens polares estratosféricas (em inglês, PSCs), compostas de água congelada e de ácido nítrico triidratado, formadas durante as noites do inverno polar. Essas nuvens atuam como uma superfície catalítica para a liberação de clorina e bromina a partir de moléculas quimicamente inertes. Quando a estratosfera começa a esquentar novamente, esses compostos liberados podem reagir com as moléculas de ozônio causando a sua destruição (BORNMAN, 1996). Com o aumento progressivo das temperaturas no final da primavera e começos do verão, as PSCs diminuem e com isso o período de diminuição da camada de ozônio termina, e os valores de ozônio voltam a ser normais (WMO, 2002).

Os primeiros registros referentes à diminuição da camada de ozônio na Antártida indicam uma redução desse composto na primavera nos anos 80 (FARMAN *et al.*, 1985; STOLARSKI *et al.*, 1986; SMITH, 1992), com uma diminuição significativa até meados dos anos 90s (WEATHERHEAD & ANDERSEN, 2006). Como essa redução foi restrita à região da Antártida, foi denominada de “buraco” na camada de ozônio sobre a Antártida (Antarctic Ozone Hole- AHO). A definição clássica para AOH em termos quantitativos é a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou menor a 220 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). Essa diminuição apresentou curta duração e foi seguida por um rápido reestabelecimento. No entanto, a partir da década de 90, o aumento do “buraco” de O₃ e conseqüentemente da quantidade de radiação UV-B na superfície da Terra alcançaram níveis incomuns, atingindo não apenas o continente antártico, mas também o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (FARMAN *et al.*, 1985; ORCE & HELBLING, 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006). Em 1994, o “buraco” sobre o continente antártico atingiu 24 milhões de km² (WMO, 1994), aumentando para 30 milhões de km²

na primavera do ano 2000 (HELBLING *et al.*, 2001). Atualmente, esses valores têm sido registrados até o início do verão (WMO, 2002). Alguns estudos indicam ainda que a diminuição da camada de O₃ ocorre também no hemisfério Norte, sobre o Ártico (PEARCE, 1996).

Durante a primavera, quando a área do “buraco” de O₃ aumenta de tamanho, a ponta sul da América do Sul fica muitas vezes sob sua influência. Essa área é mais afetada pelos baixos níveis de ozônio do que qualquer outra região (WMO, 1999).

A dinâmica da camada de ozônio no extremo sul da América tem sido estudada por meio de quatro estratégias; i) lançamento de balões em regiões específicas, como Punta Arenas no Chile (KIRCHHOFF *et al.*, 1997); ii) uso de espectroradiômetros Brewer (CASICCIA *et al.*, 2003); iii) obtenção de dados da NASA através de satélites (Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS)-http://toms.gsfc.nasa.gov/ozone/ozone_v8.html) (KIRCHHOFF *et al.*, 1997; ORCE & HELBLING, 1997; CASICCIA *et al.*, 2003); e iv) medições da radiação UV feitas em terra (ORCE & HELBLING, 1997; CASICCIA *et al.*, 2003). Muitas dessas pesquisas confirmam que massas de ar debilitadas em ozônio provenientes das regiões polares atingem o extremo austral da América do Sul em eventos de duração variável durante setembro e novembro (ORCE & HELBLING, 1997; DIAZ *et al.*, 2006; CASICCIA *et al.*, 2003).

Sobre a cidade de Punta Arenas (53°S; 70,9°W) no Chile, CASICCIA *et al.* (2003) registraram 7 eventos de diminuição de ozônio entre agosto e outubro de 2000. Esses eventos totalizaram 17 dias com diminuição desse gás, que correspondeu ao período mais longo registrado até então. Cada evento teve uma duração de um e quatro dias com uma diminuição de ozônio entre 20 e 49%. Por outro lado, registrou-se uma correlação inversa entre aqueles dias com a diminuição de ozônio e o aumento da radiação UV-B.

A radiação UV-B que atinge a superfície da Terra pode aumentar até três vezes como decorrência da redução dos níveis de ozônio na estratosfera (CALDWELL *et al.*, 1989). Uma diminuição de 10% da camada de ozônio pode causar um aumento de 5% na radiação UV-B a 320 nm. Porém, essa mesma diminuição poderia aumentar em 100% a radiação a 300 nm que atinge a superfície terrestre (FREDERICK *et al.*, 1989). Estudos feitos em Punta Arenas mostram que o maior aumento relativo da radiação UV-B, durante um evento de destruição do ozônio, ocorre entre 296-297 nm, com a irradiância espectral em 297 nm sendo pelo menos 10 vezes maior do que durante um dia normal (KIRCHHOFF *et al.*, 1997). Já na cidade de Ushuaia (54,5° S, 68° W), FREDERICK *et al.* (1993) estimaram que os maiores níveis de radiação em 306,5 nm ao meio-dia durante

um evento de destruição de ozônio foi equivalente ao esperado no solstício de verão em Buenos Aires, 20 graus de latitude para o norte. BOJKOV *et al.* (1995), trabalhando também em Ushuaia, reportaram incrementos de 80% e 35% a 300 e 305 nm, respectivamente, durante um declínio de 15% na camada de ozônio em outubro. A irradiância medida a 300 nm foi semelhante ao valor registrado no mesmo local, no solstício de verão.

Finalmente, uma diminuição na concentração de ozônio pode promover diferentes valores no aumento da radiação UV-B dependendo da sazonalidade. Assim, 48% de redução na camada de ozônio promoveu um aumento de 95% na radiação UV-B em setembro de 2000. Entretanto, no mês de outubro de 2000, o mesmo valor de redução de ozônio promoveu um aumento de 111% de radiação UV-B (CASICCIA *et al.*, 2003).

1.2. A radiação que chega à Terra

Parte da radiação que chega à superfície terrestre é essencial para a vida uma vez que é utilizada pelos organismos fotossintetizantes. Esses organismos absorvem a energia na faixa da PAR para fixar quimicamente o carbono em compostos altamente energéticos, necessários para a produção de biomassa. Como consequência desse processo é produzido o oxigênio molecular o qual é importante para a vida dos organismos heterótrofos (BISCHOF *et al.*, 2006).

A quantidade e qualidade da radiação estão sujeitas a mudanças diárias, sazonais e globais (latitude e altitude). Essa radiação varia com o horário e com as condições meteorológicas do dia (incluindo chuva, nuvem e neblina). Varia também com a concentração de aerossóis (BISCHOF *et al.*, 2006). Já, na coluna de água, a penetração da radiação solar, incluindo UV e PAR, pode variar de acordo com o ângulo de incidência solar e propriedades óticas, inerentes ao corpo de água, como a absorção e o coeficiente de atenuação (KIRK, 1994; FRANKLIN & FOSTER, 1997). Essas propriedades variam com a presença de plâncton, matéria particulada em suspensão e matéria orgânica dissolvida, que absorvem fortemente a radiação UV (FRANKLIN & FOSTER, 1997; TALARICO & MARANZANA, 2000).

A penetração da radiação em águas costeiras, diferentemente da penetração em águas oceânicas, é mais variável, uma vez que recebe material dos ecossistemas terrestres via deságüe dos rios, atividades antropogênicas, suspensão de sedimentos e produção de exudatos por macrófitas, aumentando a concentração de materiais que dispersam e absorvem a radiação (FRANKLIN & FORSTER, 1997).

Embora os organismos fotossintetizantes aquáticos tenham mecanismos de proteção próprios, um aumento da radiação UV-B decorrente da diminuição da camada de ozônio pode promover efeitos deletérios. A coluna de água atua como uma proteção natural contra a radiação UV-B, embora essa radiação possa penetrar até 60 metros (SMITH *et al.*, 1992; GARDE & GUSTAVSON, 1999), provocando efeitos negativos em organismos ou ecossistemas localizados em até 30 metros (HÄDER *et al.*, 1998; TALARICO & MARANZANA, 2000; HOYER *et al.*, 2001).

2. Efeitos da radiação ultravioleta em organismos fotossintetizantes

Os efeitos da radiação UV podem ser perceptíveis em células ou até em ecossistemas, afetando ainda ciclos biogeoquímicos importantes (ZEPP *et al.*, 1998). O impacto do aumento da radiação UV na superfície da Terra tem sido investigado por vários grupos de pesquisadores, avaliando-se o efeito natural e artificial dessa radiação no crescimento e nos demais aspectos fisiológicos dos organismos fotossintetizantes. Os efeitos danosos da radiação UV seriam causados principalmente pela UV-B. A radiação UV-A, que atinge a superfície da Terra em quantidade comparativamente maior do que a UV-B, contribuiria para processos de reparo dos danos causados pela UV-B (Kim & SANCAR, 1993; BRIT, 1995). Muitas pesquisas revisam e descrevem os efeitos produzidos pela UV em plantas vasculares (TEVINI & TERAMURA, 1989; BARNES *et al.*, 1990; STAPLETON, 1992; REUBER *et al.*, 1993; CUADRA & HARBORNE, 1996; CUADRA *et al.*, 1997; PAL *et al.*, 1997; JANSEN *et al.*, 1998; GAO *et al.*, 2003), líquens (BUFFONI *et al.*, 2002) e algas marinhas (FRANKLIN & FOSTER, 1997; HÄDER *et al.*, 1998; VAN DE POLL *et al.*, 2001, BISCHOF *et al.*, 2006; KARSTEN *et al.*, 2009). Esses estudos indicam de forma geral, que a maioria dos organismos expostos com frequência à radiação solar apresenta mecanismos de defesa para minimizar os danos causados pela radiação UV. Embora essa radiação venha sendo apontada como indutora de efeitos estressantes, outros estudos têm demonstrado a inexistência desses, ou até a indução de efeitos positivos (FISCUS & BOOKER, 1995; FRANKLIN & FOSTER, 1997; HANELT & ROLEDA, 2009)

2.1. Efeitos diretos

O processo relacionado aos efeitos biológicos da radiação UV-B é iniciado com a absorção fotoquímica por parte de biomoléculas importantes. Essas biomoléculas podem ser danificadas pela absorção direta da radiação UV-B ou indiretamente por meio de reações fotoquímicas induzidas por esse tipo de radiação. A energia contida num fóton é

inversamente proporcional ao comprimento de onda, podendo ser suficiente para quebrar ligações químicas. Fótons altamente energéticos da faixa da radiação UV-B podem ser absorvidos por ácidos nucleicos, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (HARM, 1980; DIFFEY, 1991; FRANKLIN & FOSTER, 1997). O principal alvo celular da UV-B são o DNA e os aminoácidos devido à presença de resíduos aromáticos. Quando essas moléculas são afetadas, numerosas consequências biológicas e ecológicas podem ocorrer (KARSTEN *et al.*, 2009).

A exposição aos comprimentos de onda curtos (UV-B e UV-C) pode modificar o pareamento normal das bases de DNA pela formação de lesões entre moléculas de pirimidina adjacentes, resultando em dímeros de pirimidina ciclubutano (CPDs) e fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (fotoprodutos (6-4)) (Fig. 2) (SANCAR & SANCAR, 1988; STRID *et al.*, 1994; BRITT, 1995; FRIEDBERG *et al.*, 1995; FRANKLIN & FORSTER, 1997, PAKKER *et al.*, 2000a). Dímeros de TT são os mais comuns dos CPD's, entretanto, dímeros TC, CT e CC podem também ser verificados. A principal consequência desses danos é a incapacidade das enzimas RNA e DNA polimerases em reconhecerem esses dímeros danificados, provocando a interrupção na transcrição de genes e replicação do DNA (BRITT, 1995), e conseqüentemente, promovendo modificações no metabolismo e na divisão celular (BUMA *et al.*, 1995, 2000).

A formação de CPDs tem sido verificada nas macroalgas vermelhas *Rhodomenia pseudopalmata* e *Palmaria palmata* submetidas a altas doses biologicamente efetivas de radiação UV-B (3,9 KJ.m⁻² e 3,2 KJ.m⁻², respectivamente) (PAKKER *et al.*, 2000a, 2000b). Outro trabalho relacionado à formação de lesões no DNA em macroalgas foi o realizado por VAN DE POLL *et al.* (2001). Esses autores verificaram que espécies de zonas mais altas no costão, como *Chondrus crispus* e *P. palmata*, quando expostas a tratamentos de PAR+UV-A+UV-B apresentaram quantidades desprezíveis de lesões no DNA e o crescimento não foi afetado. Contrariamente, aquelas espécies que ocorrem no infralitoral, como *Polyneura hiliae*, *Phyllophora pseudoceranoides*, *R. pseudopalmata* e *Phycodrys rubens* apresentaram maior formação de CPDs no tratamento com UV-B, resultando num menor crescimento. A produção de dano no DNA não tem sido relacionada à temperatura e sim com o espectro de radiação incidente (PAKKER *et al.*, 2000b; VAN POLL *et al.*, 2002, 2003). Esses danos também têm sido reportados em carposporos de *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus*, sendo que a indução dessas lesões no DNA foi maior com o aumento da intensidade de UV-B aplicada (ROLEDA *et al.*, 2004).

Fig. 2. Danos no DNA ocasionados pela radiação ultravioleta: A, CPD (dímero de pirimidinas ciclobutano ou “cyclobutane pyrimidin dimmers”), representado por uma ligação entre duas timinas, e B, fotoproduto (6-4) ou dímero de pirimidina (6-4) pirimidinona (figura modificada de BRITT, 2004).

As proteínas são outro alvo direto e importante da UV-B em organismos fotossintetizantes, uma vez que são constituídas de aminoácidos, entre eles alguns com resíduos aromáticos que absorvem UV-B (tirosina, fenilalanina e triptófano). Por exemplo, o triptófano e tirosina absorvem radiação UV-B em 305 nm e podem ser fotooxidados levando à quebra da cadeia polipeptídica, mudanças estruturais ou inativação de enzimas (WILSON *et al.*, 1995). Como as proteínas ocorrem em numerosas réplicas nas células, o dano produzido pela UV-B é menos severo do que no DNA. Nas células, as proteínas cumprem várias funções específicas como enzimas, hormônios, componentes estruturais, etc. Por essa razão, qualquer mudança na sua estrutura terciária poderia se refletir na perda da vitalidade e viabilidade da célula (KARSTEN *et al.*, 2006). As principais proteínas afetadas são aquelas associadas à plasmalema e ao processo da fotossíntese, tais como a proteína D1 do PSII e a enzima Rubisco no ciclo de Calvin (BISCHOF *et al.*, 2000, 2002c).

O PSII é um complexo proteína-pigmento que está localizado nas membranas dos tilacóides de organismos fotossintetizantes e catalisa a transferência de elétrons provenientes da água para a plastoquinona a (Qa). O centro do complexo PSII é um heterodímero de dois polipetídeos homólogos, as proteínas D1 e D2 (Fig. 3). A radiação UV-B afetaria o complexo protéico D1/D2 (RICHTER *et al.*, 1990), fragmentando principalmente a proteína D1 (VASS, 1997; BISCHOF *et al.*, 2006). Essa degradação se explicaria pela presença de cromóforos UV-ativos tanto no lado doador quanto no lado aceptor dessa proteína (BOUCHARD *et al.*, 2006). O alvo da UV-B no lado doador seria a tirosina (GREENBERG *et al.*, 1989; RINGER *et al.*, 1989; BOUCHARD *et al.*, 2006), entretanto, no lado aceptor o principal alvo seria a plastoquinona (GREENBERG *et al.*,

1989; MELIS *et al.*, 1992; JANSEN *et al.*, 1994; BOUCHARD *et al.*, 2006). Outro alvo sensível da UV-B seria o complexo de clivagem da água localizado no lado doador (BISCHOF *et al.*, 2006).

Por outro lado, tem se reportado também que a proteína D2 pode ser degradada em presença de radiação UV (GREENBERG *et al.*, 1989; FRANKLIN & FORSTER, 1997). Além disso, tem sido sugerido que a UV-B possa afetar o complexo antena através do desligamento funcional do fotossistema, resultando em um fracasso na transferência de energia ao centro de reação (LORENZ *et al.*, 1997; BISCHOF *et al.*, 2006). A degradação das proteínas D1 e D2 e a inativação do PSII são processos diferentes, provocados por comprimentos de onda distintos. O último processo é acelerado por comprimentos de ondas curtos (UV-C) (JANSEN *et al.*, 1996).

Fig. 3. Esquema da organização do PSII no cloroplasto. As proteínas D1 e D2 formam um heterodímero no centro do PSII. As setas pretas indicam a via de transferência de elétrons. Tirosina (Tir) na proteína D1 transfere elétrons do complexo Mn para a molécula de clorofila chamada P₆₈₀. A P₆₈₀ transfere os elétrons para a feofitina (Feo), a qual os transfere para o aceptor primário (Quinona A: Q_A) e logo para o aceptor secundário (Quinona B: Q_B) (Modificado de BOUCHARD *et al.*, 2006)

A proteína D1 tem a propriedade de ser substituída mais rapidamente do que qualquer outra proteína do tilacóide ou do cloroplasto (MATTOO *et al.*, 1984). Essa propriedade, a qual é parte de um complexo ciclo de dano e reparo é essencial para manter a função do PSII sob condições de estresse (ARO *et al.*, 1993a,b) (Fig. 4). A

substituição de qualquer proteína danificada pela UV-B através da biossíntese *de novo* contribui para neutralizar os danos ocasionados pela UV (KARSTEN *et al.*, 2009). O mecanismo molecular desse ciclo tem sido estudado nas cianobacterias *Synechocystis* sp. e *Synechococcus* sp. Nesses organismos, a exposição a doses moderadas de UV-B resulta em uma taxa de reposição maior das subunidades D1 e D2 do centro de reação do PS II, substituindo rapidamente proteínas danificadas por polipeptídeos recém sintetizados (CAMPBELL *et al.*, 1998; MÁTÉ *et al.*, 1998).

Um passo fundamental no processo de reparo é a transcrição diferencial de genes que codificam para proteínas do centro de reação do PSII. MÁTÉ *et al.* (1998) reportam que a UV-B induz a transcrição de genes *psbA*, que codificam a proteína D1 do centro de reação do PSII. No entanto, esse mecanismo só pode ser bem sucedido enquanto a exposição à UV-B não induz fortes danos ao DNA, prejudicando assim a expressão do gene. Estudos comparáveis desse mecanismo em macroalgas são insuficientes, porém, as respostas poderiam ser similares (KARSTEN *et al.*, 2009), o que explicaria o aumento da taxa de recuperação em espécies de algas pardas (BISCHOF *et al.*, 2006).

Fig. 4. Esquema do ciclo de reparação do PSII envolvendo a síntese *de novo* da proteína D1 (Modificado de BOUCHARD *et al.*, 2006).

Tanto a degradação quanto a substituição das proteínas danificadas pela UV-B requerem síntese *de novo* de proteínas, e por sua vez, a síntese de proteínas é dependente do ATP. Por essa razão, tem-se sugerido que a presença de luz visível é necessária para permitir a fotossíntese e assim produzir ATP, o que finalmente se traduzirá em síntese de proteínas (SHELLY *et al.*, 2003). Esse processo foi confirmado em um estudo realizado

em *Synechocystis*, mostrando que a taxa de reparo do PSII foi reduzida quando a síntese de ATP foi inibida. Contrariamente, a síntese da proteína D1 foi estimulada pela síntese de ATP. Esses resultados ressaltam a necessidade de considerar todo o espectro solar no momento de analisar os efeitos produzidos pela UV-B em organismos fotossintetizantes. Cabe ressaltar que, a energia resultante da fotossíntese é fundamental também para os demais processos celulares, como a reparação do DNA.

A radiação UV pode afetar ainda enzimas importantes no processo da fotossíntese como a ribulose 1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco) (VU *et al.*, 1984; STRID *et al.*, 1990; BISCHOF *et al.*, 2000, 2002c), a ATP-ase, a violaxantina de-epoxidase (PFUNDEL *et al.*, 1992) e gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (G3PDH) (Bischof *et al.*, 2000). Dentre essas enzimas, a Rubisco vem sendo reportada como um dos principais alvos da UV-B em plantas vasculares, fitoplâncton e macroalgas (STRID *et al.*, 1990; JORDAN *et al.*, 1992; NOGUÉS & Baker 1995; LESSER *et al.*, 1996ab; ALLEN *et al.*, 1997; BISCHOF *et al.*, 2000).

Estudos realizados na planta vascular *Pisum sativum* mostraram que a atividade da Rubisco, assim como o conteúdo de subunidade polipeptídicas dessa enzima, diminuiu gradativamente de um a três dias de exposição à UV-B (JORDAN *et al.*, 1992). Diminuição na atividade da Rubisco e da G3PDH também tem sido verificada nas macroalgas *Phycodrys rubens*, *Laminaria solidungula*, *Monostroma arcticum* e *Alaria esculenta* quando expostas à radiação UV artificial (UV-A +UV-B) por 72 horas (BISCHOF *et al.*, 2000). Em *A. esculenta* observou-se ainda a formação de polipeptídeos de alto peso molecular, os quais poderiam ser originados a partir da Rubisco, como previamente descrito em estudos na planta vascular *Brassica napus* (GREENBERG *et al.*, 1996). *Chondrus crispus* exposta à UV apresentou 70% menos Rubisco do que quando cultivada em PAR num experimento com 15 dias de duração (VAN DE POOL, 2003). Todos esses resultados concordam com aqueles obtidos por BISCHOF *et al.* (2002c), no qual a exclusão da radiação UV do espectro solar resultou em um incremento na atividade total e na concentração da Rubisco em *Ulva lactuca*. Por outro lado, uma comunidade de *U. rotundata* mostrou uma perda significativa da Rubisco quando expostas à PAR+UV-A+UV-B, entretanto quando expostas apenas à UV não foi observada a redução dessa enzima. Isso confirmaria que populações naturais somente a combinação de UV-B e PAR elevada poderiam prejudicar a Rubisco e consequentemente a fotossíntese (BISCHOF *et al.*, 2002d)

A sensibilidade da Rubisco à UV pode ser explicada da seguinte forma: i) as subunidades da Rubisco poderiam ser degradadas sob radiação UV-B (GREENBERG *et al.*, 1996; BISCHOF *et al.*, 2000, 2002c); ii) comprimentos de onda efetivos na supressão da expressão de genes que codificam as subunidades da Rubisco poderiam não se expressar por ação de determinados comprimentos de onda (JORDAN *et al.*, 1992; MACKERNESS *et al.*, 1999). Verificou-se que os níveis de mRNA transcritos para as subunidades pequenas e grande da Rubisco diminuíram drasticamente nas primeiras horas de exposição à UV-B, embora esse efeito nos mRNA transcritos tenha sido uma resposta reversível (JORDAN *et al.*, 1992). A redução de mRNA transcriptomas que codificam para a Rubisco é uma etapa muito rápida durante a exposição a UV, mesmo antes que qualquer outro efeito fisiológico da UV-B seja evidente, e poderia assim representar um indicador sensível para a iniciação do estresse induzido pela UV-B (JORDAN *et al.*, 1992; MACKERNESS *et al.*, 1999). A concentração de Rubisco observada sob UV poderia então ser o resultado do equilíbrio entre a síntese e destruição induzida pela UV, ou mesmo da mudança na expressão de genes (BISCHOF *et al.*, 2002c). Porém, ainda não está claro se a exposição à UV causa uma redução temporal ou permanente na atividade da Rubisco. Portanto, as implicações da redução no conteúdo dessa enzima são atualmente difíceis de estimar.

Outras proteínas que podem ser possíveis alvos da radiação UV são aquelas que compõem o citoesqueleto das células de plantas. Dentre essas, a tubulina pode ser particularmente sensível, se apresentar um alto conteúdo de aminoácidos com cadeias aromáticas com forte absorção na banda dessa radiação (ZAREMBA *et al.*, 1984; HOLLÓSY, 2002).

2.2. Efeitos da UV-B na em pigmentos fotossintetizantes

As algas vermelhas apresentam como pigmentos responsáveis pela absorção da radiação solar a clorofila-*a* (*Cl a*), carotenóides e ficobiliproteínas. Estas últimas são pigmentos-antena capazes de absorver os comprimentos de onda entre 450 a 660nm, que não são eficientemente absorvidos pela clorofila (GANTT, 1990; SINHA *et al.*, 1995). As ficobiliproteínas estão organizadas em estruturas denominadas ficobilissomos (GANTT, 1981; ZUBER, 1986). São descritos três tipos de ficobiliproteínas: ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e aloficocianina (AFC). Esses pigmentos têm como função primária absorver energia transferindo-a em seqüência a partir da FE, FC e AFC, para o centro de reação do PSII, onde a *Cl-a* é excitada, possibilitando assim o estabelecimento de um fluxo de elétrons (GANTT, 1981; TALARICO, 1996). A FE apresenta uma importante

função no mecanismo de aclimação das algas vermelhas à luz, devido a sua localização mais externa nos ficobilissomos e suas características espectrais (TALARICO, 1996).

A degradação dos pigmentos fotossintetizantes é um processo natural reportado para algas (FIGUEROA *et al.*, 1997a) e está relacionado à diminuição nas taxas da fotossíntese que ocorre em resposta à radiação solar elevada. Modificações no conteúdo pigmentar podem alterar a transferência de energia que ocorre dos pigmentos acessórios até os centros de reação, dificultando a síntese de carboidrato, essencial para a produção da energia necessária para o crescimento e para ativar os mecanismos de proteção e reparo dos efeitos induzidos pela radiação UV-B. Assim, tem sido sugerido que a concentração de pigmentos é um parâmetro que pode ser utilizado como um importante biomarcador dos efeitos da radiação UV-B (CORDI *et al.*, 1997).

A radiação UV danifica os pigmentos e reduz seu conteúdo, possivelmente por duas razões: i) os pigmentos sofrem fotodegradação quando absorvem a energia da radiação UV diretamente, e ii) por efeito indireto de radicais livres de oxigênio (ROLEDA *et al.*, 2004a).

Assim como muitos dos efeitos da UV-B sobre alvos moleculares e processos fisiológicos, a sensibilidade dos pigmentos fotossintetizantes à UV-B é espécie-específico (ROLEDA *et al.*, 2007). Dessa maneira, é possível encontrar respostas variadas à UV-B dependendo do organismo estudado.

Em diversas espécies de Rhodophyta, têm-se observado que a concentração de pigmentos é alterada com um aumento na radiação UV. A concentração de *Cl a* diminuiu na presença de radiação UV em *Chondrus crispus* (AGUIRRE-VON-WOBESER *et al.*, 2000; YAKOVLEVA & TITLYANOV, 2001). Resultados similares foram obtidos em *Palmaria palmata* e *Phycodrys rubens* (BISCHOF *et al.*, 2000). Já em *Eucheuma strictum*, a diminuição na concentração de *Cl-a* foi acompanhada de um aumento na concentração de aminoácidos tipo micosporinas (WOOD, 1989), substâncias relacionadas à proteção contra radiação UV-B (GRÖNIGER *et al.*, 2000). Em *Gracilaria edulis*, a exposição por 24 horas à UV-B promoveu uma diminuição do conteúdo de *Cl-a* e ficobiliproteínas, em relação ao controle (PAR) (ESWARAN *et al.*, 2002). Em *Iridaea cordata* apenas a FE e a FC diminuíram em consequência da exposição a altos níveis de UV-B ($0,13\text{W.m}^{-2}$), enquanto que em baixos níveis de radiação a concentração desses pigmentos não variou (NAVARRO *et al.*, 2010c). Nessa espécie, a FE foi o pigmento que sofreu maiores alterações na sua concentração, enquanto que a *Cl-a* não teve suas concentrações alteradas. Houve, por tanto, uma degradação dos pigmentos de forma diferencial, de

acordo com sua distribuição nos ficobilissomos. Esse padrão de destruição de pigmentos está de acordo com o observado em *Porphyra umbilicalis*, na qual, dentre os pigmentos fotossintetizantes, a FE foi primeiramente afetada quando as algas foram expostas à radiação UV, e a *Cl-a* foi mais resistente (AGUILERA *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos também em algas azuis (SINHA *et al.*, 1995).

A proporção entre os pigmentos presentes em algas submetidas à radiação UV-B vem sendo analisado visando uma melhor compreensão do seu papel. Em *Iridaea cordata* exposta à altas irradiâncias de UV-B (NAVARRO *et al.* 2010c) o aumento da proporção FE/FC foi relacionado a: i) uma maior sensibilidade da FC à radiação UV-B quando comparado a FE, ocorrendo uma inibição na sua síntese e acúmulo, como sugerido para *Kappaphycus alvarezii* (ESWARAN *et al.*, 2001); ou ii) a um restabelecimento nas concentrações de FE de forma mais rápida do que a de FC durante a noite, aumentando a proporção FE/FC, como sugerido para *Ahnfeltiopsis concinna* (BEACH *et al.*, 2000). Essas duas possibilidades poderiam estar ocorrendo simultaneamente em *I. cordata*, uma vez que FE e FC sofreram alterações de concentração sob altas irradiâncias de UV-B. Entretanto, no caso de *I. cordata*, como a proporção FE/AFC não foi alterada, o mais provável seria a maior sensibilidade da FC à radiação UV-B do que a FE e a AFC (NAVARRO *et al.*, 2010c).

Por outro lado, GÓMEZ *et al.* (2005) mostraram que a concentração dos pigmentos pode variar com a profundidade, o tipo de radiação utilizada e com o tempo de exposição. As concentrações de *Cl a* de *Gracilaria chilensis* cultivada em duas profundidades distintas e em três tratamentos de radiação solar (PAR, PAR+UV-A e PA+UV-A+UV-B) não variou após um dia de cultivo. Já, após três dias nas mesmas condições, um incremento no conteúdo desse pigmento foi observado em amostras da superfície e tratadas com PAB. Em relação às ficobiliproteínas (FE e FC), a concentração das mesmas foi afetada por todos os tratamentos, mas sem uma tendência clara. Máximas concentrações de FE foram observadas após três dias em algas cultivadas na superfície, enquanto que a menor concentração foi observada durante o primeiro dia em algas mantidas mais ao fundo. Em geral, menores concentrações foram observadas quando a radiação UV foi excluída do espectro de radiação solar. Um estímulo à síntese de *Cl-a* e carotenóides em tratamentos contendo radiação UV-B foi também reportado para *Ulva rígida* (ALTAMIRANO *et al.*, 2000a). Entretanto, em *U. lactuca* observou-se uma diminuição do conteúdo de clorofila total após 5 horas de exposição à radiação UV-B (DÖHLER *et al.*, 1995). Já, no caso de estádios jovens e maduros de *Mastocarpus stellatus*

e *Chondrus crispus*, o tratamento com PAR+UVA+UVB causou aumento no total de carotenóides e não no conteúdo de clorofilas, possivelmente pelo papel fotoprotetor desses pigmentos na dissipação de energia da radiação UV (ROLEDA *et al.*, 2004a).

O estímulo à síntese de pigmentos tem sido relacionado ao fotoestímulo do transporte de NO₃ e à ativação da enzima nitrato redutase (NR) (LÓPEZ-FIGUEROA & RÜDIGER, 1991). Assim, o controle da síntese de pigmentos estaria intimamente relacionado com o controle do metabolismo de N (RÜDIGER & LÓPEZ-FIGUEROA, 1992; FIGUEROA *et al.*, 1995). Neste contexto, BONOMI *et al.* (2011) reportou que os pigmentos de *Gracilaria tenuistipitata* diminuíram durante período experimental principalmente em baixas concentrações de nitrogênio e UV. Entretanto, a incubação sob altas concentrações de nitrato (0,5 mM) atenuaram significativamente o efeito negativo da UV-B no conteúdo pigmentar. A diminuição na concentração de pigmentos poderia estar relacionada à falta de nitrogênio celular disponível para síntese e reposição de aminoácidos e proteínas importantes ao metabolismo. Esse elemento poderia ser obtido a partir de pigmentos como as ficobiliproteínas, que têm sido consideradas como reservas alternativas de nitrogênio (LAPOINTE, 1981). Enzimas responsáveis pela captação desse elemento têm sido apontadas como sensíveis à radiação UV-B (DÖHLER *et al.*, 1995), o que prejudicaria indiretamente a síntese e reposição dos pigmentos fotossintetizantes.

A fotodestruição de pigmentos parece ser um processo natural, envolvido na proteção dos sistemas fotossintetizantes em relação a mudanças bruscas de irradiância de curta duração (TALARICO, 1996; FIGUEROA *et al.*, 1997a; ROLEDA *et al.*, 2004a). FIGUEROA *et al.* (1997a) reportaram que alterações no conteúdo pigmentar ocorrem diariamente, como descrito para *Porphyra leucosticta*, em que a FE e a FC, assim como a *Cl-a*, são danificadas em condições de excesso de radiação solar (PAR+UV-A+UV-B), podendo ser recuperadas no decorrer do dia (FIGUEROA *et al.*, 1997a). Esses autores verificaram que as concentrações de FE e FC diminuíram fortemente durante o período de 12:00-13:30 horas, quando os níveis de radiação solar eram elevados, enquanto que no início da manhã e finais de tarde, as concentrações eram maiores.

A FE apresenta uma importante função no mecanismo de aclimação das algas vermelhas à luz, devido a sua localização mais externa nos ficobilissomos e suas características espectrais (TALARICO, 1996). Observações feitas em *Ahnfeltiopsis concinna* exposta a altos níveis de radiação solar revelaram que, embora a FE seja o pigmento mais degradado, é também o mais rapidamente sintetizado quando comparado

aos demais pigmentos (BEACH *et al.*, 2000). Segundo ALGARRA & RÜDIGER (1993), a síntese e a reposição de FE, além da sua capacidade de dissociação, favorece a aclimação dos ficobilissomos às mudanças de irradiâncias, sugerindo-se uma função fotoprotetora desse pigmento (SINHA *et al.*, 1995), uma vez que as proporções FE/FC e FE/AFC podem ser restabelecidas em curtos períodos de tempo (BEACH *et al.*, 2000). As ficobiliproteínas poderiam sofrer ainda um reagrupamento nos tilacóides, como sugerido para *Porphyra umbilicalis* (AGUILERA *et al.*, 1999). Nessa espécie, observou-se que, em condições de radiação UV-B, a absorção dos pigmentos diminuiu, porém a concentração não foi alterada. AGUILERA *et al.* (1999) sugerem que essa radiação pode produzir um efeito de “empacotamento” dos pigmentos prejudicando a fotossíntese, porém a concentração de pigmentos não é alterada. Esse empacotamento, causado por alterações no fluxo de energia entre as ficobiliproteínas e a Cl *a*, poderia ser uma maneira de fotoproteção (AGUILERA *et al.*, 1999), como já sugerido em cianobactérias (SINHA *et al.*, 1995). Alternativamente, uma dissociação dos ficobilissomos de cianobactérias foi relatada prejudicando sua função como pigmentos acessórios (SINHA *et al.*, 1995). Esse processo seria causado pela destruição das proteínas de ligação dos componentes do ficobilissomo (SINHA *et al.*, 1995). 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 (AGUIRRE-VON-WOBESER *et al.*, 2000)

Em decorrência dos efeitos moleculares promovidos pela radiação UV-B, muitas consequências fisiológicas e biológicas poderiam ocorrer como uma cascata de eventos. Por outro lado, essas consequências, assim como os efeitos moleculares podem também ser decorrentes da formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactive oxygen species: ROS)

2.3. Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As ROS são normalmente produzidas em organismos fotossintetizantes em algumas vias metabólicas, incluindo a fotossíntese (ASADA, 1999) e a respiração (DAT *et al.*, 2003). As ROS são produzidas diretamente pela excitação de O₂ e a consequente formação de oxigênio singlete (O₂(¹Δ_g)), ou pela transferência de um, dois ou três elétrons para o O₂, resultando na formação de radicais superóxidos (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (HO[•]), respectivamente (BOWLER *et al.*, 1992;

BAKER & ORLANDI 1995; MITTLER, 2002). Esse processo pode ser estimulado na presença de fatores ambientais estressantes, como altos níveis de radiação UV (MALANGA & PUNTAROLO, 1995; PAPADAKIS & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2002; LEE & SHIU, 2009), temperatura (ASADA, 1997), dessecação e alta irradiância (CULLEN & DAVISON, 1999a,b; BURRIT *et al.*, 2002) e metais pesados (CONTRERAS *et al.*, 2005). Além dos processos internos, a formação de ROS induzida pela UV-B pode ocorrer também no ambiente pela fotoativação da matéria orgânica dissolvida, degradação fotoquímica e liberação de elétrons excitados que iniciam a redução do oxigênio molecular, resultando em radicais ânion superóxido (COOPER & ZIKA, 1983). Um segundo passo de redução de radicais superóxido seguido de protonação produz peróxido de hidrogênio, que é um oxidante poderoso devido a sua relativa longa vida que permite a difusão a longas distâncias (KARSTEN *et al.*, 2009). Quando a produção de ROS é excessiva e favorece o estado pró-oxidante (desbalanço metabólico), o estresse oxidativo é desencadeado, provocando danos às estruturas celulares (SIES, 1993). Esses danos resultam da capacidade das ROS em reagir e oxidar biomoléculas fundamentais como proteínas, clorofilas, DNA e lipídeos de membranas, podendo alterar funções biológicas e até levar à morte celular (BOWLER *et al.*, 1992).

Indução da produção excessiva de ROS e o estresse oxidativo promovido pela UV-B tem sido observado em plantas vasculares, micro e macroalgas (FOYER *et al.*, 1994; LESSER, 1996ab; MALANGA *et al.*, 1997; HE *et al.*, 2002; RIJSTENBIL, 2002; GERHARDT *et al.*, 2005; SHIU & LEE, 2005; LEE & SHIU, 2009). Como exemplo, LEE & SHIU (2009) reportaram que a UV-B promoveu altos níveis de peroxidação lipídica e produção de H₂O₂ em *Pterocladia capillacea* e *Gelidium amansii*. Verificou-se que o estresse oxidativo foi maior em *G. amansii* do que *P. capillacea* uma vez que a primeira ocorre no médiolitoral inferior e a segunda ocorre no médiolitoral superior.

Em plantas vasculares, as ROS parecem desempenhar um papel importante na sinalização de vias de transdução de sinal, como respostas à exposição UV-B (MACKERNESS *et al.*, 1999; GERHARDT *et al.*, 2005). GERHARDT *et al.* (2005) utilizaram duas abordagens para pesquisar a possível participação das ROS nas respostas morfológicas e de aclimação à UV-B em *Brassica napus*. Os antioxidantes ascorbato e cisteína foram usados para testar se podem afetar a resposta morfológica (curvamento da planta). Por outro lado, o efeito do H₂O₂ foi usado para testar se as ROS podem promover uma resposta morfológica similar. A aplicação de ascorbato ao tecido de *B. napus* diminuiu a resposta morfológica (curvamento), enquanto que a cisteína impediu essa

resposta. Assim, a adição de antioxidante diminui a magnitude da resposta e é possível que as ROS estejam envolvidas nessa resposta. Contrariamente, a aplicação de H_2O_2 resultou na indução do curvamento na ausência de UV-B. Assim, H_2O_2 pode ser um dos mensageiros secundários na transdução do sinal da UV-B, ou pode ser convertido em ROS que desencadeia respostas para UV-B. Embora, elevados níveis de H_2O_2 são freqüentemente observados em plantas expostas à UV-B, o papel exato do H_2O_2 como um mensageiro secundário nas respostas mediadas pela UV-B é atualmente desconhecida (MACKERNESS *et al.*, 2001; DESIKAN *et al.*, 2001). Por outro lado, demonstrou-se que a transcrição induzida pela UV-B de alguns genes de *Arabidopsis thaliana* envolve ROS gerados a partir de múltiplas fontes celulares, e que as ROS são vias precoces de sinalização de uma variedade de respostas à UV-B (MACKERNESS *et al.*, 2001).

2.4. Mecanismos de defesa: fotoproteção e reparação

Diferentemente das algas bentônicas, as microalgas podem evitar a radiação UV-B por migração e movimento vertical, o que representa uma das estratégias de prevenção mais eficaz (WULFF *et al.*, 2008). Entretanto, a coluna d'água pode ter um efeito protetor às macroalgas que crescem a determinadas profundidades, contrariamente ao que ocorrem na zona entremarés, que estão sujeitas a altos níveis de UV-B (KARSTEN *et al.*, 2001). Nesses locais, algumas algas podem evitar o excesso de radiação formando densos tufos, como no caso de *Ulva*, *Acrosiphonia*, *Chaetomorpha* ou *Urospora*. As porções dos talos localizados externamente ficam expostas à radiação elevada, enquanto que as porções internas ficam permanentemente em condições de baixa radiação ou até mesmo permanecer no escuro (BISCHOF *et al.*, 2002d, 2006; ROLEDA *et al.*, 2009). Algumas macroalgas podem crescer sob a proteção de outras espécies ou até mesmo sob a proteção de adultos da sua espécie, promovendo uma atenuação dos efeitos da radiação UV-B (NAVARRO *et al.*, 2008). Outras algas podem crescer sob a proteção de grandes algas pardas (ZAMORANO & WESTERMEIER, 1996), evitando assim a exposição a altos níveis de UV-B.

Outros fatores como a estrutura do talo, densidade celular, espessura da parede celular e densidade de cloroplastos podem atenuar os efeitos da UV-B em algas marinhas. O aumento da espessura do talo poderia minimizar os danos no DNA promovidos pela UV-B, uma vez que as camadas externas de células podem filtrar essa radiação impedindo que atinja porções mais internas (FRANKLIN & FORSTER, 1997; ROLEDA *et al.*, 2007). Em diatomáceas da Antártica, a diferença no tamanho das células explicaria

em grande parte a variabilidade na acumulação de CPDs e os efeitos da UV na sobrevivência (KARENTZ *et al.*, 1991b).

As algas e as plantas vasculares desenvolveram várias estratégias de defesa contra os danos induzidos pela UV-B, dentre essas incluem-se: i) a fotorreparação do DNA mediado pela PAR e UV (MITCHELL & KARENTZ, 1993; PAKKER *et al.*, 2000a,b); ii) o acúmulo de antioxidantes e a ativação de enzimas antioxidantes (COCKELL & KOWLAND, 1999); iii) o acúmulo de compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em algas vermelhas (KARSTEN *et al.*, 1998ab; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a,b), os compostos fenólicos em algas pardas (PAVIA *et al.*, 1997; CONNAN *et al.*, 2004; ABDALA-DÍAZ *et al.*, 2006) e em *Ulva pertusa* (HAN & HAN, 2005), e as trihidroxycumarinas na alga verde *Dasycladus vermicularis* (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

2.5. Reparação do DNA

Continuamente, enzimas reparadoras do DNA atuam no genoma reconhecendo lesões (HÄDER & SINHA, 2005). Uma vez encontrada uma lesão, uma eficiente reparação do DNA é iniciada, a qual em muitos casos leva a restauração da informação genética (CARELL & EPPLE, 1998). Os danos no DNA podem ser reparados por enzimas fotossensíveis, entre elas as fotoliasas. Essas enzimas são talvez um dos mais simples e antigos sistemas de reparação do DNA (HÄDER & SINHA, 2005). Têm sido reportadas em muitos organismos terrestres e aquáticos desde bactérias até vertebrados (BRITT, 1995; SINHA & HÄDER 2002; HÄDER & SINHA, 2005; RASTOGI *et al.*, 2010). São consideradas antigas proteínas de reparação, e possivelmente tiveram papel importante na evolução dos primeiros organismos da Terra (CARELL & EPPLE, 1998).

As fotoliasas se ligam aos CPDs (CPD-fotoliase) ou 6-4 Fotoproducto (6-4 fotoliase) e revertem os dímeros à forma monomérica normal na presença de radiação UV-A e PAR (luz azul e branca), processo conhecido como fotoreativação (KIM & SCANDAR, 1993; TODO *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1994; STRID *et al.*, 1994; BRITT, 1995; VAN DE POLL *et al.*, 2002; HÄDER & SINHA, 2005). As CPD-fotoliasas têm sido reportadas em diversos grupos, tais como archaea, bactérias, fungos, vírus, plantas, invertebrados e vertebrados (SINHA & HÄDER, 2002; RASTOGI *et al.*, 2010). Por outro lado, 6-4 fotoliasas foram identificadas apenas em *Drosophila* (TODO *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (PANG & HAYS, 1991) e no bicho-da-seda *Xenopus laevis* (TODO *et al.*, 1997). O mecanismo de fotoreativação da 6-4 fotoliase e CPD-fotoliase poderia ser similar, uma

vez que ambas possuem o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (CARELL *et al.*, 2001). Esse mecanismo implicaria na transferência de elétrons a partir da FAD reduzida para o substrato, para proceder ao reparo do dímero (ZHAO *et al.*, 1997).

Os trabalhos sobre fotorreativação dos dímeros de pirimidina em algas marinhas são recentes. CPDs detectados em *Rhodomenia pseudopalmata* e *Palmaria palmata* foram rapidamente reparados em presença de PAR e UV-A (PAKKER *et al.*, 2000a,b). Verificou-se que esse reparo pode ocorrer no escuro, como observado em *P. palmata* (PAKKER *et al.*, 2000b), mas não em *R. pseudopalmata* (PAKKER *et al.*, 2000a). Adicionalmente, demonstrou-se que o processo de fotorreativação é dependente da temperatura em *P. palmata* (PAKKER *et al.*, 2000b). Esse fato torna-se importante, uma vez que a temperatura atua no crescimento e na sobrevivência das algas, tendo papel fundamental em processos enzimáticos (PAKKER *et al.*, 2000 a,b). Os 6-4 fotoprodutos detectados em *P. palmata* foram também reparados em presença de PAR e UV-A e o ótimo de eficiência ocorreu temperatura distinta da observada para o reparo de CPDs (PAKKER *et al.*, 2000b). Esses autores sugerem a presença de dois processos de reparo independentes nessa espécie.

A baixa presença de dímeros de pirimidina em *Palmaria palmata* e *Chondrus crispus* quando expostas à PAR+UV-A+UV-B por 15 dias fez com que VAN DE POLL *et al.* (2001) sugerissem a presença de enzimas fotoliasas. Por outro lado, à ausência de reparo no DNA de *Odonthalia dentata*, *Coccotylus truncatus* e *Monostroma arcticum* poderia indicar a ausência de fotoliasas (VAN DE POLL *et al.*, 2002).

Outro processo de reparo independente da presença de luz é a excisão de nucleotídeos danificados e a substituição deles por um novo fragmento (MITCHELL & KARENTZ, 1993; KARENTZ, 1994; BRITT, 1995). Esse processo foi demonstrado em microalgas (KARENTZ *et al.*, 1991b; BUMA *et al.*, 1995) e plantas vasculares (PANG & HAYS, 1991; QUAITE *et al.*, 1994). O DNA danificado pode também ser reparado após a replicação, considerando como base a informação contida na fita não danificada (ROY, 2000).

Além da temperatura e da luz desempenharem papel importante nos processos relacionados ao reparo do DNA, a disponibilidade de nutrientes pode influenciar a expressão de genes ligados às vias de reparo, como a excisão de nucleotídeos (VAN DE POLL *et al.*, 2002).

2.6. Sistema Antioxidante (neutralizadores de ROS)

Dois sistemas complexos de defesa antioxidante contra as ROS em organismos fotosintetizantes têm sido reportados: enzimáticos e não enzimáticos. Dentre esses últimos, estão sistemas que incluem a presença de ácido ascórbico (AA), α -tocoferol, carotenóides (β -caroteno, peridinina, astaxantina e zeaxantina), glutatona reduzida (GSH) e poliaminas ou flavonóides (BUCHANAN *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2003).

Glutamina e AA são agentes redutores que combatem as ROS, e podem também absorver diretamente a UV-B, uma vez que sua absorção máxima é na região UV (200-300 nm), protegendo diretamente a célula (XUE *et al.*, 2005). A concentração de AA e glutatona sofreram um aumento como resultado da exposição de *Dunaliella salina* a UV-B, conferindo uma maior proteção ao estresse oxidativo (EL-BAKY *et al.*, 2004). Similarmente, o conteúdo de glutatona em *Thalassiosira pseudonana* aumentou em resposta à UV-B (RIJSTENBIL, 2002). Compostos como AA, α -tocoferol e β -caroteno são antioxidantes bem reconhecidos em algas marinhas (DUMMERMUTH *et al.*, 2003).

Os carotenóides podem desempenhar a função de fotoprotetores pela dissipação do excesso de energia (HAVAUX & NIYOGI, 1999) e como antioxidantes (EDGE *et al.*, 1997). Esses compostos podem prevenir a formação de espécies reativas do oxigênio no cloroplasto através da extinção de moléculas de clorofila em estado triplete e de oxigênio singleto (YOUNG, 1991). Em *Dunaliella bardawil* o acúmulo de β -caroteno impediu danos fotossintetizantes relacionados à UV através da absorção da luz azul e UV-A (WHITE *et al.*, 2002). Por outro lado, sugere-se que o aumento da zeaxantina na presença do ciclo das xantofilas contribui para a proteção contra a UV e prevenção de danos promovidos por essa radiação (GÖTZ *et al.*, 2002). Além dessa atividade, os carotenóides podem ainda inibir a entrada de substâncias oxidativas e íons metálicos nas células, e dessa forma, retardar o processo de peroxidação lipídica (WISNIEWSKA & SUBCYNSKI, 1998), como observado para a peridinina (BARROS *et al.*, 2001). Esses autores também verificaram forte atividade antioxidante de astaxantina em lipossomos marcados com Fe^{2+} .

Os carotenóides podem ser acumulados em grandes quantidades (10% do peso seco) em microalgas do gênero *Dunaliella* como resposta a situações de estresse, tais como alta intensidade de luz, alta concentração de sal e limitação de nutrientes (BEN-AMOTZ & AVRON 1988; BAR *et al.*, 1995; EL-BAZ *et al.*, 2002). Grandes quantidades de carotenóides, principalmente de β -caroteno, astaxantina e zeaxantina, poderiam ser

usadas para eliminar ou reduzir ROS (RISE *et al.*, 1994; EL-BAZ *et al.*, 2002). Nesse contexto, cultivos de *D. salina* expostos à radiação UV-B apresentaram um aumento significativo no conteúdo de carotenóides principalmente, astaxantina e criptoxantina quando comparado a um cultivo sem UV-B (EL-BAKY *et al.*, 2004). Astaxantina e zeaxantina têm sido apontadas como as mais eficazes na proteção contra a UV-B em alguns organismos, impedindo o processo de peroxidação muito mais do que o β -caroteno (GÖTZ *et al.*, 1999).

Em macroalgas, também tem sido observado um incremento de carotenóides em resposta a radiação UV-B (LEE & SHIU, 2009). Esses autores sugerem que os carotenóides estão envolvidos na proteção contra a radiação UV-B em *Pterocladia capillacea*, uma vez que sua concentração aumentou quando essa alga foi exposta a 1,5–3,0 Wm^{-2} de UV-B. Contrariamente, em *Gelidium amansii*, não houve acúmulo de carotenóides quando exposta à 0,5–3,0 Wm^{-2} de UV-B. Essa diferença foi atribuída à posição dessas espécies no costão: a primeira ocorre no infralitoral inferior e a segunda no infralitoral superior. Por outro lado, espécies coexistindo num mesmo ambiente podem apresentar diferenças na sensibilidade ao estresse oxidativo promovido pela UV-B (CHOO *et al.*, 2005). Esses autores reportaram que *Cladophora glomerata* investiu mais em carotenóides frente a uma situação de estresse (UV-B), incluindo uma alta proporção entre carotenóides/clorofila e um ciclo violaxantina xantofila funcional. Contrariamente, *Ulva procera* foi mais sensível à UV-B, apresentando uma baixa proporção entre carotenóides/clorofila e nessa espécie não foi observado o ciclo das xantofilas.

O sistema antioxidante enzimático em organismos fotossintetizantes é constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e enzimas envolvidas no ciclo Ascorbato-Glutathione, tais como ascorbato peroxidase (APX), mono-dehidroascorbato reductase (MDHAR), dehidroascorbato reductase (DHAR) e glutathione reductase (GR), além da violaxantina de-epoxidase (VdEP) (AGUILERA *et al.*, 2002; DUMMERMUTH *et al.*, 2003; KARSTEN *et al.*, 2009).

A SOD é a primeira linha de enzimas de detoxificação que converte o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em uma ROS menos tóxica, o H_2O_2 . Três tipos de SOD têm sido reportadas em algas, de acordo com suas isoformas, ligadas a diferentes metais: MnSOD, CuZnSOD e FeSOD. Essa última é considerada a principal removedora de ânions superóxido no cloroplasto (ALSHER *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2003). Embora o H_2O_2 seja menos tóxico, seu acúmulo poderia danificar alguns componentes celulares. A remoção desse composto é feita pelos ciclos de ascorbato-glutathione e de glutathione peroxidase e

ainda pela atividade da CAT. A APX degrada o H_2O_2 pela oxidação do ácido ascórbico (AA) e o AA oxidado, tal como a DHA, é reduzido para regenerar o AA pela DHAR usando GSH como doador de elétrons (ASADA, 1999). A GSH oxidada (GSSG) é reduzida para GSH pela GR utilizando o poder redutor do NADPH (PINTO *et al.*, 2003; BLOKHINA *et al.*, 2003) (Fig. 5). A CAT é responsável também pela remoção do H_2O_2 (WILLEKENS *et al.*, 1997).

Sugere-se que o ciclo de ascorbato-glutationa seja o principal sistema de remoção de ROS, uma vez que esse ciclo está presente em muitos compartimentos celulares, e que a enzima APX tem uma alta afinidade por H_2O_2 . A APX seria responsável pela fina modulação dessas substâncias, enquanto que a CAT seria responsável pela remoção do excesso de espécies reativas de oxigênio durante o estresse (MITTLER, 2002).

Fig. 5. Esquema simplificado do sistema antioxidante enzimático de um organismo fotossintetizante. O ciclo do ascorbato-glutationa está indicado com setas vermelhas. As ROS encontram-se identificadas em preto. SOD, superóxido dismutase; AA, ácido ascórbico; APX, ascorbato peroxidase; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato redutase; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato redutase; GSSG, glutatona oxidada; GSH, glutatona reduzida; GR, glutatona redutase; PSI, fotossistema I; Fd, ferredoxina; PSII, fotossistema II; V, violaxantina; A, anteraxantina; Z, zeaxantina; VdEP, violaxantina de-epoxidase (Modificado de BONOMI, 2010).

Alguns estudos envolvendo os sistemas enzimáticos contra as ROS promovidos pela exposição à UV-B tem sido realizados em algas. A atividade enzimática antioxidante em algas expostas à UV-B pode depender da espécie e do seu local de ocorrência. Espécies do médiolitoral (superior e inferior) mostraram uma alta atividade enzimática antioxidante quando comparada com espécies do infralitoral (AGUILERA *et al.*, 2002). Diferenças na atividade enzimática antioxidante entre *Gelidium amansii* (infralitoral inferior) e *Pterocladia capillacea* (infralitoral superior) foram também observadas quando expostas a UV-B (LEE & SHIU, 2009). Assim, as algas expostas freqüentemente a fatores de estresse podem apresentar e manter um sistema bioquímico mais eficaz de defesa. Manter uma alta atividade enzimática de proteção durante todo o ano poderia ser energeticamente custoso. Assim, espécies que não estão permanentemente expostas a condições estressantes, por exemplo, em águas mais profundas, pode favorecer a ativação e síntese de sistemas de proteção para responder ao estresse abiótico só apenas quando necessário (KARSTEN *et al.*, 1999; BISCHOF *et al.*, 2006). Nesse contexto, COLLEN & DAVISON (1999 a,b) postularam que a tolerância diferencial ao estresse associado à distribuição vertical de diferentes espécies de *Fucus* está relacionada ao status antioxidante de cada uma das espécies, baseada principalmente em diferenças espécie-específica de atividades de enzimas antioxidantes.

Algas verdes parecem ter maiores atividades de enzimas antioxidantes e maior conteúdo de ácido ascórbico do que algas vermelhas ou pardas (AGUILERA *et al.*, 2002). Além disso, a atividade da GR foi estimulada pela UV-B artificial na alga verde *Monostroma arcticum* e nas algas vermelhas *Coccytylus truncatus* e *Phycodrys rubens* após 84 horas de exposição contínua à UV. A atividade da GR foi ainda maior quando a exposição à UV foi seguida de incubação no escuro por 24 h, indicando uma maior taxa de eliminação de radicais de oxigênio nessas condições. *Devaleraea ramentacea*, *Palmaria palmata* e *Acrosiphonia penicilliformis* não mostraram efeito significativo da UV sobre as atividades de APX, CAT e SOD após 8 dias de cultura em condições de laboratório. No entanto, uma redução significativa em atividades de GR e SOD foram observadas em *A. penicilliformis* quando a radiação UV solar foi eliminada, indicando um menor estresse oxidativo na ausência de radiação UV (AGUILERA *et al.*, 2002).

A atividade enzimática antioxidante em algas expostas à UV-B também pode depender do tempo de exposição e da dose. RIJSTENBIL (2002) mostrou que *Thalassiosira pseudonana* exposta à UV-B por 4 horas apresentou aumento na atividade das enzimas SOD e GR, enquanto que a atividade da APX não foi estimulada. Entretanto, uma

exposição à UV mais prolongada induziram a atividade da APX e também da SOD em outras microalgas (LESSER, 1996a, b; MALANGA & PUNTARULO, 1997). Por outro lado, em *Dunaliella salina* cultivada sob UV-B por 15 dias, a atividade da SOD não aumentou, enquanto que houve um aumento na atividade da CAT e da peroxidase (EL-BAKY *et al.*, 2004). No caso de *Chlorella vulgaris*, a atividade da SOD diminuiu quando exposta prolongadamente à UV-B (MALANGA & PUNTARULO, 1995). Já em algumas macroalgas estudadas a SOD não foi induzida, sendo até diminuída em alguns casos durante a exposição a UV-A+UV-B por 84 horas (AGUILERA *et al.*, 2002). Contrariamente, SHIU & LEE (2005) reportaram um aumento da atividade da SOD em *Ulva fasciata* em resposta a quatro dias de exposição à UV-B. Esses autores reportaram também que o sistema antioxidante em *Ulva fasciata*, incluindo o ciclo ascorbato-glutationa, funcionaram bem sob doses de UV-B moderadas e baixas. Já sob altas doses de UV-B, os sistemas de defesa foram insuficientes, uma vez que houve um aumento na produção de ROS (H_2O_2 e O_2^-) (SHIU & LEE, 2005). Posteriormente, LEE & SHIU (2009) observaram um controle do estresse oxidativo por meio de APX e GR em *Pterocladia capillacea*, uma alga mais tolerante à radiação UV-B. Por outro lado, *Gelidium amansii*, sensível a essa radiação, teve redução na atividade de GR, indicando que o ciclo ascorbato-glutationa pode ter sido inibido por UV-B. Esses autores concluem que *G. amansii* tem uma menor habilidade de dissipar radicais livres de oxigênio do que *P. capillacea*, uma vez que *G. amansii* teve menos capacidade de remover H_2O_2 por meio da atividade da APX (LEE & SHIU, 2009).

2.7. Compostos fotoprotetores

Um dos mais importantes mecanismos de aclimação e proteção contra a radiação UV envolve a síntese e acúmulo de compostos fotoprotetores. Esses compostos são a primeira linha de defesa bioquímica contra a radiação UV-B e seus efeitos, uma vez que absorvem comprimentos de onda na faixa da UV-B e UV-A, inclusive na faixa da UV-C.

A síntese e o acúmulo de substâncias fotoprotetoras decorrentes da exposição de organismos fotossintetizantes à radiação UV têm sido amplamente relatados tanto em plantas vasculares quanto em algas (CALDWELL *et al.*, 1983; JANSEN *et al.*, 1996; FRANKLIN & FOSTER, 1997; SINHA *et al.*, 1998; GRÖNIGER *et al.*, 2000; HOLLÓSY, 2002; HOYER *et al.*, 2002). Essas atuam de forma eficiente na filtração desse tipo de radiação, impedindo que certas estruturas sejam afetadas (KARENTZ *et al.*, 1991a; SINHA *et al.*, 1998). Neste contexto, a síntese de compostos fenólicos (flavonóides) e derivados dos

fenilpropanóides, localizados na epiderme de plantas vasculares, foram reconhecidos e propostos como um mecanismo adaptativo para prevenir danos produzidos pela radiação UV, uma vez que são capazes de absorver os comprimentos de onda entre 220-380nm (HARBORNE, 1986; MIDDLETON & TERAMURA, 1993, 1994; CUADRA & HARBORNE, 1996). Uma função similar foi outorgada a compostos denominados de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs), os quais foram isolados em macroalgas, fitoplâncton e cianobactérias (KARENTZ *et al.*, 1991a; GARCÍA-PICHEL *et al.*, 1993; SINHA *et al.*, 1998; GRÖNIGER *et al.*, 2000; HOYER *et al.*, 2001), e ainda em animais marinhos (DUNLAP & SHICK, 1998).

Dentro das macroalgas, os MAAs estão presentes principalmente em rodófitas, enquanto que as algas pardas e verdes carecem delas, com exceção da alga verde *Prasiola crispa* que apresenta um único MAAs com absorção em 324 nm (HOYER *et al.*, 2001; KARSTEN *et al.*, 2005). Em cianobactérias, foi isolada a citonemina, um pigmento amarelo que tem uma forte absorção na faixa da radiação UV-C. A presença desse pigmento parece ter sido relevante para a sobrevivência e a evolução dos organismos fotossintetizantes no Pré-Cambriano, quando altos níveis de radiação UV-C atingiam a superfície da Terra (DILLON & CASTENHOLZ, 1999).

Os MAAs são relacionados ao metabolismo secundário, e sabe-se que sua síntese ocorre via ácido chiquímico (FAVRE-BONVIN *et al.*, 1987). Como a rota desse ácido não esta presente em animais, esses compostos são presumivelmente adquiridos pela dieta, ou por algas endossimbióticas (SHICK & DUNLAP, 2002). Essa visão poderia mudar, uma vez que recentemente reportou-se genes que codificam para enzimas da via do ácido chiquímico no animal marinho *Nematostella vectensis* (STARCEVIC *et al.*, 2008). Entretanto, a aquisição e o acúmulo de MAAs em animais através da dieta a partir de algas confirmaram-se experimentalmente em ouriços (CARROLL & SHICK, 1996), crustáceos (HELBLING *et al.*, 2002) e peixes (MASON *et al.*, 1998).

Os MAAs funcionam como blindagem passiva, dissipando a energia da radiação absorvida na forma de calor, sem gerar reações fotoquímicas (BANDARANAYAKE, 1998; CONDE *et al.*, 2000; KORBEE *et al.*, 2005a). Os MAAs têm sido relatados como moléculas fotoquimicamente estáveis, um pré-requisito para a sua função fotoprotetora (CONDE *et al.*, 2000). Esses compostos são capazes de absorver os comprimentos de onda entre 310 e 360 nm (KARENTZ *et al.*, 1991a; COCKELL & KNOWLAND, 1999; SHICK & DUNLAP, 2002), impedindo que outras estruturas sejam afetadas (KARENTZ *et al.*, 1991a; SINHA *et al.*, 1998).

Em organismos aquáticos têm sido descritos 23 MAAs [micosporina-glicina, asterina-330, shinorina, porphyra-334, palitina, palitinol, palitene, micosporina-aurina, micosporina-2-glicina, ácido palitenico, micosporina-glicina-valina, micosporina-glicina-treonina, micosporina-glicina-serina e micosporina-glicina-Asp] (as referências para cada um desses compostos estão em KORBEE *et al.*, 2006).

Existe uma marcada variação na presença de MAA entre as espécies. Espécies de zonas temperadas expostas a altas doses de radiação solar apresentam maior concentração de MAAs do que aquelas de altas latitudes e de maior profundidade (HOYER *et al.*, 2001; KORBEE *et al.*, 2006). Nesse sentido, algas sujeitas à constantes variações nos níveis de radiação UV (no médiolitoral) teriam altas concentrações de MAAs. Algas do infralitoral inferior, que não são constantemente atingidas por UV, não acumulariam esses compostos, devido ao elevado custo metabólico (BISCHOF *et al.*, 2006). Por outro lado, a alta concentração de MAAs poderia conferir vantagens ecológicas a determinadas algas na ocupação de ambientes (BISCHOF *et al.*, 2000; LEE & SHIU, 2009).

Em macroalgas vermelhas, diferenças no conteúdo de MAAs podem também ser encontradas em diferentes porções dos talos, sendo que maiores concentrações têm sido verificadas nas margens e nos ápices quando comparados às porções basais, as quais estão bem protegidas pela sua maior espessura (KARSTEN *et al.* 1999; HOYER *et al.*, 2001). Outro fator que pode afetar o conteúdo de MAAs é a sazonalidade e a variação diária de radiação (POST & LARKUM, 1993; KARSTEN *et al.*, 1999). *Mazzaella laminarioides* coletadas no sul do Chile apresentaram variações diárias no conteúdo de MAAs, sendo que a maior concentração foi reportada ao meio dia (10:30 e 14:30 horas) e a menor às 18:45 horas (HUOVINEN *et al.*, 2004). Esses resultados poderiam evidenciar um possível ritmo circadiano na síntese de MAAs, o qual já foi verificado na cianobactéria *Anabaena* sp. (SINHA *et al.*, 2001). Um ciclo diário na acumulação de MAAs foi verificado apenas em uma (*Ceramium* sp.) de cinco espécies estudadas na patagônia Argentina em (HELBLING *et al.*, 2004). Um ciclo distinto, com maior concentração ao início do dia e diminuindo até o final da tarde foi verificado em *Porphyra columbina* coletada em Valdivia-Chile (39° latitude sul) (HUOVINEN *et al.*, 2004) e Playa Unión-Argentina (43° latitude sul) (HELBLING *et al.*, 2004). Outras espécies estudadas na América do sul não apresentaram tendências claras no acúmulo de MAAs durante o dia (HELBLING *et al.*, 2004).

A síntese de MAAs é realizada durante o período de luz, enquanto que a concentração desses compostos pode permanecer quase constante durante o período

escuro (SINHA *et al.*, 2001; HELBLING *et al.*, 2004). Essa informação acrescida ao fato de que a rota do ácido chiquímico está associada funcionalmente à fotossíntese (BENTLEY, 1990), poderia evidenciar uma relação entre a síntese de MAAs e a fotossíntese (CARRETO *et al.*, 1990; GLYNN *et al.*, 1993; LESSER *et al.*, 1994). De fato, os resultados obtidos a partir do uso de um inibidor do transporte de elétrons da fotossíntese (DCMU) confirmaram o bloqueio na síntese de MAAs em *Alexandrium excavatum* (CARRETO *et al.*, 1990). No entanto, evidências de que a fotossíntese não é essencial para a síntese de MAA vêm do fato de que a síntese desses compostos em *Chondrus crispus*, ocorreu em ausência da PAR (KARSTEN *et al.*, 1998a). Síntese de MAAs em ausência de PAR foi também observada na cianobacteria *Chlorogloeopsis* PCC 6912 sob estresse osmótico e radiação UV (PORTWICH & GARCIA-PICHEL, 2000). Outra evidência é que os MAAs podem ser sintetizados por fungos e uma bactéria não fotossintetizante (KLISCH & HÄDER, 2008). Por outro lado, a regulação da síntese poderia ser influenciada por fatores ambientais como altas irradiâncias de PAR e UV (MOISAN & MITCHELL, 2001; FRANKLIN *et al.*, 2001) ou por processos morfogenéticos (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a,b).

As macroalgas antárticas foram classificadas em três grupos fisiologicamente diferentes de acordo com seu conteúdo de MAAs: i) espécies que não possuem MAAs; ii) espécies com valores altos e constantes de MAAs independente das condições ambientais; e iii) espécies que possuem um nível básico de MAAs, o qual pode ser ajustável em relação a mudanças nas condições ambientais (HOYER *et al.*, 2001). Nesse último grupo, a síntese de MAAs poderia ser influenciada pela radiação UV (UV-A e/ou UV-B) (FRANKLIN *et al.*, 2001; SHICK *et al.*, 1999) e também pela luz azul (FRANKLIN *et al.*, 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b). HOYER *et al.*, (2001) demonstrou também que o conteúdo de MAAs de gametófitos e tetrasporófitos de *Gigartina skottsbergii* e *Iridaea cordata* expostas a UV-B são similares, evidenciando que não há variação intraespecífica no acúmulo de MAAs.

Enquanto algumas algas sintetizam MAAs particularmente sob radiação UV-B, outras o fazem em presença UV-A ou até de PAR (HOYER *et al.*, 2003). Em algumas cianobacterias a PAR e a UV-A não promoveram a indução de MAAs, enquanto que a UV-B induziu a síntese de shinorina (SINHA *et al.*, 2001). Similarmente, a síntese de MAAs foi induzida pela UV-B em *Ptercladiella capillacea*, mas não em *Gelidium amansii* (LEE & SHIU, 2009). Em *Iridaea cordata*, a exposição ao tratamento PAR+UV-A+UV-B promoveu um aumento na concentração de MAAs (ZACHER *et al.*, 2007).

KARSTEN *et al.* (1998a) verificou que enquanto alguns MAAs aumentaram em quantidade após exposição à PAR, a síntese de shinorina foi fortemente estimulada por UV sem adição de PAR em *Chondrus crispus* (KARSTEN *et al.*, 1998a). Nessa mesma espécie foi reportado que a PAR estimulou inicialmente a síntese de shinorina, seguida de palitina e asterina, e posteriormente uma diminuição de shinorina (FRANKLIN *et al.*, 1999). Um aumento na incidência de PAR promoveu também um aumento no total de MAAs em *Phaeocystis antártica* (MOISAN & MITCHELL, 2001). Posteriormente, FRANKLIN *et al.* (2001) reportou que a síntese de palitina em *C. crispus* foi induzida pela luz azul, enquanto que a síntese de shinorina foi estimulada pela radiação UV-A, mas não em luz azul. Em *C. crispus* demonstrou-se também que a radiação UV-A estimulou a síntese de shinorina e palitina, e a radiação UV-B inibiu a síntese desses dois compostos e induziu a síntese de outros três MAAs: asterina, palitinol e paliteno (KRÄBS *et al.*, 2002). Em *Porphyra leucosticta*, foi verificado que a luz azul e branca favoreceram o acúmulo de alguns MAAs, como palitina e asterina, enquanto que outros comprimentos de radiação monocromática estimularam o acúmulo de shinorina (KORBEE *et al.*, 2005b). Isso sugere que a síntese de cada tipo de MAAs poderia ser estimulada por diferentes comprimentos de onda (HOYER *et al.*, 2002). A dependência dos comprimentos de onda na síntese de compostos fotoprotetores tinha já sido reportada para microalgas. CARRETO *et al.* (1990) observou que a luz azul promoveu um aumento na concentração de compostos fotoprotetores em *Alexandrium excavatum*. Contrariamente a luz branca não teve o mesmo efeito. Por outro lado, RIEGGER & ROBINSON (1997) reportaram que a síntese de MAAs em diatomáceas antárticas foi estimulada por comprimentos de onda de 370 e 460 nm, mas não em UV-B. Já na primnesiofita *Phaeocystis antarctica*, a síntese foi estimulada por 340 nm e inibida por 305 nm (RIEGGER & ROBINSON, 1997).

A concentração de MAAs pode também variar com a intensidade da UV-B. Um acúmulo de MAAs foi observado em *Pterocliadella capilacea* exposta a intensidades crescentes de UV-B (0,5-1,0 Wm⁻²), enquanto que a concentração de MAAs diminuiu quando exposta à 1,5-3,0 Wm⁻². Em contrapartida a essas doses elevadas, observou-se um aumento de carotenóides, indicando que essas substâncias podem ter um papel na fotoproteção quando os MAAs não estão presentes (LEE & SHIU, 2009).

Recentemente, determinou-se que além da qualidade e quantidade de energia, a disponibilidade de compostos nitrogenados na água influencia a síntese e acúmulo de MAAs (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004, 2005; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008). Altas concentrações de amônio promoveram a síntese de MAAs em duas espécies

de *Porphyra* (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a). HUOVINEN *et al.* (2006) mostrou que a adição de 100 e 300 μM de amônio não resultou em um aumento na concentração de porphyra-334 após um, três e 10 dias de exposição aos tratamentos PAR e PAR+UVR em *Grateloupia lanceola*. A micosporina-glicina aumentou em comparação ao nível inicial quando a alga foi suprida com 300 μM no décimo dia de cultivo, independente da radiação. Já no caso da palitina, sua concentração só aumentou no tratamento com 100 μM , após um dia de cultivo sob PAR+UVR. Os autores sugerem que nenhum padrão claro de indução de MAAs em relação à irradiância e concentração de amônio foi observado. Em *Asparagopsis armata* cultivada em tanques com incrementos de amônio na água verificou-se um aumento no conteúdo de MAAs (FIGUEROA *et al.*, 2008). Foi observado ainda que a porcentagem de palitina aumentou, a medida que aumentou o fluxo de amônio, enquanto que a porcentagem de shinorina diminuiu ligeiramente. Entretanto, valores de fluxo maiores de 100 mM/h promoveram uma diminuição na concentração de MAA. Em *G. tenuistipitata*, cultivada em 10 tratamentos com acréscimo de nitrato e sob PAR+UVR durante 7 dias, houve um acúmulo de MAAs a medida que aumentou a concentração de nitrato (BONOMI *et al.*, 2011). Esses autores identificaram dois MAAs (shinorina e porphyra-334), sendo que a primeira sofreu um aumento quando em altas concentrações de nitrato, enquanto que a segunda diminuiu. Eles observaram ainda que esse acúmulo era saturado em 0,5 mM de nitrato.

O fato de que os MAAs dependam da concentração de compostos nitrogenados tem levado alguns autores a sugerir que esses compostos podem funcionar também como um reservatório de N (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a, 2006; DE LA COBA *et al.*, 2009). Embora sejam compostos nitrogenados, há escassa informação sobre o efeito da disponibilidade de nitrogênio em sua síntese e acúmulo (BANASZAK & NEALE, 2001; LITCHMAN *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005a).

Além de atuar como compostos filtradores ou bloqueadores de UV, os MAAs podem atuar como antioxidantes (DUNLAP & YAMAMOTO, 1995; SUH *et al.*, 2003; DE LA COBA *et al.*, 2009), dissipando ainda a energia de resíduos de timina excitadas, e prevenindo a formação de fotoprodutos (MISONOU *et al.*, 2003). Porém, não há evidência para a importância deste mecanismo *in vivo* (KLISCH & HÄDER, 2008). Os MAAs têm sido apontados também como pigmentos acessórios, transferindo energia radiante para os centros de reação da fotossíntese, embora esse tema seja ainda controverso.

Os florotaninos são metabolitos secundários que têm sido apontados também como fotoprotetores contra a radiação UV (SWANSON & DRUEHL, 2002). Essa função está baseada na absorção na faixa dessa radiação UV (200 e 400 nm), sendo os picos máximos de absorção entre 195 e 270 nm (PAVIA *et al.*, 1997; AMSLER & FAIRHEAD, 2005; KARSTEN, 2008). Esses compostos têm sido reportados exclusivamente em algas pardas (KARSTEN, 2008), ocorrendo dentro de vesículas conhecidas como fisoides (SCHOENWAEELDER & CLAYTON, 1998, 2000). Embora as células mais superficiais sejam danificadas pela alta irradiância solar, os florotaninos podem ser liberados, formando uma camada marrom que pode proteger os tecidos fotossintetizantes (Karsten, 2008). Os florotaninos podem ainda ser liberados na coluna de água. SWANSON & DRUEHL (2002) sugerem que os florotaninos liberados na água durante um período de estresse induzido pela UV-A reduz o impacto da radiação UV-B em meiosporos de algas pardas sensíveis a UV-B, pois esses esporos germinam a centímetros das plantas adultas (KENDRICK & WALKER, 1991).

Os florotaninos, assim como os MAAs, têm sido relacionados com a distribuição batimétrica de algas pardas (BISCHOF *et al.*, 2006). Zoósporos de algas pardas de águas rasas são menos sensíveis a UV tendo a capacidade ainda de se recuperar do estresse induzido por essa radiação, do que os zoósporos de algas de águas mais profundas (WIENCKE *et al.*, 2004). Diferenças na tolerância à UV entre zigotos de espécies do médiolitoral e do infralitoral superior foram relacionadas ao número de fisoides, sendo que um menor número promoveu uma maior sensibilidade (SCHOENWAEELDER *et al.*, 2003).

A indução e acúmulo de florotaninos em algas pardas é um tema ainda em aberto devido aos resultados contraditórios na literatura (KARSTEN *et al.*, 2009). A exposição à UV-A e UV-B aumentou a concentração de florotaninos em frondes de *Macrocystis integrifolia* (SWANSON & DRUEHL, 2002). Zoósporos de *Alaria esculenta*, *Saccorhiza dermatodea* e *Laminaria digitata* tratados com UV-B apresentaram um aumento no tamanho dos fisoides assim como exudação de florotaninos na água (WIENCKE *et al.* 2004, 2007; ROLEDA *et al.* 2006). Entretanto, esses resultados não foram confirmados pela análise ultraestrutural de zoósporos de *L. hyperborea* expostos à UV-B (STEINHOFF *et al.*, 2008). Nenhum incremento na concentração de florotaninos foram verificados em esporófitos de *Desmarestia anceps* e *D. menziesii* (FAIRHEAD *et al.*, 2006), nem em uma suspensão de zoósporos de *A. esculenta*, *L. digitata* e *S. latissima* quando cultivados em UV-B (MÜLLER *et al.*, 2009).

Além de atuar como fotoprotetores, os florotaninos têm a capacidade de neutralizar eficientemente as ROS, funcionando assim como um antioxidante. Por essa razão, os florotaninos têm sido propostos como protetores contra o excesso de irradiância, principalmente UV, filtrando essa radiação e neutralizando ROS promovidas pela UV-B (BISCHOF *et al.*, 2006).

2.8. Efeitos indiretos: processos fisiológicos afetados pela UV-B

Decorrente dos efeitos moleculares (ou efeitos diretos), muitos processos fisiológicos podem ser afetados pela presença e/ou aumento da radiação UV (principalmente UV-B). Entre esses vários processos, a fotossíntese é potencialmente o alvo principal, não só em algas, mas também em plantas vasculares, devido aos múltiplos efeitos possíveis (SCHREIBER *et al.*, 1994; KARSTEN *et al.*, 2001).

Cabe ressaltar que a inibição da fotossíntese pode ocorrer diariamente durante as horas com maior radiação, apresentando uma rápida recuperação a medida que a radiação solar começa a diminuir (FIGUEROA *et al.*, 1997a; BISCHOF *et al.*, 2002d). Esse fenômeno (chamado fotoinibição dinâmica) tem sido considerado como parte de um mecanismo fotoprotetor contra o excesso de radiação, interrompendo a cadeia transportadora de elétrons e resultando apenas em uma perda na funcionalidade do centro de reação do PSII, sem necessariamente implicar em redução na concentração da proteína D1. Quando há um excesso de energia persistente ao longo do tempo pode ocorrer fotoinibição crônica. Nesse caso, a recuperação é mais demorada, uma vez que esse fenômeno está relacionado a fotodanos nos centros de reação e subsequente proteólise da proteína D1 (CRITCHLEY & RUSELL, 1994). O fotodano ocorre quando a taxa de degradação da D1 excede a taxa de reparação (ARO *et al.*, 1993b). A recuperação dos danos nas proteínas e pigmentos pode requerer várias horas ou até dias (HANELT *et al.*, 1992). Assim, a diferença entre fotoinibição crônica e dinâmica é a cinética da recuperação (OSMOND, 1994; OSMOND & GRACE, 1995). Esses tipos de respostas têm sido verificados em plantas de sol que apresentaram fotoinibição dinâmica, enquanto que plantas de sombra apresentam fotoinibição crônica, quando transplantadas para locais de alta irradiância (HÄDER & FIGUEROA, 1997).

A potencialidade da radiação UV para inibir a fotossíntese foi demonstrada por JONES & KOK (1966) em cloroplastos de espinafre. Resultados posteriores indicaram que um aumento nos níveis da UV solar pode causar efeitos similares, comparáveis àqueles promovidos pela PAR nos organismos aquáticos, embora os mecanismos atuantes sejam

diferentes (LARKUM & WOOD, 1993). Na natureza, altas irradiâncias de PAR são acompanhadas por altos níveis de UV, mas a UV não pode ser considerada como sendo uma entrada excessiva de energia para a fotossíntese em um sentido estrito. A máxima irradiância de UV é muito menor à irradiância de PAR, e os comprimentos de onda da UV não contribuem substancialmente para a química da fotossíntese (HANELT *et al.*, 2003). Isso ressalta a necessidade do uso de ferramentas para descrever a eficiência relativa de todos os comprimentos de onda na fotossíntese e o fotodano, separando as respostas decorrentes da UV daquelas induzidas pela PAR. O uso de espectros de ação, particularmente para as funções biológicas ponderadas, é essencial para determinar os efeitos do acréscimo da UV-B no contexto de um espectro natural (FRANKLIN *et al.*, 2003). O espectro de ação para a fotoinibição dentro da faixa da PAR é paralelo ao espectro de ação da fotossíntese (HANELT *et al.*, 1992) e está diretamente relacionado a absorção da radiação excessiva por parte dos pigmentos fotossintetizantes (HANELT & ROLEDA, 2004). Contrariamente, o espectro de ação para a fotoinibição na faixa da UV-B corresponde mais com a absorção espectral do DNA e as proteínas do que com os pigmentos fotossintetizantes (JONES & KOK, 1966; SETLOW, 1974). Assim, a diminuição da atividade fotossintetizante após exposição à UV-B poderia resultar do dano direto em componentes chaves desse processo como a proteína D1 (VASS, 1997; BISCHOF *et al.*, 2006) ou a Rubisco (BISCHOF *et al.*, 2000). Poderia resultar ainda da redução na expressão de genes envolvidos na fotossíntese (MACKERNESS *et al.*, 1999), assim como também da fotodestruição de pigmentos (FIGUEROA *et al.*, 2003c)

O efeito da radiação UV-B na fotossíntese de algas tem sido avaliado com experimentos de exposição à essa radiação e subsequente recuperação em condições não estressantes (baixa PAR). A fotossíntese tem sido avaliada pela: fluorescência da clorofila *a*, a liberação de oxigênio e a assimilação de CO₂. A relação entre a liberação de O₂ e a fluorescência da Cl *a* tem sido demonstrada, validando esse método para estimar a fotossíntese (GENTY *et al.*, 1989; FLAMELING & KROMKAMP, 1998; FIGUEROA *et al.*, 2003a). Os parâmetros de fluorescência, como a produtividade quântica ótima (Fv/Fm), representam a eficiência fotossintetizante máxima, podendo ser utilizados como indicadores de fotoinibição. Por outro lado, a taxa de transporte de elétrons (ETR, do inglês: “electron transport rate”) pode ser relacionada à fotossíntese bruta (como liberação de O₂), como demonstrado para *Porphyra leucosticta* e duas espécies de *Ulva* em condições de baixa irradiância (FIGUEROA *et al.*, 2003b).

Os resultados de trabalhos realizados em macro e microalgas indicam que a sensibilidade da fotossíntese à UV-B é variável. A fotoinibição decorrente da radiação UV, foi estimada em 50% (HELBLING *et al.*, 1992) e 70% (SMITH *et al.*, 1980) para o fitoplâncton marinho exposto a radiação. Em *Chondrus crispus*, demonstrou-se que a presença de comprimentos de onda inferiores a 390 nm amplificou a fotoinibição, e seus valores chegaram em 60% de inibição (SAGERT *et al.*, 1997). Verificou-se também uma correlação da fotoinibição com a distribuição vertical, sendo que indivíduos de *C. crispus* coletados a 8,5 metros de profundidade foram mais sensíveis (maior fotoinibição) que indivíduos coletados a 3,5 metros. Similar relação entre fotoinibição e profundidade foi observada por DRING *et al.* (1996b) em diferentes espécies de algas vermelhas, porém sem uma correlação exata entre esses dois parâmetros. Assim, espécies do médiolitoral, adaptadas a altas irradiâncias e a presença da radiação UV, seriam menos sensíveis do que as espécies de maior profundidade. Resultados obtidos por VIÑEGLA & FIGUEROA (2009) corroboraram esta afirmação. Esses autores reportaram que *Fucus spiralis* que ocorre no médiolitoral aumentou as taxas de fotossíntese bruta após 24 horas de exposição em todos os tratamentos testados (PAR+UV-A+UV-B, PAR+UV-A, e só PAR), por outro lado, *Ulva olivascens* mostrou o padrão contrário, com diminuição da taxa de fotossíntese em todos os tratamentos testados, mas sendo essa diminuição menos acentuada no tratamento com PAR+UV-A+UV-B do que no tratamento PAR, como demonstrado previamente para *U. rotundata* (BISCHOF *et al.*, 2002d). *U. rotundata* exposta à PAR+UV-A+UV-B mostrou pronunciada fotoinibição, a qual foi reversível quando a radiação solar diminuiu durante a tarde. Entretanto nos talos expostos só a PAR houve uma maior fotoinibição do que naqueles expostos à PAR+UV-A+UV-B, mas com similar capacidade de recuperação. Já a exclusão da UV-B (tratamento PAR+UV-A) e o tratamento sem PAR (UV-A+UV-B) não promoveram diminuição na Fv/Fm, evidenciando um efeito adverso da UV-B na fotossíntese, enquanto que a UV-A indicaria um efeito benéfico em condições ambientais. Resultados benéficos da UV-A foram observados em *Dasycladus vermicularis* (GÓMEZ *et al.*, 1998). Nesse experimento talos expostos a PAR+UV-A apresentaram inibição menos pronunciada e rápida recuperação do que amostras expostas a tratamentos de PAR e PAR+UV-A+UV-B, sendo que nesses últimos tratamentos a inibição foi similar. Contrariamente, DRING *et al.* (1996a,b) reportaram que a radiação UV-A foi a responsável pela fotoinibição observada nas diferentes espécies por eles estudadas.

No campo, as características fotossintetizantes de 18 espécies de macroalgas do sul do Chile foram estudadas por GÓMEZ *et al.* (2004). Esses autores observaram que *in situ* as algas do médiolitoral superior são mais fotoinibidas ao meio dia do que as do médiolitoral inferior e infralitoral. Embora os dados pareçam contraditórios aos apresentados anteriormente, obedecem ao padrão de distribuição vertical das espécies, uma vez que as algas do médiolitoral inferior e infralitoral estão protegidas pela coluna de água recebendo menos radiação do que as do médiolitoral superior, que ficam expostas a altas irradiâncias e a dessecação em períodos de maré baixa. As algas adaptadas a altas irradiâncias poderiam ser mais adequadas para lidar não apenas com altas irradiâncias, mas também com alta temperatura, salinidade e dessecação (DAVISON & PEARSON, 1996). GÓMEZ *et al.* (2004) reportaram também que a presença de radiação UV ao meio dia não resultou em alta fotoinibição. Esses autores observaram ainda que as algas apresentaram recuperação durante a tarde, evidenciando fotoinibição dinâmica, concluindo assim que as espécies por eles estudadas no centro-sul do Chile tem uma marcada tolerância à UV e estão adaptadas as variações de radiação diária. Um outro estudo realizado com algas coletadas no estreito de Magallanes no Chile revelou que as taxas de fotoinibição e recuperação não foram correlacionadas com sua distribuição no costão (RAUTENBERGER *et al.*, 2009). Algas tratadas com PAR+UV-A+UV-B artificial apresentaram maior fotoinibição do que aquelas tratadas com PAR+UV-A, mas com similar capacidade de recuperação nos dois tratamentos. Esses autores concluíram que a fotossíntese não foi afetada pela UV-B, mas foi aclimatada, e que a fotoinibição não esteve relacionada com os grupos funcionais, confirmando a conclusão de GÓMEZ *et al.* (2004) para espécies do sul do Chile.

Embora tenha se observado que a radiação UV, principalmente a UV-B, pode prejudicar a fotossíntese, inibindo-a, estudos recentes têm demonstrado que a ausência da UV-B pode ser até prejudicial no período de recuperação em espécies adaptadas a altas irradiâncias. Verificou-se que a recuperação do aparato fotossintetizante inibido da macroalga *Dictyota dichotoma* foi claramente diminuída quando a UV-B foi removida do espectro de radiação solar (FLORES-MOYA *et al.*, 1999). Resultados similares foram obtidos para algas tropicais (HANELT & ROLEDA, 2009). Observa-se que a UV causa uma diminuição na fotossíntese durante o estresse com alta irradiância, mas quando a radiação solar era reduzida a 50%, foi observada a recuperação da fotossíntese. Entretanto, algumas espécies de águas rasas, adaptadas a alta incidência de UV apresentaram menos recuperação em tratamentos em que UV-B solar foi atenuada (HANELT & ROLEDA, 2009).

Esses resultados indicam que a UV-B pode também facilitar ou induzir o processo de recuperação em algas aclimatadas a alta radiação solar verificada na região entremarés.

Experimentos sobre a dinâmica da fotossíntese no longo prazo têm mostrado respostas diferentes das verificadas no curto prazo. Em experimentos realizados com espécies de *Ulva*, observou-se que no curto prazo a UV-B promoveu a fotoinibição da fotossíntese e o crescimento, mas quando o tempo de exposição foi aumentado, não só a fotoinibição foi reduzida, mas também aumentou a fotossíntese e o crescimento (ALTAMIRANO *et al.*, 2000a,b; FIGUEROA *et al.*, 2003b). Resposta similar foi observada em *Alaria esculenta*, verificando-se que o aparato fotossintetizante foi menos danificado com o tempo, depois de repetidas exposições à radiação UV e se recuperou completamente (BISCHOF *et al.*, 1999). Parcial e completa aclimação foi observada em plântulas de *Laminaria ochroleuca* (ROLEDA *et al.*, 2004b) e *Mastocarpus stellatus* (ROLEDA *et al.*, 2004a) quando expostas à UV-A e UV-B durante 28 e 10 dias, respectivamente. Contrariamente, BISCHOF *et al.* (2000) reportou que em *Chondrus crispus* o efeito da UV se acumulou ao longo do tempo, uma vez que no quinto dia de tratamento, o efeito de UV-B em reduzir o rendimento quântico foi muito maior do que no início do tratamento, sugerindo um efeito crônico no fotossistema (BISCHOF *et al.*, 2000). Resultados similares foram reportados por FIGUEROA *et al.* (2003b) em duas espécies de *Ulva*. Esses autores observaram que após seis horas de exposição a diferentes tratamentos (alta e baixa PAR combinada com UV-A e UV-A+UV-B) as duas espécies foram fotoinibidas, sendo que a combinação alta PAR e a presença de UV-B promoveram maior fotoinibição. Verificaram também que a fotoinibição sob baixa PAR em presença de UV foi menor do que sob alta PAR. Além disso, cinco dias de exposição à PAR+UV-A prejudicaram fortemente a fotossíntese (80%). Tais parâmetros foram correlacionados com um progressivo decréscimo dos pigmentos, especialmente clorofilas. Esses resultados apontam para a necessidade de estudos comparando os efeitos no curto e longo prazo, uma vez que a aclimação poderia ocorrer.

BONOMI (2010) aponta a necessidade de trabalhos em macroalgas testando as doses de radiação UV acumuladas ao longo do tempo em comparação com a intensidade (efeito de reciprocidade). CULLEN & LESSER (1991) mostraram que a fotoinibição de *Thalassiosira pseudonana*, em função da exposição à radiação UV, foi claramente dependente da escala de tempo. 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. Entretanto, RECH *et al.* (2005) verificaram a

aclimação em longo prazo à UV em espécies de diatomáceas. Eles expuseram as algas a de 110 kJ.m^{-2} de dose de UV, com uma mesma proporção entre UVA e UVB. As respostas 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.

2.9. Efeitos da UV-B e no metabolismo de carbono e nitrogênio

O nitrogênio é necessário para a constituição de substâncias fundamentais para as células dos organismos, tais como aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares e aminas (LOBBAN & HARRISON, 1994). As macroalgas podem captar nitrogênio na forma inorgânica (NO_3^- e NH_4^+) e orgânica (ureia) para logo 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).

A NR e a anidrase carbônica (AC) são enzimas chaves no metabolismo fotossintetizante das algas. A AC catalisa a desidratação reversível de HCO_3^- para CO_2 . A entrada desses compostos para o interior das células se dá por troca iônica ou por difusão direta. Isso pode ser realizado externamente à célula por meio da enzima AC externa (na superfície da célula), ou internamente (AC associada ao cloroplasto), concentrando o C para a sua fixação durante o ciclo de Calvin (MORONEY *et al.* 2001). Nem todas as algas apresentam mecanismos de concentração de carbono (JOHNSTON *et al.*, 1992) e, por outro lado, nem sempre os mecanismos de concentração de carbono requerem de AC para o transporte de bicarbonato, como no caso de algumas diatomáceas C-4 (REINFELDER *et al.*, 2000).

As atividades das enzimas AC e NR em macroalgas têm mostrado ciclos diários e ritmos diurnos dependentes da luz em macroalgas (GAO *et al.*, 1992; FIGUEROA & VIÑEGLA, 2001; LOPES *et al.*, 2002). Essas enzimas podem ser reguladas por outros fatores ambientais, tais como: disponibilidade de nutrientes e temperatura (THOMAS & HARRISON, 1985; THOMAS *et al.*, 1987; CORZO & NIELL, 1994), resultando em mudanças

sazonais (DAVISON *et al.*, 1984; VIÑEGLA & FIGUEROA *et al.*, 2009). Recentemente, demonstrou-se também que a radiação ultravioleta pode afetar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo fotossintetizante das algas (FLORES-MOYA *et al.*, 1998; GÓMEZ *et al.*, 1998; FIGUEROA & VIÑEGLA, 2001; VIÑEGLA *et al.*, 2006; VIÑEGLA & FIGUEROA, 2009).

O efeito inibitório da UV-B na incorporação de nitrogênio inorgânico em algas é bem conhecido (DÖHLER *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1995; DÖHLER, 1996), no entanto, outros estudos não tem reportado efeito nenhum dessa radiação no acúmulo de nitrogênio ou amônio (NH_4^+) (BRAUNE & DÖHLER, 1996). Por outro lado, também tem sido reportado um efeito positivo na incorporação de nitrogênio pelo aumento da atividade de NR, após exposição à UV-B (KUMAR *et al.*, 1996). A radiação UV poderia inibir também outras vias metabólicas como sugerido por BEARDALL *et al.* (2002), como assimilação de carbono pela UV-B. Entretanto, os mecanismos de concentração de CO_2 não parecem ser afetados.

A captação de amônio foi reduzida em *Fucus vesiculosus* e *Ulva lactuca* em presença de radiação UV, enquanto que a captação de NO_3 foi menos afetada nessas espécies e em *Laminaria saccharina* (DÖHLER *et al.*, 1995). O impacto negativo da UV-B na captação de NH_4^+ nas espécies estudadas estaria associada a um possível dano da radiação UV-B sobre o fotossistema II, reduzindo o suprimento de energia e esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos (DÖHLER *et al.*, 1995). Esses autores concluem ainda que o efeito da radiação UV na captação de nitrogênio inorgânico não segue um padrão definido, mas que essa resposta é espécie-específica. Essa especificidade na atividade da NR foi também reportada por HUOVINEN *et al.* (2007), em 25 espécies de macroalgas do sul do Chile quando expostas à radiação UV artificial. Contrariamente, a atividade da NR em algas coletadas no campo mostrou um padrão definido, sendo maior em algas vermelhas e mostrando uma tendência à diminuição dessa atividade em algas do médiolitoral para aquelas que habitam no infralitoral. Os autores reportaram ainda diferenças entre grupos morfofuncionais distintos (HUOVINEN *et al.*, 2007).

VIÑEGLA *et al.* (2006) mostraram que a UV-A promoveu um aumento da fotossíntese e estimulou a atividade da AC e a da NR em *Fucus spiralis*, enquanto que a PAR teve um efeito inibitório nessa espécie durante um ciclo diário. Entretanto, em *Ulva olivascens* observou-se fotoinibição crônica (redução da fotossíntese máxima e na eficiência da fotossíntese) em todos os tratamentos, e nenhum efeito estimulador foi observado nessa espécie. Os autores sugerem que as diferenças observadas em ambas as

espécies poderiam estar relacionadas com o local de ocorrência de cada uma delas e com a sensibilidade à UV de cada espécie. Por outro lado, diferentes respostas para a AC sugerem que essas espécies podem ter diferentes mecanismos de incorporação de C, como sugerido também por VIÑEGLA & FIGUEROA (2009) para *F. spiralis* e *U. olivascens*. Em *U. olivascens*, freqüentemente submersa, a incorporação poderia somente depender da quantidade de HCO_3 dissolvido, enquanto que para *F. spiralis* a fonte de C em períodos de dessecação poderia ser o CO_2 atmosférico. Já, a atividade da NR mostrou um padrão de variação comum em ambas espécies, e os mecanismos de incorporação de N poderiam ser similares.

Estudando a atividade da AC durante um ciclo diário sob radiação solar, VIÑEGLA & FIGUEROA (2009) observaram que essa atividade em *Fucus spiralis* foi menor ao meio dia aumentando no final da tarde em tratamentos com e sem radiação UV. Entretanto em *Ulva olivascens*, o maior aumento foi observado em algas expostas a UV-B as 15:30 horas. Um aumento menos pronunciado foi também observado em PAR+UV-A nesse horário. Ao final do dia a atividade de AC aumentou em algas expostas a PAR. Um ciclo diário de redução e recuperação da atividade da NR foi observado em *Plocamium cartilagineum*, quando tratada com PAR+UVA+UVB (FIGUEROA & VIÑEGLA, 2001). Esse ciclo foi atrasado quando a radiação UV-B 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. Entretanto, outros artigos não mostram efeitos claros de UV nas actividades de NR e AC (GÓMEZ *et al.*, 1998).

Os efeitos da UV na maquinaria enzimática envolvida no transporte e captação de nutrientes, os quais são essenciais para a formação de biomassa, poderia inevitavelmente promover um déficit de esqueletos de carbono e nitrogênio. Essa alteração poderia diminuir conseqüentemente a fotossíntese e finalmente o crescimento, além de diminuir a capacidade de aclimação e síntese de compostos contendo nitrogênio como a proteína D1 e substâncias fotoprotetoras como os MAAs.

2.10. Efeitos ultraestruturais da UV-B

Embora os efeitos da radiação UV-B na fisiologia de algas estejam relativamente bem documentados, a influência dessa radiação na ultraestrutura não tem sido abordada

com frequência. A exposição à UV-B tem causado alterações ultraestruturais em microalgas (MEINDL & Lütz, 1996) e macroalgas (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2004, 2006; AYRES, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010a). Esses estudos têm demonstrado a existência de vários alvos suscetíveis à radiação UV, sendo as membranas lipídicas às principais estruturas afetadas.

As estruturas que frequentemente são alteradas são os cloroplastos e mitocôndrias, enquanto que o núcleo, complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (RE), em geral, não são afetados (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2006). A estrutura das endomembranas é sensível à UV-B, já que essa radiação pode promover a síntese de ROS e esses compostos quebram os lipídeos e macromoléculas constituintes das mesmas (MURPHY, 1983; KRAMER *et al.*, 1991; BOWLER *et al.*, 1992). As ROS são altamente instáveis e podem reagir com qualquer composto ou estrutura, provocando danos (SIES, 1993). Muitos lipídeos são vulneráveis e facilmente peroxidados pela ação desses radicais nos cloroplastos, causando a perda de estabilidade das membranas (KRAMER *et al.*, 1991; JANSEN, *et al.*, 1998). Nas espécies fitoplanctônicas, como as diatomáceas *Chaetoceros simplex* e *Odontella weissflogii* e a haptófito *Phaeocystis antarctica*, a composição e o conteúdo de lipídeos foram alterados quando esses organismos foram expostos à radiação UV-B (SKERRATT *et al.*, 1998). Dentre esses lipídeos, o monogalactosildiacilglicerol, principal constituinte dos cloroplastos, é um dos principais alvos da radiação UV-B (PREDIERI *et al.*, 1995).

As alterações na estrutura celular dependem do tipo de radiação (qualidade espectral), intensidade da radiação e do tempo de exposição. POPPE *et al.* (2002, 2003) avaliaram os efeitos da radiação UV (UVA+UVB) em componentes celulares de *Palmaria decipiens*, *P. palmata*, *Phycodrys austrogeorgina* e *Bangia atropurpurea* em diferentes tempos de exposição. Esses autores observaram a vesiculação dos tilacoides nos cloroplastos das quatro espécies. Além disso, houve alteração nas cristas mitocondriais. Em *P. austrogeorgica*, observou-se também que os ficobilissomos se desprenderam dos tilacoides após 12 horas de UV (POPPE *et al.*, 2003). Posteriormente, HOLZINGER *et al.* (2004) estudando os efeitos da UV na ultraestrutura de *P. palmata* e *Odonthalia dentata* mostraram que, além da inibição da eficiência da fotossíntese do PSII, houve mudanças no arranjo das membranas dos tilacoides em *P. palmata*. Adicionalmente, pequenas vesículas acumularam-se na membrana plasmática como consequência da UV. Entretanto, as mitocôndrias foram danificadas ocasionalmente. Em *Odonthalia dentata*, tipicamente ocorrendo no infralitoral (15 metros de profundidade)

alterações similares nos tilacóides foram observados sob tratamentos com UV (HOLZINGER *et al.*, 2004).

Na alga verde *Prasiola crispa* coletada no médiolitoral superior, a exposição por 6 horas à radiação UV não promoveu alterações significativas na ultraestrutura, enquanto que após 24 horas de exposição causaram leves alterações em mitocôndrias e cloroplastos, evidentes como leve dilatação dos tilacóides e uma aparente redução do número de plastoglóbulos. O número de glóbulos citoplasmáticos incrementou consideravelmente. Embora seu conteúdo permaneça desconhecido, seu incremento com a exposição prolongada à UV sugere que eles estejam envolvidos na proteção contra essa radiação (HOLZINGER *et al.*, 2006). Corpos eletrodensos foram também observados em *Urospora penicilliformis* em presença de radiação UV (ROLEDA *et al.*, 2009). Corpos similares foram observados em *Zygnema*, mas não aumentaram com a exposição à UV (HOLZINGER *et al.*, 2009). Esses autores sugeriram ainda que a dilatação das membranas tilacoidais não podem ser consideradas como um efeito da exposição a UV-B, uma vez que essa alteração foi observada também em algas expostas à PAR por 24 horas em algas coletadas no campo.

Resultados de exposição à radiação UV em longos períodos de tempo mostraram mudanças na ultraestrutura de células corticais, incluindo um incremento na espessura das paredes celulares dessas células, alteração no contorno das células e a destruição da organização interna de cloroplastos de *Kappaphycus alvarezii* (SCHMIDT *et al.*, 2009) e *Iridaea cordata* (NAVARRO *et al.*, 2010a). Em *K. alvarezii*, houve ainda uma redução no volume dos vacúolos em células corticais e subcorticais e um aumento no número de organelas. Ainda, a exposição à UV-B promoveu a destruição das conexões citoplasmáticas, estruturas características de um grande grupo de algas vermelhas (SCHMIDT *et al.*, 2009). Em *Iridaea cordata* observou-se um maior número de vesículas formadoras de parede, as quais poderiam ser responsáveis pelo incremento da espessura da parede celular (NAVARRO *et al.*, 2010a). Nesse contexto, GÜNTER & OVODOV (2007) mostraram que a UV-B incrementou a concentração de polissacarídeos em calos da planta vascular *Silene vulgaris*. Não obstante, UV-B causou uma diminuição no rendimento de carragenanas de *K. alvarezii* (ESWARAN *et al.*, 2001).

A radiação UV-B altera principalmente a morfologia das células corticais, promovendo uma maior espessura do talo (SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010a), como reportado para folhas de plantas vasculares (JANSEN *et al.*, 1998). Possivelmente, o incremento na área superficial das paredes celulares de células de algas

ocorre para dissipar os altos níveis de UV-B, prevenindo dessa maneira que a radiação atinja as camadas celulares mais internas (NAVARRO *et al.*, 2010a). Essas alterações poderiam ser consideradas como parte de um processo de aclimação a longos períodos de exposição à UV-B.

A maioria dos trabalhos reportando alterações na ultraestrutura de células de algas decorrente da exposição à UV-B tem sido obtidas em experimentos com radiação UV-B artificial (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2004, 2006; AYRES, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010a). Entretanto, a radiação UV-B solar não tem sido utilizada em experimento visando conhecer seus reais efeitos na estrutura celular.

2.11. Efeitos da UV-B na morfologia

Alterações morfológicas decorrentes da interação entre a radiação UV-B e alvos moleculares foram identificadas inicialmente em plantas vasculares. A UV-B ativaria receptores que produziriam uma alteração nas características morfológicas, dentre elas o tamanho (área e espessura), número de folhas e grau de despigmentação (BARNES *et al.*, 1988; 1996). A possível participação das ROS nas respostas morfológicas e de aclimação a UV-B de *Brassica napus* foi sugerida por GERHARDT *et al.* (2005). Esses autores estudaram a morfologia (curvamento) de *B. napus* quando submetidas a concentrações conhecidas de antioxidantes (ascorbato e cisteína) e H₂O₂, observando que a aplicação de antioxidantes impediu o curvamento da planta, enquanto que a aplicação de H₂O₂ resultou na indução do curvamento em ausência de UV-B. Dessa maneira os autores sugerem que o H₂O₂ pode ser um dos mensageiros secundários na transdução do sinal da UV-B, ou pode ser convertido em ROS que desencadeia respostas para UV-B, dentre eles o curvamento de plantas submetidas à essa radiação.

Alterações na morfologia das algas expostas a UV-B foram primeiramente reportadas por ROLEDA *et al.* (2004b). Esses autores mostraram que a exposição crônica de *Laminaria ochroleuca* à radiação UV-B promoveu não apenas uma diminuição nas taxas de crescimento, mas também alterações na morfologia dos talos, evidentes como deformações nos tecidos, necrose, lesões e curvamento do talo. Essas alterações foram também evidentes em talos expostos à UV-A. Vale à pena ressaltar que necrose pronunciada e perda de parte dos talos foi observada em *L. solidungula* após uma semana de exposição à UV (MICHLER *et al.*, 2002). Perda de biomassa através da necrose foi também observado em plântulas de *Macrocystis pyrifera* (NAVARRO *et al.*, 2008) e

Iridaea cordata (NAVARRO *et al.*, 2010b,c). Nessas duas espécies, observou-se também um curvamento progressivo dos talos.

Em geral, os efeitos morfológicos dependem do tempo de exposição e da intensidade de radiação UV-B aplicada. Nesse contexto, NAVARRO *et al.* (2010c) avaliou a morfologia de talos jovens e adultos de *Iridaea cordata* submetida a três intensidades de UV-B durante 28 dias. Eles observaram que a morfologia dos talos adultos foi afetada em todas as intensidades de UV-B, enquanto que os talos jovens só foram afetados em altas intensidades. Essa variação foi atribuída à diferença da morfologia dos talos, enquanto os jovens são cilíndricos os adultos são laminares. Assim, nos adultos, maior área está diretamente exposta à UV-B. Além disso, em altas intensidades, talos jovens gerados no laboratório apresentaram necrose, enquanto que em baixas intensidades um menor número e tamanho de ramificações basais e curvatura do talo foram observadas (NAVARRO *et al.*, 2010b,c). Em talos coletados no campo, todas as intensidades promoveram apenas leve despigmentação e curvatura dos talos. O desenvolvimento de discos de fixação em diferentes intensidades de UV-B mostraram que a UV-B promoveu despigmentação, diminuição do crescimento e não foi observada a geração de primórdios de frondes eretas (NAVARRO *et al.*, 2010b)

As alterações morfológicas, principalmente a curvatura dos talos e o aumento da espessura dos mesmos têm sido interpretadas como uma forma de defesa à radiação UV-B, reduzindo a área de exposição a essa radiação. No entanto, altos níveis dessa radiação poderiam promover danos irreversíveis como a necrose de tecidos (NAVARRO *et al.*, 2010b,c)

O uso das alterações morfológicas como um parâmetro biológico para avaliar os efeitos da UV-B é pouco freqüente (BISCHOF *et al.*, 2006) devido aos longos períodos de tempo requeridos para observar respostas (ROLEDA *et al.*, 2004b; NAVARRO *et al.*, 2010c). Estudos desse tipo são necessários uma vez que a morfologia e a integridade das algas é um indicador integrado dos danos ocorridos em muitos níveis (ROLEDA *et al.*, 2004b, NAVARRO *et al.*, 2010c). Além disso, mudanças na morfologia poderiaam representar um importante mecanismos de defesa das algas, principalmente para estádios iniciais do desenvolvimento (NAVARRO *et al.*, 2008).

2.12. Efeitos da UV-B no crescimento

Assim como a morfologia, o crescimento é um parâmetro integrador das mudanças fisiológicas promovidos pela exposição à radiação UV-B, fornecendo uma

visão geral dos efeitos da UV-B em organismos fotossintetizantes (Fig. 6). O crescimento de plantas vasculares, macro e microalgas pode ser inibido ou estimulado por diferentes níveis de radiação UV. Variações nas taxas de crescimento também dependem do tempo de exposição e da distribuição das espécies no costão.

Em geral, os organismos do infralitoral têm sido reconhecidos como mais sensíveis a essa radiação que os do médiolitoral uma vez que não são freqüentemente atingidos por altas irradiâncias. Vários estudos em diferentes locais vêm comprovando esses resultados (WOOD, 1987, 1989; LARKUM & WOOD 1993; GROBE & MURPHY, 1994; DRING *et al.*, 1996b; HANELT *et al.*, 1997; VAN DE POLL *et al.*, 2001; MANSILLA *et al.*, 2006). Assim, o crescimento de *Sarcathalia crispata* e *Mazzaella laminarioides*, duas espécies do médiolitoral do estreito de Magallanes, foi menos sensível do que em *Gigartina skottsbergii*, do infralitoral (MANSILLA *et al.*, 2006).

Processos de aclimação à radiação UV têm sido verificados em várias espécies de macroalgas. Em *Ulva expansa* (GROBE & MURPHY, 1998), *U. rígida* (ALTAMIRANO *et al.*, 2000a), *Macrocystis pyrifera* (NAVARRO *et al.*, 2008) e *Iridaea cordata* (NAVARRO *et al.*, 2010c), as taxas de crescimento apresentaram diminuição na primeira semana de cultivo em UV-B quando comparado ao controle, sendo essas diferenças reduzidas no decorrer do tempo, evidenciando um processo de aclimação às novas condições de irradiância. Ainda, NAVARRO *et al.* (2010b,c) observaram que as taxas de crescimento de talos jovens de *I. cordata* não foram prejudicadas embora esses talos apresentassem alterações morfológicas, sugerindo que essas alterações não estariam relacionadas à energia disponível para o crescimento. Resultados similares foram reportados para plantas vasculares expostas à UV-B (ROZEMA *et al.*, 1997; GREENBERG *et al.*, 1997). Por outro lado, ROLEDA *et al.* (2004b) não verificaram um processo de aclimação à UV-B em *Laminaria ochroleuca* quando as taxas de crescimento foram avaliadas por longos períodos de tempo, entretanto, os autores observaram aclimação das taxas de fotossíntese. Embora as algas estivessem produzindo energia através da fotossíntese, essa energia estaria sendo usada para o reparo de danos moleculares em detrimento do crescimento.

Interessante de ressaltar é o fato de diferenças no crescimento entre dois estádios reprodutivos de uma espécie terem sido verificados. O crescimento de tetrasporófitos (NAVARRO *et al.*, 2010c) e gametófitos (NAVARRO *et al.*, 2010b) jovens de *Iridaea cordata* exposta PAR e PAR+UV-B, foi diferente quando expostas às mesmas doses de UV-B artificial. Em *Gracilaria caudata*, os tetrasporófitos apresentaram maiores taxas de

crescimento, quando comparados a gametófitos quando expostos à PAR+UV-B (ORNELLAS, 2011). Dessa maneira, se sugere que diferentes fases do histórico de vida podem responder de maneira diferente quando expostas as mesmas doses de UV-B. Estudos de sensibilidade a UV-B de diferentes fases do histórico de vida são escassos na literatura.

Finalmente, as consequências das alterações fisiológicas, produto da UV-B, não só têm importância no nível celular, mas também tem um impacto no desenvolvimento da estrutura da comunidade e nos padrões de distribuição das espécies (BISCHOF *et al.*, 2006) (Fig. 6), uma vez que esses danos são mais pronunciados nas estruturas de reprodução, como esporos e zoósporos (ROLEDA *et al.*, 2005, 2007; NAVARRO *et al.*, 2008, 2010c). Os efeitos biológicos da radiação UV em organismos fotossintetizantes são respostas combinadas dos danos, dos reparos e da aclimação, que podem ter consequências no crescimento e na produção primária global.

Fig. 6. Esquema simplificado dos efeitos do aumento da radiação UV-B em um organismo fotossintetizante. Observam-se efeitos diretos no DNA, proteínas e enzimas da fotossíntese, e a atuação de alguns mecanismos de fotoproteção. Quando a produção de ROS é excessiva e favorece o estado pró-oxidante (desbalanço metabólico), o estresse oxidativo é desencadeado, provocando danos às estruturas celulares e ao metabolismo em geral como em decorrência desses eventos, várias conseqüências biológicas e ecológicas poderiam ocorrer. Ox: oxidação; Red: redução; Fot: fotoliase, AE: antioxidante enzimático; AnE: antioxidante não enzimático; CPD: dímero de ciclobutano pirimidina; D1: proteína D1; ROS: espécies reativas de oxigênio.

3. Abordagens experimentais em estudos sobre os efeitos da UV-B em organismos fotossintetizantes

Grande parte dos primeiros estudos sobre os efeitos da UV-B em organismos fotossintetizantes foram realizados em laboratório, empregando-se sistemas de lâmpadas em salas de cultivo, nas quais os organismos eram expostos a altas irradiâncias de UV-B e a baixas irradiâncias de UV-A e PAR. Após a década de 80, foi amplamente aceito que os efeitos da UV-B em plantas era exacerbado nessas condições uma vez que as proporções entre UV-B/UV-A e UV-B/ PAR eram desproporcionais ao que ocorria na natureza. Conseqüentemente, extrapolação dessas respostas para o que ocorreria na natureza passou a ser questionada (CALDWELL *et al.*, 1994; CALDWELL & FLINT, 1994,

1997; KRIZEK, 2004). As lâmpadas UV-B fornecem mais comprimentos de onda curtos, e menos comprimentos de onda longos, do que a radiação solar em condições de depleção de ozônio. A alta relação UV-B/UVA pode ter consequências fotobiológicas importantes uma vez que a UV-B tem um efeito biológico desproporcional, danificando macromoléculas tais como DNA, proteínas e lipídeos (JONES & KOK, 1966; SETLOW, 1974; FRANKLIN & FORSTER; 1997).

Embora a irradiância UV-B e UV-A fornecida pelas lâmpadas seja muito diferente da obtida a partir da radiação solar, muitos estudos são ainda realizados com esse sistema. Sua importância está no fato de que é possível identificar rotas metabólicas específicas. No entanto, estudos realizados em laboratório deveriam levar em consideração o conhecimento das condições naturais de irradiância que atinge o local de crescimento dos organismos em experimentação, uma vez que a contribuição de uma pequena variação nos comprimentos de onda mais curtos da UV-B pode gerar severos efeitos. Nesse contexto, MARCHANT (1997) reportou que uma pequena mudança no comprimento de onda em 7 nm pode modificar consideravelmente um efeito biológico.

Experimentos que utilizam lâmpadas para a obtenção de radiação UV devem fornecer informações sobre o tipo de lâmpada, espectro de emissão, tempo de exposição, irradiância, tipo de espectro de ação utilizado, etc. Essas informações são necessárias para uma melhor comparação entre trabalhos e entre os efeitos reportados. Alguns autores usam doses de irradiação em KJ.m^{-2} num tempo determinado (ponderadas ou não com diferentes espectros de ação), enquanto outros descrevem a intensidade expressada em diferentes unidades (W.m^{-2} , $\mu\text{mol fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). A transformação entre Watts e Joules ($\text{W}=\text{J.s}^{-1}$) é possível se a informação do tempo (segundos, minutos, etc) é fornecida, possibilitando conversões e análises comparativas sobre efeitos causados pela UV.

Uma abordagem mais realista dos efeitos biológicos da UV-B ocorre em estudos realizados ao ar livre sob radiação solar. Nesses casos, os dois métodos mais amplamente usados são; i) o método da atenuação, e ii) o método do aumento da radiação UV-B.

O método da atenuação propõe o uso de filtros que absorvem (tratamento sub-ambiental) ou permitem a passagem da radiação UV-B (tratamento similar ao ambiente). A vantagem desse método é o baixo custo, simplicidade, e independência de fonte de energia. A redução de UV-B é possível também através do uso de cubetas contendo o gás ozônio (TEVINI *et al.*, 1991), embora esse método seja complexo e muito caro. A desvantagem do método de atenuação é o fato de que permitem apenas avaliar o efeito da

exposição à radiação UV-B solar ambiental, porém não possibilita averiguar os efeitos de níveis de UV-B promovidos por uma depleção na camada de ozônio.

O método do aumento da radiação UV-B propõe adicionar radiação artificial por meio de lâmpadas. A maioria desses estudos emprega UV-B de emissão contínua por determinado período, principalmente ao redor do meio dia. Esse sistema fornece um acréscimo de UV-B baseado nas consequências da destruição da camada de ozônio em condições de céu claro e não leva em conta a cobertura por nuvens e a variação diária da radiação. Se esse sistema não é monitorado cuidadosamente, pode levar a maiores níveis de UV-B do que é pretendido em relação à depleção de ozônio, e a relações substancialmente mais elevadas de UV-B/UV-A e UV-B/PAR do que aquelas que poderiam ocorrer devido à destruição de ozônio (FISCUS & BOOKER, 1995). Essas relações são relativamente importantes na determinação de como as plantas respondem a mudanças na UV-B (CALDWELL *et al.*, 1994; ALLEN *et al.*, 1998; KRIZEK, 2004). Esse problema pode ser evitado empregando-se um sistema de fornecimento diferenciado, em que a UV-B fornecida pelas lâmpadas aumente durante a manhã e decline após o meio dia. Esse sistema poderia ser melhorado em combinação com um sistema automático de desligamento de algumas lâmpadas durante os dias nublados. Existem sistemas que fornecem radiação UV-B em incrementos proporcionais aos registrados simultânea e constantemente no campo: sistema de modulação da radiação (SULLIVAN *et al.*, 1994; MUSIL *et al.*, 2002). Esse sistema compensa não só as mudanças na radiação solar devido ao ângulo solar, mas também a cobertura de nuvens e outras condições atmosféricas. Além disso, compensa fatores, tais como degradação de filtros, envelhecimento de lâmpadas e temperatura. Desafortunadamente, esses sistemas não têm sido usados freqüentemente devido a sua complexidade técnica e seu alto custo.

Estudos realizados em altos níveis de radiação UV-B solar decorrentes da depleção na concentração de ozônio não são freqüentes na literatura, uma vez que eles podem ser realizados apenas em latitudes afetadas pelo “buraco” na camada de ozônio, ou em locais afetados esporadicamente por esses eventos, como por exemplo, o extremo sul do Chile e da Argentina.

4. Importância de estudos sobre a radiação UV-B em algas

As algas são de grande importância nos ambientes aquáticos, não só em termos de diversidade (NORTON *et al.*, 1996), mas também por desempenharem diversas funções. Os habitat em que as algas marinhas bentônicas ocorrem são principalmente zonas

costeiras rochosas ao redor do mundo, onde podem até formar densas florestas, fornecendo áreas de criação para peixes e outros organismos. Além disso, as algas evitam mudanças bruscas na concentração de nutrientes da coluna de água e estabilizam os sedimentos (FRANKLIN & FORSTER, 1997).

As algas marinhas apresentam uma grande importância econômica devido ao seu conteúdo de ficocolóides, como alginatos, agaranas e carragenanas. Além disso, têm sido utilizadas diretamente como alimento e fertilizantes. São conhecidas ainda como fonte de substâncias antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas (PESANDO, 1990; ANGGADIREDDY *et al.*, 1997; HUDSON *et al.*, 1999).

As macroalgas do médiolitoral estão sujeitas a mudanças extremas devido principalmente à influência das marés (DAVISON & PEARSON 1996). Durante os períodos de maré baixa, esses organismos são expostos à alta irradiância solar, variações de temperatura, baixa salinidade e dessecação. Entretanto, no infralitoral, as macroalgas encontram um habitat mais estável, uma vez que a coluna de água funciona como uma proteção contra as fortes mudanças nas condições abióticas (BISCHOF *et al.*, 2006). Na região subantártica, as algas estão expostas ainda a fortes ventos e a precipitação na forma de neve, assim como a mudanças drásticas no fotoperíodo e irradiância ao longo do ano.

Devido à extrema importância dos produtores primários nos ecossistemas costeiros, qualquer alteração na sua abundância relacionadas a mudanças ambientais, como o aumento da radiação ultravioleta pode ter dramáticas consequências para a comunidade e para o ecossistema costeiro. Assim, as pesquisas direcionadas à compreensão da interação entre esses organismos e as condições ambientais têm tido grande relevância nas últimas décadas. Os altos níveis de radiação UV-B podem ser danosos aos organismos marinhos, especialmente às algas bentônicas. Estas, ao contrário das espécies fitoplanctônicas, ficam expostas à radiação por períodos prolongados durante as horas de maré baixa por estarem fixas e restritas ao seu local de crescimento. O risco da ocorrência de efeitos prejudiciais aumenta quando as algas recebem níveis elevados de radiação UV-B, como ocorre na Antártica e parte da América do Sul nos meses de primavera-verão (CABRERA *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 2006).

A importância de avaliar os efeitos causados pela radiação UV-B em organismos marinhos está relacionada ao fato de que 50% da produção primária de biomassa do planeta é atribuída à atividade dos ecossistemas aquáticos (HOUGHTON & WOODWELL, 1989). Além disso, os altos níveis de radiação UV-B que atingem esses ecossistemas

atualmente, podem representar um risco para a sobrevivência dos organismos fotossintetizantes marinhos. Outro aspecto que ressalta a necessidade de mais estudos relacionados à radiação UV-B é a baixa perspectiva de recuperação dos níveis normais de ozônio atmosférico (níveis dos anos 1970-1980) que, segundo previsões recentes, não serão alcançados antes de 2070 (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009).

5. Justificativa

Nos últimos anos, o aumento da radiação UV-B, principalmente nas regiões Antártica e Subantártica, tem apontado para a necessidade de estudos que avaliem seus efeitos em organismos marinhos. Essa necessidade é ainda mais imperativa devido a previsões recentes, de que a recuperação da camada de ozônio não será alcançada antes de 2070 (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009).

As algas bentônicas, por ficarem expostas por períodos prolongados durante as marés baixas, são mais suscetíveis aos efeitos da radiação UV-B. Muitos esforços têm sido realizados visando conhecer esses efeitos em macroalgas. A maioria desses estudos tem sido realizado em laboratório, porém existem dificuldades na aplicação desses conhecimentos para populações naturais, uma vez que: i) a radiação UV é variável diária e sazonalmente; ii) na natureza há outros fatores que podem incrementar os efeitos ou até atenuá-los; e iii), as algas têm a capacidade de se aclimatar às variações da radiação.

Aspectos ambientais da radiação UV, assim como seu impacto em macroalgas marinhas, têm sido consideravelmente menos estudados nos oceanos do hemisfério sul do que do hemisfério norte (HUOVINEN *et al.*, 2006). Conhecer os efeitos da UV solar é importante e necessário, principalmente em macroalgas que ocorrem em locais onde há periodicamente uma diminuição na camada de ozônio. A realização de estudos durante períodos em que haja efetivamente essa diminuição poderá fornecer dados sobre os efeitos da UV-B solar num cenário real. Além disso, é fundamental avaliar esses efeitos em populações de algas que se constituem em matéria prima para a produção de ficocolóides e consumo humano, a fim de permitir uma melhor avaliação das consequências do aumento dessa radiação para o setor produtivo.

Estudos referentes à combinação de fatores de estresse, como disponibilidade de nitrogênio e exposição à UV-B solar fazem parte de uma área de pesquisa recente e em expansão. Dessa forma, justifica-se o estudo dos efeitos de variáveis integradas, a fim de se conhecer as respostas ecofisiológicas de algas de importância econômica expostas à UV-B solar e supridas com diferentes concentrações de nitrogênio.

Estudos sobre a sensibilidade à UV-B de diferentes fases do histórico de vida de algas são poucos na literatura, principalmente em espécies com alternância de gerações isomórficas. Um aumento da radiação UV-B poderia alterar ou interromper essa alternância, causando um desequilíbrio nas proporções entre as fases e prejudicando a permanência de espécies num determinado ambiente. Dessa maneira, estudos sobre a diversidade intraespecífica se justificam, a fim de se conhecer as estratégias de gametófitos e tetrasporófitos frente à radiação UV-B.

No presente trabalho, *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq (Gigartinales, Rhodophyta) e *Porphyra columbina* Montagne (Bangiales, Rhodophyta) foram escolhidas como objetos de estudo, pois são coletadas frequentemente no litoral do Chile para a extração de carragenanas (*M. laminarioides*) e para consumo humano (*P. columbina*).

Porphyra columbina se distribui em toda a costa do Chile e é coletada por pescadores e vendida nos mercados locais como alga seca e prensada para consumo humano. Em 2009, 120 toneladas de alga foram coletadas e processadas (Sernapesca, 2009). Essa espécie ocorre no médiolitoral (superior e inferior) e por tanto está sujeita às variações da maré. Pode também ocorrer no médiolitoral inferior. Existem alguns estudos sobre os efeitos da UV-B em *P. columbina*. Esses estudos avaliam os efeitos da UV-B na fotossíntese (HÄDER *et al.*, 2003; GÓMEZ *et al.*, 2004; RAUTENBERGER *et al.*, 2009) e síntese de MAAs (HELBLING *et al.*, 2004; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004). A maioria deles têm sido realizados na região central do Chile e Argentina. Entretanto, existem poucas informações sobre os efeitos da radiação UV-B em algas de regiões onde tem havido um aumento efetivo dessa radiação a partir de década de 90.

Mazzaella laminarioides se distribui em toda a costa do Chile até as Ilhas Diego Ramírez (56° 30' S; 68° 43' W) (VÁSQUEZ & VEGA, 2004; MANSILLA & NAVARRO, 2004a). É frequentemente coletada no litoral do Chile central para a extração de carragenanas. Em 2009, foram coletadas 4.225 toneladas de alga seca a partir de populações naturais (SENAPESCA, 2009). Há uma preocupação com o excesso de coleta dessa espécie, e a Subsecretaria de Pesca (Chile), sugere uma redução na exploração nos próximos anos. Além da coleta, essas algas estão sujeitas à pressão ocasionada por mudanças recentes nas condições ambientais, principalmente ao que se refere à radiação ultravioleta (UV), uma vez que elas ocorrem no médiolitoral. Diferentemente ao que acontece com *Porphyra columbina*, há uma carência de estudos sobre os efeitos da UV-B em *M.*

laminarioides, com exceção de alguns trabalhos sobre os efeitos de radiação UV na fotoinibição (GÓMEZ *et al.*, 2004) e no crescimento (MANSILLA *et al.*, 2006). Foram identificados para a espécie 5 MAAs (HUOVINEN *et al.*, 2004).

6. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da radiação UV solar (UV-A e UV-B) e os efeitos da disponibilidade de nitrogênio em duas espécies de algas de importância econômica no sul do Chile, *Mazzaella laminarioides* e *Porphyra columbina*, durante a primavera, período no qual frequentemente tem sido verificado um aumento de radiação UV-B decorrente da diminuição da camada de ozônio. Esses efeitos foram avaliados considerando-se aspectos fisiológicos e bioquímicos, após a exposição de indivíduos procedentes de populações naturais a diferentes combinações de radiação solar. Essas informações, principalmente as referentes ao crescimento e ao conteúdo de ficocolóides, devem permitir uma melhor avaliação das conseqüências do aumento da radiação UV-B para o setor produtivo chileno.

6.1. Objetivos específicos

Mazzaella laminarioides

- Verificar se o crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, MAAs, conteúdo de nitrogênio, hidrogênio, carbono e rendimento de carragenanas são influenciados pela disponibilidade de diferentes concentrações de nitrato, durante um período de 18 dias, quando cultivados em radiação solar.
- Avaliar as respostas de tetrasporófitos e gametófitos frente à radiação UV solar, considerando-se: crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, MAAs, conteúdo de nitrogênio, hidrogênio, carbono e rendimento de carragenanas durante um período de 18 dias.
- Avaliar o conteúdo de MAAs durante um ciclo diário em que houvesse um aumento de radiação UV-B solar e verificar se a disponibilidade de nitrato propicia um aumento na síntese e acúmulo desses compostos.

Pophyra columbina

- Avaliar o conteúdo de MAAs durante um ciclo diário em que houvesse um aumento de radiação UV-B solar e verificar se a disponibilidade de nitrato propicia um aumento na síntese e acúmulo desses compostos.
- Verificar os efeitos ultraestruturais durante um ciclo diário em que houvesse um aumento de radiação UV-B solar.

7. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

Os experimentos foram realizados nas primaveras dos anos de 2008 e 2009. Metodologias específicas serão descritas no item Material e Métodos de cada capítulo.

7.1. Material biológico e cultivo

O material biológico foi obtido no Estreito de Magallanes, no extremo sul do Chile. Gametófitos femininos e tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Bory de Frédericq) foram coletados em Punta Santa Ana, Provincia de Punta Arenas (53°37' S; 70°59' W), distante 70 km ao sul da cidade de Punta Arenas, Provincia de Punta Arenas, Chile (Fig. 7 e 8). Frondes de *Porphyra columbina* Montagne foram coletadas na Bahía Mansa, Provincia de Punta Arenas (53°36'20" S; 70°55'55" W), distante 65 km ao sul da cidade de Punta Arenas (Fig. 7). As datas de coleta e os locais onde os experimentos foram realizados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Locais, datas e espécies coletadas e utilizadas nos diferentes experimentos e locais onde foram desenvolvidos os experimentos.

Espécie	Local de coleta (Provincia de Punta Arenas)	Data de coleta	Local e descrição dos experimentos
<i>M. laminarioides</i> (tetrasporófitos)	Santa Ana	06-09-2009	Campus central da Universidad de Magallanes (UMAG). Efeito de diferentes concentrações de nitrato em algas expostas à radiação solar durante 18 dias (<u>Capítulo 2</u>).
<i>M. laminarioides</i> (tetrasporófitos e gametófitos femininos)	Santa Ana	27-09-2009	Campus central da UMAG. Efeito da radiação UV-B e UV-A em tetrasporófitos e gametófitos cultivados durante 18 dias (<u>Capítulo 3</u>)
<i>M. laminarioides</i> (tetrasporófitos)	Santa Ana	10-10-2008	Centro de cultivo Bahía Laredo (UMAG) Efeito da radiação UV-B e UV-A no conteúdo de MAAs em tetrasporófitos cultivados durante um ciclo diário (<u>Capítulo 4</u>).
<i>P. columbina</i>	Bahía Mansa	07-11-2008	Campus central da UMAG. Efeito da radiação UV-B e UV-A no conteúdo de MAAs em frondes cultivadas durante um ciclo diário (<u>Capítulo 5</u>).
<i>P. columbina</i>	Bahía Mansa	07-11-2008	Campus central da UMAG. Efeito da radiação UV-B e UV-A na ultraestrutura de frondes cultivadas durante um ciclo diário (<u>Capítulo 6</u>).

Fig. 7. Posicionamento geográfico dos locais de coleta de *Mazzaella laminarioides* (local 1: Punta Santa Ana) e *Porphyra columbina* (local 2: Bahía Mansa) no Estreito de Magallanes. Os experimentos dos capítulos 2, 3, 5 e 6 foram realizados na Universidad de Magallanes na cidade de Punta Arenas, enquanto que o experimento 4 foi realizado no Centro de cultivo Bahía Laredo (local 3).

Fig. 8. Local de coleta de *Mazzaella laminarioides*. A, Aspecto geral do local de coleta; B, costão rochoso mostrando cobertura de *M. laminarioides* e outras algas típicas da região subantártica do Chile; C, detalhe de frondes de *M. laminarioides* em períodos de maré baixa.

7.2. Água do mar

A água do mar utilizada em cada um dos experimentos foi obtida no mesmo local e período onde o material biológico foi coletado (tabela 1). Previamente ao uso nos experimentos, essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade da água foi de 32 psu.

7.3. Tipos de filtros utilizados para os cultivos

Foram utilizados filtros (Fig. 9) para a obtenção dos diferentes tratamentos de radiação, que são apresentados a seguir:

- Radiação ambiental ($PAR + UV-A + UV-B = PAB$) - filtro Ultraphan URT (Digefra GmbH, Munich, Alemanha), que elimina a radiação abaixo de 295 nm.
- Radiação ambiental excluindo-se a UV-B ($PAR + UV-A = PA$) - filtro Folex 320 (Folex, Cologne, Alemanha), que elimina a radiação abaixo de 320 nm
- Radiação ambiental excluindo-se a UV-A e a UV-B ($PAR = P$) - filtro Ultraphan URUV (Digefra GmbH, Munich, Alemanha) que elimina a radiação abaixo de 395 nm

Fig. 9. Transmitância dos filtros utilizados nos experimentos: Ultraphan 295, Folex 320 e Ultraphan 395. Referências no texto.

7.4. Radiação solar

Os dados de radiação solar referentes aos dias dos experimentos foram proporcionados pelo Laboratorio de Ozono da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile). Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectroradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. Esse instrumento registra dados em quatro bandas de UV (305, 320, 340 e 380 nm) e de PAR (400-700 nm) a cada minuto durante o ano inteiro. Os dados nas bandas de UV foram fornecidos em unidades de $\mu\text{W.cm}^{-2}$, as quais foram transformadas em W.m^{-2} . Os valores de PAR foram fornecidos em $\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e transformados em $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e, posteriormente em W.m^{-2} .

$$\mu\text{W.cm}^{-2} * 0,01 \longrightarrow \text{W.m}^{-2}$$

$$\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1} * 1000 \longrightarrow \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1} * 0,217 \longrightarrow \text{W.m}^{-2}$$

O fator 0,217 foi usado para transformar valores de $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em W.m^{-2} . Esse fator foi obtido a partir da equação geral de energia:

$$E = hc / \lambda$$

onde, h = constante de Planck ($6.6*10^{-34} \text{ W.s}^{-2}$), c = velocidade da luz ($3*10^{17} \text{ nm.s}^{-1}$), e λ =comprimento de onda. Se assumirmos que a E é igual a um mol de fótons, e que esse valor é igual ao número de Avogadro de fótons e substituírmos todos os valores na equação geral de energia, temos a expressão final:

$$1 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} = 119,7 / \lambda (\text{W.m}^{-2})$$

O comprimento de onda usado para a radiação PAR foi o valor médio desta banda, o seja, 550 nm. Se substituírmos na expressão anterior, então obtemos que:

$$1 \mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1} = 0,217 \text{ W.m}^{-2}, \text{ ou}$$

$$1 \text{ W.m}^{-2} = 4,60 \mu\text{mol fótons m}^{-2}.\text{s}^{-1}.$$

A irradiância solar por hora foi calculada integrando os dados de irradiância obtidos a cada minuto em cada uma das bandas. Em seguida, esses valores foram integrados por dia, visando obter as doses diárias no ambiente em cada uma das bandas, desde o início do período de luz até o por o sol, como segue:

$$\text{Dose diária no ambiente} = \int_{t_0}^{t_f} I(\lambda) dt$$

onde, t_0 = tempo inicial (início período de luz), t_f = tempo final (por do sol), $I(\lambda)$ = valores de irradiâncias à 305, 320, 340, 380 e a PAR (400-700 nm) e t = tempo. Posteriormente, as doses de UV-B e UV-A diárias biologicamente efetivas foram calculadas aplicando um espectro de ação que descreve a medida de um efeito biológico como uma função do comprimento de onda (ex. espectro ponderado de ação no DNA, fotossíntese, danos generalizados em cloroplastos, etc). Diferentes funções ponderadas têm seus efeitos como consequência de diferentes comprimentos de onda, a maioria deles na faixa da UV-B (Fig. 10). Neste caso foi utilizado o espectro de ação apresentado por Jones & Kok (1966) para inibição da fotossíntese de cloroplastos isolados de espinafre, como segue:

$$\text{Dose Biologicamente Efetiva no ambiente} = \int_{t_0}^{t_f} \int_{280 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} I(\lambda) \varepsilon(\lambda) d(\lambda) dt$$

onde, $I(\lambda)$ é a irradiância à λ nm e $\varepsilon(\lambda)$ é a resposta biológica à λ nm definida pela função de ponderação. Então, a dose biologicamente efetiva é a área sob a curva, a qual resulta da multiplicação do espectro de ação pela irradiância espectral em cada comprimento de onda (RUNDEL, 1983). É importante enfatizar que foram calculadas doses biologicamente efetivas de UV-B e UV-A separadamente, usando apenas dois comprimentos de onda para cada radiação (UV-B: 305 e 320; UV-A: 340 e 380), pois o instrumento fornece apenas essas bandas.

Fig. 10. 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.

Cabe destacar que a irradiância solar e a dose diária no ambiente são diferentes dos valores que as algas recebem dentro das unidades experimentais, uma vez que o acrílico dos frascos e placas Petri, assim como os filtros utilizados nos experimentos, transmitem diferentes porcentagens de radiação PAR e UV (Fig. 9). O acrílico (metacrilato) usado nos capítulos 2 e 3 transmite aproximadamente 80% da radiação UV e 85% de PAR (Fig. 11). Valores semelhantes aos da irradiância solar são transmitidos pelo filtro Ultraphan URT (Digefra GmbH, Munich, Alemanha) (Fig. 9). Assim, a porcentagem de UV-B, UV-A e PAR retida pelo acrílico e filtros foram subtraídos dos valores ambientais, obtendo-se assim valores reais de dose diária as quais as algas foram expostas. No caso dos experimentos dos capítulos 5 e 6, apenas foi subtraída a porcentagem de UV-B, UV-A e PAR retida pelos filtros, uma vez que esses experimentos foram realizados em recipientes de plástico abertos.

Fig. 11. A: Frascos de acrílico (metacrilato) utilizados para o cultivo de *Mazzaella laminarioides* nos experimentos dos capítulos 2 e 3. B: Porcentagem de transmitância do acrílico transparente deixando passar a radiação UV a partir dos 290 nm.

A radiação UV-B (280-320nm) e UV-A (320-400 nm) foi estimada usando as fórmulas sugeridas por Orce & Helbling (1997):

$$\text{UV-B} = 59,5 * E_{305} + 4,1 * E_{320}$$

$$\text{UV-A} = 87,4 * E_{340} - 2,4 * E_{380}$$

onde, E corresponde à energia registrada nas bandas 305, 320, 340, 380 nm, respectivamente.

Finalmente, a relação UV-B/UV-A foi avaliada visando estimar indiretamente a variação na concentração de Ozônio durante o experimento. Variações na razão UV-B/UV-A indicariam variações na coluna de ozônio uma vez que esse composto filtra apenas a radiação UV-B. os valores de UV-B/UV-A foram comparados com dados de concentração de Ozônio do Goodart Space Flight Center (<http://jwocky.gsfc.nasa.gov>).

7.5. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com um número mínimo repetições equivalentes a três. A normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados foram testadas (teste de Kolmogorov–Smirnov teste de validação de Cochran). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) uni ou multifatorial de acordo com o caso. Quando foram encontradas diferenças significativas, foi aplicado um teste *a posteriori* de Newman-Keuls (ZAR, 1999) e Tukey LSD. Todas as conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$). Adicionalmente, alguns dados foram submetidos a testes de correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

Capítulo 2

Efeitos da concentração de NO₃ em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivados sob radiação solar: crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, aminoácidos tipo micosporinas, conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio, e rendimento de carragenanas.

ABSTRACT

In this chapter, we studied the effects of nitrate supply on growth, photosynthetic pigments (Chl *a*, phycobiliproteins, and total carotenoids), mycosporine-like amino acids (MAAs), soluble proteins, C, N, H content, and carrageenan yield of *Mazzaella laminarioides* tetrasporophytes cultivated under solar radiation (PAR+UV-A+UV-B). Apical segments were cultivated under five concentrations of NO₃ (0, 0.09, 0.18, 0.38, and 0.75 mM) for 18 days in spring 2009, Punta Arenas, Chile. The treatment without NO₃ caused a reduction of photosynthetic pigments (FE, FC, and Cl *a*) when compared to the NO₃ supply treatments. However, the concentration of MAAs and growth rates were similar in all treatments. The polysaccharides yield was higher in 0 and 0.75 mM treatments. These results indicate an adaptation of *M. laminarioides* metabolism to maintain their growth rates in different conditions of nitrate availability under high irradiance.

RESUMO

Neste capítulo, foram estudados os efeitos da adição de nitrogênio no crescimento, conteúdo pigmentar (Cl *a*, ficobiliproteínas e carotenóides totais), aminoácidos tipo micosporina (MAAs), proteínas solúveis, C, N, H e rendimento de carragenanas de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados sob radiação solar (PAR+UV-A+UV-B). Segmentos apicais foram cultivados em cinco tratamentos de NO₃ (0; 0,09; 0,18; 0,38 e 0,75 mM) durante 18 dias na primavera de 2009 em Punta Arenas, Chile. O tratamento sem adição de NO₃ promoveu diminuição de pigmentos fotossintetizantes (FE, FC e Cl *a*), quando comparado aos tratamentos com adição NO₃. Entretanto, a concentração de MAAs foi semelhante em todos os tratamentos bem como as taxas de crescimento. O rendimento dos polissacarídeos foi maior no tratamento de 0 e 0,75 mM de NO₃. Esses resultados evidenciam uma aclimação do metabolismo de *M. laminarioides* a fim de manter suas taxas de crescimento nas diferentes condições de disponibilidade de nitrato em condições de alta irradiância.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é apontado como o nutriente que potencialmente limita a produtividade primária nos oceanos (FALKOWSKI, 1997; TYRRELL, 1999). O nitrogênio inorgânico solúvel pode ser captado na forma de nitrato, nitrito ou amônio, e incorporado em substâncias fundamentais para as células, tais como aminoácidos, ácidos nucleicos, pigmentos e outras macromoléculas nitrogenadas (LOBBAN & HARRISON, 1994), constituindo-se em reservas de nitrogênio dentro da célula. Sob limitação de nitrogênio, as algas podem consumir essas reservas internas.

A ficoeritrina é uma das principais reservas intracelulares de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras macromoléculas consumidas quando a alga encontra-se sob limitação de nitrogênio (LAPOINTE & DUKE, 1984; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 1993; VERGARA *et al.*, 1995; ANDRIA *et al.*, 1999). Dentre outros compostos que podem ser consumidos sob condições de limitação de nitrogênio estão a *Cl a* (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 1993; VERGARA *et al.*, 1995; ANDRIA *et al.*, 1999; COSTA, 2005; MARTINS, 2007) e a Rubisco (KÜPPERS & WEIDNER, 1980; LAPOINTE & DUKE, 1984; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 1993; ANDRIA *et al.*, 1999). Como consequência do consumo dessas moléculas, um decréscimo nas taxas de fotossíntese e uma diminuição das taxas de crescimento podem ser verificados (LAPOINTE & DUKE, 1984). Quando as reservas de nitrogênio intracelular são esgotadas, as algas tornam-se mais sensíveis às variações ambientais (SMIT, 2002).

A radiação ultravioleta tem sido apontada como um fator de estresse muito importante nos ambientes aquáticos (FRANKLIN & FORSTER, 1997). A radiação UV-B pode afetar diretamente os organismos quando é absorvida por importantes biomoléculas, tais como ácidos nucleicos, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (FRANKLIN & FOSTER, 1997; BISCHOF *et al.*, 2006; KARSTEN *et al.*, 2009). Essa radiação pode ainda agir de forma indireta induzindo reações fotoquímicas. Como decorrência desses efeitos muitos processos bioquímicos e fisiológicos, como crescimento, sobrevivência, produção de oxigênio, metabolismo de nitrogênio e captação e assimilação de CO₂, podem ser alterados (HÄDER *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1996; SINHA *et al.*, 1998; FRANKLIN & FOSTER, 1997; BISCHOF *et al.*, 2002c; KARSTEN *et al.*, 2009).

As algas têm desenvolvido mecanismos bioquímicos de defesa contra os danos promovidos pela UV-B, dentre os quais estão a síntese e o acúmulo de compostos fotoprotetores, principalmente MAAs (DUNLAP & SHICK 1998). Os MAAs são moléculas

de baixo peso molecular, alto coeficiente de extinção molar e banda de absorção entre 310 e 360 nm (COCKELL & KNOWLAND, 1999; SHICK & DUNLAP, 2002; KORBEE *et al.*, 2005a).

HOYER *et al.* (2001) classificaram as macroalgas em três grupos fisiológicos em termos de valores de MAAs: i) espécies que não possuem MAAs; ii) espécies que possuem concentração basal de MAAs ajustável de acordo com as condições ambientais; e iii) espécies que possuem altos teores de MAAs, independentemente das condições ambientais. No segundo grupo (ii), a síntese de MAAs poderia ser influenciada pela radiação UV (UV-A e/ou UV-B) (FRANKLIN *et al.*, 2001, SHICK *et al.*, 1999), podendo ainda ser influenciada pela luz azul (FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b).

Recentemente, determinou-se que além da qualidade e quantidade de energia, a disponibilidade de compostos nitrogenados na água (principalmente amônio) influencia a síntese e o acúmulo de MAAs (LITCHMAN *et al.*, 2002; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004, 2005; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008). Altas concentrações de amônio promoveram a síntese de MAAs em *Grateloupia lanceola* (HUOVINEN *et al.*, 2006), *Asparagopsis armata* (FIGUEROA *et al.*, 2008) e em duas espécies de *Porphyra* (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005b).

Além de estimular o acúmulo de MAAs, a disponibilidade de amônio pode aumentar o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (Cl *a* e ficobiliproteínas) e de proteínas solúveis (KORBEE *et al.*, 2005b). Esses resultados têm levado alguns autores a sugerir que os MAAs podem funcionar também como um reservatório de nitrogênio (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a, 2006, DE LA COBA *et al.*, 2009).

Embora sejam compostos nitrogenados, há escassa informação sobre os efeitos da disponibilidade de nitrogênio na síntese e acúmulo de MAAs especialmente utilizando-se nitrato como fonte de nitrogênio (BANASZAK & NEALE 2001, LITCHMAN *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005a). O único artigo que aborda os efeitos da disponibilidade de nitrato (NO₃) na síntese e acúmulo de MAAs refere-se à *Gracilaria tenuistipitata* cultivada sob condições de laboratório (BONOMI *et al.*, 2011). Essa alga tem a capacidade de acumular grandes quantidades de MAAs, quando é suprida com grandes concentrações de NO₃ sob PAR+UV.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da disponibilidade de NO₃ na concentração de MAAs de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* quando expostos à radiação solar (PAR+UV-A+UV-B), durante a primavera na Região de Magallanes,

Chile, período no qual frequentemente tem sido verificado um aumento de radiação UV-B decorrente da diminuição da camada de ozônio (ORCE & HELBLING, 1997; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006). Uma vez que a limitação de nitrogênio pode afetar o crescimento, conteúdo pigmentar, proteínas solúveis totais, rendimento de carragenanas e razão de C:N, esses parâmetros também foram avaliados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Porções apicais de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq foram coletados em Punta Santa Ana província de Punta Arenas, Chile (53° 37' S; 70° 59' W) no dia 6 de setembro de 2009. Essas frondes foram transportadas para o Laboratorio de Biología Marina da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile), onde após seleção, ápices de três centímetros foram cultivados em frascos cilíndricos. Esses frascos foram fabricados em acrílico (metacrilato), permitindo a passagem da radiação UV a partir de 290 nm (Fig. 11, Capítulo 1).

2.2. Água do mar e meio de cultivo

A água do mar utilizada no experimento foi coletada em Punta Santa Ana, Punta Arenas (Chile) no dia 5 de setembro de 2009. Essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade foi de 32 psu.

2.3. Desenho experimental

Ápices tetrasporofíticos de *Mazzaella laminarioides* com três centímetros de comprimento, na proporção de $2 \pm 0,1$ gramas de massa fresca para 1,5 litros de água do mar enriquecida com von Stosch sem a adição de NO_3 (Tabela 1; Oliveira *et al.*, 1995) foram cultivados em diferentes concentrações de NO_3 , acrescidos na forma de NaNO_3 .

Foram preparados cinco tratamentos com diferentes concentrações de NO_3 (Tabela 2).

Tabela 1. Soluções estoques para preparação de solução enriquecida de von Stosch (VS) sem a adição de NO_3 .

Reagentes	[] na água do mar	Diluição	Volume final
Na-EDTA	3,72 mg	0,4650 g / 100 mL	100 mL
Na_2HPO_4 ($12\text{H}_2\text{O}$)	10,75 mg	1,3438 g / 100 mL	100 mL
FeSO_4 ($7\text{H}_2\text{O}$)	278 μg	0,0348 g / 100 mL	100 mL
MnCl_2 ($4\text{H}_2\text{O}$)	19,8 μg	0,0124 g / 500 mL	100 mL
Tiamina	0,2 μg	0,2 g / 100 mL	12,5 mL
Biotina	1 μg	0,01 g / 100 mL	1,25 mL
Cianocobalamina	1 μg	0,01 g / 100 mL	1,25 mL
Volume Final em água destilada			1000 mL

Tabela 2. Descrição dos tratamentos empregados nos cultivos de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* com diferentes concentrações de nitrato.

Tratamentos	Descrição
0 mM NO_3	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50%
0,09 mM NO_3	Água do mar +VS sem nitrato diluído a 50% + 0,09 mM de nitrato
0,18 mM NO_3	Água do mar +VS sem nitrato diluído a 50% + 0,18 mM de nitrato
0,38 mM NO_3	Água do mar +VS sem nitrato diluído a 50% + 0,38 mM de nitrato
0,75 mM NO_3	Água do mar +VS sem nitrato diluído a 50% + 0,75 mM de nitrato

Três repetições (frascos) foram preparadas por tratamento. A Fig. 1 ilustra o sistema de cultivo das algas mantidas em diferentes concentrações de nitrato. A aeração foi fornecida por um compressor a cada 30 minutos ao longo do experimento. Os frascos foram mantidos em um recipiente de fibra de vidro contendo água para manter a temperatura do cultivo ao longo dos dias. Uma vez preparado o sistema de cultivo, as algas foram expostas à radiação solar (PAR+UV) durante 18 dias, entre os dias 8 e 26 de setembro de 2009. Esse período foi escolhido por ser um mês com ampla variação de PAR e principalmente de UV-B, decorrentes da presença de massas de ar pobres em ozônio (Fig. 2).

Fig. 1. Representação esquemática do experimento, no qual ápices de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foram cultivados por 18 dias em concentrações crescentes de NO_3 e expostos à radiação PAR+UVA+UVB (PAB) solar.

2.4. Radiação solar

Durante o experimento as algas foram expostas a radiação solar. Esses dados foram proporcionados pelo Laboratorio de Ozono da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile). Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectrorradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. Detalhes sobre a transformação desses dados, assim como os detalhes sobre os cálculos da irradiância solar e doses por hora são apresentados no item Materiais e Métodos do Capítulo 1.

Fig. 2. Imagens da depleção da camada de ozônio sobre a Antártica e sul do Chile e Argentina entre os dias 8 e 27 de setembro de 2009. Imagens obtidas a partir do site <http://jwocky.gsfc.nasa.gov> (TOMS - Goodart Space Flight Center).

2.5. Amostragem e parâmetros avaliados

A tabela 3 apresenta os parâmetros analisados nas diferentes etapas do experimento. A cada etapa de cultivo, as algas de cada frasco foram avaliadas quanto à massa fresca. Uma vez pesadas, foram retirados dois ápices de cada frasco, os quais foram utilizados para a quantificação dos parâmetros bioquímicos definidos na tabela 3. O restante dos ápices foi pesado novamente, e esse valor foi utilizado como a massa inicial do próximo período de crescimento.

Todas as análises foram feitas considerando-se três amostras por condição experimental. Para os MAAs, cada repetição foi subdividida em 3 (sub-repetições), totalizando um número amostral de 9.

Tabela 3. Resumo dos parâmetros avaliados e os tempos nos quais as amostragens foram realizadas. Cl *a*, clorofila *a*; FE, ficoeritrina; FC, ficocianina; MAAs, aminoácidos tipo micosporinas; PS, proteínas solúveis.

Parâmetros	Tetrasporófitos			
	início	6	12	18
Avaliação da massa fresca	x	x	x	x
FE	x	x	x	x
FC	x	x	x	x
Cl <i>a</i>	x	x	x	x
Carotenóides totais	x	x	x	x
PS	x	x	x	x
Carragenana	x			x
C, N, H	x	x		x
MAAs	x	x	x	x

2.5.1. Taxas de crescimento

Foram calculadas a partir da massa fresca, empregando-se a seguinte fórmula (LIGNEL & PEDERSEN, 1989):

$$TC = [(MF_f/MF_i)^{1/t} - 1] * 100$$

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 % .dia⁻¹.

2.5.2. Clorofila a

Um total de 50 mg de massa fresca de algas provenientes de cada condição de cultivo foi congelado em nitrogênio líquido e posteriormente mantido em freezer a -80 °C. Para a extração da Cl *a*, as amostras foram colocadas em tubos tipo Eppendorf, aos quais foram adicionados 1,5 ml de DMF (N,N- dimetilformamida). Os tubos foram mantidos no escuro por 24 horas. Após esse período, o extrato foi centrifugado a 12.000 g e a 4°C por 10 min. A seguir, o sobrenadante foi avaliado em espectrofotômetro Spectronic Genesys 10S (Thermo Scientific) entre 400 e 750 nm. O conteúdo de Cl *a* foi estimado a partir da seguinte fórmula (WELLBURN, 1994):

$$\text{Cl } a_{\text{DMF}} = 11,65 * (A_{664})$$

O total de clorofila foi ajustado para mg de Cl *a* por g de massa seca da amostra.

Os carotenóides totais foram calculados a partir do extrato de clorofila, usando a seguinte fórmula (WELLBURN, 1994):

$$\text{Carotenóides totais}_{\text{DMF}} = (1000 * A_{480} - 0,89 * \text{Cl } a) / 245$$

2.5.3. Ficobiliproteínas

A extração pigmentar foi realizada a partir de amostras de aproximadamente 50mg de massa fresca de cada repetição. Essas amostras foram secas com papel absorvente e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas em freezer a -80 °C. Essas foram maceradas até a formação de um pó fino em almofariz previamente congelado em nitrogênio líquido. O pó foi diluído em 1,5 mL de tampão fosfato 50mM, pH 5,5. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as ficobiliproteínas foi retirado e mantido em tubos tipo Eppendorff vedados, até a leitura em espectrofotômetro. Os espectros de absorção foram obtidos após a leitura em espectrofotômetro Spectronic Genesys 10S (Thermo Scientific), utilizando-se cubetas de quartzo de percurso óptico de 10 mm. A calibragem do aparelho foi realizada com soluções de tampão fosfato. Os espectros de absorção foram obtidos registrando-se as absorbâncias no intervalo de 400 a 750nm (UV-visível) com varredura durante 1 segundo. Os dados de absorbância obtidos foram normalizados em relação ao valor de absorbância de 750 nm. O conteúdo de ficoeritrina (FE) e ficocianina (FC) foi estimado a partir das fórmulas descritas por Beer & Eshel (1985):

$$\text{FC} = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) * 0,51] * 0,15$$

$$\text{FE} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) * 0,2] * 0,12$$

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, multiplicando-se pelo volume do solvente utilizado e, posteriormente, dividindo pela biomassa seca da amostra. As relações de FE/Cl *a* e FC/Cl *a*, além de FE/FC foram obtidas.

2.5.4. Proteínas solúveis totais (PS)

As proteínas solúveis totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Extratos de ficobiliproteínas (item 2.5.3.) com volume de 0,2 mL foram acrescido de 2 mL do reagente Bradford, em temperatura ambiente. As amostras permaneceram em reação por 10 min, e em seguida foram avaliadas espectrofotometricamente (Spectronic Genesys 10S-Thermo Scientific) na absorvância de 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 com concentrações conhecidas: 200, 160, 120, 80, 40, 20 e 0 (branco). A seguir, 0,2 mL de cada uma das concentrações de albumina foram acrescidos a 2 mL do reagente de Bradford. Esse extrato foi avaliado em espectrofotômetro na absorvância A_{595} . Uma reta linear, com a respectiva equação foi gerada, de modo que os valores de A_{595} obtidos a partir dos tratamentos pudessem ser correlacionados a uma determinada concentração protéica.

2.5.5. Aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)

Para esta análise, aproximadamente 0,01 grama de massa seca foi inserido em tubo tipo Eppendorf, e os MAAs foram extraídos em 1 mL de metanol a 20%. Os tubos com as algas permaneceram em incubação para extração por 2 h a 45 °C. Após esse período, 600 μL de extrato foram transferidos a novos tubos, e o conteúdo líquido dos tubos foi removido à vácuo em evaporador rotatório. A esse resíduo sólido de extrato, foram adicionados 600 μL de metanol para cromatografia (100%), misturando-os por agitação em vórtex. Posteriormente, a mistura foi filtrada em membranas de 0,2 μm .

Um total de 20 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 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ através de uma fase fixa, uma coluna C8 (Spheroclone Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) de 5 μm de diâmetro,

com tamanho de 250x4 mm. Uma pré-coluna foi utilizada para filtrar as amostras antes que as mesmas passassem pela coluna. O tempo de eluição de cada uma das amostras foi aproximadamente de 28 min.

Os MAAs foram detectados por meio de um diodo de UV-visível (Photodiode Array Detector 996). A cada segundo, foram tomados dados para cada comprimento de onda entre 290 e 400 nm. Ao final, um cromatograma foi obtido (Fig. 3), e os picos registrados foram identificados, de acordo com o espectro e os tempos de retenção. Os diferentes tipos de MAAs foram identificados comparando-se os picos de absorbância e tempos de retenção com os seguintes padrões: *Mastocarpus stellatus* (para shinorina), *Porphyra yezoensis* (porphyra-334) e *Bostrychia scorpioides* (palitina). A partir do valor de área dos picos presentes em cada cromatograma, relacionados a cada um dos MAAs ou o seu total, e também dos coeficientes de extinção molar (Tabela 4), foi obtido o total de MAAs em mg.g⁻¹ massa seca:

$$\text{MAAs} = (A * F) / (\epsilon' * V * MS * 60)$$

onde, **A** é a área dos picos (μV.s⁻¹), **F** é o fluxo da fase móvel (mL.min⁻¹), **ε'** é o coeficiente de extinção específico (g⁻¹.L), **V** é o volume injetado (em mL) e **MS** é a massa seca original das amostras, em gramas.

Tabela 4. Coeficientes de extinção molar (ε) utilizados para quantificar os diferentes MAAs encontradas neste estudo. O coeficiente de extinção específico (ε') é calculado como ε'=ε/peso molecular.

Nome	λ _{máx} (nm)	ε (M ⁻¹ .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
Palitina	320	36200	244,2	TAKANO <i>et al.</i> 1978
Asterina	330	43500	288,3	GLEASON, 1993
Micosporina-glicina	310	28100	245,23	ITO & HIRATA, 1977

Fig. 3. Exemplo de cromatograma de MAAs obtido a partir de amostras de *Mazzaella laminarioides*. A: Picos de absorção e B: tempos de retenção de cada um dos MAAs identificados.

2.5.6. Conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio

O conteúdo desses elementos foi avaliado usando um analisador LECO CHNS – 932. Esse aparelho identifica cada um desses elementos por meio de um detector de infravermelho, durante um aquecimento a 1.050 °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. Um a dois mg de massa seca foram utilizadas para determinar a quantidade de cada elemento em mg por g de massa seca de alga.

2.5.7. Rendimento dos polissacarídeos (carragenanas)

Ápices de *Mazzaella laminarioides* foram secos em estufa a 60°C. Posteriormente foram armazenados em local fresco e seco. Um grama de massa seca foi triturado e submetido a uma extração em 100 mL de água destilada por 2 horas a 90°C com agitação constante e vigorosa. O produto da extração foi centrifugado (Universal 32-Hettich) a 8.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e submetido à diálise usando membranas semipermeáveis (Spectra/Por Membrane MWCO:3.500, Canadá) em água destilada (12 h) e água deionizada (12 h). A solução foi concentrada à vácuo em evaporador rotatório (Büchi R110), e posteriormente os polissacarídeos foram precipitados em etanol (5:1). O precipitado foi dissolvido em água destilada, congelado e

liofilizado (Christ Alfer 1-2). Finalmente o rendimento de polissacarídeos foi calculado empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = (\text{MS poli}/\text{MS}) \times 100$$

onde **MS poli** é a massa seca de polissacarídeos e **MS** a massa seca da alga.

A identificação e caracterização dos polissacarídeos foram realizadas por meio de espectroscopia de infravermelho (Bruker IFS66v) transformado de Fourier (IR-TF) com segunda derivada entre 4.000-400 cm⁻¹.

2.6. Análises estatísticas

A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram analisadas (teste de validação de Cochran). Para determinar o efeito da adição de NO₃ nas algas, os dados de cada variável dependente (parâmetros bioquímicos e biológicos) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) incluindo todos os tratamentos em um tempo determinado e os valores obtidos ao início do experimento. As análises fatoriais foram realizadas a fim de verificar efeitos do tempo e a interação do tempo com a concentração de NO₃. Quando foram encontradas diferenças significativas, foi aplicado um teste *a posteriori* de Newman-Keuls (ZAR, 1999). Todas as conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% (P<0,05). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.). Todas as variáveis dependentes avaliadas tiveram um N=3, com exceção dos MAAs (N=9).

3. RESULTADOS

3.1. Radiação solar (PAR e UV)

Os valores de irradiâncias (Fig. 4) e doses diárias (Fig. 5) de PAR e UV mostraram grande variação dentro e entre os dias do experimento. Observaram-se menores valores de PAR e UV entre os dias 16 e 20 de setembro de 2009, em decorrência da presença de nuvens e chuva. Os maiores valores foram observados entre os dias 21 e 26 de setembro. Nesse último período, o maior valor de radiação UV-B foi observado no dia 25 de setembro ($1,05 \text{ W.m}^{-2}$ às 17:10), embora não tenha se observado variações na PAR e UV-A. Esse fenômeno ficou também evidente na razão UV-B/UV-A (Fig. 6). Os valores de doses diárias de UV-B, UV-A e PAR no ambiente, dentro dos frascos em que as algas foram cultivadas e dose efetiva calculada a partir do fator de JONES & KOK (1966) estão apresentados na Tabela 5.

Fig. 4. Valores de irradiância PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), UV-A e UV-B (W.m^{-2}) registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 e 26 de setembro de 2009).

Fig. 5. Doses diárias de UV-B, UV-A e PAR em $\text{KJ} \cdot \text{m}^{-2}$ registradas na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 e 26 de setembro de 2009). São apresentados também os valores de dose UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelo acrílico (material com que foram construídos os frascos), além dos valores de dose biologicamente efetivas.

Fig. 6. Razão UV-B / UV-A diária (em preto) e quantidade de ozônio (cinza) registradas em Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 a 26 de setembro de 2009). Os dados de UV-B e UV-A foram fornecidos pelo Laboratorio de Ozono da Universidad de Magallanes, enquanto que os dados de Ozônio foram obtidos no site <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>.

Tabela 5. Valores de doses de UV-B, UV-A e PAR (KJ.m^{-2}) aos 6, 12 e 18 dias de cultivo registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 a 26 de setembro de 2009). São apresentados também os valores de doses de UV-B, UV-A e PAR transmitidas pelos frascos, além das doses biologicamente efetivas.

	Doses no ambiente			Doses transmitidas pelos frascos			Doses biologicamente efetivas recebidas pelas algas		
	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	UV-A+UV-B
6 dias	43	1756	26526	28	1202	20075	16	370	386
12 dias	80	3048	43858	51	2087	33193	30	643	673
18 dias	149	5088	73084	96	3483	55311	58	1073	1131

3.2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos

Nem todos os parâmetros avaliados em *Mazzaella laminarioides* cultivada sob diferentes concentrações de NO_3 foram influenciados significativamente pela quantidade desse composto ao longo do experimento (Tabela 6).

3.2.1. Taxas de crescimento

As taxas de crescimento de ápices de *Mazzaella laminarioides* verificadas nos tratamentos com diferentes concentrações de NO_3 não apresentaram diferenças significativas (Fig. 7). Observou-se também que o tempo de cultivo teve influência na taxa de crescimento (ANOVA: $F=50,06$; $P=0,000$), com maiores taxas obtidas aos 18 dias (Fig. 7), enquanto que a interação entre esses fatores não produziu efeitos significativos (ANOVA: $F=2,052$; $P=0,056$).

Tabela 6. Análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados da concentração de NO_3^- . Esses dados foram obtidos para tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* após exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) durante 6, 12 e 18 dias. Efeitos significativos são apresentados com os dados de F e p em negrito. gl, graus de liberdade.

Fonte de variação		Concentração NO_3^-					
Variável	gl= 5	T= 6 dias		T=12 dias		T= 18 dias	
		F	p	F	P	F	P
Taxa crescimento		0,88	0,525	2,90	0,058	2,16	0,067
FE		9,60	0,000	12,98	0,000	20,29	0,000
FC		2,28	0,085	3,34	0,056	14,31	0,000
Cl <i>a</i>		3,29	0,023	3,39	0,020	4,00	0,010
Carot Totais		2,93	0,036	2,39	0,071	2,48	0,059
PS		2,60	0,052	1,89	0,096	2,21	0,067
FE:FC		2,54	0,058	2,28	0,082	2,39	0,081
FE:Cl <i>a</i>		2,95	0,035	2,70	0,048	3,09	0,029
FC:Cl <i>a</i>		4,44	0,006	1,36	0,288	2,56	0,056
FE+FC:PS		15,52	0,000	15,13	0,000	20,81	0,000
Carragenana						3,62	0,032
C		7,93	0,000			4,94	0,004
H		1,02	0,447			1,52	0,225
N		11,36	0,000			14,86	0,000
C:N		12,26	0,000			26,36	0,000
MAAs Total		7,66	0,000	2,92	0,076	1,59	0,069
mic-glic		1,23	0,086	12,98	0,000	32,07	0,000
shinorina		7,11	0,000	2,73	0,072	15,58	0,000
palitina		14,81	0,000	2,23	0,084	1,73	0,092

Tabela 7. Análises fatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos do tempo e interação do tempo e da concentração de NO₃. Esses dados foram obtidos para tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* após exposição à PAR+UVA+UVB (PAB) durante 6, 12 e 18 dias. Efeitos significativos são apresentados com os dados de F e p em negrito. gl, graus de liberdade.

Fonte de variação	Tempo gl:2		Tempo x NO ₃ gl: 9	
	F	p	F	p
FE	5,35	0,009	3,98	0,001
FC	6,89	0,003	2,06	0,055
Cl a	2,31	0,114	1,81	0,094
Carot Totais	2,20	0,126	1,93	0,073
PS	0,47	0,630	1,17	0,339
FE:FC	2,76	0,077	1,26	0,289
FE:Cl a	0,77	0,470	1,43	0,205
FC:Cl a	5,31	0,010	2,65	0,016
FE+FC:PS	5,49	0,008	3,78	0,002
Carragenana	-	-	-	-
C	3,0	0,097	1,0	0,444
H	4,84	0,035	1,31	0,277
N	7,44	0,010	3,29	0,009
C:N	15,59	0,000	6,77	0,000
MAAs Total	7,3	0,001	5,4	0,000
mic-glic	122,5	0,000	12,1	0,000
shinorina	25,5	0,000	5,8	0,000
palitina	32,7	0,000	3,1	0,001

Fig. 7. Taxas de crescimento de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

3.2.2 Conteúdo pigmentar e proteínas solúveis.

O conteúdo pigmentar de *Mazzaella laminarioides* variou significativamente em relação aos diferentes tratamentos de concentração de NO_3 (Tabela 6).

O conteúdo de Cl *a* variou entre os tratamentos e ao longo do tempo. No entanto, esses valores foram similares aos obtidos no início do experimento ($0,32 \pm 0,04$; mg. gMS^{-1}), com exceção do tratamento $0,09 \text{ mM NO}_3$ aos 6 dias de cultivo ($0,77 \pm 0,23$ mg. gMS^{-1}) (Fig. 8). Comparando-se os diferentes tratamentos, observou-se que as algas cultivadas em $0,09 \text{ mM}$ de NO_3 apresentaram as maiores concentrações de Cl *a* aos 6, 12 e 18 dias de cultivo, enquanto que aquelas cultivadas sem adição NO_3 apresentaram as menores concentrações desse pigmento ao longo do tempo (Fig. 8). Observou-se também que, o tempo de cultivo e a interação entre tempo e a concentração de NO_3 não produziram efeitos significativos na concentração de Cl *a* ($\text{ANOVA}_{(\text{tempo})}$: $F=2,31$; $P=0,114$; $\text{ANOVA}_{(\text{tempo} \times \text{NO}_3)}$: $F=1,81$; $P=0,094$; Tabela 7).

Os carotenóides totais apresentaram as mesmas tendências que a Cl *a*. Embora tenham sido observadas variações na concentração entre os tratamentos em cada um dos tempos avaliados, esses valores foram similares aos valores obtidos ao início do experimento ($40,1 \pm 3 \text{ mg. gMS}^{-1}$) (Fig. 8).

Fig. 8. Conteúdo de clorofila (Cl *a*) e carotenóides totais (carot totais) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO_3 e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desses compostos verificados em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Em relação às ficobiliproteínas, observou-se que os valores obtidos durante o experimento foram menores aos verificados em algas no início de experimento ($FE = 3,25 \pm 0,67$; $FC = 0,66 \pm 0,18$ mg. gMS⁻¹) (Fig. 9). Os conteúdos de FE e FC apresentaram variações na sua concentração entre os tratamentos e nos diferentes tempos de avaliação (Tabelas 6 e 7), com maiores valores em algas cultivadas sob tratamentos com adição de NO₃. Em ausência de NO₃, foi verificado branqueamento das frondes. Essa diferença entre os tratamentos ficou mais evidente ao longo do tempo (Fig. 9). Já a concentração de PS se manteve constante nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Fig. 9. Conteúdo de ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e proteínas solúveis (PS) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desses compostos verificados em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

O conteúdo de FE e FC variaram de forma semelhante em todos os tratamentos. As proporções entre FE e FC variaram também de forma semelhante entre os tratamentos e ao longo do tempo (Fig. 10, Tabela 6). Os dados de proporção pigmentar refletem a maior variação do conteúdo de FE do que dos demais pigmentos (Tabela 6; Fig. 10). As variações entre FE e Cl *a* nos diferentes tratamentos e ao longo do tempo não foram semelhantes, uma vez que foram verificadas diferenças significativas nas proporções FE:Cl *a*. A maior variação de FE refletiu-se também nos valores de FE+FC:PS. Já os valores de FC:Cl *a* mostram diferenças significativas apenas aos 6 dias de cultivo, enquanto que aos 12 e 18 dias as proporções mantiveram-se constantes (Tabela 6; Fig. 10). Além disso, a partir dos dados de proporção entre pigmentos, observou-se que *Mazzaella laminarioides* possui como pigmento predominante a FE seguida de FC e Cl *a*.

Fig. 10. Proporção entre FE:Cl a FE:FC, FC:Cl a e FE+FC:PS de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação às proporções verificadas em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

3.2.3. Aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)

Os valores de concentração de MAAs obtidos a partir de ápices de *M. laminarioides* supridos com diferentes concentrações de NO₃ foram em geral menores

aos verificados em algas coletadas no início do experimento ($4,26 \pm 1,29 \text{ mg. gMS}^{-1}$) (Fig. 11).

A concentração total de MAAs variou com os fatores concentração de NO_3 e tempo. Além disso, houve uma interação entre esses fatores (Tabelas 6 e 7). As maiores variações na concentração de MAAs foram observadas aos seis dias de cultivo. Nesse período, as maiores concentrações de MAAs foram observadas em algas supridas com 0,18 e 0,38 mM de NO_3 , enquanto que a menor concentração foi obtida de algas cultivadas sem adição de NO_3 . Após 12 e 18 dias, a concentração de MAAs não variou entre as algas supridas com diferentes concentrações de NO_3 (Fig. 11).

Fig. 11. Conteúdo total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO_3 e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desses compostos verificados em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

Quatro diferentes MAAs foram identificados em *Mazzaella laminarioides*. De acordo com a sua abundância, na ordem decrescente, foram identificados: shinorina, palitina, micosporina-glicina e asterina. Este último apresentou concentrações inferiores a 0,02 mg por grama de massa seca de alga e foi encontrado em poucas amostras, e por esta razão não foi considerado nas análises.

Considerando-se a análise de cada MAA separadamente, nota-se que as concentrações de cada um deles variaram de maneira distinta com relação ao tratamento e aos tempos avaliados (Fig. 12).

A concentração de micosporina-glicina foi similar em todos os tratamentos aos seis dias de cultivo e semelhante à concentração verificada em amostras coletadas no início do experimento ($0,054 \pm 0,042 \text{ mg. gMS}^{-1}$) (Fig. 12). Um aumento do conteúdo desse MAA foi verificado quase em todos os tratamentos após os 12 dias de cultivo, atingindo $0,255 \pm 0,05 \text{ mg.gMS}^{-1}$ no tratamento 0,18 mM de NO_3 aos 18 dias de cultivo, o que equivale a um aumento de quase 5 vezes.

A concentração de palitina diminuiu em todos os tratamentos após seis dias de cultivo quando comparada ao valor inicial, com exceção do tratamento com 0,18 e 0,38 mM de NO_3 , (Fig. 12). Neste período, as maiores concentrações foram obtidas nos tratamentos 0,18 e 0,38 mM de NO_3 , enquanto que a menor foi obtida em algas sem adição de NO_3 . Aos 18 dias de cultivo, verificou-se um aumento da concentração de palitina em todos os tratamentos e uma diminuição das diferenças entre os tratamentos.

A shinorina mostrou uma diminuição da sua concentração aos 18 dias de cultivo em comparação aos valores verificados ao início do experimento, assim como aos valores obtidos aos seis dias de cultivo em todos os tratamentos.

Fig. 12. Conteúdo dos diferentes aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6, 12 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desses compostos verificados em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

3.2.4. Conteúdo de C, H e N

O conteúdo tecidual total de C e N de *Mazzaella laminarioides* variou significativamente em relação aos tratamentos de concentração de NO₃, enquanto que o conteúdo de H não variou (Fig. 13).

Em geral, as concentrações de C verificadas em algas cultivadas sob diferentes tratamentos com NO₃ foram semelhantes e até maiores aos valores registrados ao início

do experimento ($236,3 \pm 2,8$ mg C. gMS⁻¹). Aos seis dias de cultivo, o conteúdo de C variou de $242 \pm 2,1$ mg C. gMS⁻¹ (0,09 mM) a $252 \pm 0,5$ mg C. gMS⁻¹ (0,18 mM), sendo esses valores estatisticamente diferentes (Fig. 13). Já aos 18 dias de cultivo, o menor valor de conteúdo de C foi observado nas algas cultivadas sem adição de NO₃ ($239 \pm 1,32$ mg C. gMS⁻¹), enquanto que o maior valor foi obtido no tratamento 0,18 mM ($250 \pm 5,5$ mg C. gMS⁻¹).

Em relação ao H, embora seu conteúdo não tenha variado entre os tratamentos, observou-se que a variável tempo teve efeito significativo (Tabela 7). O conteúdo de H nos diferentes tratamentos variou de $43,9 \pm 1,3$ a $48,1 \pm 1,8$ mg H. gMS⁻¹, sendo esses valores, em geral, semelhantes ou até maiores aos verificados no início do experimento ($43 \pm 2,1$ mg C. gMS⁻¹).

O conteúdo de N total em ápices de *M. laminarioides* no início do experimento ($23,87 \pm 3,04$ mg N. gMS⁻¹) foi semelhante e até menor aos valores registrados nos diferentes tratamentos com adição de NO₃. O conteúdo de N apresentou variações na sua concentração entre os tratamentos e nos diferentes tempos de avaliação (Tabela 6 e 7), com maiores valores em algas cultivadas na presença de NO₃, e menores valores no tratamento sem adição de NO₃ (Fig. 13). Essas diferenças entre os tratamentos tornaram-se mais evidentes ao longo do tempo.

A proporção entre C e N para os diferentes tratamentos seguiu o mesmo padrão verificado para concentrações de NO₃. Foi observado efeito significativo do tratamento e do tempo na proporção de C:N, e houve interação entre esses fatores (Tabela 6 e 7). Os maiores valores de C:N foram observados em ápices cultivados na ausência de NO₃ ($14,30 \pm 0,14$) aos 18 dias de cultivo (Fig. 14).

Fig. 13. Conteúdo tecidual total de carbono, hidrogênio e nitrogênio em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desses elementos verificados em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 14. Razão C:N de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 6 e 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos num mesmo período de tempo e em relação à razão verificada em amostras realizadas no início do experimento (x). Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças encontradas entre os tratamentos. N=3.

3.2.5. Rendimento dos polissacarídeos

O rendimento dos polissacarídeos de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em tratamentos com diferentes concentrações de NO₃ variou de $26,37 \pm 2,64\%$ (0,09 mM) a $34,27 \pm 5,27\%$ (0 mM) em relação à massa seca da alga (Fig. 15). Em geral, esses valores foram semelhantes ou até maiores ao rendimento verificado no início do experimento ($27,16 \pm 1,43$). Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos obtidos para cada uma das repetições dos cinco tratamentos de NO₃ (18 espectros) foram semelhantes entre si. Portanto apenas um deles é apresentado aqui (Fig. 16). A partir deste espectro pode-se verificar que o principal polissacarídeo é a carragenana do tipo lambda (λ), pois apresenta bandas características (Tabela 8). O polissacarídeo apresentou sinais correspondentes à presença de sulfato (580 cm^{-1}) (Fig. 16). Sinais em 839 cm^{-1} , correspondem ao sulfato equatorial unido em C-2 (830 cm^{-1} segundo a Tabela 8) e em 820 cm^{-1} , correspondem ao sulfato equatorial em C-6. Esse último sinal é característico de carragenana do tipo λ . O sinal a 930 cm^{-1} , característico de carragenana tipo kappa (κ), não foi observado.

Fig. 15. Rendimento de polissacarídeos (%) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* cultivados em diferentes concentrações de NO₃ e sob PAR+UVA+UVB (PAB) após 18 dias. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos e em relação ao rendimento de carragenana verificado em amostras realizado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 8. Frequências vibracionais de carragenanas. Fonte: MATSUHIRO E RIVAS (1993); MATSUHIRO (1996).

Vibrações		Sinal segundo o tipo de Carragenana				
Numero da onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	κ	μ	ι	ν	λ
1250	S=O de ésteres de sulfato.	+	+	+	+	+
930	C-O de 3,6 anidro -D- galactose.	+	-	+	-	-
845	C-O-S de sulfato axial em C-4 de galactose.	+	+	+	+	-
830	C-O-S de sulfato ecuatorial em C-2 galactose.	-	-	-	+	+
820	C-O-S de sulfato ecuatorial em C-6 de galactose.	-	+	-	+	+
805	C-O-S de sulfato axial em C-2 de 3,6 anidro -D- galactose.	-	-	+	-	-
580	Presença de grupo sulfato no polissacarídeo	+	+	+	+	+

Fig. 16. Espectro de infravermelho transformado de Fourier (FT-IR) normal e com segunda derivada para identificação de carragananas de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* submetida a 18 dias de cultivo sob radiação solar.

4. DISCUSSÃO

4.1. Radiação solar (PAR e UV)

Os registros da espessura da camada de ozônio sobre a cidade de Punta Arenas entre os anos 1978-1987, período considerado como não influenciado pelo AOH (buraco na camada de ozônio), mostram para o mês de setembro um valor de 324 ± 34 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). Massas de ar pobres em ozônio têm alcançado a cidade de Punta Arenas a cada primavera a partir da década de 90, quando a área do “buraco” na camada de ozônio alcançou níveis incomuns, atingindo o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (ORCE & HELBLING, 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006).

CASICCIA *et al.* (2003) reportaram que o valor médio da espessura da camada de ozônio entre os anos 1992 e 2000 para o mês de setembro sobre a cidade de Punta Arenas variou entre 345 e 265 UD. Considerando-se esses últimos valores, a maioria dos dias nos quais nosso trabalho foi realizado apresentou condições esperadas, com exceção dos dias 25 e 26 de setembro (205 e 231 UD, respectivamente). Por outro lado, no período entre 8 e 9 de setembro, os valores de espessura da camada de ozônio foram maiores aos valores de referência (1978-1987). Isto mostra a grande variação do ozônio e conseqüente variação de UV-B em curtos períodos de tempo, o que poderia ser prejudicial para os organismos que ficam expostos durante as horas de maré baixa.

A ampla variação na irradiância e doses diárias de UV e PAR durante o período em que realizamos o experimento com *Mazzaella laminarioides* seria também o resultado da presença de nuvens e chuva presentes em alguns desses dias, principalmente entre 16 e 20 de setembro de 2009 (observação pessoal). Nos demais períodos, entre 8 e 15 e entre 21 e 26 de setembro, os dias estiveram com poucas nuvens. Ápices de *M. laminarioides* foram expostos a elevadas irradiâncias e doses de UV-B entre os dias 21 e 26 de setembro de 2009, uma vez que esses dias estiveram sem nuvens.

Comparando as doses diárias entre o dia 19 (nublado) e 25 (sem nuvens) de setembro observa-se um aumento de 510%. Essa diferença seria produto da presença de nuvens, mas também da espessura da camada de ozônio. No dia 19 de setembro, registraram-se 334 UD, enquanto que no dia 25 de setembro, registraram-se 205 UD. Nesse último dia, o local do experimento teria ficado sob a influência do AOH, que corresponde a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou menor a 220 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). Assim, uma diminuição de 38% na espessura na camada de

ozônio promoveu um aumento de 510% na dose diária de UV-B. Da mesma forma, a comparação das doses diárias de dois dias com condições climáticas similares (21 e 25 de setembro: dias sem nuvens), mas com diferentes espessuras na camada de ozônio mostra que uma diminuição de 42% na espessura (de 354 para 205 UD) promoveu um aumento de mais de 95% nas doses de UV-B de 21 de setembro para o dia 25. Assim, os ápices de *Mazzaella laminarioides* estiveram expostos não apenas às variações de radiação solar durante o dia e entre os dias, mas também às variações decorrentes das mudanças na concentração da camada de ozônio, a qual promove diferenças entre um dia e outro.

4.2. Efeitos das diferentes concentrações de NO₃

Menores concentrações de N foram verificadas em ápices de *Mazzaella laminarioides* cultivados sem adição de NO₃ aos 6 e 18 dias. Embora essas variações tenham sido observadas, as taxas de crescimento foram semelhantes quando comparados os tratamentos com e sem adição de NO₃. Esses dados sugerem que maiores teores de N não resultaram necessariamente em ganho de massa.

É importante ressaltar que possivelmente, nos frascos de acrílico utilizados neste experimento, os ápices de *Mazzaella laminarioides* receberam maiores irradiâncias PAR e UV do que os exemplares de populações naturais, pois, na natureza, os indivíduos ficam expostos ao ar e à radiação direta durante a maré baixa, enquanto que nos períodos de maré alta podem ficar submersos até 50 cm. Durante os períodos submersos a fotoinibição pode diminuir, pois a radiação solar (PAR+UV) é parcialmente absorvida e dispersa pela água. Além disso, esses indivíduos podem estar protegidos pelos seus congêneres através do efeito sombra.

As variações no conteúdo de N promoveram diferenças na razão C:N. As razões observadas aos 6 dias em ápices cultivados com adição de NO₃ (C:N= 8,8 e 9,9) foram semelhantes às verificadas no início do experimento (C:N=10) e superiores à razão clássica de Redfield: 6,6 (REDFIELD *et al.*, 1963), o que poderia sugerir deficiência de N no meio de cultura. No entanto, essa razão varia de acordo com a espécie e com as condições nutricionais a que os organismos estão submetidos (GEIDER & LA ROCHE, 2002; HO *et al.*, 2003). Em *Gracilaria tenuistipitata*, valores de C:N maiores que 15 indicariam carência de N (GARCÍA-SANCHEZ *et al.*, 1993). Nessa mesma espécie, foram reportados valores de C:N superiores a 20 em cultivos sem adição de nitrogênio, enquanto que a adição desse composto (0,5 mM) promoveu razões C:N entre 7 e 10 (BONOMI, 2010). No presente trabalho, a deficiência de N teria sido verificada apenas em

ápices de *M. laminarioides* aos 18 dias de cultivo sem a adição de NO_3 , uma vez que a razão C:N atingiu valores de 14. Já a adição de NO_3 em concentrações iguais ou superiores a 0,09 mM promoveu razões C:N semelhantes entre si (valores entre 9,4 e 9,6).

O N pode ser captado e incorporado em aminoácidos, ácidos nucleicos, pigmentos (ficobiliproteínas e clorofila) e outras macromoléculas nitrogenadas (LOBBAN & HARRISON, 1994), constituindo-se em reservas dentro da célula. Em condições de limitação de nitrogênio as algas consumiriam essas fontes. Ápices de *Mazzaella laminarioides* cultivados sem a adição de NO_3 apresentaram sintomas da escassez de N, como a despigmentação do talo, devido à degradação de FE e FC verificada aos 12 e aos 18 dias de cultivo. Essa degradação pigmentar foi também verificada em *Gracilaria tenuistipitata*, quando cultivadas em concentrações de NO_3 inferiores a 0,1 mM (BONOMI, 2010). Como consequência do consumo desses compostos, uma diminuição nas taxas de fotossíntese e finalmente uma diminuição nas taxas de crescimento seriam esperadas (LAPOINTE & DUKE, 1984). No entanto, o crescimento em *M. laminarioides* não foi alterado, pelo menos durante os 18 dias de cultivo.

O nitrogênio obtido da degradação de FE e FC em ápices de *Mazzaella laminarioides* cultivados sem NO_3 teria sido deslocado para manter o estoque de PS totais, como evidenciado pelos baixos valores de FE+FC:PS. Esses valores indicam que as ficobiliproteínas representam aproximadamente 4 a 5% da quantidade total de proteínas solúveis em algas cultivadas com adição de NO_3 , enquanto que sem adição desse composto, a porcentagem de ficobiliproteínas diminuiu até valores inferiores a 2%.

O nitrogênio procedente da FE e FC em *Mazzaella laminarioides* cultivada sem adição de NO_3 poderia também ter sido deslocado para a síntese de MAAs, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no conteúdo desses compostos entre os tratamentos com e sem adição de NO_3 aos 18 dias. Nesse período, o acúmulo de MAAs teria sido estimulado pela alta irradiância a que foram expostos os ápices de *M. laminarioides*. Entretanto, as maiores concentrações de MAAs observadas nos tratamentos com adição de NO_3 aos seis dias de cultivo somente foram possíveis pela disponibilidade de nitrogênio no meio.

Estudos realizados em condições controladas e com radiação artificial demonstraram que a presença de amônio no meio de cultivo incrementou as concentrações de MAAs em espécies de *Porphyra* (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004, KORBEE *et al.*, 2005a), assim como em *Grateloupia lanceola* (HUOVINEN *et al.*, 2006).

Resultados semelhantes foram reportados para *Gracilaria tenuistipitata* cultivada em concentrações crescentes de NO_3 e sob PAR+UV no laboratório, sendo que o conteúdo de MAAs foi saturado em 0,5 mM de NO_3 (BONOMI *et al.*, 2011). Em *Mazzaella laminarioides* o conteúdo de MAAs parece ter alcançado seu valor máximo quando os ápices foram cultivados em 0,38 mM de NO_3 aos seis dias. Maiores concentrações de NO_3 promoveram diminuição nas concentrações de MAAs. Um efeito inibitório no acúmulo de MAAs já havia sido demonstrado para *Asparagopsis armata* e *G. conferta* quando cultivadas em tanques com incremento de amônio proveniente do cultivo de peixes (FIGUEROA *et al.*, 2008, 2010).

Os resultados obtidos para *Mazzaella laminarioides* são relevantes, pois na região de Magallanes, onde a espécie ocorre, há demanda de produtores para concessões marinhas referente à piscicultura. Caso isso venha a ocorrer, a concentração de nitrogênio nesses ambientes poderia aumentar, como já foi verificado em outros locais do Chile, onde foram instalados cultivos de peixes (Chiloé). Além de causar prejuízos à diversidade marinha, o excesso de N na água poderia causar a inibição na síntese de compostos fotoprotetores de muitas algas. Nesse sentido, pesquisas sobre produção de compostos de grande valor comercial, como os MAAs, em espécies nativas, bem como sobre sua capacidade como biofiltro são importantes.

Finalmente, o rendimento de polissacarídeos em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foi maior no tratamento sem adição de NO_3 , como esperado, uma vez que a limitação de N favorece a síntese de carboidratos (LAPOITE & DUKE, 1984). Entretanto, o rendimento de polissacarídeos não mostrou uma tendência clara em relação aos tratamentos com adição de NO_3 . Esses dados sugerem que para se obter maior rendimento de carragenana em *M. laminarioides* seria mais adequado cultivá-la em água do mar sem a adição de NO_3 . No entanto, deve-se salientar que esses resultados foram obtidos em cultivos enriquecidos com nutrientes (Von Stosch) o que encareceria um possível cultivo comercial.

Capítulo 3

Efeitos da UV solar em tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta): crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, aminoácidos tipo micosporinas, conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio, e rendimento de carragenanas.

ABSTRACT

In this chapter, we studied the effects of solar UV-B radiation on growth, photosynthetic pigments (chlorophyll a, phycobiliproteins and total carotenoids), soluble protein, mycosporine-like amino acids (MAAs), and C, N, H content, and carrageenan yield of *Mazzaella laminarioides* tetrasporophytes and gametophytes. Apical segments were exposed to solar radiation under three treatments (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) during 18 days in spring 2009, Punta Arenas, Chile. Samples were taken after 2, 6, 12, and 18 days of solar radiation exposure. The short-term exposure (2 days) to UV radiation (PA and PAB) promoted the MAAs synthesis in tetrasporophytes and gametophytes. After 18 days of exposure, this radiation did not cause differences among all treatments in relation to MAAs content, growth rates, and carrageenan production. Different responses between gametophytes and tetrasporophytes were observed only in high UV and PAR irradiances, suggesting that gametophytes can acclimate more quickly to changes in PAR and UV irradiance than tetrasporophytes. The tolerance of *M. laminarioides* to higher PAR and UV irradiances was expected, as this intertidal species is exposed to variations in solar radiation, especially during low tide.

RESUMO

Neste capítulo, foram avaliados os efeitos da radiação solar UV-B no crescimento, conteúdo pigmentar (Cl *a*, ficobiliproteínas e carotenóides totais), proteínas solúveis, aminoácidos tipo miscosporina (MAAs), C, N, H e rendimento de carragenanas de tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides*. Segmentos apicais foram cultivados em três tratamentos de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) durante 18 dias na primavera de 2009 em Punta Arenas, Chile. Amostras foram obtidas aos 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo. No curto prazo (2 dias), a exposição à radiação UV (PA e PAB) promoveu a síntese de MAAs em gametófitos e tetrasporófitos. Já, após 18 dias, não foram observadas diferenças entre os tratamentos em relação ao conteúdo de MAAs, crescimento e produção de carragenanas. Respostas diferenciadas entre gametófitos e tetrasporófitos foram observadas apenas em altas irradiâncias de PAR e UV-B, sugerindo que os gametófitos podem se aclimatar mais rapidamente a mudanças nessas irradiâncias do que os tetrasporófitos. A tolerância de *M. laminarioides* a altas irradiâncias PAR e UV era esperado, já que a espécie ocorre no médiolitoral, onde está exposta a variações na radiação solar, especialmente durante a maré baixa.

1. INTRODUÇÃO

A contínua diminuição da camada de ozônio tem resultado no aumento da radiação ultravioleta B (UV-B: 280-320 nm) que atinge a superfície da Terra (CRUTZEN 1992; MADRONICH *et al.*, 1998). Os primeiros registros referentes à diminuição da camada de ozônio na Antártica indicam uma redução de 40% a 50% desse composto na estação primaveril (FARMAN *et al.*, 1985; STOLARSKI *et al.*, 1986; SMITH, 1992). A entando, a partir da década de 90, o aumento da área correspondente ao “buraco” de ozônio e conseqüentemente da quantidade de radiação UV-B na superfície da Terra alcançaram níveis incomuns, atingindo não apenas o continente antártico, mas também o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (FARMAN, 1985; ORCE & HELBLING, 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003). Diminuição da camada de ozônio também ocorre no hemisfério Norte, sobre o Ártico (PEARCE, 1996).

Os efeitos da radiação UV-B podem ser perceptíveis em células ou até em ecossistemas, afetando ainda ciclos biogeoquímicos importantes (ZEPP *et al.*, 1998). Em organismos aquáticos, a coluna de água atua como uma proteção natural, embora esta radiação possa penetrar até 60 metros (SMITH *et al.*, 1992; GARDE & GUSTAVSON, 1999). Os efeitos negativos da UV-B são registrados em organismos ou ecossistemas localizados em até 5 ou 6 metros (TALARICO & MARANZANA, 2000; HÖYER *et al.*, 2001; BISCHOF *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos descrevem e revisam os efeitos produzidos pela UV-B em algas marinhas, reportando que muitos processos bioquímicos e fisiológicos, como crescimento, sobrevivência, síntese de pigmentos e de substâncias fotoprotetoras, produção de oxigênio, mobilidade, metabolismo de nitrogênio e captação e assimilação de CO₂ são alvos suscetíveis dessa radiação (HÄDER *et al.*, 1995, 1998; SINHA *et al.*, 1996, 1998; Franklin & FORSTER, 1997; VAN DE POLL *et al.*, 2001; MICHLER *et al.*, 2002; POPPE *et al.*, 2002, 2003; ROLEDA *et al.*, 2004ab; MANSILLA *et al.*, 2006; BISCHOF *et al.*, 2002c, 2006; NAVARRO *et al.*, 2008; KARSTEN *et al.*, 2009). A radiação UV-B pode ainda reduzir a produção de biomassa e mudar a composição de espécies num determinado ecossistema (HÄDER *et al.*, 1998). Por outro lado, alguns desses trabalhos indicam de forma geral, que a maioria dos organismos expostos com frequência à radiação solar apresenta mecanismos de defesa para minimizar os danos causados pela radiação UV. Os principais alvos da UV-B são o DNA e o centro de reação do fotossistema II (PSII) (FRANKLIN & FORSTER, 1997; VAN DE POLL *et al.*, 2001; KARSTEN *et al.*, 2009).

A síntese e o acúmulo de substâncias decorrentes da exposição de organismos fotossintetizantes à radiação UV têm sido amplamente relatados tanto em plantas vasculares quanto em algas (FRANKLIN & FORSTER, 1997; SINHA *et al.*, 1998; GRÖNIGER *et al.*, 2000; HOLLÓSY, 2002; HUOVINEN *et al.*, 2004). Essas servem eficientemente como filtros desse tipo de radiação, impedindo que outras estruturas sejam afetadas (KARENTZ *et al.*, 1991a; SINHA *et al.*, 1998). Neste contexto, a síntese de compostos denominados de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), os quais foram isolados de macroalgas, fitoplâncton e cianofíceas (KARENTZ *et al.*, 1991a; GARCÍA-PICHEL *et al.*, 1993; SINHA *et al.*, 1998; GRÖNIGER *et al.*, 2000; HOUVINEN *et al.*, 2004), é considerada como um mecanismo adaptativo para prevenir danos produzidos pela radiação UV, uma vez que são capazes de absorver os comprimentos de onda entre 310 e 360 nm (COCKELL & KNOWLAND, 1999; SHICK & DUNLAP, 2002). Outros mecanismos que proporcionam proteção contra os efeitos induzidos pela radiação UV têm sido relatados. Entre eles, destacam-se o acúmulo de carotenóides e enzimas desintoxicantes e antioxidantes, que combatem as espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o oxigênio singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) (BOWLER *et al.*, 1992).

As ROS são normalmente produzidas em organismos fotossintetizantes durante o metabolismo, porém esse processo pode ser estimulado na presença de fatores ambientais estressantes, como altos níveis de radiação UV (PAPADAKIS & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2002). Quando o balanço oxidativo favorece o estado pró-oxidante (desbalanço metabólico), o estresse oxidativo é desencadeado, provocando danos às estruturas celulares (SIES, 1993). Esses danos resultam da capacidade das ROS em reagir e oxidar biomoléculas fundamentais como lipídeos de membranas, proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos, podendo alterar funções biológicas e até levar à morte celular (BOWLER *et al.*, 1992).

O crescimento das algas pode ser inibido por diferentes níveis de radiação UV. Os organismos do infralitoral têm sido reconhecidos como mais sensíveis a essa radiação que os do médiolitoral (WOOD, 1987, 1989; LARKUM & WOOD, 1993; GROBE & MURPHY, 1994; DRING *et al.*, 1996; HANELT *et al.*, 1997; VAN DE POLL *et al.*, 2001). Quando os níveis de radiação UV-B superam os naturais, os efeitos causados podem ser irreversíveis, de acordo com o tempo de exposição e a intensidade da radiação (HÄDER *et al.*, 1998).

Alterações morfológicas decorrentes da interação entre a radiação UV-B e alvos moleculares foram também observadas em algas (ROLEDA *et al.*, 2004b; MICHLER *et al.*, 2002; POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2008, 2010a,b,c). Algumas dessas alterações poderiam ser interpretadas como uma forma de defesa à radiação UV-B. Dentre as alterações ultraestruturais, tem-se observado um espessamento da parede celular (NAVARRO *et al.*, 2010a; SMIDTH *et al.*, 2009), o que poderia indicar um aumento nos componentes fibrilares ou mucilaginosos (polissacarídeos) dessas paredes. Entretanto, existem evidências que a UV-B possa causar redução no rendimento e na força do gel (ESWARAN *et al.*, 2001).

A grande maioria dos trabalhos relacionados aos efeitos da radiação solar em macroalgas marinhas tem sido realizado em condições de laboratório e em curtos períodos de tempo, o que torna difícil a aplicação desses conhecimentos para populações naturais, uma vez que: i, a radiação UV-B é variável diária e sazonalmente; ii) na natureza, há outros fatores que podem incrementar os efeitos ou até atenuá-los; e iii) as algas têm a capacidade de se aclimatar às variações da radiação.

As primeiras informações sobre os efeitos da radiação UV na biologia das macroalgas em ambiente natural ou em cultivos com radiação natural mostrou que essa radiação podia causar danos a algas localizadas a uma profundidade de 5 metros (WOOD, 1987). Posteriormente, outros estudos foram realizados em ambiente natural com objetivo de entender a fisiologia das macroalgas quando submetidas à radiação solar UV-B (GÓMEZ *et al.*, 1998, BISCHOF *et al.*, 1998; HANELT *et al.*, 1997; SAGERT *et al.*, 1997). Novos estudos vêm sendo incentivados nessa área, especialmente visando avaliar possíveis impactos do aumento da radiação UV-B no setor produtivo, uma vez que os efeitos biológicos dessa radiação são respostas combinadas dos danos, reparos e aclimações, que podem ter consequências no crescimento e na produção primária global. Nesse sentido, é fundamental avaliar esses efeitos em populações de algas que se constituem em matéria prima para a produção de ficocolóides. Informações sobre essas algas devem permitir uma melhor avaliação das consequências do aumento dessa radiação para o setor produtivo. Adicionalmente, a necessidade de estudos que avaliem os efeitos da UV-B em organismos marinhos de regiões afetadas pela diminuição da camada de ozônio é ainda mais imperativa, pois, segundo as previsões recentes, a recuperação da camada de ozônio não será alcançada antes de 2070 (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009) devido a influência das mudanças climáticas (MCKENZIE *et al.*, 2007), embora a emissão de substâncias que afetam a concentração de ozônio venha diminuído nos últimos anos.

Estudos sobre os efeitos da UV-B em diferentes estádios do histórico de vida são poucos na literatura. HOYER *et al.* (2001) demonstrou que o conteúdo de MAAs de gametófitos e tetrasporófitos de *Gigartina skottsbergii* e *Iridaea cordata* expostas à UV-B são similares. Em *Gracilaria caudata*, os tetrasporófitos apresentaram maiores taxas de crescimento, quando comparados a gametófitos quando expostos à PAR+UV-B (ORNELLAS, 2011). Contrariamente, gametófitos de *Iridaea cordata* foram menos sensíveis que tetrasporófitos quando expostos a UV-B artificial (NAVARRO *et al.*, 2010b,c). Dessa forma, estudos sobre variação intraespecífica se justificam a fim de conhecer a estratégia de gametófitos e tetrasporófitos frente à radiação UV-B.

Mazzaella laminarioides é uma alga do médiolitoral, frequentemente coletada no médiolitoral do Chile central para a extração de carragenanas (BUSCHMAN *et al.*, 2001). Como consequência da sua importância econômica, alguns estudos sobre os efeitos da UV-B foram realizados. Esses estudos avaliaram os efeitos dessa radiação na fotoinibição (GÓMEZ *et al.*, 2004) e no crescimento (MANSILLA *et al.*, 2006). Foram também identificadas 5 MAAs (HUOVINEN *et al.*, 2004). Entretanto, não existem informações sobre os efeitos do aumento da UV-B solar, que vem ocorrendo durante as primaveras dos últimos anos, como consequência da diminuição da camada de ozônio (ORCE & HELBLING, 1997; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radiação UV-B solar em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides*. Esses efeitos foram avaliados considerando-se crescimento, pigmentos, proteínas solúveis, MAAs, conteúdo de nitrogênio, hidrogênio, carbono e rendimento de carragenanas em indivíduos expostos a diferentes combinações de radiação: i) PAR; ii) PAR+UV-A; e iii) PAR+UV-A+UV-B por 18 dias durante a primavera austral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Porções apicais de tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq foram coletadas em Punta Santa Ana (53 37' S; 70 59' W) no dia 27 de setembro de 2009. Em seguida, foram transportadas para o Laboratório de Biologia Marina da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile), onde, após seleção, ápices de quatro centímetros foram selecionados para o experimento.

2.2. Água do mar e meio de cultivo

A água do mar utilizada no experimento foi coletada em Punta Santa Ana, Punta Arenas, Chile, no dia 25 de setembro de 2009. Essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade foi de 32 psu. A água do mar foi enriquecida com solução de von Stosch (OLIVEIRA *et al.*, (1995) a 50% (contendo 0,38 mM de NO₃) (Tabela 1, Capítulo 2).

2.3. Radiação solar

Durante o experimento, as algas foram expostas a radiação solar. Esses dados foram proporcionados pelo Laboratório de Ozono da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile). Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectroradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. O detalhe da transformação desses dados assim como o detalhe do cálculo da irradiância solar e doses por hora é apresentado no item de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

2.4. Desenho experimental

Os representantes dos dois estádios reprodutivos (tetrasporófitos e gametófitos femininos) de *Mazzaella laminarioides* foram distribuídos em diferentes frascos cilíndricos de acrílico transparente contendo dois litros de meio de cultura. Esse material permite a passagem da radiação UV a partir de 290 nm (Fig. 11, Capítulo 1).

Um total de 3 gr de alga foi cultivado por frasco. Três repetições (frascos) para cada estágio reprodutivo foram preparadas por tratamento. A aeração foi fornecida por um compressor a cada 30 minutos ao longo do experimento. Os frascos foram mantidos em um recipiente de fibra de vidro contendo água para manter a temperatura do cultivo ao longo dos dias. A temperatura foi registrada a cada hora entre 8 e 19 horas.

Foram realizados três tratamentos utilizando-se filtros de corte (Fig. 1). As características de cada filtro estão descritas no item 6.2 de Materiais e Métodos do Capítulo 1. O sistema de cultivo foi exposto à radiação solar (PAR+UV) durante 18 dias (28 de setembro até 15 de outubro de 2009). Esse período foi escolhido por ser um mês com ampla variação de PAR e principalmente de UV-B, decorrentes da presença de massas de ar pobres em ozônio.

Fig. 1. Representação esquemática do experimento, no qual gametófitos e tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foram expostos por 18 dias em diferentes tratamentos de radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB).

Ao início do experimento, foram obtidas amostras para análise do conteúdo de carragenanas, pigmentos (Cl *a*, carotenóides totais e ficobiliproteínas), proteínas solúveis totais (PS), MAAs, carbono, hidrogênio e nitrogênio (C, H e N). Além disso, amostras foram obtidas para avaliar a relação entre massa fresca e massa seca (Tabela 1). Após

dois dias de cultivo, foram retirados dois ápices de cada frasco, que serviram para as análises apresentados na Tabela 1. Aos seis dias de cultivo, a massa fresca de cada repetição foi avaliada. Uma vez pesadas, foram retirados dois ápices de cada frasco, os quais foram utilizados para a quantificação dos parâmetros bioquímicos definidos na tabela 1. O restante dos ápices foi pesado novamente, e esse valor foi utilizado como a massa inicial do próximo período de crescimento. Todas as amostragens foram realizadas perto do meio dia. O meio de cultura foi renovado a cada 6 dias, na ocasião da avaliação da massa. Todas as análises foram feitas considerando-se três amostras por condição experimental. Para os MAAs, cada repetição foi subdividida em 3 (sub-repetições), totalizando um número amostral de 9.

Tabela 1. Resumo dos parâmetros avaliados e os tempos nos quais as amostragens foram realizadas. Resumo dos parâmetros avaliados e os tempos nos quais as amostragens foram realizadas. Cl *a*, clorofila a; FE, ficoeritrina; FC, ficocianina; MAAs, aminoácidos tipo micopsporinas; Ms:Mf, relação massa seca: massa fresca; PS, proteínas solúveis;.

Parâmetro	Gameófitos femininos					Tetrasporófitos				
	início	2	6	12	18	início	2	6	12	18
Avaliação massa fresca	x		x	x	x	x		x	x	x
Ms:Mf	x			x	x	x			x	x
FE	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
FC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Cl <i>a</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Carotenóides totais	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Carragenana	x				x	x				x
C, N, H	x	x			x	x	x			x
MAAs	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Os protocolos para avaliar o crescimento, conteúdo pigmentar, PS, MAAs, rendimento de carragenanas e conteúdo de C, H e N estão descritos no Capítulo 2 (item 2.5). As amostras destinadas à avaliação da Ms:Mf foram primeiramente pesadas em balança analítica (massa fresca) e posteriormente secas em estufa a 50°C por dois dias até obter peso constante (massa seca).

2.5. Análises estatísticas

A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram analisadas (teste de validação de Cochran). Para determinar os efeitos dos tratamentos sobre as algas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) uni ou multifatorial de acordo com o caso. Nessas análises, foram incluídos os valores iniciais de cada parâmetro avaliado. Quando foram encontradas diferenças significativas, aplicaram-se testes *a posteriori* de Ficher (LSD) e de Newman-Keuls (ZAR, 1999). Todas as conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.). Todas as variáveis dependentes avaliadas tiveram um $N=3$, com exceção dos MAAs ($N=9$).

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis ambientais

Os valores de PAR e UV apresentaram ampla variação dentro e entre os dias (Fig. 2). Os maiores valores de PAR foram registrados nos dias 14 de outubro (2009 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$ as 18:14 horas) e 7 de outubro (1834 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$ as 17:21 horas). Nesses dois dias e nos mesmos horários registraram-se os maiores valores de UV-A: 34,85 W.m^{-2} (14/10/2009) e 32,34 W.m^{-2} (7/10/2009). Entretanto, para a UV-B, os maiores valores foram registrados nos dias 4 (1,02 W.m^{-2} , 15:53 horas), 5 (1,07 W.m^{-2} , 16:01 horas) e 15 de outubro de 2009 (1,05 W.m^{-2}).

Fig. 2. Valores de irradiância PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$), UV-A e UV-B (W.m^{-2}) registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (28 de setembro a 15 de outubro de 2009).

Os valores de doses diárias e doses diárias biologicamente efetivas calculadas a partir do ambiente e a partir dos frascos onde as algas foram cultivadas seguiram a mesma tendência, com maiores valores de PAR e UV-A nos dias 7 e 14 de outubro de 2009 e maiores valores de UV-B em 4, 5 e 15 de outubro de 2009 (Fig. 3). Esse padrão foi observado também na razão UV-B/UV-A (Fig. 4). Os valores de doses totais no ambiente, dentro dos frascos e dose biologicamente efetiva são apresentados na Tabela 2. A temperatura média no experimento variou entre 5,5 e 10,2° (Fig. 5).

Fig. 3. Doses diárias de UV-B, UV-A e PAR em KJ.m^{-2} verificadas na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (28 de setembro a 15 de outubro 2009). São apresentados também os valores de dose UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelo acrílico (material com que foram construídos os frascos) e pelos filtros usados no experimento. Apresentam-se ainda os valores de dose biologicamente efetivas.

Fig. 4. Razão UV-B / UV-A diária (em preto) e quantidade de ozônio (cinza) registradas em Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (28 de setembro a 15 de outubro de 2009). Os dados de UV-B e UV-A foram fornecidos pelo Laboratorio de Ozono da Universidad de Magallanes, enquanto que os dados de ozônio foram obtidos no site <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>.

Tabela 2. Valores de doses de UV-B, UV-A e PAR (KJ.m^{-2}) aos 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (28 de setembro a 15 de outubro de 2009). São apresentados também os valores de doses de UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos frascos e diferentes filtros utilizados para obter os tratamentos, além das doses biologicamente efetivas.

	Doses no ambiente			Doses transmitidas pelos frascos e filtros específicos de cada tratamento			Doses biologicamente efetivas recebidas pelas algas		
	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	UV-A+UV-B
2 dias	20	564	7851	13	386	5942	8	119	127
6 dias	65	1937	25904	42	1326	19604	26	409	435
12 dias	156	4355	60761	99	2981	45984	63	919	982
18 dias	227	6415	90438	144	4391	68444	91	1353	1444

Fig. 5. Valores médios de temperatura registrados ao longo dos dias em que foram realizados o experimentos (28 de setembro até 15 de outubro de 2009).

3.2. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos

A análises uni e multifatoriais (ANOVA) para cada um dos parâmetros fisiológicos avaliados em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* expostos aos tratamentos P, PA e PAB são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Análises unifatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos isolados do tipo de radiação. Esses dados foram obtidos para tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* após exposição à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) durante 2, 6, 12 e 18 dias. Os efeitos significativos ($P < 0,05$) são apresentados em negrito.

Fonte de Variação		Radiação															
Variável		Tetrasporófitos								Gametófitos							
		T= 2 dias		T= 6 dias		T= 12 dias		T= 18 dias		T= 2 dias		T= 6 dias		T= 12 dias		T= 18 dias	
		F	P	F	p	F	p	F	p	F	P	F	p	F	p	F	p
Taxas crescimento				0,03	0,973	0,8	0,508	0,3	0,761			1,4	0,318	1,3	0,350	0,1	0,955
Ms:Mf						5,3	0,047	1,1	0,381					2,0	0,216	1,8	0,253
FE	0,1	0,948	1,8	0,218	5,6	0,026	1,7	0,228	1,1	0,374	0,3	0,724	1,3	0,317	1,6	0,254	
FC	0,1	0,873	1,6	0,258	6,4	0,018	2,6	0,128	0,9	0,423	0,5	0,627	0,9	0,430	2,4	0,149	
Cl a	0,5	0,632	1,2	0,339	4,8	0,037	7,1	0,014	1,4	0,287	4,3	0,049	3,9	0,058	0,4	0,673	
Carotenóides totais	0,7	0,495	2,1	0,178	2,9	0,108	7,8	0,011	2,5	0,136	3,9	0,059	3,1	0,095	0,4	0,697	
PS	1,2	0,357	3,1	0,094	5,5	0,027	1,8	0,224	0,4	0,963	1,3	0,324	0,01	0,987	0,03	0,971	
FE:FC	0,3	0,739	0,7	0,538	3,7	0,067	3,2	0,091	0,2	0,803	0,8	0,493	5,6	0,026	0,6	0,593	
FE:Cl a	0,2	0,811	2,2	0,172	8,3	0,009	4,7	0,040	0,2	0,788	1,8	0,220	1,5	0,282	0,5	0,605	
FC:Cl a	0,1	0,884	1,7	0,229	8,2	0,009	6,5	0,018	0,4	0,661	1,4	0,306	2,3	0,156	1,2	0,341	
FE+FC:PS	0,5	0,683	0,3	0,824	1,1	0,382	1,2	0,351	1,2	0,368	0,2	0,874	0,2	0,885	0,8	0,498	
Carragenana							0,4	0,663							256,1	0,000	
C	6,9	0,027					0,5	0,616	0,2	0,861					0,1	0,843	
H	2,3	0,176					1,2	0,359	4,9	0,056					2,0	0,210	
N	2,3	0,185					0,9	0,466	0,2	0,839					0,2	0,846	
C:N	1,2	0,378					1,2	0,354	0,4	0,696					0,2	0,866	
MAAs Total	6,7	0,005	1,9	0,176	7,0	0,004	0,6	0,578	5,7	0,009	44,6	0,00	1,4	0,262	0,03	0,968	
Mic-Glic	0,9	0,414	9,1	0,001	1,8	0,189	2,4	0,110	0,7	0,518	5,2	0,01	2,2	0,136	1,3	0,281	
Shinorina	4,2	0,027	6,9	0,004	10,3	0,001	0,3	0,783	5,3	0,012	41,7	0,00	1,4	0,262	0,01	0,990	
Palitina	9,7	0,001	6,2	0,007	4,8	0,018	2,7	0,090	4,0	0,031	24,1	0,00	0,8	0,472	0,1	0,964	
Asterina	12,5	0,000	16,9	0,000	1,0	0,383	5,7	0,009	2,2	0,130	35,8	0,00	0,2	0,818	0,1	0,972	

Tabela 4. Análises fatoriais ANOVA para cada variável dependente, com resultados de efeitos do tempo, estágio reprodutivo e a interação entre as variáveis: tempo, tipo de radiação e estágio reprodutivo. Esses dados foram obtidos para tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* após exposição à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) durante 2, 6, 12 e 18 dias. Os efeitos significativos ($P < 0,05$) são apresentados em negrito. gl: graus de liberdade.

Fonte de variação	Tempo (A) gl:2		Estádio (B) gl:1		A x B gl:2		Radiação (C) x B gl:2		A x C gl: 4		C x A x B gl: 4	
Variável	F	P	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Taxas crescimento	158,5	0,000	8,9	0,005	0,8	0,463	0,4	0,662	1,0	0,435	0,8	0,552
Ms:Mf	4,8	0,039	26,3	0,000	4,6	0,042	7,6	0,003	3,9	0,034	4,6	0,020
FE	2,0	0,122	9,2	0,003	0,6	0,607	0,2	0,792	0,4	0,853	2,1	0,067
FC	0,7	0,567	21,4	0,000	3,7	0,015	0,9	0,427	0,2	0,959	2,8	0,016
Cl a	6,5	0,001	38,7	0,000	3,1	0,031	0,7	0,519	1,7	0,126	3,9	0,002
Carotenóides totais	2,0	0,122	9,2	0,003	0,6	0,607	0,2	0,792	0,4	0,853	2,1	0,067
PS	3,1	0,032	3,5	0,067	2,7	0,052	1,9	0,161	1,0	0,415	1,6	0,173
FE:FC	6,4	0,001	2,2	0,145	2,1	0,107	0,8	0,448	0,7	0,677	1,6	0,160
FE:Cl a	4,6	0,006	0,5	0,464	6,0	0,001	0,3	0,776	0,9	0,481	2,4	0,033
FC:Cl a	3,9	0,013	0,9	0,352	5,6	0,002	0,1	0,929	0,3	0,931	2,7	0,019
FE+FC/PS	2,8	0,043	9,9	0,002	0,7	0,555	0,1	0,923	0,3	0,940	1,8	0,121
C	4,6	0,042	178,1	0,000	2,3	0,139	0,0	0,966	1,5	0,233	2,0	0,157
H	1,8	0,191	14,4	0,001	5,5	0,028	5,5	0,011	0,6	0,562	2,8	0,079
N	18,8	0,000	0,1	0,803	0,3	0,562	0,1	0,881	0,5	0,611	1,4	0,263
C:N	25,7	0,000	27,1	0,000	0,0	0,991	0,1	0,896	0,3	0,760	1,1	0,359
MAAs Total	25,9	0,000	42,2	0,000	25,5	0,000	4,5	0,012	9,5	0,000	7,0	0,000
Mic-Glic	239,4	0,000	0,9	0,332	16,1	0,000	0,7	0,490	1,7	0,129	3,2	0,005
Shinorina	71,9	0,000	94,4	0,000	19,0	0,000	8,8	0,000	6,7	0,000	9,5	0,000
Palitina	13,2	0,000	3,5	0,064	25,7	0,000	0,1	0,906	13,7	0,000	1,9	0,075
Asterina	39,2	0,000	0,7	0,406	1,6	0,202	13,3	0,000	3,3	0,004	14,1	0,000

3.2.1. Taxas de crescimento e relação Ms:Mf

As taxas de crescimento de ápices tetrasporofíticos e gametofíticos de *Mazzaella laminarioides* foram semelhantes entre os três tratamentos de radiação (P, PA e PAB) nos três períodos de avaliação (6, 12 e 18 dias) (Tabela 3, Fig. 6). Entretanto, as taxas de crescimento variaram com o tempo e com o estágio reprodutivo (Tabela 4). As maiores taxas foram observadas aos 12 dias de cultivo e as menores aos 6 dias, tanto em tetrasporófitos quanto em gametófitos (Fig. 6). Os gametófitos apresentaram maiores taxas de crescimento quando comparados aos tetrasporófitos aos 6 dias de cultivo no tratamento PA, e aos 12 dias em PAB (Fig. 7).

Fig. 6. Taxas de crescimento de tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* após 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos numa mesma condição de tempo. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

A relação Ms:Mf de gametófitos não variou ao longo do tempo, nem com o tipo de radiação (Tabela 3), sendo que os valores verificados aos 12 e 18 dias de cultivo nos três tratamentos foram similares aos verificados ao início do experimento ($21,7 \pm 0,3\%$) (Fig. 8).

A relação Ms:Mf de tetrasporófitos apresentou variações entre os tratamentos e ao longo do tempo. Aos 12 dias de cultivo, observou-se a maior diferença entre os tratamentos, com maiores valores em PA ($23,8 \pm 0,2$) e PAB ($23,9 \pm 0,04$) e menores em P ($20,0 \pm 2,9$) (Fig. 8, Tabela 3). Nesse período, os valores obtidos em PA e PAB foram similares aos valores verificados ao início do experimento ($22,8 \pm 0,3$). Aos 18 dias, de cultivo, não foram verificadas diferenças nos valores de Ms:Mf entre os tratamentos.

Observou-se que os tetrasporófitos apresentaram maiores valores de Ms:Mf que os gametófitos (Tabela 4, Fig. 9), com exceção do tratamento P aos 12 dias de cultivo, em que essa relação foi semelhante entre os estádios reprodutivos.

Fig. 8. Relação massa seca e massa fresca (Ms:Mf) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor verificado em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 9. Comparação da relação massa seca e massa fresca (Ms:Mf) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* após 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre tetrasporófitos e gametófitos numa mesma condição e tempo. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

3.2.2. Conteúdo pigmentar

O conteúdo pigmentar de *Mazzaella laminarioides*, principalmente em tetrasporófitos, variou significativamente em relação aos diferentes tratamentos de radiação.

3.2.2.1. Clorofila *a*

O conteúdo de Cl *a* em tetrasporófitos variou entre os tratamentos e ao longo do tempo. As diferenças foram observadas aos 12 e 18 dias de cultivo (Fig. 10, Tabela 3). Aos dois dias de cultivo, o conteúdo de Cl *a* foi similar entre os diferentes tratamentos e similar ao obtido ao início do experimento ($0,33 \pm 0,06 \text{ mg. gMS}^{-1}$). Aos 6 dias, registrou-se um aumento da Cl *a* em todos os tratamentos em relação aos valores iniciais, embora diferenças entre os tratamentos não tenham sido observadas. Já, aos 12 dias, houve um aumento significativo ($F = 4,8$; $p = 0,037$) da concentração de Cl *a* em algas submetidas à PA ($0,54 \pm 0,04 \text{ mg. gMS}^{-1}$), embora, aos 18 dias esse valor tenha diminuído. Nesse último período, observou-se maior concentração de Cl *a* em algas submetidas à PAB ($0,58 \pm 0,09 \text{ mg. gMS}^{-1}$) do que em algas cultivadas em PA e P.

Gametófitos expostos a P, PA e PAB apresentaram um aumento nas concentrações de Cl *a* após dois dias de cultivo quando comparados aos valores obtidos ao início ($0,39 \pm 0,05 \text{ mg. gMS}^{-1}$), entretanto, diferenças significativas não foram observadas entre os

tratamentos. Aos 6 dias de cultivo, observou-se que o menor valor de Cl *a* foi obtido no tratamento P (Fig. 10). Já, após 12 dias, a maior concentração foi registrada em algas submetidas ao tratamento PAB e menor em PA ($0,67 \pm 0,07$ e $0,45 \pm 0,14$ mg. gMS⁻¹ em PAB e PA, respectivamente; P= 0,05), sendo que aquelas algas cultivadas em P apresentaram um valor intermediário. Já, aos 18 dias, não se observaram diferenças entre os tratamentos (P= 0,673).

Além do tipo de radiação, os outros dois fatores avaliados neste experimento (tempo e estágio reprodutivo) apresentaram efeitos significativos na concentração de Cl *a* em *M. laminarioides*, seja considerando esses dois fatores separadamente ou a interação entre eles (Tabela 3 e 4). Comparando os dois estádios reprodutivos observou-se que, em geral, os gametófitos apresentaram maiores concentrações de Cl *a* (Tabela 5).

Fig. 10. Conteúdo de Cl *a* em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse composto verificado em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 5. Comparação dos valores médios de pigmentos (Cl *a*, carotenóides totais, FE, FC) e proteína solúvel (PS) de tetrasporófitos (Tet) e gametófitos femininos (Gam) de *Mazzaella laminarioides* expostos à radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo. Índices diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos e estádios reprodutivos (teste de Fisher LSD, N=3).

			Cl a	Carot tot	FE	FC	PS
2 dias	P	Tet	0,46 ± 0,09 ^a	82,3 ± 40,9 ^{ac}	2,38 ± 0,49 ^{ac}	0,44 ± 0,12 ^a	54,22 ± 7,49 ^a
	P	Gam	0,62 ± 0,11 ^{bc}	78,6 ± 25,0 ^{ad}	2,63 ± 0,70 ^{ac}	0,49 ± 0,13 ^a	49,01 ± 7,57 ^a
	PA	Tet	0,48 ± 0,09 ^{ad}	63,8 ± 15,7 ^a	2,47 ± 1,06 ^c	0,48 ± 0,12 ^a	55,67 ± 6,63 ^a
	PA	Gam	0,72 ± 0,07 ^b	142,3 ± 66,7 ^{bc}	2,69 ± 0,29 ^b	0,49 ± 0,07 ^a	48,57 ± 4,20 ^a
	PAB	Tet	0,42 ± 0,02 ^a	107,6 ± 4,6 ^{abc}	2,56 ± 0,70 ^{abc}	0,49 ± 0,17 ^a	49,46 ± 3,06 ^a
	PAB	Gam	0,60 ± 0,13 ^{bcd}	122,9 ± 68,4 ^{cde}	2,15 ± 0,61 ^{ab}	0,39 ± 0,13 ^a	49,72 ± 5,57 ^a
6 dias	P	Tet	0,44 ± 0,03 ^{ab}	75,9 ± 9,7 ^{ab}	2,45 ± 0,29 ^{ab}	0,45 ± 0,07 ^{abc}	59,85 ± 6,22 ^{abc}
	P	Gam	0,36 ± 0,06 ^a	55,4 ± 11,5 ^a	2,68 ± 0,59 ^a	0,52 ± 0,12 ^a	53,15 ± 10,20 ^{ab}
	PA	Tet	0,44 ± 0,04 ^{ab}	86,4 ± 18,7 ^{ab}	1,94 ± 0,27 ^{ab}	0,38 ± 0,06 ^{bc}	48,28 ± 8,11 ^a
	PA	Gam	0,53 ± 0,10 ^b	90,6 ± 22,7 ^{ab}	2,88 ± 0,34 ^{ab}	0,55 ± 0,07 ^a	57,58 ± 7,80 ^{bc}
	PAB	Tet	0,41 ± 0,04 ^{ac}	68,6 ± 3,0 ^{ab}	2,03 ± 0,57 ^{ab}	0,37 ± 0,08 ^c	52,31 ± 5,39 ^{ab}
	PAB	Gam	0,51 ± 0,11 ^{bc}	102,9 ± 32,2 ^b	2,89 ± 0,19 ^b	0,57 ± 0,04 ^a	62,45 ± 6,13 ^c
12 dias	P	Tet	0,38 ± 0,09 ^a	53,7 ± 12,4 ^a	2,62 ± 0,31 ^a	0,54 ± 0,09 ^{ac}	54,98 ± 5,80 ^{ab}
	P	Gam	0,59 ± 0,10 ^{cd}	99,2 ± 23,1 ^{ab}	2,61 ± 0,43 ^{ab}	0,51 ± 0,07 ^{ad}	56,91 ± 8,33 ^a
	PA	Tet	0,54 ± 0,04 ^{bc}	77,2 ± 8,0 ^{ab}	2,29 ± 0,12 ^{ab}	0,44 ± 0,02 ^{ac}	53,54 ± 1,43 ^{ab}
	PA	Gam	0,46 ± 0,14 ^{abc}	71,2 ± 10,5 ^{ab}	2,48 ± 0,12 ^{ab}	0,57 ± 0,08 ^{bde}	55,93 ± 7,52 ^a
	PAB	Tet	0,42 ± 0,09 ^{ab}	62,1 ± 19,4 ^{ab}	2,07 ± 0,24 ^{ab}	0,38 ± 0,07 ^c	46,47 ± 3,05 ^b
	PAB	Gam	0,67 ± 0,08 ^d	105,4 ± 25,3 ^b	2,79 ± 0,15 ^b	0,55 ± 0,03 ^{ad}	56,31 ± 9,69 ^a
18 dias	P	Tet	0,41 ± 0,04 ^a	57,3 ± 9,1 ^a	1,94 ± 0,39 ^a	0,40 ± 0,10 ^{ac}	49,94 ± 4,17 ^a
	P	Gam	0,55 ± 0,06 ^{bd}	92,9 ± 20,6 ^{ab}	2,58 ± 0,19 ^{ab}	0,58 ± 0,07 ^{bc}	58,62 ± 2,66 ^{ab}
	PA	Tet	0,47 ± 0,04 ^{acd}	75,1 ± 11,7 ^{ab}	2,34 ± 0,11 ^{ab}	0,50 ± 0,07 ^{abd}	55,56 ± 4,07 ^{ab}
	PA	Gam	0,59 ± 0,12 ^{bd}	93,2 ± 19,5 ^{ab}	2,29 ± 0,32 ^{ab}	0,47 ± 0,10 ^{bce}	58,36 ± 9,19 ^{ab}
	PAB	Tet	0,58 ± 0,10 ^{bc}	100,6 ± 22,6 ^{ab}	2,05 ± 0,36 ^{ab}	0,38 ± 0,06 ^{ac}	56,26 ± 6,87 ^{ab}
	PAB	Gam	0,63 ± 0,16 ^b	106,6 ± 33,9 ^b	2,74 ± 0,50 ^b	0,58 ± 0,06 ^{de}	59,30 ± 2,30 ^b

3.2.2.2. Carotenóides totais

Os carotenóides totais apresentaram tendências similares às observadas para a Cl *a* (Fig. 10). O conteúdo de carotenóides em tetrasporófitos de *M. laminarioides* apresentou diferenças entre os tratamentos aos 18 dias de cultivo (Tabela 3; Fig. 11). Nesse mesmo período, observou-se o maior valor de carotenóides totais no tratamento PAB (100,6 ± 22,5 mg. gr MS⁻¹), sendo esse valor também maior ao registrado ao início do experimento (58,7 ± 12,4 mg. gr MS⁻¹).

Em gametófitos, as análises unifatoriais ANOVA para os carotenóides totais mostraram que a variável independente tipo de radiação não teve efeito significativo

(Tabela 3). Já, a análise *a posteriori* de Newman-Keuls revelou que houve diferença significativa entre os tratamentos P e PA aos 6 dias de cultivo ($P = 55,4 \pm 11,5$; $PA = 90,6 \pm 22,7$ mg. gr MS^{-1} ; $P = 0,048$). Nesse período, o valor registrado no tratamento P foi inferior ao valor registrado no início do experimento ($87,4 \pm 25,9$ mg. gr MS^{-1}).

Dentre os demais fatores avaliados, apenas o estágio reprodutivo apresentou efeitos significativos na concentração de carotenóides em *M. laminarioides* (Tabela 4). Em geral, os gametófitos apresentaram maiores concentrações de carotenóides totais do que os tetrasporófitos (Tabela 5).

Figura 11. Conteúdo de carotenóides totais (Car Total) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse composto verificado em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

3.2.2.3. Ficobiliproteínas e proteínas solúveis

Em relação às ficobiliproteínas (Fig. 12 e 13), observou-se que os valores obtidos durante o experimento foram, em geral, similares aos verificados ao início do experimento, tanto para os tetrasporófitos ($FE = 1,82 \pm 0,10$; $FC = 0,32 \pm 0,04 \text{ mg. gMS}^{-1}$) quanto para os gametófitos ($FE = 2,43 \pm 0,83$; $FC = 0,43 \pm 0,10 \text{ mg. gMS}^{-1}$). Já o conteúdo de PS de tetrasporófitos cultivados nos diferentes tratamentos apresentou, em geral, valores maiores aos verificados no início de experimento ($PS = 43,2 \pm 5,4 \text{ mg. gMS}^{-1}$). Entretanto, os gametófitos apresentaram valores similares aos verificados no início de experimento ($PS = 47,1 \pm 2,5 \text{ mg. gMS}^{-1}$), com exceção aos 18 dias de cultivo, quando foram observados maiores valores (Fig. 14).

Nos tetrasporófitos, os conteúdos de FE e FC e PS apresentaram tendências similares aos observados em gametófitos, com diferenças significativas entre os tratamentos apenas aos 12 dias de cultivo (Tabela 3; Fig. 12, 13 e 14). Nesse período, observaram-se maiores concentrações de FE, FC e PS em algas submetidas à P ($FE = 2,62 \pm 0,31$; $FC = 0,54 \pm 0,09$; $PS = 55 \pm 5,8 \text{ mg. gMS}^{-1}$) e menores no tratamento PAB ($FE = 2,07 \pm 0,23$; $FC = 0,38 \pm 0,07$; $PS = 46,5 \pm 3,1 \text{ mg. gMS}^{-1}$).

A variação no conteúdo de FE e FC de tetrasporófitos aos 12 dias de cultivo refletiu-se na proporção FE:FC, mas apenas no tratamento PA (Fig. 15). Entretanto, essa proporção não apresentou diferenças entre os tratamentos nos demais dias avaliados. A relação FE+FC:PS não apresentou diferenças entre os tratamentos em nenhum período avaliado (Tabela 6; Fig. 16). Já, a relação FE:Cl *a* foi menor no tratamento PA, quando comparado aos tratamentos P e PAB aos 12 dias (Fig. 17). Essa diferença teria sido promovida pelo maior valor de Cl *a* e um menor valor de FE registrados no tratamento PA para esse período em comparação aos demais tratamentos (Fig. 10 e 12). Por outro lado, a relação FC:Cl *a* apresentou diferenças entre os tratamentos ($P > PA = PAB$) aos 12 dias de cultivo (Fig. 18). O maior valor de FC:Cl *a* em P teria sido promovido principalmente pela diminuição da Cl *a* no tratamento P comparado com os tratamentos PA e PAB (Fig. 10), e pelo aumento de FC nesse tratamento e período (Fig. 13). Após 18 dias de cultivo, menor valor da relação FC:Cl *a* foi observado em PAB quando comparado aos tratamentos P e PA (Fig. 18), porém nesse período, a concentração de FC foi similar em todos os tratamentos (Fig. 13), enquanto que a concentração de Cl *a* foi maior em PAB do que em P e PA (Fig. 10).

Os gametófitos apresentaram concentrações de FE, FC e PS semelhantes entre os tratamentos P, PA e PAB durante todo o experimento (Tabela 5; Fig. 12, 13 e 14). A

relação entre FE:FC variou apenas aos 12 dias ($PA < P = PAB$) (Tabela 6; Fig. 15). A redução na relação FE:FC no tratamento PA nesse período teria sido promovida pela maior concentração FC e menor de FE, embora não tenham sido observadas diferenças nas concentrações de FE e FC entre os tratamentos P, PA e PAB (Fig. 12 e 13; Tabela 3). Por outro lado, as razões FE:Cl *a* e FC:Cl *a* não apresentaram diferenças entre os tratamentos em nenhum período avaliado (Fig. 17 e 18), embora tenham sido verificadas diferenças nas concentrações de Cl *a* entre os tratamentos aos 6 e 12 dias de cultivo (Fig. 10).

Dentre os outros dois fatores avaliados neste experimento (tempo e estágio reprodutivo), apenas o estágio reprodutivo apresentou efeitos significativos no conteúdo de FE e FC. No caso da FC, a interação entre o estágio reprodutivo-tempo de cultivo e a interação entre tempo-estádio reprodutivo-tipo de radiação tiveram efeitos significativos na concentração de FC (Tabela 4). O conteúdo de PS apenas variou com a variável tempo.

Comparando-se os gametófitos e tetrasporófitos em cada um dos tratamentos (P, PA e PAB), observaram-se maiores quantidades de FE em gametófitos do que em tetrasporófitos aos 2 dias de cultivo no tratamento PA (Tabela 6). Já, o conteúdo de PS foi maior em gametófitos do que em tetrasporófitos aos 12 e 18 dias, principalmente nos tratamentos PA e PAB. Para o caso da FC, suas concentrações foram, em geral, maiores nos gametófitos do que nos tetrasporófitos em todos os tratamentos.

Fig. 12. Conteúdo de ficoeritrina (FE) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse composto verificado em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 13. Conteúdo de ficocianina (FC) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse composto verificado em amostras no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 14. Conteúdo de proteína solúvel (PS) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor desses compostos registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 15. Razão ficoeritrina: ficocianina (FE:FC) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor de FE:FC registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 16. Razão ficoeritrina+ficocianina:proteína solúvel (FE+FC:PS) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos femininos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor de FE+FC:PS registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 17. Razão ficoeritrina:clorofila a (FE:Cl a) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) ou PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor de FE:Cl a registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 6. Razões FE:Cl *a*, FE:FC, FC:Cl *a* e FE+FC:PS de tetrasporófitos (Tet) e gametófitos femininos (Gam) de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo. Dados apresentados visando à comparação entre tetrasporófitos e gametófitos numa mesma condição e tempo. Diferentes índices representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos e estádios reprodutivos (Fisher LSD, N=3).

			FE:Cl <i>a</i>	FE:FC	FC:Cl <i>a</i>	FE+FC:PS
2 dias	P	Tet	5,22 ± 1,01 ^{ab}	5,46 ± 0,47 ^a	0,97 ± 0,24 ^{ab}	0,052 ± 0,004 ^a
	P	Gam	4,30 ± 1,12 ^{ab}	5,42 ± 0,51 ^a	0,81 ± 0,27 ^{abc}	0,063 ± 0,009 ^{ab}
	PA	Tet	5,39 ± 2,48 ^{ab}	5,02 ± 1,16 ^a	1,03 ± 0,30 ^a	0,053 ± 0,020 ^{ab}
	PA	Gam	3,78 ± 0,68 ^b	5,54 ± 0,35 ^a	0,69 ± 0,14 ^{bc}	0,066 ± 0,008 ^b
	PAB	Tet	6,01 ± 1,57 ^a	5,33 ± 0,61 ^a	1,16 ± 0,38 ^a	0,061 ± 0,017 ^{ab}
	PAB	Gam	3,79 ± 1,61 ^b	5,63 ± 0,45 ^a	0,69 ± 0,32 ^c	0,051 ± 0,015 ^a
6 dias	P	Tet	5,56 ± 0,60 ^a	5,45 ± 0,25 ^a	1,02 ± 0,13 ^{ab}	0,048 ± 0,003 ^{ab}
	P	Gam	7,70 ± 2,05 ^b	5,20 ± 0,29 ^a	1,48 ± 0,39 ^a	0,060 ± 0,007 ^a
	PA	Tet	4,40 ± 0,47 ^a	5,19 ± 0,19 ^a	0,85 ± 0,10 ^b	0,049 ± 0,011 ^{ab}
	PA	Gam	5,60 ± 1,41 ^{ab}	5,23 ± 0,25 ^a	1,08 ± 0,30 ^{ab}	0,060 ± 0,006 ^a
	PAB	Tet	4,97 ± 1,14 ^a	5,42 ± 0,51 ^a	0,91 ± 0,17 ^{ab}	0,045 ± 0,008 ^b
	PAB	Gam	5,94 ± 1,49 ^a	5,04 ± 0,14 ^a	1,18 ± 0,27 ^{ab}	0,056 ± 0,006 ^{ab}
12 dias	P	Tet	7,07 ± 1,31 ^a	4,86 ± 0,32 ^{ab}	1,46 ± 0,25 ^a	0,058 ± 0,005 ^a
	P	Gam	4,58 ± 1,49 ^b	5,13 ± 0,15 ^a	0,89 ± 0,27 ^b	0,056 ± 0,014 ^a
	PA	Tet	4,24 ± 0,46 ^b	5,20 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,09 ^b	0,051 ± 0,002 ^a
	PA	Gam	5,87 ± 1,99 ^{ab}	4,43 ± 0,54 ^b	1,35 ± 0,47 ^{ab}	0,055 ± 0,009 ^a
	PAB	Tet	5,05 ± 1,08 ^b	5,49 ± 0,47 ^a	0,93 ± 0,22 ^{ab}	0,053 ± 0,007 ^a
	PAB	Gam	4,19 ± 0,39 ^b	5,06 ± 0,04 ^{ab}	0,83 ± 0,08 ^b	0,061 ± 0,012 ^a
18 dias	P	Tet	4,80 ± 0,97 ^a	4,86 ± 0,42 ^{ab}	1,0 ± 0,27 ^{ab}	0,047 ± 0,007 ^a
	P	Gam	4,72 ± 0,41 ^a	4,52 ± 0,60 ^a	1,07 ± 0,23 ^a	0,054 ± 0,004 ^a
	PA	Tet	4,99 ± 0,52 ^a	4,77 ± 0,47 ^a	1,06 ± 0,18 ^a	0,051 ± 0,003 ^a
	PA	Gam	4,05 ± 1,31 ^a	4,91 ± 0,41 ^{ab}	0,84 ± 0,32 ^{ab}	0,048 ± 0,012 ^a
	PAB	Tet	3,55 ± 0,59 ^a	5,41 ± 0,26 ^b	0,66 ± 0,11 ^b	0,043 ± 0,007 ^a
	PAB	Gam	4,48 ± 0,83 ^a	4,72 ± 0,55 ^a	0,95 ± 0,17 ^a	0,056 ± 0,011 ^a

Fig. 18. Razão ficocianina: clorofila *a* (FC:Cl *a*) de tetrasporófitos (*tet*) e gametófitos (*gam*) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor de FC:Cl *a* registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

3.2.3. Conteúdo de MAAs

Os valores de concentração de MAAs obtidos durante o experimento foram, em geral, maiores do que os verificados ao início do experimento ($4,4 \pm 0,9$ para tetrasporófitos e $3,6 \pm 0,8$ mg. gMS⁻¹ para gametófitos) (Fig. 19). A concentração total de MAAs variou com todos os fatores avaliados (tipo de radiação, estágio reprodutivo e tempo) e a interação entre esses fatores (Tabela 3 e 4).

Tetrasporófitos de *M. laminarioides* apresentaram aumento no conteúdo de MAAs nos primeiros 2 dias de cultivo nos tratamentos PA e PAB, quando comparados ao tratamento P e ao valor inicial (Fig. 19). Aos 6 dias de cultivo, o conteúdo de MAAs foi similar nos três tratamentos e superior ao valor verificado no início do experimento (Tabela 7). Diminuição nas concentrações desses compostos foi observada aos 12 dias de cultivo no tratamento PA, quando comparado à P e PAB (Fig. 19). Já, no final do experimento, novamente verificou-se aumento de MAAs em todos os tratamentos, quando comparados ao valor inicial, mas não foram observadas diferenças significativas entre os três tratamentos (Tabela 7).

Gametófitos apresentaram um aumento na concentração de MAAs após 2 dias de cultivo nos três tratamentos, quando esses valores foram comparados aos valores verificados ao início do experimento. Nesse mesmo período, observou-se que a concentração de MAAs foi maior quando as algas foram submetidas à PAB e menor no tratamento P (Fig. 19). Já, aos 6 dias de cultivo, verificou-se que as concentrações de MAAs nos tratamentos PA e PAB diminuíram em relação aos valores verificados aos 2 dias de cultivo nesses mesmos tratamentos. Por outro lado, os valores de MAAs verificados em PA e PAB foram menores aos verificados no tratamento P aos 6 dias de cultivo. Após 12 dias de cultivo, as concentrações de MAAs foram similares entre os tratamentos P, PA e PAB. Aos 18 dias de cultivo, os valores de concentração de MAAs foram similares em todos os tratamentos, porém, foram maiores aos verificados ao início do experimento (Fig. 19).

Comparando-se os gametófitos e tetrasporófitos em cada um dos tratamentos P, PA e PAB), observaram-se maiores quantidades de MAAs em tetrasporófitos do que em gametófitos aos 18 dias de cultivo (Tabela 7; Fig. 19)

Quatro diferentes MAAs foram identificados em *Mazzaella laminarioides* durante o experimento, como verificado também no Capítulo 2. De acordo com a sua abundância, na ordem decrescente, foram identificados: shinorina, palitina, micosporina-glicina e

asterina. A asterina apresentou concentrações baixas (0,00 a 0,09 mg por grama de massa seca de alga) (Tabela 7).

Fig. 19. Conteúdo total de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) em tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao valor desses compostos registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

As concentrações de shinorina, embora tenham aumentado após 2 dias de cultivo em todos os tratamentos, diminuíram ao longo do tempo, tanto em tetrasporófitos quanto em gametófitos de *Mazzaella laminarioides* (Fig. 21), enquanto que, palitina, micosporina-glicina e asterina aumentaram ao longo do tempo (Fig. 20, 22 e 23). Isto se refletiu na proporção de cada um dos MAAs em relação ao total (Fig. 24). O percentual de shinorina apresentou uma tendência a diminuir em relação ao tempo, ao passo que a palitina e micosporina-glicina passaram a ser mais representativas. Esse resultado foi verificado independentemente do tipo de radiação ao qual a alga foi exposta.

Considerando-se a análise de cada MAA separadamente, notou-se que cada um deles respondeu de maneira distinta aos tratamentos e tempos utilizados. No segundo dia de cultivo, o conteúdo de micosporina-glicina em gametófitos e tetrasporófitos aumentou de forma similar em todos os tratamentos em relação à quantidade verificada ao início do experimento (Fig. 20). Nesse mesmo período, a síntese de shinorina e palitina foi favorecida principalmente, em gametófitos e tetrasporófitos expostos à PA e à PAB (Fig.

21 e 22). Aos 6 dias de cultivo, essa tendência manteve-se apenas para shinorina em tetrasporófitos. Entretanto, a concentração de shinorina em gametófitos e a concentração de palitina de ambos estádios reprodutivos foram maiores no tratamento P do que as concentrações verificadas em PA e PAB (Tabela 7). Deve-se notar ainda que shinorina e asterina apresentaram tendências opostas, quando comparados gametófitos e tetrasporófitos aos 6 dias (Fig. 21 e 23). Em tetrasporófitos, registraram-se maiores concentrações de shinorina e asterina nos tratamentos PA e PAB e menores em P. Entretanto, observou-se o inverso em gametófitos. Já, após 12 dias de cultivo, essas diferenças entre os tratamentos de radiação não foram observadas.

Fig. 20. Conteúdo de micosporina-glicina (Mic-Glic) em mg por g de massa seca (MS) em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo de desse MAA registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

Fig. 21. Conteúdo de shinorina em mg por g de massa seca (MS) em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* no início, e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse MAA registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

Fig. 22. Conteúdo de palitina em mg por g de massa seca (MS) em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* no início, e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse MAA registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

Fig. 23. Conteúdo de asterina em mg por g de massa seca (MS) em tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* no início, e após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse MAA registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=9.

Fig. 24. Proporção dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* expostas à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) por um período de 18 dias cultivo. Os dados são representados em relação ao conteúdo total de MAAs (100%) identificado em cada tratamento. N=9.

Tabela 7. Valores médios de diferentes tipos de MAAs de tetrasporófitos (Tet) e gametófitos femininos (Gam) de *Mazzaella laminarioides* expostos a radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo. Diferentes índices representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos e estádios reprodutivos (teste de Fisher LSD, N=9).

			MAAs	Mic-Glicina	Shinorina	Palitina	Asterina
Início	Tet		4,36 ± 0,86 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	3,32 ± 0,72 ^a	0,95 ± 0,17 ^a	0,01 ± 0,02 ^a
	Gam		3,64 ± 0,82 ^a	0,09 ± 0,04 ^a	2,38 ± 0,56 ^a	1,14 ± 0,43 ^a	0,02 ± 0,03 ^a
2 dias	Tet	P	4,73 ± 0,96 ^a	0,14 ± 0,06 ^a	3,42 ± 0,65 ^a	1,14 ± 0,30 ^a	0,04 ± 0,02 ^{ac}
		PA	6,02 ± 0,42 ^{bc}	0,15 ± 0,02 ^a	4,18 ± 0,37 ^{bc}	1,62 ± 0,15 ^b	0,08 ± 0,01 ^b
		PAB	5,54 ± 0,78 ^{bd}	0,17 ± 0,04 ^a	3,93 ± 0,63 ^{bc}	1,41 ± 0,22 ^b	0,03 ± 0,03 ^{ac}
	Gam	P	5,26 ± 1,10 ^{ad}	0,33 ± 0,15 ^b	3,38 ± 0,79 ^a	1,53 ± 0,25 ^b	0,03 ± 0,03 ^a
		PA	5,96 ± 0,74 ^b	0,27 ± 0,05 ^b	3,77 ± 0,75 ^{ab}	1,86 ± 0,24 ^c	0,06 ± 0,05 ^{cb}
		PAB	6,65 ± 0,73 ^c	0,29 ± 0,08 ^b	4,40 ± 0,42 ^c	1,90 ± 0,40 ^c	0,06 ± 0,03 ^{cb}
6 dias	Tet	P	6,22 ± 0,70 ^a	0,26 ± 0,06 ^a	3,72 ± 0,48 ^{ac}	2,23 ± 0,22 ^a	0,01 ± 0,02 ^{ad}
		PA	6,97 ± 0,48 ^b	0,16 ± 0,04 ^b	4,91 ± 0,37 ^b	1,86 ± 0,21 ^b	0,05 ± 0,03 ^b
		PAB	6,25 ± 1,38 ^{ab}	0,22 ± 0,05 ^{ab}	4,09 ± 1,03 ^{ac}	1,85 ± 0,33 ^b	0,09 ± 0,03 ^c
	Gam	P	6,15 ± 0,56 ^a	0,23 ± 0,04 ^{ab}	3,85 ± 0,46 ^c	1,97 ± 0,19 ^b	0,10 ± 0,01 ^c
		PA	4,13 ± 0,72 ^c	0,18 ± 0,08 ^{ab}	2,38 ± 0,46 ^d	1,53 ± 0,29 ^c	0,03 ± 0,04 ^{ab}
		PAB	3,58 ± 0,52 ^c	0,15 ± 0,02 ^b	2,24 ± 0,29 ^d	1,19 ± 0,23 ^d	0,00 ± 0,01 ^d
12 dias	Tet	P	4,95 ± 0,57 ^{ac}	0,64 ± 0,14 ^a	2,66 ± 0,37 ^{ab}	1,65 ± 0,20 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
		PA	4,20 ± 0,26 ^b	0,53 ± 0,04 ^{bc}	2,30 ± 0,20 ^{ac}	1,37 ± 0,10 ^b	0,00 ± 0,00 ^a
		PAB	5,14 ± 0,74 ^c	0,55 ± 0,17 ^{ab}	3,03 ± 0,41 ^b	1,55 ± 0,26 ^{ab}	0,00 ± 0,01 ^a
	Gam	P	4,71 ± 0,67 ^{bc}	0,49 ± 0,16 ^{bd}	2,46 ± 0,61 ^{ac}	1,75 ± 0,25 ^a	0,01 ± 0,02 ^a
		PA	4,34 ± 0,64 ^{ab}	0,59 ± 0,18 ^{ac}	2,15 ± 0,49 ^c	1,62 ± 0,16 ^a	0,01 ± 0,02 ^a
		PAB	4,27 ± 0,44 ^b	0,45 ± 0,06 ^{cd}	2,13 ± 0,27 ^c	1,67 ± 0,22 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
18 dias	Tet	P	6,18 ± 0,58 ^a	0,67 ± 0,13 ^{ab}	3,59 ± 0,16 ^a	1,85 ± 0,22 ^{ab}	0,03 ± 0,04 ^a
		PA	6,04 ± 0,40 ^a	0,75 ± 0,12 ^b	3,46 ± 0,49 ^a	1,76 ± 0,13 ^{ab}	0,08 ± 0,02 ^b
		PAB	5,90 ± 0,67 ^a	0,64 ± 0,06 ^{ad}	3,58 ± 0,52 ^a	1,64 ± 0,21 ^b	0,05 ± 0,03 ^b
	Gam	P	5,05 ± 0,94 ^b	0,52 ± 0,14 ^{ce}	2,57 ± 0,54 ^b	1,90 ± 0,32 ^a	0,06 ± 0,03 ^b
		PA	5,12 ± 0,98 ^b	0,56 ± 0,09 ^{de}	2,60 ± 0,57 ^b	1,89 ± 0,35 ^a	0,06 ± 0,04 ^b
		PAB	5,16 ± 0,65 ^b	0,63 ± 0,17 ^{ad}	2,60 ± 0,40 ^b	1,86 ± 0,16 ^{ab}	0,07 ± 0,03 ^b

3.2.4. Conteúdo de C, N e H

Os valores de C, N e H de gametófitos e tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* obtidos ao início do experimento foram, em geral, menores as registrados após a exposição a P, PA e PAB. Os conteúdos de C, H, N e C:N de amostras de tetrasporófitos e gametófitos não apresentaram diferenças quando expostos a P, PA e PAB aos 18 dias (Fig. 25 - 28). Já, aos 2 dias, observaram-se diferenças na concentração de H em gametófitos ($P < PA \geq PAB$) e na concentração de C em tetrasporófitos ($P < PA = PAB$). As diferenças verificadas na concentração de C em gametófitos não afetaram a razão C:N nos três tratamentos nesse período (Fig. 28).

Além do tipo de radiação, os outros dois fatores avaliados neste experimento (tempo e estágio reprodutivo) apresentaram efeitos significativos nas concentrações de C, N, H e na razão C:N. A variável tempo teve efeito no conteúdo C, H e na razão C:N, entretanto a variável estágio reprodutivo teve efeito no conteúdo C, N e razão C:N (Tabela 3 e 4). Comparando-se os dois estádios reprodutivos, observou-se que em geral,

os gametófitos apresentaram maiores concentrações de C, N e maiores razões de C:N em todos os tratamentos e tempos (Tabela 8).

Fig. 25. Conteúdo de carbono (mg.gMS^{-1}) em tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse elemento registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 26. Conteúdo de hidrogênio (mg.gMS^{-1}) em tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse elemento registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 27. Conteúdo de nitrogênio (mg.gMS^{-1}) em ápices de tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação ao conteúdo desse elemento registrado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Fig. 28. Razão C:N em ápices de tetrasporófitos (tet) e gametófitos femininos (gam) de *Mazzaella laminarioides* no início e após 2 e 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação num mesmo período de tempo e em relação à razão C:N registrada no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Tabela 8. Comparação dos valores médios do conteúdo de carbono (C), Hidrogênio (H), nitrogênio (N) e da relação C:N em tetrásporófitos (Tet) e gametófitos femininos (Gam) de *Mazzaella laminarioides* expostos a radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) após 2, 6, 12 e 18 dias de cultivo. Diferentes índices ao lado dos valores representam a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos e estádios reprodutivos num mesmo período de tempo (teste de Fisher LSD com N=3).

			C	H	N	C:N
Início	Tet		235,5 ± 3,7	41,7 ± 1,3	22,6 ± 0,6	10,4 ± 0,1
	Gam		265,3 ± 1,2	45,1 ± 0,6	24,6 ± 0,1	10,8 ± 0,1
2 dias		P	241,5 ± 3,0 ^a	45,7 ± 0,8 ^{abd}	25,3 ± 0,9 ^a	9,5 ± 0,2 ^{ab}
	Tet	PA	247,3 ± 3,3 ^{ab}	43,9 ± 1,0 ^a	26,1 ± 1,0 ^a	9,5 ± 0,3 ^{ab}
		PAB	250,0 ± 2,1 ^b	44,2 ± 1,5 ^{ab}	27,4 ± 1,7 ^a	9,1 ± 0,5 ^a
		P	268,6 ± 4,2 ^c	46,2 ± 1,1 ^{bcd}	26,8 ± 1,1 ^a	10,0 ± 0,3 ^{bc}
	Gam	PA	270,0 ± 1,4 ^c	48,6 ± 1,4 ^c	26,4 ± 1,3 ^a	10,2 ± 0,4 ^c
		PAB	269,7 ± 3,3 ^c	46,4 ± 0,5 ^d	27,0 ± 1,3 ^a	10,0 ± 0,4 ^{bc}
18 dias		P	255,3 ± 7,4 ^a	44,8 ± 1,2 ^a	30,1 ± 1,3 ^a	8,5 ± 0,1 ^a
	Tet	PA	250,6 ± 1,0 ^a	44,2 ± 0,6 ^a	28,2 ± 0,6 ^a	8,9 ± 0,2 ^{ab}
		PAB	250,1 ± 9,3 ^a	46,0 ± 2,2 ^a	28,8 ± 2,8 ^a	8,7 ± 0,5 ^{ac}
		P	269,2 ± 5,3 ^b	46,0 ± 1,2 ^a	28,3 ± 2,1 ^a	9,5 ± 0,5 ^b
	Gam	PA	270,6 ± 1,8 ^b	46,2 ± 0,7 ^a	28,8 ± 0,8 ^a	9,4 ± 0,2 ^{bc}
		PAB	271,4 ± 5,9 ^b	44,5 ± 1,2 ^a	29,3 ± 3,0 ^a	9,3 ± 0,7 ^{bc}

3.2.5. Rendimento dos polissacarídeos

O rendimento dos polissacarídeos de tetrásporófitos de *Mazzaella laminarioides* obtidos aos 18 dias de cultivo nos tratamentos P, PA e PAB foram similares (Fig. 29; Tabela 3). Esses valores foram também similares aos verificados ao início do experimento ($16,4 \pm 1,5$). Por outro lado, o rendimento dos polissacarídeos de gametófitos variou entre os tratamentos (Fig. 29; Tabela 3), obtendo-se um maior rendimento em algas submetidas à P ($38,5 \pm 1,4$) e menor naquelas submetidas à PA ($10,7 \pm 0,9$). O valor obtido ao início do experimento ($24 \pm 0,001$) foi similar ao valor verificado em algas submetidas a PAB ($22,1 \pm 2,1$).

Fig. 29. Teor de carragananas de tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* no início e após 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos de radiação e em relação ao valor de rendimento obtido no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tratamentos. N=3.

Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos de tetrasporófitos e gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* submetidos aos distintos tratamentos de radiação solar foram obtidos para todas as repetições de cada tratamento. Porém, como exibiram perfis semelhantes, apenas um espectro representativo é apresentado (Fig. 30 e 31). A partir deste espectro, verificou-se que o polissacarídeo de gametófitos femininos de *Mazzaella laminarioides* é uma carragenana com estrutura do tipo kappa-iota (κ - ι), uma vez que ocorrem bandas de absorção características desses tipos de carragenana (930 , 840 e 805 cm^{-1}) (Fig. 30). A banda em 930 cm^{-1} corresponde ao movimento de vibração do anel 3,6-anidro-D-galactose, enquanto que as bandas com absorção a 840 e 805 cm^{-1} correspondem a resíduos de hemi-ester sulfato em C-4 da galactopiranosil e C-2 de 3,6 anidro-D-galactose (Tabela 8, Capítulo 2). A análise qualitativa dos espectros FT-IR normal e com segunda derivada não mostrou diferenças entre os tratamentos avaliados (Fig. 30).

O principal polissacarídeo presente nas amostras de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foi o carragenano tipo lambda (λ), como verificado no Capítulo 2. Os

sinais apresentados no espectro FT-IR deste polissacarídeo correspondem à presença de sulfato (580 cm^{-1}) ligado ao C-2 (843 cm^{-1}) e ao C-6 (820 cm^{-1}). Esse último sinal é característico para carragenana λ . O sinal em 930 cm^{-1} , característico de carragenano tipo kappa (κ), não foi observado em tetrasporófitos.

A análise qualitativa dos espectros FT-IR normal e com segunda derivada mostraram diferenças entre os tratamentos avaliados (Fig. 31).

Fig. 30. Espectro FT-IR de polissacarídeos extraídos de gametófitos de *Mazzaella laminarioides* no início e após 18 dias de cultivo em radiação PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). A: espectro normal entre $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, B: segunda derivada na região entre $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, C: segunda derivada na região entre $1250\text{--}750\text{ cm}^{-1}$.

Fig. 31. Espectro FT-IR de polissacarídeos extraídos de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* após 18 dias de cultivo nos tratamentos PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB). A: espectro normal entre 4000-400 cm^{-1} , B: segunda derivada na região entre 2000-400 cm^{-1} , C: segunda derivada na região entre 1250-750 cm^{-1} .

4. DISCUSSÃO

4.1. Radiação solar (PAR e UV)

Os registros da espessura da camada de ozônio sobre a cidade de Punta Arenas entre os anos 1978-1987, período considerado como não influenciado pelo AOH, mostram para o mês de outubro um valor de 336 ± 46 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). A partir da década de 90, os valores de concentração de ozônio sobre Punta Arenas variou entre 360 e 260 UD em decorrência da presença de massas de ar pobre em ozônio (CASICCIA *et al.*, 2003). Considerando-se esses últimos valores, a maioria dos dias em que o experimento foi realizado apresentou condições esperadas, com exceção dos dias 4 e 5 de outubro (236 e 246 UD, respectivamente). Embora, esses dois últimos valores estejam abaixo dos valores referenciais, o local do experimento não esteve sob a influência do AOH, que corresponde a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou menor a 220 UD (CASICCIA *et al.*, 2003).

A ampla variação na irradiância e doses de UV e PAR em cada um dos dias e entre os dias em que foram realizados o experimento reflete as mudanças nas condições ambientais durante todo o período. Todos os dias do experimento apresentaram algum grau de cobertura de nuvens (observação pessoal), situação comum para a primavera na região de Magallanes.

Ápices de *Mazzaella laminarioides* foram expostos a maiores doses de UV-B entre os dias 4 e 5 de outubro, uma vez que nesses dias foram registrados os menores valores de concentração de ozônio sobre a cidade de Punta Arenas (236 e 246 UD, respectivamente). Comparando-se as doses diárias entre os dias 2 (nublado) e 4 (com menor cobertura de nuvens) de outubro, observa-se um aumento de 125% para a última data. Essa diferença seria decorrente da presença de nuvens, mas também das diferenças na espessura da camada de ozônio. No dia 2 de setembro, registraram-se 299 UD, enquanto que no dia 4 de outubro registraram-se 236 UD. A redução de 21% na concentração da camada de ozônio promoveu 125% de aumento na dose diária. Paradoxalmente, quando comparamos as doses diárias dos dias 4 (236 UD) e 14 de outubro (363 UD), observou-se que a diminuição de 34% na camada de ozônio promoveu apenas um aumento de 63% na dose diária de UV-B. Essa diferença resultou da variação climática ao longo dos dias, com menor quantidade de nuvens no dia 14 de outubro.

Ápices de *Mazzaella laminarioides* foram também submetidos a baixas doses de UV-B durante o experimento, principalmente entre os dias 9 e 11 de outubro. Nesse período, registraram-se os maiores valores de concentração de ozônio, inclusive, maiores aos registrados historicamente antes e depois da década de 90. Isto mostra a grande variação no ozônio e UV-B em curtos períodos de tempo, o que poderia ser prejudicial para os organismos que ficam expostos a essa radiação durante as horas de maré baixa. Assim, os ápices de *M. laminarioides* tiveram que se aclimatar não apenas às variações diárias, mas também às variações decorrentes na concentração da camada de ozônio.

4.2. Efeitos da UV-B em *Mazzaella laminarioides*

Nos ecossistemas naturais, a fisiologia das algas é influenciada não apenas pela PAR, mas também pela radiação UV (UV-A e UV-B) (MAKAROV & VOSKOBOINIKOV, 2001). A radiação UV pode prejudicar a fisiologia e o desenvolvimento de organismos marinhos, dentre eles, as algas vermelhas (FIGUEROA *et al.*, 1997a; JIMÉNEZ *et al.*, 1998; FLORES-MOYA *et al.*, 1998; GÓMEZ *et al.*, 2001; FIGUEROA *et al.*, 2003c; GÓMEZ *et al.*, 2005). Neste capítulo, embora alguns parâmetros fisiológicos avaliados para *Mazzaella laminarioides* apresentaram variações pontuais, o crescimento e a produção de carragenanas dessa espécie não foram influenciados quando as algas foram expostas aos altos níveis de UV-B solar. A tolerância a altas irradiâncias PAR e UV estaria no fato de que *M. laminarioides* ocorre no médiolitoral, onde constantemente enfrenta variações da radiação solar, especialmente durante a maré baixa. Contrariamente, aquelas espécies que ocorrem no infralitoral seriam mais sensíveis a altos níveis de PAR e UV, uma vez que em seu habitat frequentemente não são submetidas a grandes variações de radiação solar (van de Poll *et al.*, 2001).

É importante ressaltar que, possivelmente, nos frascos de acrílico utilizados neste experimento, os ápices de *M. laminarioides* receberam maiores irradiâncias PAR e UV do que os exemplares de populações naturais, pois, nessas populações os indivíduos ficam expostos ao ar e radiação direta apenas durante a maré baixa, enquanto nos períodos de maré alta podem ficar submersos até 50 cm. Durante os períodos submersos, a fotoinibição pode diminuir, uma vez que a radiação solar (PAR+UV) pode ser absorvida e dispersada pela água e as partículas contidas nela, além de haver a proteção pelos seus congêneres através do efeito sombra. O fato de estar diretamente exposta a radiação PAR e UV durante 18 dias, sem a influência das marés, sugere que a espécie

está adaptada a alta radiação solar, incluindo altos níveis de UV-B, verificados durante o experimento em decorrência da presença do “buraco” de ozônio no local de estudo. Os resultados obtidos mostraram que a exclusão de UV-B do espectro solar não alterou o crescimento de tetrasporófitos nem gametófitos, pelo menos no período de 18 dias.

Esporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* estariam adaptados a altas irradiâncias talvez pela ocorrência de fotoinibição dinâmica, como já reportado para a espécie no litoral de Valdivia, Chile (GÓMEZ *et al.*, 2004). Essa estratégia implicaria apenas na perda da funcionalidade do centro de reação do PSII, mas não na redução na concentração de proteína D1 e pigmentos fotossintetizantes. De fato, em geral, as concentrações de FE e FC em todos os tratamentos e tempos de radiação foram semelhantes às verificadas no início do experimento (Fig. 12 e 13), com exceção de tetrasporófitos expostos à PA e PAB aos 12 dias de cultivo. A adaptação a altas irradiâncias poderia também estar relacionada à presença de pigmentos fotoprotetores, como os diferentes MAAs verificados na espécie. Esses compostos poderiam contribuir para a proteção contra a UVR, não apenas pela absorção da mesma, mas também pela dissipação dessa energia como calor (KARENTZ *et al.*, 1991a; COCKELL & KNOWLAND, 1999; CONDE *et al.*, 2000; CONDE *et al.*, 2004). Os MAAs poderiam ainda contribuir para a regulação do potencial osmótico de *M. laminarioides* em períodos de maré baixa, como sugerido para células de cianobactérias expostas a condições de hipersalinidade (KARSTEN, 2002). Esses compostos poderiam atuar ainda como antioxidantes (DE LA COBA *et al.*, 2009), neutralizando ROS, que são estimuladas por altas irradiâncias PAR e UV (MALANGA & PUNTAROLO, 1995; CULLEN & DAVISON, 1999a,b; Burrit *et al.*, 2002; LEE & SHIU, 2009).

O conteúdo de N em gametófitos e tetrasporófitos foram semelhantes em todos os tratamentos de radiação, no entanto, aumentou proporcionalmente ao longo do tempo. Isso sugere que os ápices captaram N da água e assimilaram esse elemento em semelhantes quantidades nos três tratamentos de radiação. Esses dados sugerem que o N não foi limitante durante o cultivo.

O aumento de N promoveu uma diminuição na razão C:N aos 2 e 18 dias de cultivo, quando essas razões foram comparadas às verificadas no início do experimento. A razão C:N é um parâmetro relacionado à nutrição em longo prazo e empregado em modelos de produtividade primária (GEIDER & LA ROCHE, 2002; BARR & REES, 2003). Embora a razão C:N em ápices de *Mazzaella laminarioides* tenha aumentado durante o experimento, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos. Esses valores

estiveram entre 8 e 10, o que poderia indicar uma deficiência de N segundo a razão clássica de Redfield: 6,6 (REDFIELD *et al.*, 1963). No entanto, essa razão varia de acordo com a espécie e com as condições nutricionais a que os organismos estão submetidos (GEIDER & LA ROCHE, 2002; HO *et al.*, 2003). Deficiência de N (C:N= 14,30) foi verificada quando ápices de *M. laminarioides* foram cultivados durante 18 dias sem a adição de NO₃ (Capítulo 2). Já, adição de 0,75 mM de NO₃ promoveu uma diminuição nessa razão (9,5). No entanto, o crescimento em ambas condições foi semelhante. Esses resultados, sugerem que os ápices de *M. laminarioides* utilizados no atual experimento não apresentaram deficiência de N ao ponto de limitar o crescimento. Poder-se-ia sugerir também que a diminuição das taxas de crescimento de gametófitos e tetrasporófitos em todos os tratamentos não parecem ter sido limitadas pelo nitrogênio disponível na água e poderia estar relacionada ao excesso de PAR.

O nitrato disponível no meio teria sido rapidamente captado e assimilado na forma de compostos nitrogenados, como MAAs, Cl *a* e PS. De fato, aos dois dias de cultivo, verificou-se aumento de Cl *a* em gametófitos, aumento de PS em tetrasporófitos, e aumento de MAAs nos dois estádios reprodutivos, quando comparados ao valor inicial. Certos compostos poderiam ser usados como reserva de N e conseqüentemente poderiam contribuir na manutenção das taxas de crescimento como já verificado para outras espécies (FIGUEROA *et al.*, 2008). Dentre estes compostos, estariam os MAAs, que dependem da disponibilidade de N na forma de distintos aminoácidos para sua síntese (CARRETO *et al.*, 2005). O uso dos MAAs como fonte de N tem sido sugerido em espécies de *Porphyra* (KORBEE-PEINADO *et al.* 2004; KORBEE *et al.*, 2005b). Esses compostos poderiam ter um papel similar aos das ficobiliproteínas, quando houvesse deficiência de N no meio (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980; SCHENK *et al.*, 1983; TALARICO & MARANZANA, 2000).

As menores taxas de crescimento foram registradas aos seis dias de cultivo e seriam o resultado de um processo de aclimação às novas condições de cultivo. A aclimação, possivelmente, levou à síntese de MAAs em tetrasporófitos expostos aos três tratamentos de radiação. Entretanto, em gametófitos verificou-se aumento de MAAs apenas no tratamento P e aumento de Cl *a* nos tratamentos PA e PAB.

As altas taxas de crescimento verificadas aos 12 dias de cultivo em *M. laminarioides* teriam sido mantidas pela diminuição de MAAs, principalmente shinorina, quando comparados os valores registrados aos 2 e 6 dias. Já, as concentrações de FE, Cl *a*

e OS, aos 12 dias de cultivo, mantiveram-se, em geral, sem variação quando comparadas aos valores verificados aos 6 dias de cultivo. Portanto, a diminuição de MAAs permite supor que esses compostos foram degradados, e o nitrogênio foi usado em outras vias metabólicas permitindo assim o crescimento.

O desvio de N a partir dos MAAs para compor compostos indispensáveis ao crescimento poderia ter ocorrido pela incapacidade dos ápices de *M. laminarioides* de captar o N da água em quantidades suficientes durante esse período. Essa incapacidade poderia estar relacionada à maior irradiância solar, principalmente UV-B, verificada nesse período (entre 6 e 12 dias de cultivo). O efeito inibitório da UV na absorção de N inorgânico em algas é bem conhecido (DÖHLER *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1995; DÖHLER, 1996). Os MAAs que sofreram redução neste período foram, em ordem decrescente, shinorina, asterina e palitina. Esses três compostos possuem dois átomos de N na sua estrutura (CARRETO *et al.*, 2005), ao passo que a micosporina-glicina, que possui um átomo de N, aumentou aos 12 dias de cultivo. Essa variação poderia ser considerada como uma estratégia para aportar N para outras vias metabólicas sem diminuir em demasia os níveis de MAAs totais, nem a capacidade de absorção e propriedades antioxidantes desses compostos. De fato, a micosporina-glicina, além de ter maior absorbância em UV-B (310nm), possui atividade antioxidante, neutralizando ROS (DUNLAP & YAMAMOTO, 1995). Por outro lado, os carotenóides podem auxiliar na função de fotoproteção através da dissipação de excesso de energia (HAVAUX & NIYOGLI, 1999) e como antioxidantes (EDGE *et al.*, 1997). Em *M. laminarioides* verificou-se que o conteúdo de carotenóides totais foi similar ou até maior durante o experimento quando comparado ao valor inicial.

Já, aos 18 dias, houve diminuição no crescimento sugerindo algum efeito inibitório, como a falta de nutrientes. Outra possibilidade seria um efeito acumulativo pelo excesso de PAR ao longo do tempo, pois *Mazzaella laminarioides* foi cultivada em altas irradiâncias, talvez maiores do que às recebidas pelas algas no campo. No entanto, pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis e MAAs apresentaram concentrações relativamente semelhantes ou até superiores aos valores registrados no início do experimento e aqueles verificados após 12 dias de cultivo, sugerindo talvez uma estabilização nas taxas de crescimento.

O efeito da alta irradiância PAR e UV-B em pigmentos fotossintetizantes, assim como em muitos alvos moleculares e processos fisiológicos é espécie-específico (ROLEDA *et al.*, 2007). Dessa maneira, é possível encontrar variadas respostas desse parâmetro à altos valores de PAR e UV-B na literatura. Em diversas espécies de Rhodophyta, têm-se observado que a concentração de pigmentos é alterada com um aumento na radiação UV. Diferentes doses de radiação UV e diferentes tempos de exposição têm promovido uma diminuição na concentração de Cl *a* em *Chondrus crispus* (AGUIRRE-VON-WOBESER *et al.*, 2000; YAKOVLEVA & TITLYANOV, 2001), *Palmaria palmata* e *Phycodrys rubens* (BISCHOF *et al.*, 2000), *Eucheuma strictum* (WOOD, 1989) e *Gracilaria edulis* (ESWARAN *et al.*, 2002). Entretanto, a radiação UV-B promoveu um aumento na concentração de Cl *a* em *G. chilensis* (GÓMEZ *et al.*, 2005). Estímulos à síntese de Cl *a* e carotenóides em tratamentos contendo radiação UV-B foram também reportados em *Ulva rígida* (ALTAMIRANO *et al.*, 2000a). Já, no caso de estádios jovens e maduros de *Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus*, o tratamento com PAR+UVA+UVB causou aumento nos carotenóides totais, mas não no conteúdo de clorofila, o que foi relacionado ao papel fotoprotetor desses carotenóides na dissipação de energia da radiação UV (ROLEDA *et al.*, 2004a). Em *Mazzaella laminarioides*, em geral, a presença de radiação UV-B solar não promoveu diminuição no conteúdo de Cl *a* nos dois estádios reprodutivos, sugerindo que esse pigmento não seja afetado negativamente pela presença de elevadas doses de UV-B solar. Em *Mazzaella laminarioides*, essa radiação promoveu maiores concentrações de Cl *a* e carotenóides totais em tetrasporófitos após 18 dias de cultivo, quando comparados aos tratamentos sem UV-B.

A fotodestruição de pigmentos parece ser um processo natural, envolvido na proteção dos sistemas fotossintetizantes em relação a mudanças bruscas de irradiância de curta duração (TALARICO, 1996; FIGUEROA *et al.*, 1997a; ROLEDA *et al.*, 2004a). FIGUEROA *et al.* (1997a) reportaram que alterações no conteúdo pigmentar ocorrem diariamente, como descrito para *Porphyra leucosticta*, em que a FE e a FC, assim como a Cl *a*, são danificadas em condições de excesso de radiação solar (PAR+UV-A+UV-B), podendo ser recuperadas no decorrer do dia (FIGUEROA *et al.*, 1997a). Esses autores verificaram que as concentrações de FE e FC diminuíram fortemente durante o período de 12:00-13:30h, quando os níveis de radiação solar eram elevados, enquanto que no início da manhã e finais de tarde, as concentrações eram maiores. Em *Mazzaella laminarioides* o conteúdo de ficobiliproteínas foi avaliado sempre em horário próximo ao meio dia, verificando-se que o conteúdo de FE e FC, em geral, não foi alterado pela

radiação UV-B aos 2 e aos 18 dias de cultivo. Entretanto, aos 12 dias, os conteúdos de FE e FC foram menores em tetrasporófitos expostos à UV-B e à UV-A do que naqueles expostos apenas à PAR. Porém, não é possível relacionar essa diferença à degradação de FE e FC em presença de radiação UV-B, uma vez que os valores desses pigmentos foram semelhantes aos 6 e aos 12 dias de cultivo. A diferença teria ocorrido pela síntese de FE e FC em tetrasporófitos expostos à PAR e PAR+UV-A. Assim, sugere-se que o aumento de radiação UV-B verificada no período entre os 6 e 12 dias não promoveu a síntese de FE e FC em tetrasporófitos e gametófitos.

4.3. Variação intraespecífica

Estudos comparando a sensibilidade de dois estádios reprodutivos isomórficos são escassos na literatura. Baseados em dois artigos avaliando o crescimento de tetrasporófitos (NAVARRO *et al.*, 2010c) e gametófitos (NAVARRO *et al.*, 2010b) jovens de *Iridaea cordata* expostos à PAR e PAR+UV-B, observou-se que diferentes fases do histórico de vida respondem de maneira diferente quando expostas às mesmas doses de UV-B artificial. Em *Mazzaella laminarioides*, os diferentes tratamentos de radiação solar não promoveram efeitos deletérios em tetrasporófitos nem em gametófitos. No entanto, diferenças entre esses dois estádios foram verificadas aos seis dias de cultivo, em que gametófitos, em geral, apresentaram maiores taxas de crescimento que os tetrasporófitos, sugerindo que os primeiros poderiam se aclimatar mais rapidamente a mudanças na irradiância PAR e UV do que os tetrasporófitos. Após esse período inicial, os tetrasporófitos ter-se-iam aclimatado, uma vez que a exposição à radiação solar durante 12 e 18 dias de cultivo promoveu taxas de crescimento semelhantes entre gametófitos e tetrasporófitos, com exceção do observado aos 12 dias em PAB. Nessa situação, verificou-se maior crescimento de gametófitos, sugerindo que esse estágio estaria mais adaptado a altas irradiâncias de UV-B, uma vez que nesse período registram-se os maiores valores de irradiância UV-B. Esses dados corroboram observações em *Iridaea cordata*, em que gametófitos foram menos sensíveis que tetrasporófitos, quando expostos a UV-B artificial (NAVARRO *et al.*, 2010b,c). Por outro lado, nossos dados não concordam com o que foi reportado para *Gracilaria caudata* (ORNELLAS, 2011) e para esporos de *Gigartina skottsbergii* expostos à radiação UV-B (ROLEDA *et al.*, 2008). Nesses casos, carpósporos de *G. skottsbergii* e gametófitos de *G. caudata* mostraram maior tolerância à UV que tetrásporos e tetrasporófitos, respectivamente.

A tolerância a altas irradiâncias PAR e UV observada em gametófitos de *Mazzaella laminarioides* estaria no fato de que esse estágio reprodutivo se distribui principalmente no médiolitoral superior, enquanto que os tetrasporófitos ocorrem no médiolitoral inferior, como já reportado em estudos populacionais (LUXORO & SANTELICES, 1987; MANSILLA & NAVARRO, 2003b). Dessa maneira, os gametófitos estariam mais adaptados às mudanças de radiação ocorridas durante o dia e durante longos períodos de tempo. A diferença na sensibilidade à radiação solar poderia então explicar a dominância da fase gametofítica em algumas populações de *M. laminarioides* na costa chilena estudadas em San Antonio (HANNACH & SANTELICES, 1985; LUXORO & SANTELICES, 1989), Matanza (SANTELICES & NORAMBUENA, 1987) e Mehuin (WESTERMEIER *et al.*, 1987). Já, no estreito de Magallanes, a dominância da fase gametofítica foi registrada no inverno (75%), enquanto que na primavera a relação entre as fases foi de 1:1 (MANSILLA & NAVARRO, 2003b).

A maior tolerância dos gametófitos de *Mazzaella laminarioides* quando comparados aos tetrasporófitos poderia estar relacionada também à maior quantidade de carragenana nas paredes celulares, observada nesses exemplares. O maior conteúdo de polissacarídeos poderia promover um aumento na resistência ao dessecação dos gametofíticos.

No início do experimento, verificou-se que a concentração de MAAs foi semelhante entre tetrasporófitos e gametófitos de *Mazzaella laminarioides* (Tabela 7). Isso indicaria que no campo, ambos estádios apresentam semelhantes concentração de MAAs, uma vez que os ápices de *M. laminarioides* foram coletados em populações naturais um dia antes de iniciar o experimento. Esses dados concordam com o verificado para as fases isomórficas de *Gigartina skottsbergii* e *Iridaea cordata* da antártica, entre as quais não foram verificadas diferenças no conteúdo de MAAs (HOYER *et al.*, 2001). No entanto, aos 18 dias, gametófitos e tetrasporófitos de *M. laminarioides*, quando cultivados nos diferentes tratamentos apresentaram uma dinâmica diferente no acúmulo de MAAs (Tabela 7; Fig. 24). Aos dois dias de cultivo, os gametófitos sintetizaram principalmente micosporina-glicina e palitina, promovendo um aumento de MAAs totais em todos os tratamentos, mas principalmente em PAB. A rápida síntese de MAAs reforça a sugestão de que os gametófitos respondam mais rapidamente a altas irradiâncias, principalmente

UV-B, do que os tetrasporófitos. Esses últimos teriam aumentado a concentração total de MAAs aos 6 dias cultivo. Esse aumento teria ocorrido pela síntese de todos os tipos de MAAs, mas principalmente pela síntese de shinorina. Ao final do período experimental (18 dias), observou-se que os tetrasporófitos acumularam mais MAAs do que os gametófitos em todos os tratamentos. Isso indicaria que os tetrasporófitos, embora tenham produzido mais MAAs do que os gametófitos, o fizeram em detrimento às taxas de crescimento, uma vez que esse parâmetro foi semelhante entre gametófitos e tetrasporófitos nessa data.

No início do experimento, verificou-se que o conteúdo de carbono foi maior em gametófitos do que em tetrasporófitos. Essa diferença poderia explicar o maior teor de carraganana verificado em gametófitos (24%) do que em tetrasporófitos (16%). Durante o experimento, os tetrasporófitos teriam assimilado percentualmente maior quantidade de carbono. Aos dois dias, teriam assimilado entre 2,5 e 5,8%, em relação ao valor inicial, enquanto que os gametófitos teriam assimilado apenas valores entre 1,3 e 1,6%. Já, aos 18 dias, os tetrasporófitos teriam assimilado valores entre 6 e 7,8%, enquanto que gametófitos assimilaram valores entre 1,5 e 2,3% em relação ao valor inicial. Essa mesma tendência foi observada na assimilação de nitrogênio. Tetrasporófitos assimilaram entre 10 e 17% aos 2 dias, enquanto que, aos 18 dias, assimilaram entre 20 e 25% de nitrogênio em relação ao valor inicial. No caso de gametófitos, esses valores variaram entre 7 e 9%, aos 2 dias, e entre 13 e 16%, aos 18 dias de cultivo. É importante ressaltar que esses valores não dependeram do tipo de radiação, porém, variaram com o estágio reprodutivo. O maior conteúdo de nitrogênio verificado em tetrasporófitos ao final do experimento teria promovido a maior concentração de MAAs, quando esses valores foram comparados com os observados em gametófitos.

Finalmente, embora tenham sido observadas algumas alterações em parâmetros bioquímicos de tetrasporófitos e gametófitos expostos a radiação UV-B, essas alterações não promoveram efeitos deletérios que prejudicassem a sobrevivência e a produção de carragenanas de *Mazzaella laminarioides* no longo prazo (18 dias). É importante salientar ainda que tetrasporófitos e gametófitos se desenvolveram diferentemente frente aos tratamentos de radiação testados, refletindo sua distribuição vertical no costão. Estudos sobre diferenças nas respostas de diferentes fases do histórico de vida em relação ao aumento de UV-B solar são ainda necessários, uma vez que a alternância de gerações

poderia ser interrompida causando um desbalanço nas proporções entre essas fases e uma diminuição na diversidade genética, prejudicando a permanência da espécie num determinado habitat.

Capítulo 4

Variação diária na concentração de MAAs em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) expostos à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

ABSTRACT

In this chapter, we evaluated the mycosporine-like amino acids (MAAs) content of *Mazzaella laminarioides* tetrasporophytes exposed to solar radiation in a day with ozone layer depletion in Punta Arenas, Chile. Additionally, the effect of NO₃ supply on MAAs content was evaluated. Apical segments were cultivated under three treatments of solar radiation (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) and with (0,38 mM) or without NO₃ supply. To determinate MAAs concentration samples were taken at the following times: i) 9:00h (initial value); ii) 14:00h; iii) 18:00h; and iv) 9:00h (next day, recovery period). Apical segments cultivated without NO₃ showed a MAAs increase only in PA treatment at 14:00h. However, the NO₃ supply promoted an increase of MAAs in all radiation treatments and in different exposure times. The greatest accumulations of MAAs were observed at 14:00h in P and PAB treatment, whereas the greatest value in PA treatment was observed in the afternoon. Four MAAs were identified: shinorine, asterine, Palythine, and micosporine-glycine. In general, an inverse relationship was observed between shinorine and Palythine, and between micosporina-glycine and asterine. Our results suggest a high photoprotective potential against UV and PAR in *M. laminarioides* by MAAs synthesis, that is related to nitrogen supply. The presence of a daily cycle in the MAAs production with higher concentrations of these compounds at noon, a period with higher levels of irradiance is discussed. It is also discussed an interconversion among MAAs that could easily be adjusted to the irradiance conditions.

RESUMO

Neste capítulo, foram avaliadas as concentrações de aminoácidos tipo miscosporina (MAAs) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à radiação solar durante um dia com diminuição na concentração da camada de ozônio em Punta Arenas, Chile. Além disso, avaliou-se o afeito do suprimento de NO_3 no conteúdo de MAAs. Segmentos apicais foram cultivados em três tratamentos de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) com adição (0,38 mM) e sem adição de NO_3 ao meio de cultivo. Amostras para quantificação de MAAs foram obtidas nos seguintes horários: i) 9:00h (valor inicial); ii) 14:00h; iii) 18:00h; iv) 9:00h (dia seguinte, período de recuperação). Segmentos apicais cultivados sem adição de NO_3 apresentaram aumento no conteúdo de MAAs apenas no tratamento PA as 14:00h. Entretanto, a adição de NO_3 promoveu o aumento desses compostos em todos os tratamentos, embora em diferentes tempos de exposição. O maior acúmulo de MAAs nos tratamentos P e PAB ocorreu as 14:00h, enquanto que no tratamento PA esses aumento ocorreu a tarde. Quatro diferentes MAAs foram identificados: shinorina, palitina, asterina e micosporina-glicina. Em geral, uma relação inversa foi observada entre shinorina e palitina e entre micosporina-glicina e asterina. Nossos resultados sugerem um alto potencial de fotoproteção contra as radiações UV e PAR através da síntese de MAAs para *M. laminarioides*. Essa fotoproteção estaria relacionada ao suprimento de nitrogênio. Discute-se a presença de um ciclo diário na síntese de MAAs, com maiores concentrações desses compostos ao meio dia, período com maiores níveis de irradiância. Discute-se ainda uma interconversão nos MAAs que poderiam ser ajustados às condições de irradiância.

1. INTRODUÇÃO

A diminuição da camada de ozônio e o conseqüente aumento da radiação UV-B têm sido registrados não apenas sobre a Antártida e América do Sul até 38° sul (KIRCHHOFF *et al.* 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003; Diaz *et al.* 2006), mas também sobre o Ártico (PEARSE, 1996; ZACHER *et al.*, 2009b). Muitos esforços têm sido realizados visando conhecer e compreender os efeitos promovidos por essa radiação (artificial ou natural) em organismos fotossintetizantes terrestres e aquáticos. Aspectos ambientais da radiação UV, assim como seu impacto em macroalgas marinhas, têm sido consideravelmente menos estudados nos oceanos do hemisfério sul do que do hemisfério norte (HUOVINEN *et al.*, 2006).

A radiação UV-B pode afetar as algas diretamente, pela absorção dessa radiação por importantes biomoléculas (aminoácidos e ácidos nucléicos), ou indiretamente, pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BISCHOF *et al.*, 2006; KARSTEN *et al.*, 2009). Quando alvos moleculares são afetados, numerosas conseqüências biológicas e ecológicas podem ser verificadas (KARSTEN *et al.*, 2009). Assim, o crescimento, a sobrevivência, a síntese de pigmentos e de substâncias fotoprotetoras, a produção de oxigênio, o metabolismo de nitrogênio e a captação e a assimilação de CO₂ são alvos suscetíveis dessa radiação (DÖLHER *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1996, 1998; FRANKLIN & FORSTER, 1997; GÓMEZ *et al.*, 1998; FIGUEROA & VIÑEGLA, 2001; VAN DE POLL *et al.*, 2001; MICHLER *et al.*, 2002; POPPE *et al.*, 2002; ROLEDA *et al.*, 2004ab; MANSILLA *et al.*, 2006; BISCHOF *et al.*, 2002c; KARSTEN *et al.*, 2009). A radiação UV-B pode ainda reduzir a produção de biomassa e mudar a composição de espécies num determinado ecossistema (HÄDER *et al.*, 1998).

Durante a evolução, as algas têm sido expostas a importantes variações de radiação UV-B, desenvolvendo mecanismos de defesa para minimizar os danos causados por essa radiação. Entre eles, inclui-se a síntese de substâncias antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas (BOWLER *et al.*, 1992; SCHRIEK, 2000, AGUILERA *et al.* 2002, DUMMERMUTH *et al.*, 2003). Outro mecanismo de proteção é a síntese de substâncias que absorvem essa radiação, incluindo os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), capazes de absorver os comprimentos de onda entre 310 e 360 nm (KARENTZ *et al.*, 1991a; COCKELL & KNOWLAND, 1999; SHICK & DUNLAP, 2002) e, conseqüentemente, impedindo que estruturas celulares sejam afetadas (KARENTZ *et al.*, 1991a; SINHA *et al.*, 1998).

A síntese de MAAs envolve numerosas fontes de variação e existem diferentes tipos distribuídos entre as espécies. Neste contexto, HOYER *et al.* (2001) classificou as macroalgas antárticas em três grupos fisiologicamente diferentes (em termos de valores de MAAs): i) espécies que não possuem MAAs; ii) espécies com valores altos e constantes de MAAs, independentemente das condições ambientais; e iii) espécies que possuem um nível básico de MAAs, o qual pode ser ajustável em relação às mudanças nas condições ambientais. Nesse último grupo, a síntese de MAAs poderia ser influenciada pela radiação UV (UV-A e/ou UV-B), ou pela PAR (SHICK *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b). A indução de diferentes MAAs poderia requerer escalas de tempo variáveis, desde um dia até uma semana ou mais (KARSTEN *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.*, 1999; FIGUEROA *et al.*, 2003c).

Além da qualidade e quantidade de energia, a disponibilidade de compostos nitrogenados na água influencia a síntese e o acúmulo de MAAs (LITCHMAN *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005a; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008). Diferenças no conteúdo desses compostos podem também ser encontradas em distintas porções dos talos, sendo que maiores concentrações têm sido verificadas nas porções marginais e apicais quando comparadas às secções basais (KARSTEN *et al.*, 1999; HOYER *et al.*, 2001).

O conteúdo de MAAs pode variar ao longo do dia, além de apresentar variação sazonal. *Mazzaella laminarioides* coletada em Niebla (Valdivia, Chile, 39° sul) em diferentes horários em um mesmo dia de verão apresentou maiores concentrações entre as 10:30 e 14:30 horas, e menores as 18:45 horas (HUOVINEN *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo de MAAs de tetrasporófitos de *M. laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq coletados em populações naturais e expostos a diferentes combinações de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) durante um ciclo diário. Esse experimento foi realizado num dia de primavera (21 de outubro de 2008) em que houve diminuição de ozônio e conseqüente aumento de radiação UV-B na região de Austral do Chile. Avaliou-se também o efeito do suprimento de NO₃ no conteúdo de MAAs dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Porções apicais de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq foram obtidas a partir de plantas coletadas em Punta Santa Ana (53° 37' S; 70° 59' W), no dia 10 de outubro de 2008. Em seguida, foram transportados para o Laboratório de Biologia Marina da Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile, onde após seleção, ápices de dois centímetros foram selecionados e mantidos em tanques de 100 L por 1 semana. Os tanques contaram com um fluxo contínuo de água do mar (renovação total a cada 40 minutos) e foram mantidos em ambiente externo (expostos à radiação solar).

2.2. Água do mar e meio de cultivo

A água do mar utilizada no experimento foi coletada em Punta Santa Ana, Punta Arenas, Chile. Essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade foi de 32 psu. Essa água foi enriquecida com solução de von Stosch a 50% (VS) sem adição de NO₃, e foi preparado de acordo com OLIVEIRA *et al.*, (1995) (Tabela 1, Capítulo 2).

2.3. Radiação solar

Durante o experimento as algas foram expostas a radiação solar. Esses dados foram proporcionados pelo Laboratório de Ozono da Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectralradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. O detalhe da transformação desses dados assim como o detalhes como os cálculos da irradiância solar e doses por hora são apresentado no item de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

2.4. Desenho experimental

Seis ápices tetrasporofíticos de *Mazzaella laminarioides* com dois centímetros de comprimento foram cultivados em cada unidade experimental. As unidades experimentais foram placas Petri de acrílico transparente contendo 40 ml de água de mar. Após a introdução das algas, as placas foram tampadas e cobertas com os diferentes filtros de corte, visando obter os tratamentos P (PAR), PA (PAR+UVA) e PAB

(PAR+UVA+UVB). As características de cada filtro estão descritas no item 6.2 de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

Em cada um desses três tratamentos foram mantidas 12 unidades experimentais, seis delas contendo água de mar enriquecida com VS sem adição de NO_3 e as outras seis com VS acrescido de 0,38 mM de NO_3 (Fig. 1). Seis placas de Petri foram coladas a uma placa de acrílico transparente de 30x20 cm, e esse conjunto foi introduzido em tanques contendo 100 L de água de mar não filtrada visando manter a temperatura constante durante o experimento. Esse conjunto foi introduzido a uma profundidade de aproximadamente dois cm abaixo da superfície da água.

O experimento teve início no dia 21 de outubro de 2008 às 9:00h. Essa data foi escolhida por ter sido prevista a ocorrência de uma diminuição na camada de ozônio e conseqüentemente aumento de UV-B na região austral do Chile (Fig. 2).

A quantificação e a identificação de MAAs foram realizadas a partir de dois ápices de cada repetição removidos nos seguintes horários: i) 9:00h (horário de montagem do experimento); ii) 14:00h; iii) 18:00h; iv) 9:00h (22 de outubro, período de recuperação). O protocolo para extração e quantificação de MAAs está descrito no Capítulo 2 (item 2.5.5).

Fig. 1. A: Representação esquemática do experimento, no qual ápices tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foram expostos a três tratamentos de radiação solar ((PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) e cultivados em meio enriquecido von Stosch com e sem a adição de NO_3 no dia 21 de outubro de 2008. B: detalhe da montagem das placas de Petri.

Fig. 2. Imagens do buraco na camada de ozônio sobre a Antártica e sul do Chile e Argentina entre os dias 20 e 23 de outubro de 2008 (Goodart Space Flight Center - <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>).

2.5. Análises estatísticas

A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram analisadas (teste de validação de Cochran). Para determinar os efeitos dos tratamentos sobre as algas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando foram encontradas diferenças significativas, foram utilizados os testes *a posteriori* de Fisher (LSD) e de Newman-Keuls (ZAR, 1999). As conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1. Radiação solar (PAR e UV)

Os valores de PAR e UV mostraram ampla variação na data em que o experimento foi realizado em decorrência da presença de nuvens (21 de outubro, Fig. 3). Os maiores valores de PAR foram registrados às 16:36 horas ($1,769 \mu\text{mol.m}^{-2}$). No mesmo horário, registrou-se o maior valor de UV-A ($26,87 \text{ W.m}^{-2}$) e UV-B ($1,15 \text{ W.m}^{-2}$). Os valores de UV-B no dia 21 de outubro foram maiores que os registrados nos dias 20 e 22 de outubro (Fig. 3).

Os valores de doses no ambiente e de doses biologicamente efetivas ambientais foram maiores às 15:00 horas (Fig. 4), enquanto que a razão UV-B/UV-A foi maior às 16:00 horas, com valores superiores a 0,044 (Fig. 5). Os valores de UV-B/UV-A foram menores nos dias 20 e 22 de outubro (0,036 e 0,032, respectivamente). Os valores de doses totais no ambiente, dentro das placas e de dose total efetiva são apresentados na tabela 1.

Fig. 3. Valores de irradiância PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), UV-A e UV-B (W.m^{-2}) registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, no dia 21 de outubro de 2008. São apresentados também os valores do dia anterior e posterior à data do experimento.

Fig. 4. Doses de UV-B, UV-A e PAR em KJ.m⁻² ficadas na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o dia do experimento (21 de outubro de 2008). São apresentados também os valores de dose UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos filtros usados no experimento. Apresentam-se ainda os valores de dose biologicamente efetiva.

Fig. 5. Razão UV-B/UV-A registrada em Punta Arenas durante o dia 20, 21 e 22 de outubro de 2008.

Tabela. 1. Valores de dose de UV-B, UV-A e PAR (KJ.m^{-2}) registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento. São apresentados também os valores de dose de UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos diferentes filtros utilizados para obter os três tratamentos, além de das doses biologicamente efetivas.

Horário	Dose no ambiente			Doses transmitidas pelos filtros específicos de cada tratamento			Doses biologicamente efetivas recebidas pelas algas		
	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	UV-A+UV-B
09:00 – 14:00	5,27	144,4	1656	4,35	122,9	1457	2,97	39,2	42,2
09:00 – 18:00	17,32	420,2	5018	14,26	357,6	4416	9,93	113,9	123,8

3.2. Conteúdo total de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)

A concentração total de MAAs em ápices tetrasporofíticos de *Mazzaella laminarioides* expostos à P, PA e PAB e cultivados com e sem adição de NO_3 apresentaram variações ao longo do dia (Fig. 6). Esses valores foram, em geral, similares ou até maiores do que os verificados no início de experimento.

Em cultivo sem adição de NO_3 , a análise estatística fatorial mostrou que tanto o tipo de radiação (P, PA e PAB) quanto o tempo de exposição a essas radiações afetaram a concentração de MAAs de tetrasporófitos de *M. laminarioides* cultivados em água de mar sem a adição de NO_3 (radiação: $gl=2$; $F=4,57$; $P=0,015$; tempo: $gl=3$; $F=3,53$; $P=0,022$). A análise *a posteriori* de Fisher (LSD) mostrou que as maiores variações ocorreram no tratamento PA, observando-se um ciclo na concentração de MAAs. O menor valor foi observado ao início do experimento e após 24 horas, enquanto que o maior valor foi observado após 5 horas de exposição à PA, próximo ao meio dia (Fig. 6). Após 9 horas de exposição (final do dia), a concentração de MAAs atingiu um valor intermediário aos registrados no início do experimento e após 5 horas de exposição. Nos tratamentos P e PAB não se observaram variações na concentração de MAAs durante o dia. A comparação entre os tratamentos P, PA e PAB mostrou que nos três períodos analisados, 5, 9 e 24 horas após início do experimento, a concentração de MAAs foi sempre maior no tratamento PA, seguido do tratamento PAB e finalmente P (Tabela 2).

No caso dos ápices de *M. laminarioides* cultivados em 0,38 mM de NO_3 , o tipo de radiação não afetou significativamente a concentração de MAAs ($gl=2$; $F=0,99$; $P=0,377$), embora o teste *a posteriori* de Fisher LSD tenha mostrado diferenças entre tratamentos P, PA e PAB (Fig. 6; Tabela 2). Entretanto, houve uma variação principalmente em relação ao tempo de exposição ($gl=3$; $F=3,49$; $P=0,023$) e a interação

entre o tempo o tipo de radiação ($gl=6$; $F=2,89$; $P=0,017$). A análise *a posteriori* de Fisher revelou que ocorreram variações ao longo do experimento nos três tratamentos de radiação (Fig. 6). No tratamento P, após 5 horas de exposição, observou-se um aumento significativo (28%) na concentração de MAAs em relação ao valor registrado ao início de experimento, enquanto que após 9 horas de exposição esse valor diminuiu atingindo um valor similar ao registrado ao início do experimento. No tratamento PA, o conteúdo de MAAs aumentou 32 % (maior valor obtido em todo o experimento) após 9 horas de exposição em relação ao valor inicial. Neste tratamento, os valores de MAAs registrados após 5 horas de exposição e após um período de recuperação foram similares ao valor inicial. Já no tratamento PAB, observou-se um aumento de 31% na concentração de MAAs em relação ao valor inicial, mantendo-se nesse nível até o final do experimento (Fig. 6). A comparação entre os tratamentos de radiação, após 5 horas de exposição, mostrou a seguinte ordem de significância: $P>PAB=PA$ (Tabela 2). Após 9 horas, observou-se que $PA>PAB=P$. Já após o período de recuperação, a concentração de MAAs em todos os tratamentos foi similar.

Considerando-se o meio de cultivo, verificou-se que apenas no tratamento P, após 5 horas de exposição, os tetrasporófitos de *M. laminarioides* supridos com 0,38 mM NO_3 apresentaram maior concentração de MAAs que os cultivados sem a adição de NO_3 , enquanto que no tratamento PA observou-se a situação contrária, com maior concentração de MAAs em ápices cultivados sem NO_3 (Tabela 2). Já, no tratamento PAB, a concentração de MAAs foi similar entre as algas cultivadas com e sem adição de NO_3 . Nos outros períodos analisados, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 2).

Fig. 6. Conteúdo total de aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivados com (0,38 mM) e sem adição de NO₃ durante um ciclo de 24 horas. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os distintos horários e entre os tratamentos (N=3). A franja cinza representa o período de recuperação.

3.3. Tipos de aminoácidos tipo micoporinas

Quatro diferentes tipos de MAAs foram identificados durante o experimento. De acordo com a sua abundância, na ordem decrescente, foram identificados: shinorina, palitina, asterina e micoporina-glicina. Esses dois últimos MAAs apresentaram concentrações inferiores a 0,04 mg. gMS⁻¹ (Tabela 2).

Considerando-se a análise de cada MAA separadamente, nota-se que cada um deles respondeu de maneira distinta aos tratamentos e ao tempo (Fig. 7 e 8).

Os dois MAAs mais importantes em abundância, shinorina e palitina, apresentaram aumento de suas concentrações apenas no tratamento PA sem adição de NO₃, após as primeiras 5 horas de exposição, enquanto que nesse mesmo tratamento e horário a micoporina-glicina e asterina não apresentaram variação em relação ao valor inicial (Fig. 7). O aumento da shinorina e palitina promoveu um aumento na concentração total de MAAs verificado após 5 horas de exposição em PA (Fig. 6). No entanto, essa variação na concentração não se refletiu na contribuição em porcentagens desses MAAs em relação ao total (Fig. 9). No caso da micoporina-glicina, observou-se uma tendência à diminuição da concentração ao longo do dia em todos os tratamentos, embora variações significativas só foram verificadas nos tratamentos P e PA (Fig. 7). Essas variações foram refletidas nas porcentagens desse MAAs em relação ao total (Fig. 9).

Tabela 2. Valores médios da concentração de diferentes tipos de MAAs e do total em mg por g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides*. Diferentes índices ao lado dos valores representam a ocorrência de diferenças significativas entre os 3 tratamentos de radiação e dois tratamentos de NO₃ (com e sem adição) em cada um dos tempos analisados (teste de Fisher LSD com n=3).

			mic-glic	shinorina	palitina	asterina	MAAs TOTAL
Início -21 de outubro- 2008 (9:00 horas)			0,03 ± 0,01	1,47 ± 0,21	0,66 ± 0,08	0,02 ± 0,01	2,19 ± 0,28
14 : 00 horas	Sem adição de NO ₃	P	0,02 ± 0,01 ^{ad}	1,50 ± 0,24 ^{ac}	0,71 ± 0,17 ^{ac}	0,02 ± 0,03 ^{abc}	2,25 ± 0,43 ^{ac}
		PA	0,02 ± 0,01 ^{ac}	2,10 ± 0,22 ^b	1,02 ± 0,07 ^b	0,04 ± 0,03 ^a	3,18 ± 0,28 ^b
		PAB	0,02 ± 0,02 ^{ad}	1,74 ± 0,35 ^{abc}	0,85 ± 0,18 ^{ab}	0,03 ± 0,02 ^{abc}	2,65 ± 0,53 ^{abc}
	0,38 mM NO ₃	P	0,04 ± 0,01 ^b	2,05 ± 0,51 ^{ab}	0,94 ± 0,24 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	3,04 ± 0,75 ^b
		PA	0,01 ± 0,00 ^c	1,39 ± 0,33 ^c	0,58 ± 0,13 ^c	0,03 ± 0,01 ^{ac}	2,01 ± 0,47 ^a
		PAB	0,04 ± 0,01 ^{bd}	1,91 ± 0,45 ^{abc}	0,91 ± 0,13 ^{ab}	0,01 ± 0,02 ^{cb}	2,86 ± 0,56 ^{cb}
18 : 00 horas	Sem adição de NO ₃	P	0,01 ± 0,01 ^{ab}	1,36 ± 0,57 ^{bae}	0,59 ± 0,16 ^{ad}	0,02 ± 0,02 ^a	1,98 ± 0,71 ^{ac}
		PA	0,02 ± 0,01 ^b	1,91 ± 0,34 ^{cd}	0,97 ± 0,09 ^b	0,01 ± 0,02 ^a	2,91 ± 0,35 ^b
		PAB	0,02 ± 0,02 ^{ab}	1,74 ± 0,06 ^{cde}	0,77 ± 0,23 ^{cd}	0,02 ± 0,02 ^a	2,55 ± 0,27 ^c
	0,38 mM NO ₃	P	0,01 ± 0,01 ^a	1,64 ± 0,50 ^a	0,66 ± 0,11 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	2,33 ± 0,59 ^a
		PA	0,02 ± 0,01 ^{ab}	2,24 ± 0,43 ^{abd}	0,95 ± 0,19 ^{bc}	0,03 ± 0,03 ^a	3,24 ± 0,58 ^{bc}
		PAB	0,01 ± 0,01 ^{ab}	1,99 ± 0,63 ^{ac}	0,82 ± 0,19 ^{abc}	0,03 ± 0,02 ^a	2,85 ± 0,74 ^{abc}
09:00 horas (22 de outubro-2008)	Sem adição de NO ₃	P	0,01 ± 0,02 ^{ac}	1,51 ± 0,48 ^{ab}	0,71 ± 0,25 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	2,26 ± 0,73 ^a
		PA	0,01 ± 0,01 ^{ac}	1,58 ± 0,63 ^{ab}	0,67 ± 0,16 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	2,29 ± 0,78 ^a
		PAB	0,003 ± 0,008 ^c	1,40 ± 0,53 ^a	0,67 ± 0,17 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	2,09 ± 0,66 ^a
	0,38 mM NO ₃	P	0,03 ± 0,01 ^b	1,62 ± 0,33 ^{ab}	0,73 ± 0,06 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	2,40 ± 0,34 ^a
		PA	0,02 ± 0,01 ^{ab}	1,75 ± 0,55 ^{ab}	0,68 ± 0,18 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	2,46 ± 0,72 ^a
		PAB	0,02 ± 0,01 ^{ab}	2,01 ± 0,53 ^b	0,82 ± 0,16 ^a	0,02 ± 0,03 ^a	2,87 ± 0,70 ^a

Fig. 7. Conteúdo dos diferentes tipos de aminoácidos tipo micsporinas em mg/g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivados em meio enriquecido von Stosch sem adição de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tempos de exposição dentro de cada tratamento de radiação (N=3). A franja cinza representa o período de recuperação.

Ápices de *M. laminarioides* cultivados em $0,38 \text{ NO}_3$ apresentaram variação na concentração de todos os tipos de MAAs ao longo do experimento (Fig. 8). No tratamento P, dos quatro MAAs identificados, apenas a asterina não aumentou sua concentração após 5 horas de exposição. O aumento observado nas concentrações dos outros três MAAs refletiu-se num aumento da concentração de MAAs total verificada nesse horário (Fig. 6). Entretanto, as porcentagens desses MAAs não variaram significativamente em relação ao total (Fig. 10). Após 9 horas de exposição a P, a shinorina, a palitina e a asterina atingiram concentração similar à verificada no início do experimento. Porém, a concentração de micosporina-glicina diminuiu, e após o período de recuperação, seu valor foi semelhante ao verificado no início do experimento. No

tratamento PA, após 5 horas de exposição, apenas a micosporina-glicina apresentou variação nas concentrações, diminuindo (Fig. 8). Após 9 horas, apresentou concentração semelhante à verificada no início do experimento, enquanto que a shinorina e a palitina aumentaram. Esses aumentos refletiram-se num aumento total de MAAs verificado nesse período (Fig. 6). No entanto as porcentagens de shinorina e palitina em relação à concentração total não variam nesse período quando comparadas ao valor inicial, nem ao longo do tempo (Fig. 10). Já no tratamento PAB, apenas a micosporina-glicina e a palitina apresentaram variação nas suas concentrações ao longo do experimento (Fig. 8), sendo que ambas aumentaram após 5 horas de exposição, verificando-se também um aumento total de MAAs para esse período (Fig. 6). Após 9 horas de experimento, esses dois compostos apresentaram uma diminuição em suas concentrações, sendo que essa redução foi significativa apenas para a micosporina-glicina. A concentração total de MAAs verificada para esse período e para o período de recuperação foi significativamente maior do que a verificada no início (Fig. 6). Em relação à contribuição de cada um desses MAAs para o total, observou-se que apenas a micosporina-glicina variou ao longo do tempo (Fig. 10).

Nota-se que, em geral, em todos os tratamentos a shinorina e a palitina apresentaram uma relação inversa, quando uma aumentou a outra diminuiu, embora em alguns casos essas diferenças não tenham sido significativas. A mesma relação foi observada entre a micosporina-glicina e a asterina (Fig. 10).

Fig. 8. Conteúdo dos diferentes tipos de MAAs em mg/g de massa seca (MS) de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivados em meio enriquecido von Stosch com 0,38 mM de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tempos de exposição dentro de cada tratamento de radiação (N=3). A franja cinza representa o período de recuperação.

O efeito da adição de NO_3 nas concentrações dos diferentes MAAs em cada um dos tratamentos ficou evidente em P e PAB após 5 horas e no período de recuperação (Tabela 2). Após 5 horas de cultivo no tratamento P, aqueles ápices supridos com NO_3 apresentaram maiores concentrações de micospirina-glicina do que aqueles sem a adição de NO_3 . Essa diferença foi observada também no período de recuperação. Após 5 horas, observou-se também que os ápices cultivados em PAB apresentaram maiores concentrações de micospirina-glicina quando cultivados na presença de NO_3 do que na ausência desse nutriente. No caso da palitina, verificaram-se maiores concentrações em ápices cultivados com NO_3 no tratamento P do que em ausência desse nutriente. Entretanto, em cultivos sem adição de NO_3 , houve um aumento na concentração de palitina no tratamento PA, quando comparado aos tratamentos supridos com NO_3 . Houve

um aumento na concentração de shinorina em ápices supridos com NO_3 apenas no tratamento PAB no período de recuperação. Entretanto, ápices cultivados sem adição de NO_3 apresentaram um aumento na concentração de shinorina após 5 horas de cultivo, quando comparados a ápices supridos com NO_3 .

Fig. 9. Porcentagem dos diferentes tipos de MAAs identificados em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivados em meio enriquecido von Stosch sem adição de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Os dados são representados considerando-se como 100% a soma de todas as porcentagens de MAAs identificadas em cada tratamento. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tempos de exposição aos três tratamentos de radiação (N=3). A franja cinza representa o período de recuperação.

Fig. 10. Porcentagem dos diferentes tipos de MAAs identificados em tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* expostos à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivados em meio enriquecido Von Stosch com 0,38 mM de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Os dados são representados considerando-se como 100% a soma de todas as porcentagens de MAAs identificadas em cada tratamento. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças significativas entre os tempos de exposição aos três tratamentos de radiação (N=3). A franja cinza representa o período de recuperação.

4. DISCUSSÃO

Os valores de irradiância UV-B no dia do experimento (21 de outubro de 2008) foram maiores que os registrados nos dias 20 e 22 de outubro. Esse aumento da UV-B ocorrido na data do experimento esteve relacionado à diminuição da coluna de ozônio sobre a cidade de Punta Arenas, Chile, que teria atingido um valor médio de 206 UD. Entretanto, para os dias 20 e 22 de outubro, os valores da concentração de ozônio atingiram 246 e 275 UD, respectivamente (fonte: Goodart Space Flight Center - <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>). Esses valores indicariam a presença de massas de ar pobres em ozônio sobre a cidade de Punta Arenas nesses três dias. O valor médio de concentração de ozônio para a cidade de Punta Arenas para o mês de outubro (1978-1987) durante o período considerado como não influenciado pelo “buraco” na camada de ozônio é de 336 ± 46 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). O extremo austral da América do Sul tem sido atingido pelo “buraco” na camada de ozônio a partir da década de 90 (ORCE & HELBLING, 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006), período após o qual valores de concentração de ozônio incomuns têm sido reportados. Nesse contexto, CASICCIA *et al.* (2003) registraram 7 eventos de diminuição de ozônio entre agosto e outubro de 2000. Esses eventos totalizaram 17 dias com diminuição desse gás, que correspondeu ao período mais longo registrado até então. Cada evento teve uma duração de um a quatro dias com uma diminuição de ozônio entre 20 e 49%. Cabe ressaltar que a definição clássica de “buraco” na camada de ozônio (Antarctic Ozone Hole-AOH) em termos quantitativos é a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou menor a 220 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). Assim, no dia do experimento a cidade de Punta Arenas esteve sob o “buraco” na camada de ozônio.

Mazzaella laminarioides ocorre no médiolitoral, onde constantemente é exposta a variações na radiação solar, especialmente durante a maré baixa. Na região sul do Chile, ocorre esporadicamente eventos de diminuição da camada de ozônio com conseqüente aumento da radiação UV-B durante a primavera de cada ano (KIRCHHOFF *et al.*, 1997; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006). Espera-se que as algas que ocorram na região entre-marés tenham desenvolvido mecanismos adaptativos e de aclimação no curto prazo para evitar os efeitos negativos dessa radiação. Um desses mecanismos refere-se à síntese de compostos fotoprotetores, como os MAAs. Esses compostos têm sido encontrados em numerosas espécies de algas vermelhas e cianobactérias de ambientes variados (GARCÍA-PICHEL *et al.*, 1993; SINHA *et al.*, 1998; HOYER *et al.*, 2001).

A síntese de MAAs pode ser influenciada por diferentes fatores como: i) qualidade da radiação, seja UV (UV-A e/ou UV-B) ou PAR (SHICK *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b); ii) intensidade da radiação (LEE & SHIU, 2009); e iii) disponibilidade de compostos nitrogenados na água (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004, KORBEE *et al.*, 2005a; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008). Esses efeitos têm sido verificados em diferentes escalas de tempo (KARSTEN *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.*, 1999; FIGUEROA *et al.*, 2003c). Além disso, caracterizam-se como processos espécie-específicos (HOYER *et al.*, 2001). *Mazzaella laminarioides* apresentou aumento da concentração total de MAAs, durante um ciclo diário, quando cultivada na presença de NO₃ e exposta aos diferentes tratamentos de radiação solar (P, PA e PAB). Quando não houve adição de NO₃, verificou-se um aumento de MAAs apenas na condição PA.

A presença de MAAs em *Mazzaella laminarioides* tinha sido reportada em espécimes coletados em Valdivia e Chiloé, Chile (39° e 41° sul, respectivamente), durante o verão, com concentrações entre 2,1 e 4,8 mg. gMS⁻¹ (HUOVINEN *et al.*, 2004). No presente trabalho, que foi realizado com algas procedentes de populações localizadas 53° latitude sul e coletadas na primavera, foram verificadas concentrações entre 1,98 e 3,24 mg. gMS⁻¹. Essas diferenças populacionais no teor de MAAs poderiam estar relacionadas ao fato de que as algas coletadas em Punta Arenas (53° latitude sul), estão sujeitas a menores intensidades de radiação do que as coletadas em Valdivia ou Chiloé. Maiores concentrações no conteúdo de MAAs têm sido observadas em espécies de zonas temperadas expostas a altas doses de radiação solar do que naquelas que ocorrem em altas latitudes e em maior profundidade (HOYER *et al.*, 2001; KORBEE *et al.*, 2006). Outra possibilidade seria o fato que foram coletadas em épocas distintas, primavera e verão. Diferenças no conteúdo de MAAs já foram atribuídas à sazonalidade, como demonstrado para *Devalerea ramentacea* coletada em junho (menor concentração de MAAs) e agosto (maior concentração) em Kongsfjord, Spitsbergen, Alemanha (KARSTEN *et al.*, 1999).

A dinâmica de síntese de MAAs ao longo de um ciclo diário não era conhecida em *Mazzaella laminarioides*, embora houvessem alguns indícios da existência do acúmulo de desses compostos durante o dia (HUOVINEN *et al.*, 2004). Esses autores observaram que amostras coletadas em Valdivia (Chile) em diferentes horários de um mesmo dia de verão apresentam variação no conteúdo de MAAs, sendo a maior concentração verificada entre as 10:30 e 14:30 horas, enquanto que a menor as 18:45 horas. Porém, em outras amostras da mesma espécie coletadas as 18:45 horas, a

concentração de MAAs foi similar às verificadas na manhã e ao meio dia. Já, um ciclo diário na concentração de MAAs foi verificado em *Ceramium* sp. coletado na Patagônia Argentina (43° latitude sul), com máxima concentração de MAAs ao meio dia (HELBLING *et al.*, 2004). Um possível ritmo circadiano na síntese de MAAs foi reportado para a cianobacteria *Anabaena* sp. cultivada sob condições naturais, com indução durante o período de luz, embora, a concentração desses compostos tenha permanecido constante durante o período escuro (SINHA *et al.*, 2001).

O ciclo de MAAs em *Mazzaella laminarioides* cultivada sem adição de nitrato foi mais evidente quando a radiação UV-B foi excluída do espectro solar. Já, a exclusão da UV-A (tratamento com apenas PAR) não induziu o acúmulo de MAAs durante o dia. Assim, pode-se sugerir que a presença de UV-A estimulou a síntese de MAAs em *M. laminarioides*, como também demonstrado para *Chondrus crispus* (FRANKLIN *et al.*, 2001) e *Porphyra columbina* (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004). Em *Ceramium* sp., um aumento de MAAs foi verificado em presença de UV-A e UV-B (HELBLING *et al.*, 2004).

A síntese de MAAs em *M. laminarioides* poderia ser induzida não só pela presença ou ausência de determinados comprimentos de onda, mas também pela disponibilidade de nitrogênio, como sugerido para outras macroalgas (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008; BONOMI *et al.*, 2011). Quando os ápices de *M. laminarioides* foram supridos com 0,38 mM de NO₃, a síntese de MAAs foi induzida em todos os tratamentos, embora em tempos diferentes (Fig. 6). As algas cultivadas em PAB e P acumularam MAAs apenas nas primeiras 5 horas, enquanto que as cultivadas em PA o fizeram até 9 horas após o início do experimento.

Estudos anteriores têm demonstrado que a radiação PAR, principalmente os comprimentos de onda azul, podem induzir a síntese de MAAs em *Chondrus crispus* (FRANKLIN *et al.*, 2001) e *Porphyra lecosticta* (KORBEE *et al.*, 2005b). *M. laminarioides* foi exposta a comprimentos de luz azul nos três tratamentos, o que poderia ter propiciado a síntese de MAAs. Por outro lado, é necessário salientar que o filtro Ultraphan URUV utilizado para obter o tratamento P transmite até 20% da radiação entre 375 e 395 nm. Assim, no tratamento P, as algas foram submetidas não apenas à PAR, mas também a pequenas quantidades de UV-A, o que poderia ter um efeito estimulador na síntese de alguns tipos de MAAs, como já demonstrado para *C. crispus* (FRANKLIN *et al.*, 2001).

A ausência na indução de MAAs em algumas macroalgas quando submetidas a diferentes tratamentos de radiação tem sido explicada pela alta concentração inicial

desses compostos (HOYER *et al.*, 2001; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a). No entanto, quando essas algas são cultivadas sem adição de nitrogênio ocorre uma diminuição da concentração de MAAs (KORBEE *et al.*, 2005a). *M. laminarioides* foi mantida por uma semana em tanques sem a adição de fonte de nitrogênio antes de se iniciar os experimentos. Quando as algas foram transferidas para as unidades experimentais e o nitrogênio foi adicionado, a síntese de MAAs teria sido estimulada.

O acúmulo de compostos nitrogenados (ficobiliproteínas e clorofilas) sob luz azul tem sido relacionado à estimulação na captação de nitrato e à atividade da nitrato redutase e glutamina sintetase (FIGUEROA, 1996). Embora os MAAs sejam compostos nitrogenados, observou-se aumento em suas concentrações em ápices de *M. laminarioides* cultivados sem a adição de nitrogênio. Esses maiores valores foram registrados no tratamento PA.

Neste trabalho, quatro diferentes MAAs foram identificados em *Mazzaella laminarioides*: micosporina-glicina (λ_{max} : 310nm), palitina (λ_{max} : 320nm), asterina-330 (λ_{max} : 330nm) e shinorina (λ_{max} : 334nm). Os três últimos compostos haviam sido reportados anteriormente para a espécie (HUOVINEN *et al.*, 2004). Durante o experimento, foram observadas variações no conteúdo e na proporção de cada um deles em relação ao total de MAAs. Maiores variações ocorreram em todos os tratamentos em adição de NO_3 , embora não tenha sido observado um padrão. HOYER *et al.* (2002) afirmam que não haveriam padrões definidos de indução de MAA, sugerindo ainda que a indução, formação e acúmulo dos diferentes tipos são mecanismos espécie - específico e muito variáveis.

Enquanto alguns MAAs aumentaram em quantidade após exposição à PAR, a síntese de shinorina foi fortemente estimulada por UV sem adição de PAR em *Chondrus crispus* (KARSTEN *et al.*, 1998a). A síntese desse mesmo composto foi estimulada pela radiação UV-A, e a palitina foi induzida pela luz azul (FRANKLIN *et al.*, 2001). A luz azul favoreceu também o acúmulo de porphyra-334, palitina e asterina-330 em *Porphyra leucosticta* (KORBEE *et al.*, 2005b). Em *C. crispus* demonstrou-se também que a radiação UV-B induziu a síntese asterina, palitina e paliteno, porém inibiu a síntese de shinorina e palitina, as quais foram induzidas pela radiação UV-A (KRÄBS *et al.*, 2002). Os resultados obtidos para *Mazzaella laminarioides* corroboram dados obtidos para *C. crispus*, pois houve um acúmulo de shinorina e palitina às 14:00 horas no tratamento PA, quando comparado aos tratamentos P e PAB em algas cultivadas sem adição de NO_3 (Tabela 2). Isso possibilitou um aumento de MAAs total verificado nesse horário, quando

comparado ao valor inicial (Fig. 6). Uma vez que, quantitativamente a shinorina e palitina são os principais MAAs, o aumento desses compostos não foi refletido na proporção em relação ao total. Baseado nesses resultados, seria razoável assumir que a indução de palitina e shinorina é dependente da presença da UV-A e talvez da exclusão de UV-B do espectro solar. No entanto, a indução dos diferentes MAAs não é um processo simples, pois com adição de NO_3 a shinorina e a palitina apresentaram redução nas concentrações em PA as 14:00horas, quando comparadas à P e PAB (Tabela 2). Nesse mesmo horário, as algas cultivadas na presença de NO_3 apresentaram também uma diminuição de micosporina-glicina nos três tratamentos de radiação, quando comparadas àquelas cultivadas em ausência de NO_3 .

Analisando-se as proporções dos diferentes MAAs, observou-se uma tendência oposta entre palitina e shinorina com a adição de NO_3 , embora, em alguns casos, não significativas. A shinorina tendeu a aumentar sua proporção nos tratamentos PA e PAB conforme aumentou o tempo de experimentação, atingindo valores maiores no período de recuperação quando comparados aos valores obtidos no início. A palitina tendeu a diminuir sua concentração nesses tratamentos. Mudanças recíprocas na concentração desses compostos foram reportadas em *Chondrus crispus* (FRANKLIN *et al.*, 1999). Esses autores especularam a possibilidade de existir uma relação precursor-produto, com uma inter-conversão entre esses compostos. Em *Mazzaella laminarioides*, mudanças recíprocas nas proporções puderam também ser observadas entre asterina e micosporina-glicina. Esse último composto foi o que mais variou entre os tratamentos e tempos de exposição. A tendência observada para a micosporina-glicina foi diminuir ao longo do tempo em quase todos os tratamentos, independentemente da concentração de NO_3 . Deve-se ressaltar também o fato da proporção desse composto ter diminuído durante a recuperação nos tratamentos PA e PAB com adição de NO_3 , enquanto que a proporção de shinorina aumentou nesse mesmo período. PORTWICH & GARCÍA-PICHEL (1999) sugerem que a micosporina-glicina seja um precursor da shinorina, e que a síntese desse composto seja o segundo passo na síntese de MAAs. Baseados nos resultados obtidos para *M. laminarioides*, sugerimos que a micosporina-glicina seja o precursor de palitina e shinorina, sendo esse último composto o precursor da asterina. Dessa maneira, manter altos níveis de shinorina e palitina implica necessariamente na síntese de micosporina-glicina.

O conteúdo de MAAs verificado em *Mazzaella laminarioides* poderia contribuir para o estabelecimento dessa espécie em locais onde outras sem esses compostos não

poderiam ocorrer. Existem evidências de que os MAAs contribuam na proteção contra a UVR por dissipação dessa energia como calor (CONDE *et al.*, 2000; CONDE *et al.*, 2004). Os MAAs poderiam ainda contribuir na regulação do potencial osmótico de *M. laminarioides* em condições de hipersalinidade. Sugere-se que esses compostos contribuam em 10-20% do potencial osmótico de células de cianobactérias expostas a condições de hipersalinidade (KARSTEN, 2002). *M. laminarioides* freqüentemente fica exposta ao ar durante as marés baixas e está sujeita a salinidades com valores de hipersaturação. Essa condição pode ser agravada pelo vento, predominante na região austral do Chile.

Os MAAs poderiam atuar ainda como antioxidantes (DUNLAP & YAMAMOTO, 1995; SUH *et al.*, 2003; DE LA COBA *et al.*, 2009). A micosporina-glicina é uma das MAAs com maior atividade antioxidante (DUNLAP & YAMAMOTO, 1995). Recentemente, DE LA COBA *et al.* (2009) reportou a capacidade antioxidante da shinorina e das combinações porphyrina-334/shinorina (P-334+SH) e asterina-330/ palitina (AS-330+PNE), sendo a maioria delas identificadas em *M. laminarioides*. Além disso, os MAAs poderiam contribuir na dissipação da energia de resíduos de timina excitados, prevenindo a formação de fotoprodutos (MISONOU *et al.*, 2003). Entretanto, não há evidências sobre a importância desse mecanismo *in vivo* (KLISCH & HÄDER, 2008).

Capítulo 5

Variação diária na concentração de MAAs em *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) exposta à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

ABSTRACT

In this chapter, we evaluated the mycosporine-like amino acids (MAAs) content of *Porphyra columbina* exposed to solar radiation in a day with ozone layer depletion in Punta Arenas, Chile. Additionally, the effect of NO₃ supply on MAAs concentration was evaluated. Segments were cultivated under three treatments of solar radiation (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) and with (0,38 mM) or without NO₃ supply. To determinate MAAs concentration samples were taken at the following times: i) 8:00h (initial value); ii) 9:00h; iii) 12:30h; iv) 15:30h; v) 18:00h, and vi) 9:00h (next day, recovery period). The MAAs content increased in all radiation and NO₃ supply treatments. Samples cultivated without NO₃ and under P treatment showed the highest MAAs content at 12:30h. After this time, a decreasing of these compounds was observed until late afternoon. In PA treatment, an increase of MAAs content was observed until 12:30h, however this value did not change after this time. In contrary, the PAB treatment showed the highest MAAs content in the late afternoon. The NO₃ supply changed the dynamic of accumulation mainly in PAB treatment, reaching the highest MAAs content at 12:30h, highlighting the importance of N availability for *P. columbina* provides photoprotection. Five MAAs were identified: porphyra-334, shinorine, asterina, Palythine, and micosporine-glycine. The dynamic of accumulation of each MAAs varied with radiation treatments, time of exposure, and NO₃ supply. In general, the percentage of porphyra-334 increased, while the others MAAs decreased during exposure time. These results suggest that *P. columbina* MAAs content varied in relation of solar irradiance, with maximum values occurring at noon. The presence of a daily cycle in the MAAs production, and the ability to synthesize these compounds in response to high irradiances in short periods of time are discussed.

RESUMO

Neste capítulo, foram avaliadas as concentrações de aminoácidos tipo miscosporina (MAAs) de *Porphyra columbina* exposta à radiação solar durante um dia com diminuição na concentração da camada de ozônio em Punta Arenas, Chile. Além disso, avaliou-se o efeito do suprimento de NO_3 no conteúdo de MAAs. Segmentos foram cultivados em três tratamentos de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) com adição (0,38 mM) e sem adição de NO_3 ao meio de cultivo. Amostras para quantificação de MAAs foram obtidas nos seguintes horários: i) 8:00h (valor inicial); ii) 9:30h; iii) 12:30h; iv) 15:30h; v) 18:00h e vi) 9:00h (dia seguinte, período de recuperação). A concentração de MAAs aumentou em todos os tratamentos de radiação e nitrato. Na condição sem adição de NO_3 , no tratamento P, os maiores valores de MAAs foram registrados às 12:30h. Após esse horário, houve uma diminuindo até o final da tarde. No tratamento PA, houve aumento no conteúdo de MAAs até 12:30h, entretanto, esses valores não variaram após as 12:30h. Já no tratamento PAB, o maior conteúdo de MAAs foi observado ao final da tarde. A adição de NO_3 alterou a dinâmica de acúmulo principalmente no tratamento PAB, atingindo o maior valor às 12:30h, evidenciando a importância de uma fonte de N para a fotoproteção de *P. columbina*. Cinco diferentes MAAs foram identificados: porphyrina-334, shinorina, asterina, palitina e micosporina-glicina. A dinâmica no acúmulo desses compostos variou com os tratamentos de radiação, com o tempo de exposição e com a adição de NO_3 . De modo geral, a porphyrina-334 aumentou sua proporção ao longo do tempo, enquanto que os demais compostos diminuíram. Esses resultados sugerem que as concentrações de MAAs em *P. columbina* variaram em função da irradiância solar, com máximos valores ao redor do meio dia. Discute-se ainda a presença de um ciclo diário na produção de MAAs, e a capacidade de sintetizar esses compostos como resposta a altas irradiâncias em curtos períodos de tempo.

1. INTRODUÇÃO

Um aumento nos níveis de radiação ultravioleta B (UV-B: 280-320 nm) que atinge a superfície terrestre, como decorrência da diminuição da camada de ozônio, tem sido verificado anualmente a partir da década de 80 sobre o continente antártico (FARMAN *et al.*, 1985; BIANCIOTTO *et al.*, 2003). Esse evento atinge ainda o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (ORCE & HELBLING, 1997; DIAZ *et al.*, 2006) e vem sendo verificado também sobre o Ártico (PEARCE, 1996). Portanto, a necessidade de estudos que avaliem os efeitos da UV-B em organismos marinhos da região austral do Chile torna-se imperativa. Essa necessidade é ainda maior, já que segundo as previsões recentes, a recuperação da camada de ozônio não será alcançada antes de 2070 (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009) devido à influência das mudanças climáticas (MCKENZIE *et al.*, 2007).

Até o presente, muitos estudos têm sido realizados visando conhecer e compreender os efeitos promovidos pela radiação UV-B (artificial ou natural) em organismos fotossintetizantes terrestres e aquáticos. A radiação UV-B pode afetar esses organismos através da absorção por biomoléculas, tais como ácidos nucléicos, aminoácidos, clorofilas e carotenóides (FRANKLIN & FOSTER, 1997; KARSTEN *et al.*, 2009). Essas biomoléculas e outras que não absorvem diretamente a UV-B, como os lipídeos, principais constituintes das membranas biológicas, podem ser afetadas ainda pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são normalmente produzidas em organismos fotossintetizantes durante o metabolismo, porém esse processo pode ser estimulado na presença de fatores ambientais estressantes, como altos níveis de radiação UV (BOWLER *et al.*, 1992; PAPADAKIS & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2002). Numerosas consequências biológicas e ecológicas ocorrem em decorrência aos danos causados a essas moléculas (KARSTEN *et al.*, 2009).

São alvos suscetíveis da radiação UV-B: o crescimento, a sobrevivência, a síntese de pigmentos e de substâncias fotoprotetoras, a produção de oxigênio, o metabolismo de nitrogênio e a captação e assimilação de CO₂ (DÖLHER *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1996, 1998; GÓMEZ *et al.*, 1998; FIGUEROA & VIÑEGLA, 2001; VAN DE POLL *et al.*, 2001; MICHLER *et al.*, 2002; ROLEDA *et al.*, 2004ab; MANSILLA *et al.*, 2006; BISCHOF *et al.*, 2002c, 2006; KARSTEN *et al.*, 2009). A UV-B pode ainda reduzir a produção de biomassa e mudar a composição de espécies num determinado ecossistema (HÄDER *et al.*, 1998).

A maioria dos organismos expostos com frequência à radiação solar apresenta mecanismos de defesa para minimizar os danos causados pelas ROS induzidas pela UV-B. Dentre esses mecanismos está a síntese de: i, substâncias antioxidantes não enzimáticas, como ascorbato (vitamina C), tocofenol (vitamin E), carotenóides e glutathione reduzida; e ii, substâncias antioxidantes enzimáticas, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e as enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione (BOWLER *et al.*, 1992; SCHRIEK, 2000; AGUILERA *et al.*, 2002, DUMMERMUTH *et al.*, 2003). Outro mecanismo de proteção contra a radiação UV é a síntese e o acúmulo de substâncias que absorvem essa radiação, incluindo os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs).

A síntese de MAAs, isoladas a partir de macroalgas, fitoplâncton e cianofíceas (KARENTZ *et al.*, 1991a; GARCÍA-PICHEL *et al.*, 1993; SINHA *et al.*, 1998; HUOVINEN *et al.*, 2004), é considerada como um mecanismo adaptativo para prevenir danos produzidos pela radiação UV, uma vez que são capazes de absorver os comprimentos de onda entre 310 e 360 nm (COCKELL & KNOWLAND, 1999; SHICK & DUNLAP, 2002), impedindo que outras estruturas celulares sejam afetadas por essa radiação (KARENTZ *et al.*, 1991a; SINHA *et al.*, 1998).

HOYER *et al.* (2001) classificou as macroalgas antárticas em três grupos fisiologicamente diferentes: i) espécies que não possuem MAAs; ii) espécies com valores altos e constantes de MAAs, independentemente das condições ambientais; e iii) espécies que possuem um nível básico de MAAs, o qual pode ser ajustável em relação às mudanças nas condições ambientais. Nesse último grupo, a síntese de MAAs poderia ser influenciada pela radiação UV (UV-A e/ou UV-B), ou pela PAR (SHICK *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b). A indução de diferentes MAAs poderia requerer escalas de tempo variáveis, desde um dia até uma semana ou mais (KARSTEN *et al.*, 1999; FRANKLIN *et al.*, 1999; FIGUEROA *et al.*, 2003c). Recentemente, determinou-se que além da qualidade e quantidade de energia, a disponibilidade de compostos nitrogenados na água, principalmente amônio, influencia a síntese e o acúmulo de MAAs (LITCHMAN *et al.*, 2002; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a; FIGUEROA *et al.*, 2008). Altas concentrações de amônio promoveram a síntese de MAAs em duas espécies de *Porphyra* (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a). Esses dados sugerem que as MAAs podem funcionar também como um reservatório de N (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; KORBEE *et al.*, 2005a, 2006, DE LA COBA *et al.*, 2009). Embora os MAAs sejam compostos

nitrogenados, há escassa informação sobre os efeitos da disponibilidade de nitrogênio na síntese e acúmulo dessas substâncias (BANASZAK & NEALE 2001; KORBEE *et al.*, 2005a), principalmente considerando-se o nitrato como fonte de nitrogênio.

Embora HOYER *et al.* (2001) tenha classificado as algas em três grandes grupos de acordo com o conteúdo de MAAs, outros autores sugerem que não existam padrões de indução, síntese e acúmulo de diferentes tipos de MAAs, sendo esse mecanismo muito flexível e espécie-específico (HOYER *et al.*, 2002). Nesse contexto, trabalhos que investiguem a indução de MAAs podem ser importantes, principalmente quando as algas são expostas a um aumento natural de UV-B solar. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo de MAAs de frondes de *Porphyra columbina* Montagne coletadas em populações naturais e expostas a diferentes combinações de radiação solar (PAR; PAR+UV-A; e PAR+UV-A+UV-B) durante um ciclo diário. Esse experimento foi realizado num dia de primavera (8 de novembro de 2008) em que houve diminuição de ozônio e conseqüente aumento de radiação UV-B na região de Austral do Chile. Avaliou-se também o efeito do suprimento de NO₃ no conteúdo de MAAs dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Frondes de *Porphyra columbina* foram coletadas na Bahía Mansa (53°36'20" S; 70°55'55" W), município de Punta Arenas, Chile, no dia 7 de novembro de 2008 e transportadas para o Laboratório de Biologia Marina da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile). Porções do talo (2cm X 3cm) foram isoladas a partir da região central de diferentes frondes e mantidas em tanques de 50 litros de capacidade preenchidos com água do mar sem adição de meio. Esses tanques foram colocados em câmara de cultivo do tipo "walk-in" a 8°C durante uma noite.

2.2. Água do mar e meio de cultivo

A água do mar utilizada no experimento foi coletada em Punta Santa Ana, Punta Arenas, Chile. Essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade foi de 32 psu. Essa água foi enriquecida com solução de von Stosch a 50% (VS) sem adição de NO₃, e foi preparado de acordo com OLIVEIRA *et al.*, (1995) (Tabela 1, Capítulo 2).

2.3. Radiação solar

Durante o experimento as algas foram expostas a radiação solar. Esses dados foram proporcionados pelo Laboratório de Ozono da Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectroradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. O detalhe da transformação desses dados assim como o detalhes como os cálculos da irradiância solar e doses por hora são apresentado no item de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

2.4. Desenho experimental

Porções de frondes de *Porphyra columbina* foram incluídas em 24 frascos de plástico fosco e preenchidos com 1 L de água do mar filtrada e esterilizada (total de 25 porções por frasco). Após a introdução das algas, as unidades experimentais foram cobertas com os diferentes filtros de corte, visando obter os tratamentos P (PAR), PA (PAR+UVA) e PAB (PAR+UVA+UVB). As características de cada filtro estão descritas no item 6.2 de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

Em cada um desses três tratamentos foram mantidas 8 unidades experimentais, quatro delas contendo água de mar enriquecida com VS sem adição de NO_3 e as outras quatro com VS acrescido de 0,38 mM de NO_3 (Fig. 1). Esses frascos foram introduzidos em tanques contendo 150 L de água de mar não filtrada, a qual foi trocada periodicamente visando manter a temperatura constante durante o experimento.

O experimento teve início no dia 8 de novembro de 2008 às 08:00. Essa data foi escolhida por ter sido prevista a ocorrência de uma diminuição na camada de ozônio e conseqüente aumento de UV-B na região austral do Chile (Fig. 2). A quantificação e a identificação de MAAs foram realizadas a partir de 4 porções de talo de cada repetição removidos nos seguintes horários: i) 8:00h (horário de montagem do experimento); ii) 09:00h; iii) 12:30h; iv) 15:30h; v) 18:00h; vi) 08:00h (9 de novembro, período de recuperação). No período de recuperação, as amostras foram mantidas dentro de uma câmara de cultivo, a 8°C no escuro até o dia seguinte. O protocolo para extração e quantificação de MAAs está descrito no Capítulo 2 (item 2.5.5).

Fig. 1. A: Representação esquemática do experimento, no qual porções de *Porphyras columbina* foram expostas a três tratamentos de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) e cultivados em meio enriquecido von Stosch com e sem a adição de NO_3 durante o dia 8 de novembro de 2008. B: detalhe da montagem dos frascos preenchidos com 1 litro de meio de cultura. C: período de recuperação em câmara de cultivo durante uma noite.

Fig. 2. Imagens do “buraco” na camada de ozônio sobre a Antártica e sul do Chile e Argentina entre os dias 7 e 10 de novembro de 2008 (Goodart Space Flight Center - <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>).

2.5. Análises estatísticas

A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram analisadas (teste de validação de Cochran). Para determinar os efeitos dos tratamentos sobre as algas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando foram encontradas diferenças significativas, foram utilizados os testes *a posteriori* de Newman-Keuls (ZAR, 1999). As conclusões estão baseadas em um nível de confiança de 95% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1. Radiação solar (PAR e UV)

Os valores das irradiâncias PAR e UV mostraram ampla variação na data em que o experimento foi realizado (8 de novembro, Fig. 3), em decorrência da presença de nuvens. Os maiores valores de PAR foram registrados as 17:02 horas ($2399 \mu\text{mol.m}^{-2}$). No mesmo horário registrou-se o maior valor de UV-A ($46,33 \text{ W.m}^{-2}$) e UV-B ($1,63 \text{ W.m}^{-2}$). Os valores de UV-B no dia 8 de novembro foram maiores que os registrados nos dias 7 e 9 de novembro (Fig. 3).

Os valores de doses registradas no ambiente e doses biologicamente efetivas transmitidas pelos filtros utilizados nos diferentes tratamentos foram maiores as 16:00 horas (Fig. 4), entretanto, a razão UV-B/UV-A foi maior as 15:00 horas (Fig. 5). Os valores de doses no ambiente e dose efetiva, as quais as algas foram expostas estão apresentados na tabela 1.

Fig. 3. Valores de irradiância PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), UV-A e UV-B (W.m^{-2}) incidentes no dia 8 de novembro de 2008 na cidade de Punta Arenas. São apresentados também os valores do dia anterior e posterior à data do experimento.

Fig.4. Doses de UV-B, UV-A e PAR em KJ.m⁻² registradas na cidade de Punta Arenas (Chile) durante o dia do experimento (8 de novembro de 2008). São apresentados também os valores de dose UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos filtros usados no experimento. Apresentam-se ainda os valores de doses biologicamente efetivas.

Fig. 5. Razão UV-B/UV-A diária registrada em Punta Arenas durante o dia 7, 8 e 9 de novembro de 2008.

Tabela 1. Valores de doses de UV-B, UV-A e PAR (KJ.m^{-2}) registrados na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 de novembro de 2008). São apresentados também os valores de doses de UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos diferentes filtros utilizados para obtenção dos tratamentos, além das doses biologicamente efetivas.

Horário	Dose no ambiente			Doses transmitidas pelos filtros específicos de cada tratamento			Doses biologicamente efetivas recebidas pelas algas		
	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	UV-A+UV-B
08:00 - 09:30	0,05	4,9	49	0,04	4,2	43	0,02	1,3	1,32
08:00 - 12:30	1,99	87,5	633	1,67	74,5	557	1,03	23,8	24,83
08:00 - 15:30	10,68	330,4	2662	8,85	281,4	2343	5,86	89,8	95,66
08:00 - 18:00	23,71	706,6	6478	19,62	601,9	5701	13,12	191,7	204,82

3.2. Conteúdo de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)

A concentração total de MAAs em *Porphyra columbina* exposta à P, PA e PAB e cultivada com e sem adição de NO_3 apresentou variações ao longo do dia (Tabela 2; Fig. 6). A análise *a posteriori* de Newman-Keuls para esses dados revelou que as concentrações obtidas no início do experimento (8:00h) foram inferiores aos valores obtidos após as algas serem expostas aos tratamentos P, PA e PAB (Fig. 6).

Tabela 2. Análises unifatoriais ANOVA para a variável dependente “concentração de MAAs” em *Porphyra columbina*, com resultados de efeitos isolados do tipo de radiação em cada tratamento de NO_3 . Dados obtidos para frondes de *P. columbina* após exposição à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) durante um ciclo diário de 24 horas (8 de novembro de 2008). Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de F e p em negrito. N= 4.

		Concentração de MAAs	
		F	p
Sem adição de NO_3	P	13,34	0,000
	PA	6,31	0,001
	PAB	15,82	0,000
Com adição de NO_3	P	12,37	0,000
	PA	12,51	0,000
	PAB	15,801	0,000

Observou-se também um ciclo diário com maior concentração de MAAs as 12:30h, principalmente no tratamento P (com e sem NO₃) e no PAB (com adição de NO₃). Após um período de 12 horas de recuperação, observou-se que a concentração de MAAs foi maior em relação à concentração inicial, e semelhante ou até superior à concentração verificada as 12:30h.

Houve variações no conteúdo de MAAs entre os tratamentos considerando-se cada um dos horários avaliados (Tabela 3). Após uma hora e meia de exposição aos tratamentos P, PA e PAB, frondes de *Porphyra columbina* cultivadas sem adição de NO₃ não mostraram diferenças significativas no conteúdo de MAAs (Fig. 7). Já, as 12:30h, observou-se maior quantidade de MAAs no tratamento P e menor no tratamento PAB. Embora essas diferenças não sejam evidenciadas as 15:30h, nota-se que ao final do dia houve maior concentração de MAAs nos tratamentos PA e PAB.

No caso das algas supridas com NO₃, houve um aumento da concentração de MAAs após uma hora e meia de cultivo, principalmente naquelas cultivadas no tratamento PA. Essa diferença se manteve até as 12:30h. A partir desse horário, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Fig. 7).

Tabela 3. Análises unifatoriais ANOVA para a variável dependente “concentração de MAAs” de *Porphyra columbina*, com resultados de efeitos isolados do horário e concentração de NO₃. Dados obtidos para frondes de *P. columbina* após exposição à PAR (P), PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) durante um ciclo diário de 24 horas (8 de novembro de 2008). Os efeitos significativos do fator são apresentados com os dados de F e p em negrito. N= 4.

		Concentração de MAAs	
		F	P
sem NO ₃	09:00	0,42	0,672
	12:00	11,32	0,003
	15:00	0,64	0,551
	18:00	13,97	0,002
	recup	7,01	0,015
com 0,38 NO ₃	09:00	7,81	0,011
	12:00	13,22	0,002
	15:00	2,92	0,105
	18:00	1,58	0,257
	recup	-	-

Fig. 6. Conteúdo total de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido von Stosch com (0,38 mM) e sem a adição de NO₃ durante um ciclo de 24 horas. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes horários de exposição numa mesma condição de radiação e NO₃. Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam diferenças entre os distintos horários (N=4). A franja cinza representa o período de recuperação. nd: sem dado.

Fig. 7. Conteúdo total de aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido von Stosch com (0,38 mM) e sem a adição de NO₃ durante um ciclo de 24 horas. Dados apresentados visando à comparação entre os diferentes tratamentos numa mesma condição de tempo e NO₃ e em relação ao valor desses compostos verificado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barras de desvio padrão representam as diferenças observadas entre os tratamentos (N=4). **nd**: sem dado.

A adição de NO₃ teve efeito na concentração de MAAs em todos os tipos de radiação, principalmente nos horários entre 12:30 e 18:00h (Fig. 8). No tratamento P, a concentração de MAAs aumentou a partir das 09:30h, tanto em algas com NO₃ quando em algas cultivadas sem adição de NO₃. As 12:30h, essa concentração continuou aumentando de maneira similar nos dois tratamentos. Já as 15:30h, embora tenha sido observada diminuição dos MAAs em ambos tratamentos (com e sem adição de NO₃), as algas supridas com 0,38 mM de NO₃ apresentaram menores concentrações do que as cultivadas sem adição de nitrato. Duas horas e meia depois (18:00h) essa situação se inverteu. No tratamento PA, a concentração total dos MAAs em algas cultivadas com e sem a adição de NO₃ foi distinta apenas as 15:30h, sendo que aquelas supridas com NO₃ apresentaram a menor concentração quando comparadas às algas cultivadas sem adição desse nutriente. No tratamento PAB, embora tenha sido observada maiores concentrações de MAAs em algas supridas com NO₃, diferenças significativas foram detectadas apenas as 12:30h. Nesse horário, os MAAs aumentaram consideravelmente, atingindo valores de $10,4 \pm 1,1$ mg de MAAs por grama de massa seca. Esse valor foi o maior detectado ao longo de todo o experimento.

Fig. 8. Conteúdo total de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) em mg por g de massa seca (MS) de frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido von Stosch com (0,38 mM) e sem a adição de NO₃ durante um ciclo de 24 horas. Dados apresentados visando à comparação entre as condições com e sem adição de NO₃ num mesmo tratamento de radiação e tempo e em relação ao valor desses compostos verificado no início do experimento (x). Diferentes letras sobre as barra de desvio padrão representam as diferenças observadas entre os tratamentos. N=4. **nd**: sem dado.

3.3. Tipos de aminoácidos tipo micoporinas

Cinco diferentes MAAs foram identificados em *Porphyra columbina*. De acordo com a sua abundância, na ordem decrescente, foram identificados: porphyra-334, shinorina, asterina, palitina e micoporina-glicina. A concentração desses MAAs e sua porcentagem em relação ao total de MAAs variaram com os tratamentos de radiação e com o tempo de exposição (Fig. 9 e 10).

Em geral, a porcentagem de porphyra-334 em algas cultivadas com e sem adição de NO₃ aumentou as 9:30h quando comparada à porcentagem encontrada no início do experimento. Entretanto, em asterina, palitina e shinorina observou-se uma diminuição da porcentagem após esse mesmo período, independentemente da concentração de NO₃ (Fig. 9 e 10). Por outro lado, a presença de micoporina-glicina em baixas concentrações (0 -

0,15 %) foi detectada nos tratamentos P e PA, principalmente em algas com adição de NO_3 e após o meio dia (Fig. 10).

Entre 12:30 e 18:00h, o percentual de porphyra-334 continuou aumentando, enquanto que o percentual de asterina, palitina e shinorina diminuíram em todos os tratamentos (Fig. 9 e 10), com exceção das algas submetidas à PAB sem adição de NO_3 (Fig. 10). Nessas condições, as 12:30h, observou-se uma diminuição do percentual de porphyra-334, quando comparado ao valor registrado as 9:30h, enquanto que o percentual de shinorina, micosporina-glicina e asterina aumentou em relação ao valor registrado as 09:30h (Fig. 9). A variação na porphyra-334 promoveu uma diminuição na concentração total de MAAs em PAB, quando essas concentrações foram comparadas às obtidas em P e PA nesse período (Fig. 6 e 7), uma vez que porphyra-334 é o MAAs mais abundante na espécie. Essa variação também se reflete no aumento das proporções entre shinorina/porphyra-334, palitina/ porphyra-334 e asterina/porphyra-334 as 12:30 horas no tratamento PAB (Fig. 11). Uma diminuição dessas proporções foi observada em algas cultivadas com adição de NO_3 nesse mesmo período e tratamento, quando comparados aos valores registrados as 9:30h (Fig. 11), enquanto que no período da tarde (18:00h), essas relações aumentaram, promovidas por uma queda na porcentagem de porphyra-334 (Fig. 10). Isto contrasta com o observado em algas cultivadas sem adição de NO_3 , que apresentaram uma tendência a diminuição das proporções shinorina/porphyra-334, palitina/ porphyra-334 e asterina/porphyra-334 em PAB as 18:00 horas (Fig. 11).

Fig. 9. Porcentagem dos diferentes aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido de von Stosch sem a adição de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Dados apresentados visando à comparação entre os tratamentos de radiação nos distintos horários de exposição. Os dados são representados considerando-se como 100% a soma de todas as porcentagens de MAAs identificadas em cada tratamento. A franja cinza representa o período de recuperação. N=4.

Fig. 10. Porcentagem dos diferentes aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido de von Stosch com adição de 0,38 mM de NO_3 durante um ciclo de 24 horas. Dados apresentados visando à comparação entre os tratamentos de radiação em os diferentes horários de exposição. Os dados são representados considerando-se como 100% a soma de todas as porcentagens de MAAs identificadas em cada tratamento. A franja cinza representa o período de recuperação. N=4.

Fig. 11. Proporção entre asterina/porphyrina-334, palatina/porphyrina-334 e shinorina/porphyrina-334 em frondes de *Porphyrira columbina* expostas à PAR, PAR+UVA (PA) e PAR+UVA+UVB (PAB) e cultivadas com meio enriquecido von Stosch com (0,38 mM - linha pontilhada) e sem adição de NO_3^- (linha preta) durante um ciclo de 24 horas. A franja cinza representa o período de recuperação. N=4.

4. DISCUSSÃO

O aumento da irradiância UV-B no dia do experimento (8 de novembro, 2008) estaria relacionada a uma menor concentração de ozônio na região austral do Chile, a qual teria atingido um valor médio de 299 UD, enquanto que para os dias 7 e 9 de novembro os valores da concentração de ozônio atingiram 316 e 364 UD, respectivamente (fonte: Goodart Space Flight Center - <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>). Esses valores estão dentro da média ($338,7 \pm 33,5$ UD) registrada para novembro em Punta Arenas entre os anos 1978 e 1987, período considerado como não influenciado pelo “buraco” na camada de ozônio (CASICCIA *et al.*, 2003). Massas de ar pobres em ozônio têm alcançado a cidade de Punta Arenas nos meses de primavera desde a década de 90, quando a área do “buraco” na camada de ozônio alcançou níveis incomuns, atingindo o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (BIANCOTTO *et al.*, 2003; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006). Embora, no dia do experimento houvesse uma diminuição na camada de ozônio, quando comparado com valores referenciais, esse valor não pode ser considerado como característico de um período com “buraco” na camada de ozônio (Antarctic Ozone Hole-AOH), uma vez que a definição clássica para AOH em termos quantitativos corresponde a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou menor a 220 UD (CASICCIA *et al.*, 2003). Assim, os valores nas concentrações de ozônio e de irradiâncias de UV-B registrados no dia do experimento poderiam ser considerados como normais dentro dos registros das últimas duas décadas em Punta Arenas.

Trata-se do primeiro relato sobre um ciclo diário de produção de MAAs em *Porphyra columbina*. As maiores concentrações foram atingidas nos períodos de maior irradiância, com exceção das frondes expostas à UV-B e cultivadas na ausência de NO₃. Nesse caso, houve um aumento de MAAs após o período de recuperação. No entanto, quando o NO₃ foi adicionado, observou-se uma rápida indução de MAAs, evidenciando a importância de uma fonte de nitrogênio na síntese desses compostos quando as algas são submetidas a altos níveis de UV-B.

O acúmulo de MAAs em *Porphyra columbina* seguiu a dinâmica da irradiância solar incidente, o que sugere um ciclo diário em sua produção. Um ciclo diário de acúmulo de MAAs foi verificado em *Ceramium* sp. (HELBLING *et al.*, 2004) e em *Mazzaella laminarioides* (capítulo 4 desta tese). Nessas espécies, houve também uma maior concentração desses compostos no horário de maior irradiância solar. Entretanto,

um ciclo distinto, com maior concentração ao início do dia e diminuindo até o final da tarde foi verificado em *P. columbina* coletada em Valdivia, Chile (39° latitude sul) (HUOVINEN *et al.*, 2004) e Playa Unión, Argentina (43° latitude sul) (HELBLING *et al.*, 2004).

Os valores de MAAs iniciais verificados em nosso experimento para *Porphyra columbina* foram de $2,2 \pm 0,6$ mg. gMS^{-1} , atingindo um nível máximo de $10,4 \pm 1,1$ mg. gMS^{-1} ao longo do dia. Entretanto, representantes dessa espécie coletados em Valdivia apresentaram 7,2 a 10, 6 mg. gMS^{-1} (HUOVINEN *et al.*, 2004). KORBEE-PEINADO *et al.* (2004) registraram valores iniciais de 4 mg. gMS^{-1} em *P. columbina* de Playa Unión, embora esse valor tenha sido verificado após as algas permanecerem 12 dias sem suprimento de nitrogênio. O conteúdo de MAAs verificado nesses trabalhos são variáveis e essas diferenças poderiam ser atribuídas a vários fatores abióticos relacionados à latitude, sazonalidade, a posição vertical das algas no costão e mesmo à condições prévias a que as algas foram submetidas.

O acúmulo de MAAs é um processo dose-dependente uma vez que esses compostos são produzidos em maiores taxas à medida que a irradiância aumenta. Assim, espécies de zonas temperadas apresentam maiores concentrações de MAAs do que aquelas de altas latitudes e de maior profundidade (KARSTEN & WIENCKE, 1999; HOYER *et al.*, 2001). Por outro lado, um forte efeito sazonal tem sido atribuído à produção desses compostos, ocorrendo maiores concentrações em períodos com maior irradiância (POST & LARKUM, 1993; KARSTEN *et al.*, 1999).

O conteúdo de MAAs em algumas espécies de *Porphyra* varia significativamente entre exemplares de sombra (menor concentração) e de sol (maior concentração) evidenciando uma via de adaptação (KARSTEN *et al.*, 1999; FIGUEROA *et al.*, 2003c). Frondes de *P. columbina* de sombra e de sol coletadas em Valdivia, Chile, não apresentaram diferenças no conteúdo de MAAs durante o dia (HUOVINEN *et al.*, 2004). Exemplares de *P. columbina* utilizados no atual trabalho foram coletados a 10 cm de profundidade durante uma maré baixa e estariam aclimatadas à sombra. Independentemente do tratamento, verificou-se um aumento de MAAs quando as frondes foram expostas à radiação solar, sugerindo que *P. columbina* acumulou esses compostos em resposta às altas irradiâncias, e possivelmente também em resposta à qualidade espectral da radiação utilizada, uma vez que a dinâmica no acúmulo de MAAs foi diferente nos três tratamentos de radiação.

Os cinco diferentes MAAs identificados para *Porphyra columbina* neste trabalho já haviam sido observados para a espécie (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004; HUOVINEN *et al.*, 2004). HUOVINEN *et al.* (2004) verificaram ainda a presença de palitinol (λ_{max} : 332nm), principalmente em exemplares adaptados ao sol.

Nossos resultados corroboram trabalhos anteriores nos quais a porphyra-334 e a shinorina foram os principais MAAs encontrados em *Porphyra columbina* em termos de concentração (HELBLING *et al.*, 2004; HOUVINEN *et al.*, 2004; KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004). Entretanto, as porcentagens desses compostos foram distintas. Porcentagens ao redor de 80% de porphyra-334 foram verificadas em exemplares procedente de Valdivia, Chile, e Playa Unión, Argentina, enquanto que em exemplares de Magallanes (este trabalho) foram observados valores superiores a 90%. A porcentagem de shinorina em exemplares de Magallanes atingiu valores médios de 6%, enquanto que em representantes de Valdivia e Playa Unión os valores foram de 20%. Essas diferenças poderiam ser atribuídas ao histórico de exposição à radiação solar em cada um dos locais e também ao tratamento das amostras durante os experimentos.

A síntese de MAAs, assim como de outros metabolitos, está relacionada à atividade fotossintetizante (CARRETO *et al.*, 1990; GLYNN *et al.*, 1993; LESSER *et al.*, 1994). Espera-se, portanto, que um aumento na produção de ATP e NADPH promova uma maior síntese de MAAs. Além do controle fotossintetizante, a síntese de MAAs é estimulada por comprimentos de onda específicos da PAR (FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b). Comprimentos de onda da luz azul podem induzir a síntese de palitina e asterina 330, enquanto que a luz branca, verde, amarela e vermelha favorecem a síntese de shinorina em *Porphyra leucosticta* (KORBEE *et al.*, 2005b). A presença da luz azul em todos os tratamentos nos quais *P. columbina* foram cultivadas poderia explicar a síntese de MAAs durante as horas de maior irradiância.

Existem evidências de que a síntese de MAAs seja estimulada pela radiação UV (UV-A e/ou UV-B) (FRANKLIN *et al.*, 2001, SHICK *et al.*, 1999) e alguns autores sugerem a atuação de dois fotorreceptores, um para UV-A e outro para UV-B (KRÄBS *et al.*, 2002). O filtro Ultraphan URUV utilizado para obter o tratamento P no presente trabalho transmite até 20% da radiação entre 375 e 395 nm. Assim, frondes de *P. columbina* foram submetidas não apenas à PAR, mas também a pequenas quantidades de UV-A, o que poderia ter um efeito estimulador na síntese de alguns tipos de MAAs, como verificado para *Chondrus crispus* (FRANKLIN *et al.*, 2001; KRÄBS *et al.*, 2002). De fato, as maiores concentrações de MAAs em *P. columbina* foram observadas às 12:30h no tratamento P.

Embora nos tratamentos PA e PAB as algas tenham sintetizado e acumulado MAAs em relação ao valor inicial, esses valores foram menores aos registrados nas algas expostas ao tratamento P. Nesses casos, a energia disponível para síntese de MAAs poderia ter sido usada para reparar danos celulares promovidos pela exposição a irradiâncias de UV-A (PA) e UV-A+UV-B (PAB).

Embora existam evidências de que a radiação UV (principalmente a UV-B) possa prejudicar processos importantes como a fotossíntese, estudos recentes têm demonstrado que a exclusão da UV-B pode ser até prejudicial no período de recuperação. A recuperação do aparato fotossintetizante em *Dictyota dichotoma* foi prejudicada quando a UV-B foi removida do espectro de radiação (FLORES-MOYA *et al.*, 1999) e algumas espécies de águas rasas apresentaram menor recuperação em tratamentos em que a UV-B solar foi atenuada (HANELT & ROLEDA, 2009). Verificou-se que, durante a tarde, o conteúdo de MAAs em *P. columbina* exposta aos tratamentos P e PA é menor quando comparada à algas submetidas ao tratamento PAB. A rápida recuperação durante o período da tarde no tratamento PAB teria promovido um maior acúmulo de MAAs.

A adição de NO₃ promoveu um aumento de MAAs principalmente em *Porphyra columbina* tratada com UV-B as 12:30h. A presença de amônio no meio de cultura incrementou a concentração de MAAs em espécies do gênero *Porphyra* (KORBEE *et al.*, 2005b), incluindo *P. columbina* (KORBEE *et al.*, 2005b), quando expostas à radiação UV artificial. A adição de NO₃ promoveu também um incremento de MAAs em *Gracilaria tenuistipitata* quando cultivada em laboratório sob PAR+UV (BONOMI *et al.*, 2011). Ao final da tarde, a redução na irradiância UV-B e a adição de NO₃ promoveriam um efeito inibitório na síntese de MAAs. A adição de NO₃ reduziria o efeito positivo da UV-B no período de da tarde, possivelmente porque o NO₃ não é captado nem assimilado nesse período. Outra alternativa para explicar o efeito inibitório na síntese de MAAs refere-se à utilização do nitrogênio absorvido e da energia resultante da fotossíntese em vias metabólicas de síntese de outros compostos relacionados ao reparo de danos promovidos pela exposição à UV-B durante as horas de maior irradiância. A diminuição na concentração de MAAs verificada no final da tarde permite supor que esses compostos foram degradados, e o nitrogênio foi usado em outras vias metabólicas.

A adição de NO₃ não afetou a dinâmica de acúmulo de MAAs totais quando *Porphyra columbina* foi cultivada nos tratamentos P e PA, mas promoveu a síntese de micosporina-glicina. Esse composto teve sua concentração aumentada a partir do meio dia, o que poderia sugerir que altas irradiâncias de PAR e UV-A, ou mesmo a exclusão de

UV-B, teriam induzido sua síntese. A micosporina-glicina tem maior absorvância em UV-B (310nm), porém só foi produzida na ausência da UV-B, indicando que sua síntese poderia estar relacionada à sua capacidade antioxidante.

Em geral, a porcentagem de porphyrina-334 em *Porphyra columbina* aumentou ao longo do experimento em todos os tratamentos, atingindo seu maior valor após o período de recuperação, enquanto que as porcentagens de shinorina, asterina e palitina diminuíram ao longo do tempo. Entretanto, a presença de alta irradiância UV-B teria promovido efeito contrário, pois a síntese de porphyrina-334 diminuiu as 12:30h, enquanto que a palitina, shinorina e asterina aumentaram, quando as algas foram cultivadas em ausência de NO_3 . Essa variação ficou evidente no aumento das proporções asterina/porphyrina-334, palitina/porphyrina-334 e shinorina/porphyrina-334 para esse período e tratamento. Situação inversa foi observada quando as algas foram cultivadas com adição de NO_3 . Nesse caso, o NO_3 teria induzido à síntese de porphyrina-334 e inibido a síntese de palitina, shinorina e asterina. Por outro lado, quando a intensidade de UV-B diminuiu durante a tarde, a presença de NO_3 promoveu o acúmulo de palitina, shinorina e asterina, uma vez que as proporções entre asterina/porphyrina-334, palitina/porphyrina-334 e shinorina/porphyrina-334 aumentaram. Dessa maneira, sugere-se que o efeito da adição de NO_3 na síntese e acúmulo de MAAs em *Porphyra columbina* dependa da intensidade da radiação UV-B.

A shinorina, palitina, asterina, palitinol e paliteno seriam sintetizados em duas vias metabólicas diferentes, com um precursor comum, a micosporina-glicina (KRÄBS *et al.*, 2002; CARRETO *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2008). Existem evidências da ocorrência de inter-conversões entre esses compostos (KORBEE *et al.*, 2005b). É interessante ressaltar que micosporina-glicina possui um único átomo de N em sua estrutura, enquanto que os demais MAAs derivados apresentam dois, implicando na dependência da disponibilidade de N para a síntese dessas substâncias (CARRETO *et al.*, 2005). Dessa maneira, poder-se-ia sugerir que a micosporina-glicina seria o precursor dos demais MAAs verificados em *Porphyra columbina*. O fato de que a concentração total de MAAs tenha aumentado durante o dia e que a micosporina-glicina tenha sido identificadas apenas em alguns tratamentos e tempos avaliados, sugerem que: i) esse composto é sintetizado e imediatamente transformado nos demais MAAs; ou ii) a micosporina-glicina não é o precursor dos demais MAAs. Nesse último caso, o total de MAAs teria aumentado em consequência da síntese de porphyrina-334, palitina, shinorina ou asterina, e a variação nas porcentagens dos MAAs durante o experimento teria ocorrido pela inter-conversão entre

esses MAAs. O fato da porphyrina-334 ter aumentado sua porcentagem ao longo do experimento, enquanto que os demais MAAs apresentaram uma diminuição permite sugerir uma conversão dos demais para porphyrina-334. Uma inter-conversão entre os MAAs poderia levar a um conjunto de diferentes MAAs, como respostas de ajustes às condições as quais a alga é submetida (FRANKLIN *et al.*, 1999; KRÄBS *et al.*, 2002).

O aumento na concentração total de MAAs em *Porphyra columbina* poderia contribuir para a proteção contra a UVR e os altos níveis de PAR registrados ao longo do experimento. Essa proteção ocorreria pela dissipação dessa energia como reportado para outras espécies (CONDE *et al.* 2000, 2004). Esses compostos contribuiriam ainda como antioxidantes. A micosporina-glicina é uma das MAAs com maior atividade antioxidante (DUNLAP & YAMAMOTO, 1995). Recentemente, DE LA COBA *et al.* (2009) reportou a capacidade antioxidante da shinorina e das combinações porphyrina-334/shinorina (P-334+SH) e asterina-330/ palitina (AS-330+PNE), sendo a maioria desses MAAs identificados em *P. columbina*. Futuras pesquisas poderiam ser direcionadas ao entendimento dos ciclos diários de produção de ROS e a atividade antioxidante e sua relação com o acúmulo de MAAs.

Nossos dados sugerem que *Porphyra columbina* está aclimatada (pelo menos a curto prazo) às freqüentes mudanças na razão UV-B/UV-A que ocorrem como resultado da diminuição da camada de ozônio verificada em Punta Arenas durante os meses de primavera. Neste trabalho verificaram-se no ambiente valores de UV-B/UV-A máximo de 0,037. Além disso, verificou-se que a espécie tem uma grande versatilidade em sua maquinaria bioquímica, principalmente ao que se refere à síntese de MAAs. Essa versatilidade poderia ter permitido a colonização da espécie em ambientes variados, desde o médiolitoral superior até o infralitoral.

Capítulo 6

Ultraestrutura de *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) exposta à radiação solar durante um evento de diminuição da camada de ozônio na região austral do Chile.

ABSTRACT

In this chapter, the impact of solar UV-B radiation on the ultrastructure of *Porphyra columbina* was assessed during a day with ozone layer depletion. Segments were exposed to solar radiation under three treatments (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]). Samples for transmission electron microscopy analysis were taken at the following times: i) 8:00h (initial); ii) 12:30h; iii) 18:00h, and iv) 9:00h (next day, recovery period). Ultra-structural modifications as mucilage vesicles, destruction of chloroplast internal organization (thylakoids swollen and formation of vesicles from the pirenoidal thylakoids), and the increase of cell wall thickness, took place in all treatments from 12:30h, but were more evident in the UV-B treatment (PAB). In this treatment, the mucilage vesicles showed a granular content. Starch grains were also observed in all treatments, but in different period of exposure. These ultra-structural changes did not affect the survival, once after the period of recovery, the cells showed only alteration in wall thickness and thylakoids. Our work is one of the few studies evaluating the effects of solar UV radiation on the ultrastructure of red algae and their recovery, being the first study that assesses the effects of increased UV-B radiation during a daily cycle.

RESUMO

Neste capítulo, avaliou-se o impacto da radiação solar UV-B na ultraestrutura de *Porphyra columbina* durante um dia com diminuição na concentração da camada de ozônio em Punta Arenas, Chile. Segmentos foram cultivados em três tratamentos de radiação solar (PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]). Amostras para a

análise sob microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas nos seguintes horários: i) 8:00h (início); ii) 12:30h; iii) 18:00h e iv) 9:00h (dia seguinte, período de recuperação). Alterações ultra-estruturais, como a presença de vesículas mucilaginosas, desorganização interna dos cloroplastos (tilacóides inflados e vesículas originadas a partir de tilacóides do pirenóide) e aumento na espessura da parede celular ocorreram em todos os tratamentos a partir das 12:30h, sendo mais evidentes no tratamento com radiação UV-B (PAB). Nesse tratamento, as vesículas mucilaginosas apresentaram conteúdo granulado. Grãos de amido foram também observados em todos os tratamentos, embora em diferentes tempos de exposição. Esses efeitos ultra-estruturais não afetaram a sobrevivência das frondes, uma vez que após o período de recuperação, as células apresentaram apenas alterações quanto à espessura da parede celular e tilacóides. Este é um dos poucos trabalhos que avaliam os efeitos da radiação UV solar na ultraestrutura de algas vermelhas e sua recuperação, sendo o primeiro que avalia os efeitos do aumento da UV-B durante um ciclo diário.

1. INTRODUÇÃO

A diminuição da camada de ozônio e o conseqüente aumento de radiação UV-B (280-320 nm) sobre o continente Antártico têm sido verificados a partir da década de 80 (FARMAN *et al.*, 1985; BIANCIOTTO *et al.*, 2003). Essa situação se agravou, e a partir da década de 90, a área do “buraco” na camada de ozônio alcançou níveis incomuns, atingindo o continente americano até a latitude de 38° Sul, alcançando cidades como Ushuaia (Argentina) e Punta Arenas (Chile) (ORCE & HELBLING, 1997; BIANCIOTTO *et al.*, 2003; CASICCIA *et al.*, 2003; DIAZ *et al.*, 2006). Segundo as previsões recentes, a recuperação da camada de ozônio não será alcançada antes de 2070 (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009) devido à influência de fatores relacionados às mudanças climáticas (MCKENZIE *et al.*, 2007). Essas mudanças podem promover o movimento de massas de ar de zonas equatoriais para latitudes médias e altas, o que altera as concentrações de ozônio na estratosfera (HEGGLIN & SHEPHERD, 2009).

Uma vez que a radiação UV-B pode penetrar na coluna de água (SMITH *et al.*, 1992; FIGUEROA, 2002), muitos estudos têm sido realizados visando conhecer os efeitos promovidos por esse tipo de radiação em organismos fotossintetizantes aquáticos. Efeitos negativos relacionados à radiação UV-B (artificial e natural) vêm sendo referidos para as algas marinhas, incluindo efeitos na fotossíntese, captação de nitrogênio, crescimento e danos no DNA (FRANKLIN & FORSTER, 1997; XUE *et al.*, 2005; BISCHOF *et al.*, 2006; KARSTEN *et al.*, 2009).

Embora os efeitos da radiação UV-B na fisiologia de algas estejam relativamente bem documentados, a influência dessa radiação na ultraestrutura não tem sido relatada com frequência (HOLZINGER & LÜTZ, 2006). A exposição à UV-B causou alterações ultraestruturais em microalgas (MEINDL & LÜTZ, 1996) e macroalgas (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2004, 2006; AYRES, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010a). Esses estudos têm demonstrado a existência de vários alvos suscetíveis à radiação UV, sendo as membranas lipídicas as principais estruturas afetadas. Dessa maneira, espera-se que muitas organelas possam ser atingidas e danificadas. No entanto, as estruturas que freqüentemente são reportadas como alvos da UV-B são os cloroplastos e mitocôndrias, enquanto que o núcleo, complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (RE), em geral, não são afetados (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos que reportam alterações na ultraestrutura de algas como decorrência da exposição à UV-B têm sido realizados em condições de radiação artificial

(POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2004, 2006; AYRES, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010a). Entretanto, poucos são os trabalhos que relatam os efeitos da radiação UV-B solar.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ultraestrutura de *Porphyra columbina* Montagne coletada em população natural e exposta a diferentes combinações de radiação solar (PAR; PAR+UV-A; e PAR+UV-A+UV-B) durante um ciclo diário. O experimento foi realizado num dia de primavera (8 de novembro de 2008) em que houve diminuição de ozônio e conseqüente aumento de radiação UV-B na região Austral do Chile.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Porphyra columbina foi coletada na Bahía Mansa (53°36'20" S; 70°55'55" W), município de Punta Arenas, Chile, no dia 7 de novembro de 2008 e transportada para o Laboratório de Biología Marina da Universidad de Magallanes (Punta Arenas, Chile). Porções do talo (2cm X 3cm) foram isoladas a partir da região central de diferentes indivíduos e mantidas em tanques de 50 litros de capacidade preenchidos com água do mar sem adição de meio. Esses tanques foram colocados em câmara de cultivo do tipo "walk-in" a 8°C durante uma noite.

2.2. Água do mar e meio de cultivo

A água do mar foi coletada em Punta Santa Ana, Punta Arenas, Chile. Essa água foi filtrada em filtros de 0,4µm. A salinidade foi de 32 psu. A água do mar foi enriquecida com solução de von Stosch a 50% (OLIVEIRA *et al.*, 1995) contendo 0,38 mM de NO₃ (Tabela 1, Capítulo 2).

2.3. Radiação solar

Durante o experimento as algas foram expostas a radiação solar. Esses dados foram proporcionados pelo Laboratório de Ozono da Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. Dados de irradiância PAR e UV foram registrados através de um espectroradiômetro (GUV-511, Biospherical Instrument, INC.) instalado nas dependências da mesma Universidade. O detalhe da transformação desses dados assim como o detalhes como os cálculos da irradiância solar e doses por hora são apresentado no item de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

2.4. Desenho experimental

Porções do talo de *Porphyra columbina* foram incluídas em 12 frascos de plástico fosco e contendo 1 L de meio de cultura (total de 25 porções por frasco). Após a introdução das algas, as unidades experimentais foram cobertas com os diferentes filtros de corte, visando obter os tratamentos P (PAR), PA (PAR+UVA) e PAB (PAR+UVA+UVB). As características de cada filtro estão descritas no item 6.2 de Materiais e Métodos do Capítulo 1.

Os frascos foram introduzidos em tanques contendo 150 L de água de mar não filtrada, a que foi trocada periodicamente visando manter a temperatura constante durante o experimento. As análises ultraestruturais foram realizadas a partir de uma porção de talo de cada repetição removida nos seguintes horários: i) 8:00h (horário de montagem do experimento); ii) 12:30h; iii) 18:00h; e iv) 08:00h (9 de novembro, período de recuperação). No período de recuperação, as amostras foram mantidas em câmara de cultivo, a 8°C e no escuro.

O experimento teve início no dia 8 de novembro de 2008 as 08:00. Essa data foi escolhida por ter sido prevista a ocorrência de uma diminuição na camada de ozônio e conseqüente aumento de UV-B na região austral do Chile (Fig. 2, Capítulo 5).

Fig. 1. A: Representação esquemática do experimento, no qual porções de *Porphyra columbina* foram cultivados sob três tipos de radiação solar ((PAR [P], PAR+UVA [PA] e PAR+UVA+UVB [PAB]) durante o dia 8 de novembro de 2008. B: detalhe da montagem dos frascos. C: período de recuperação em câmara de cultivo.

A metodologia empregada na fixação e preparação dos segmentos de *Porphyra columbina* para as observações no MET foi baseada em PLASTINO & COSTA (1999), com modificações, visando adequar a técnica à espécie. As modificações foram feitas principalmente nos tempos de fixação e tipos de soluções tampão.

Pequenos (0,8 x 0,4cm) segmentos de algas foram fixados em glutaraldeído 6% tamponado com fosfato de sódio 0,1M (pH 6,0) e água do mar e mantidos a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada, no mesmo tampão (0,1M) com concentrações decrescentes de sacarose (0,2N, 0,15N e 0,1N). Após duas lavagens em tampão puro, os segmentos foram pós-fixados em tetróxido de Ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 0,1M, durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, o

material foi lavado quatro vezes, sendo as duas primeiras em tampão cacodilato (0,1M) durante 15 minutos cada. As duas outras lavagens foram feitas em solução salina 0,1N, a primeira por 15 minutos e a outra por 12 horas. O material foi desidratado em uma série de concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95%, 100%), sendo 15 minutos em cada etapa; o etanol 100% foi trocado três vezes. Todas essas etapas foram realizadas a temperatura ambiente. A infiltração foi realizada em etapas, utilizando-se resina Spurr diluída em etanol. Inicialmente, foi utilizada resina e etanol na proporção 1:3, seguido de 1:2 durante uma hora cada, e de uma mistura 1:1 durante 12 horas, com duas trocas de resina pura durante uma hora cada. Finalmente, as amostras foram transferidas a molduras de silicone para montagem dos blocos e polimerização em estufa, a 68°C durante 72 horas. Os cortes ultrafinos (80µm) foram feitos com navalha de diamante e montados em telas de cobre (200 mesh). A contrastação do material foi feita com acetato de uranila 2% por 10 minutos, e posteriormente, com citrato de chumbo, por mais 10 minutos (REYNOLDS, 1963). As amostras foram observadas em microscópio Zeiss EM 900 e fotografadas.

3. RESULTADOS

Os resultados das análises dos dados de radiação UV e PAR estão descritos no item Resultados do Capítulo 5, enquanto que os valores de doses no ambiente e dose efetiva as quais as algas foram expostas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de doses de UV-B, UV-A e PAR (KJ.m^{-2}) registrados no ambiente na cidade de Punta Arenas, Chile, durante o período do experimento (8 de novembro de 2008). São apresentados também os valores de doses de UV-B, UV-A e PAR transmitidos pelos diferentes filtros utilizados para obtenção dos tratamentos, além das doses biologicamente efetivas.

Horário	Dose no ambiente			Doses transmitidas pelos filtros específicos de cada tratamento			Doses biologicamente efetivas recebidas pelas algas		
	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR	UV-B	UV-A	PAR
08:00 – 12:30	1,99	87,5	633	1,67	74,5	557	1,03	23,8	-
08:00 – 18:00	23,71	706,6	6478	19,62	601,9	5701	13,12	191,7	-

Os talos de *Porphyra columbina* são foliáceos e se caracterizam por apresentar uma camada de células (Fig. 2). A parede é constituída por microfibrilas reticuladas eletro-densas embebidas em uma matriz amorfa. Externamente à camada de células, ocorre uma matriz mucilaginosa eletro-transparente (Fig. 2, 5).

As células apresentam um único cloroplasto lobado com um pirenóide central (Fig. 3) e envolto por dupla membrana (Fig. 9). Possuem ainda tilacóides regularmente espaçados (Fig. 3). Esses tilacóides apresentaram-se inflados ou até deformados em algumas células de frondes coletadas no início do experimento (Fig. 5,8). Tilacóides intrapirenoidais foram também observados, os quais se apresentam freqüentemente inflados e, em alguns casos formando vesículas (Fig. 4, 5, 6). No interior dos cloroplastos, freqüentemente, foram observados plastoglóbulos (Fig. 13). O núcleo e numerosas mitocôndrias esféricas ou alongadas com cristas achatadas foram localizados na região periférica (Fig. 7, 8, 9, 15). Na periferia das células foi observada ainda a presença de vesículas mucilaginosas (Fig. 2, 4, 5, 7). O diâmetro dessas vesículas foi maior em células de algas expostas à PAB as 12:30h e também em todos os tratamentos as 18:00h.

Observações após 4 horas e meia de exposição (12:30h)

Frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR, mostraram tilacóides intrapirenoidais inflados (Fig. 10, 11). Os tilacóides periféricos geralmente apresentaram-se delgados, organizados, bem definidos e regularmente espaçados (Fig. 11, 12, 14). Entretanto, algumas células apresentaram organização irregular dos tilacóides (Fig. 13). Foram observadas numerosas mitocôndrias íntegras (Fig. 12, 15).

As células das frondes de *Porphyra columbina* expostas à PA apresentaram-se plasmolisadas, com redução do volume do protoplasto e desprendimento da parede celular (Fig. 16). Observaram-se ainda numerosos grãos de amido (Fig. 17, 20) e a presença de vesículas mucilaginosas nas regiões mais expostas à radiação (Fig. 16, 18). Os cloroplastos apresentaram tilacóides variando de inflados (Fig. 18, 19) até regularmente espaçados e organizados (Fig. 22). Os tilacóides na região do pirenóide apresentaram-se inflados e formando vesículas (Fig. 20). Numerosas mitocôndrias com cristas achatadas foram observadas (Fig. 17, 18, 20, 21).

Em frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAB observou-se formação de vesículas mucilaginosas com conteúdo granulado nas regiões mais expostas à radiação (Fig. 23, 24, 25). Uma única vesícula ocupava, em alguns casos, grande parte do citoplasma (Fig. 24). Um aumento na espessura e densidade da parede celular foi também observado, promovendo contorno irregular da célula principalmente em regiões expostas à radiação (Fig. 25, 26). Porções do cloroplasto, próximas às paredes de células adjacentes apresentaram tilacóides organizados (Fig. 27, 28), enquanto que aquelas mais expostas à radiação apresentaram tilacóides desorganizados (Fig. 29, 30, 31). Foi observada a presença de grãos de amido (Fig. 31, 32), embora menos freqüentes que sob PA.

Observações após 10 horas de exposição (18:00h)

Frondes de *Porphyra columbina* expostas à PAR apresentaram vesículas mucilaginosas nas regiões mais expostas a radiação (Fig. 33, 34), além da presença de grãos de amido (Fig. 34, 35, 36). Os tilacóides, em geral, apresentaram-se organizados e definidos (Fig. 37), embora em alguns casos, foram observadas deformações (Fig. 38, 40). Tilacóides regulares e deformados foram observados num mesmo cloroplasto (Fig. 37, 39, 40). Foram observadas mitocôndrias íntegras (Fig. 41).

Células de frondes expostas à PA apresentaram diminuição do volume celular (Fig. 42), além da presença de vesículas mucilaginosas na região distal e central (Fig. 42, 43). Grãos de amido foram observados (Fig. 44). Os tilacóides apresentaram-se de forma irregular, deformados e afastados entre si (Fig. 45). Porém, em algumas regiões do cloroplasto, estavam regularmente espaçados (Fig. 46). Na região do pirenóide, os tilacóides apresentaram-se inflados e formando vesículas (Fig. 47).

As células de frondes expostas à PAB apresentaram vesículas mucilaginosas com conteúdo granulado e eletro-denso (Fig. 48). Grãos de amido foram observados, embora menos freqüentes que sob PA. A formação de parede celular foi observada através da deposição de vesículas formadoras de parede (Fig. 49). Os cloroplastos apresentaram tilacóides organizados (Fig. 50, 51), porém, em algumas regiões do cloroplasto foram observados tilacóides inflados (Fig. 52, 53, 54, 55). As mitocôndrias apresentaram-se definidas (Fig. 49, 50, 51).

Observações após 14 horas de recuperação

Após 14 horas de recuperação no escuro, aquelas células de frondes cultivadas previamente no tratamento P apresentaram vesículas mucilaginosas pequenas (Fig. 56) e grãos de amido (Fig. 57, 59). Tilacóides inflados foram observados na região do pirenóide (Fig. 58), enquanto que aqueles da periferia do cloroplasto apresentaram-se desde definidos e organizados (Fig. 59), até desorganizados (Fig. 60) e inflados (Fig. 61). Várias mitocôndrias íntegras foram observadas (Fig. 57, 62, 63).

As frondes expostas previamente à PA, após o período de recuperação, apresentaram vesículas mucilaginosas pequenas e a porção interna da parede celular espessa (Fig. 64, 65, 66, 67). Grãos de amido foram menos freqüentes que durante a exposição à PA (Fig. 64, 65). Nos cloroplastos, os tilacóides apresentaram-se definidos e regularmente espaçados (Fig. 68, 70), embora se observasse também tilacóides inflados de arranjo irregular (Fig. 69, 71), formando vesículas (Fig. 69). Os tilacóides da região do pirenóide apresentaram-se inflados (Fig. 70). A presença de mitocôndrias íntegras foi freqüente (Fig. 65).

Células de frondes expostas previamente à PAB, após o período de recuperação, apresentaram parede celular espessa e diminuição do tamanho das vesículas mucilaginosas (Fig. 72, 73, 74). A maioria dos tilacóides observados apresentaram arranjo irregular (Fig. 75, 76). Os tilacóides da região do pirenóide apresentaram-se

inflados e formando vesículas (Fig, 77). As mitocôndrias apresentaram-se íntegras (Fig. 78).

4. DISCUSSÃO

Este é um dos poucos trabalhos que avaliam os efeitos ultraestruturais da radiação UV solar em algas vermelhas, sendo o primeiro a avaliar os efeitos da UV-B durante um ciclo diário com aumento de radiação UV-B solar.

As características ultraestruturais das células de *Porphyra columbina* são semelhantes às observadas em outras espécies do gênero *Porphyra* (DELIVOPOULUS *et al.*, 1999; TSEKOS *et al.*, 2002; OURIQUES *et al.*, 2011). Os cloroplastos constituídos por dupla membrana e a presença de grãos de amido dispersos no citoplasma foram comumente observados. Plastoglóbulos, estruturas envolvidas no armazenamento de lipídios, foram comumente encontrados nos cloroplastos de indivíduos coletados antes do início do experimento. Além disso, outras estruturas celulares foram identificadas, entre elas o núcleo e mitocôndrias. Foram observadas ainda associações entre organelas, as quais têm sido referidas para outras algas vermelhas (GUIMARÃES & PLASTINOS, 1999; NAVARRO *et al.*, 2010a). Essas associações parecem ser comuns nessas algas, proporcionando uma maior eficiência no metabolismo celular (OATES & COLE, 1989).

A presença de parede celular espessa em células de indivíduos de *Porphyra columbina* expostos à UV-B foi comumente observada. O aumento na espessura da parede celular resulta da produção de polissacarídeos (PUESCHEL, 1979; TSEKOS, 1981, 1985), e de uma intensa atividade dos complexos de Golgi e das vesículas mucilaginosas (PUESCHEL, 1979; TSEKOS, 1981, 1985; DELIVOPOULUS *et al.*, 1999). A liberação dessas vesículas resulta na irregularidade da plasmalema como observado em *P. columbina* e já descrito para outras espécies (TSEKOS, 1981, 1985).

A intensa produção de compostos formadores de parede celular em *Porphyra columbina* resultou em uma diminuição do volume do protoplasto em células de algas expostas a altas irradiâncias de UV, enquanto que aquelas expostas apenas à PAR não apresentaram essas alterações. A diminuição do volume do protoplasto promoveu uma compressão das organelas celulares, que foi evidenciada pela formação de grandes vesículas mucilaginosas, principalmente em indivíduos expostos à UV-B. A presença de um grande número dessas vesículas já foi referida para *P. lecosticta*, quando exposta à luz azul e vermelha (TSEKOS *et al.*, 2002). Estruturas similares, sugeridas como vacúolos, foram identificadas em carpósporos de *P. spiralis* var. *amplifolia* (OURIQUES *et al.*, 2011). Essas vesículas teriam origem a partir do RE ou de corpos membranosos concêntricos que liberam seu conteúdo na parede celular (TSEKOS *et al.*, 2002).

Exposição à UV-B artificial promoveu um incremento na espessura das paredes celulares, assim como alteração no contorno das células em *Kappaphycus alvarezii* (SCHMIDT *et al.*, 2009) e *Iridaea cordata* (NAVARRO *et al.*, 2010a). Nesses casos, houve um aumento de vesículas formadoras de parede (NAVARRO *et al.*, 2010a). SCHMIDT *et al.* (2009) mostraram que a UV-B incrementou a concentração de polissacarídeos neutros, referidos como celulose, em células de *K. alvarezii* expostas à UV-B por 28 dias. O incremento das paredes celulares de *Porphyra columbina* ocorreria para dissipar os altos níveis de UV-B e UV-A, evitando possíveis danos em organelas, como já sugerido para outras espécies (NAVARRO *et al.*, 2010a). Essas alterações poderiam ser consideradas como parte de um processo de aclimação à radiação UV (UV-A e UV-B).

Um aumento do número de grãos de amido foi observado principalmente em indivíduos de *Porphyra columbina* expostos à PAR+UV-A as 12:30 h. Já, no final da tarde, células expostas aos três tratamentos apresentaram acúmulo de grãos de amido, sugerindo que esse efeito não depende do tipo de radiação, mas do tempo de exposição à PAR, UV-A ou UV-B. O aumento no número de grãos de amido foi verificado em *Prasiola crispa* (HOLZINGER *et al.*, 2006), *Kappaphycus alvarezii* (SCHMIDT *et al.*, 2009) e *Gracilaria birdiae* (AYRES, 2009), quando as plantas foram expostas à UV-B. O aumento no número de estruturas para o armazenamento de reservas sugere danos ao metabolismo celular. Nesses casos, os indivíduos tornam-se incapazes de utilizar essas substâncias para manter as atividades de síntese e reparo, necessárias para sua manutenção quando em condições adversas, como altas intensidades de radiação solar.

As estruturas que freqüentemente são alteradas pela exposição à UV são os cloroplastos e mitocôndrias, enquanto que o núcleo, complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, em geral, não são afetados (POPPE *et al.*, 2002, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2006). Desintegração das cristas mitocondriais, induzida pela UV-B tem sido documentada para linhagens de *Gracilaria birdiae* (AYRES, 2009) e para outras espécies como *Palmaria palmata* e *P. decipiens* (POPPE *et al.*, 2003; HOLZINGER *et al.*, 2004). Em células de *Porphyra columbina* não se observou alteração das mitocôndrias, sugerindo que essas organelas não foram sensíveis aos tratamentos de radiação solar.

Células de frondes de *Porphyra columbina* expostas à UV-A e UV-B durante as primeiras 4 horas e meia de exposição (12:30h) apresentaram modificações ultraestruturais principalmente nos cloroplastos, indicando uma maior sensibilidade dessas organelas à UV, quando comparadas às demais estruturas celulares. Essa radiação promoveu a desorganização, o afastamento de tilacóides adjacentes e a formação de

vesículas. Essas alterações foram também observadas em *Palmaria decipiens* (POPPE *et al.*, 2002, 2003), *P. palmata* (HOLZINGER *et al.*, 2004) e *Gracilaria birdiae* (AYRES, 2009) expostas à UV-B. A dilatação e a formação de vesículas em tilacóides foram também observadas em cloroplastos de *Porphyra columbina* coletada antes do início do experimento, e em células expostas à PAR durante a tarde e após o período de recuperação, sugerindo que essas alterações não possam ser consideradas como um efeito exclusivo da presença da radiação UV-B. Alterações na estrutura dos cloroplastos foram também observadas em *Zygnema* sp. após a exposição à PAR, PAR+UV-A e PAR+UV-A+UV-B, durante 24 horas e em amostras coletadas no campo (HOLZINGER *et al.*, 2009).

A presença de estruturas íntegras como mitocôndrias, núcleo e parte dos tilacóides em células de frondes expostas à radiação solar sugere a existência e ativação de um eficiente mecanismo de defesa. De fato, observou-se o aumento de MAAs durante as horas de maior irradiância em frondes de *Porphyra columbina* em todos os tratamentos (Capítulo 5). Além disso, os carotenóides e as enzimas desintoxicantes e antioxidantes podem contribuir nesse mecanismo, detendo a ação destrutiva das ROS. Esses últimos compostos são apontados como responsáveis pela perda da estabilidade das membranas de células expostas à radiação UV-B e pela peroxidação dos lipídios constituintes das mesmas (KRAMER *et al.*, 1991; BOWLER *et al.*, 1992; JANSEN, *et al.*, 1998).

Figuras 2-9: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* coletada antes de iniciar o experimento. **2:** Célula com organelas e a parede celular composta de microfibrilas reticuladas elétron-densas embebidas em uma matriz amorfa (cabeça de seta preta). Notar a presença de uma matriz mucilaginosa externa. **3:** Detalhe de região central da célula: cloroplasto com tilacóides espaçadamente arranjados (seta branca) e um tilacóide inflado próximo ao pirenóide (cabeça de seta preta). **4:** Região superficial (distal) de uma célula mostrando formação de vesículas nos tilacóides do pirenóide (seta branca) cloroplasto e tilacóides do pirenóide formando vesículas (associados a mitocôndrias). **5:** Vesícula mucilaginosa localizado em região distal e formação de vesículas em tilacóide do pirenóide (setas brancas). **6:** Arranjo irregular de tilacóides em cloroplasto. **7:** Região lateral de uma célula, mostrando o arranjo de tilacóides. **8:** Tilacóides inflados (cabeças de setas brancas). **9:** Associação entre mitocôndria com cristas achatadas e cloroplastos, esses últimos mostrando dupla membrana envolvente (cabeça de setas brancas). Cloroplasto (C), cutícula (Cu), mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), vesícula mucilaginosa (Sm), pirenóide (Py).

Figuras 10-15: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após 4 horas e meia de exposição à PAR. **10:** Célula com pirenóide central e tilacóide inflado, além da presença de alguns grãos de amido. **11:** Detalhe da célula anterior mostrando cloroplastos com tilacóides organizados e presença de tilacóide inflado no pirenóide. **12:** Associação entre cloroplasto e mitocôndrias e grãos de amido (cabeças de seta preta). **13:** Arranjo irregular de tilacóides em cloroplasto mostrando ainda a presença de plastoglóbulos (seta branca). **14:** Detalhe de tilacóides arranjados espaçadamente. **15:** Mitocôndrias intactas. Cloroplasto (C), mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), plastoglóbulos (Pg), pirenóide (Py).

Figuras 16-22: Elétronmicrografias de transmissão de células de *Porphyra columbina* após 4 horas e meia de exposição à PAR+UV-A (tratamento PA). **16:** Aspecto geral das células. **17:** Grãos de amido. **18:** Mitocôndrias com cristas achatadas associadas a cloroplasto com tilacóide inflados (cabeça de seta branca). **19:** Detalhe dos tilacóides inflados. **20:** Formação de vesícula em tilacóide intrapirenoidal (cabeça de seta branca). **21:** Detalhe de mitocôndrias. **22:** Tilacóides espaçadamente arranjados. Cloroplasto (C), mitocôndria (M), parede celular (Pc), vesícula mucilaginosa (Sm), pirenóide (Py).

Figuras 23-32: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após 5 horas de exposição à PAR+UV-A+UV-B (PAB). **23 e 24:** Aspecto geral das células mostrando a forma e conteúdo das vesículas mucilaginosas além da espessura da parede celular. **25:** Célula com vesícula mucilaginosa na região distal, mostrando ainda tilacóide inflado no pirenóide (cabeça de seta branca). **26:** Detalhe da parede celular com contorno irregular. **27 e 28:** Cloroplasto com tilacóides homogêneos e espaçadamente organizados. **29:** Cloroplasto com tilacóides com organização irregular. **30:** Cloroplasto com tilacóides regular e espaçadamente organizados (cabeça de seta branca) próximos à tilacóides com organização irregular (cabeça de seta preta). **31 e 32:** associação entre mitocôndrias e cloroplastos além da presença de grãos de amido. Cloroplasto (C), mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), vesícula mucilaginosa (Sm).

Figuras 33-41: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após 10 horas de exposição à PAR. **33 e 34:** Aspecto geral das células mostrando o tamanho, forma e conteúdo das vesículas mucilaginosas, além da espessura da parede celular. **35 e 36:** Grãos de amido. **37-40:** Arranjo irregular de tilacóides, com setas pretas mostrando tilacóides inflados. **41:** Detalhe de mitocôndria. Cloroplasto (C), mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), plastoglôbulos (Pg), vesícula mucilaginosa (Sm), grão de amido (S).

Figuras 42-47: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após 10 horas de exposição à PAR+UV-A (PA). **42 e 43:** Aspecto geral das células mostrando parede celular espessa (seta). **44:** Detalhe de vesícula mucilaginosa e grãos de amido. **45-47:** Arranjo de tilacóides. **45:** Desorganizado. **46:** Tilacóides espaçadamente arranjados. **47:** Tilacóides espaçadamente organizados e outros desorganizados. Nota-se ainda formação de vesículas em tilacóide intrapirenoidal (seta preta). Parede celular (Pc), vesícula mucilaginosa (Sm), grão de amido (S).

Figuras 48-55: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após 10 horas de exposição à PAR+UV-A+UV-B (PAB). **48:** Aspecto geral de células, mostrando a forma e conteúdo das vesículas mucilaginosas além da espessura da parede celular (seta preta). **49:** Formação de parede celular a partir de vesículas formadoras de parede (setas pretas) além da presença de mitocôndrias (setas brancas). **50-55.** Arranjo de tilacóides. **50:** Tilacóides espaçadamente organizados mostrando-se também alguns tilacóides inflados (cabeça de seta branca). **51:** Tilacóides espaçadamente organizados e mitocôndrias com cristas achatadas. **52:** Tilacóides inflados e espaçadamente organizados. **53-55:** Detalhe de tilacóides inflados (cabeça de setas brancas). Cloroplasto (C), mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), vesícula mucilaginosa (Sm).

Figuras 56-63: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyrora columbina* após o período de recuperação no escuro (frondes cultivadas previamente no tratamento P: PAR). **56:** Aspecto geral das células. **57:** Detalhe da porção distal de uma célula com organelas definidas e presença de grãos de amido. **58:** Detalhe da camada interior da parede celular com densidade irregular. **59:** Presença de corpo membranoso (Cm). **60:** Arranjo irregular de tilacóides, alguns deles inflados (cabeças de setas brancas). **61:** Detalhe de tilacóides inflados e formação desses tilacóides. **62-63:** Detalhe de mitocôndrias. Cloroplasto (C), corpo membranosos (Cm), parede celular (Pc), vesículas mucilaginosas (Sm), grão de amido (S).

Figuras 64-71: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após um período de recuperação no escuro (frondes cultivadas previamente no tratamento PA: PAR+UV-A). **64:** Aspecto geral da célula. **65:** Detalhe da porção distal de uma célula com organelas definidas e parede celular mais espessa (seta preta). Observa-se também a retração do conteúdo celular (cabeça de seta branca). **66-67:** Detalhe da parede celular mais espessa (seta preta). **68-71.** Arranjo de tilacóides. **68:** Arranjo regular de tilacóides. **69:** Tilacóides irregulares e formação de vesículas em tilacóide do pirenóide (cabeça de seta branca). **70:** Tilacóides inflados (setas pretas) e tilacóides espaçadamente organizados (cabeça de seta branca). **71:** Arranjo irregular de tilacóides, alguns deles desintegrados. Cloroplasto (C), núcleo (N), parede celular (Pc), vesículas mucilaginosas (Sm).

Figuras 72-78: Elétronmicrografias de transmissão de *Porphyra columbina* após um período de recuperação no escuro (frondes cultivadas previamente no tratamento PAB: PAR+UV-A+UV-B). **72:** Aspecto geral da célula. **73:** Detalhe de porção distal de uma célula com organelas definidas e parede celular mais espessa (seta preta). **74:** Detalhe da parede celular espessa (seta preta). **75-77:** Arranjo de tilacóides. **75:** Arranjo regular de tilacóides. **76:** Tilacóides irregulares e inflados. **77:** Formação de vesículas a partir de tilacóides no pirenóide (cabeça de seta branca) e presença de tilacóides normais (cabeça de seta preta). **78:** Detalhe de mitocôndrias. Mitocôndria (M), núcleo (N), parede celular (Pc), vesículas mucilaginosas (Sm).

Capítulo 7

Discussão Geral e Conclusões

A abordagem experimental

Muitos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de se obter informações sobre os efeitos da radiação UV-B em algas cultivadas em laboratório. Alguns deles tentam extrapolar os efeitos verificados no laboratório para o campo, aludindo a possíveis cenários com drástica diminuição de ozônio. A grande dificuldade da extrapolação desses dados para a natureza está no fato de que as proporções entre UV-B/UV-A e UV/PAR empregados em laboratório são distintas das verificadas em ambiente natural. Além disso, as lâmpadas UV-B fornecem comprimentos de onda mais curta do que a radiação solar em condições de depleção de ozônio, o que poderia exacerbar os efeitos da UV-B. Em nosso trabalho, embora as algas não tenham sido expostas por longos períodos a altas e constantes irradiâncias de UV-B, tentou-se avaliar os efeitos da UV-B solar num cenário real.

Os valores de concentração de ozônio registrados durante os experimentos podem, em geral, ser considerados como esperados para as primaveras na cidade de Punta Arenas, devido a presença de massas de ar pobres em ozônio. No entanto, também se registraram valores baixos e incomuns, sendo considerados como compatíveis à definição de “buraco” na camada de ozônio (Antarctic Ozone Hole-AOH), uma vez que a definição clássica para AOH em termos quantitativos é a área geográfica na qual a coluna de ozônio é igual ou inferior a 220 UD (CASICCA *et al.*, 2003). Nossos modelos experimentais foram expostos a uma ampla variação de radiação UV-B em curtos períodos de tempo, pois durante os experimentos essa radiação variou não só ao longo do dia devido à inclinação dos raios solares, nuvens e chuva, mas também por efeito da variação na coluna de ozônio registrada sobre a cidade de Punta Arenas.

Nos experimentos executados no atual trabalho, possivelmente as algas foram expostas a maiores irradiâncias, tanto PAR quanto UVR, que os exemplares do campo, pois permaneceram próximas à superfície, o que poderia ser prejudicial para as atividades fisiológicas e sobrevivência desses organismos. No entanto, observou-se que gametófitos

e tetrasporófitos de *M. laminarioides* mantiveram taxas de crescimento semelhantes entre os tratamentos até 18 dias de experimentação.

Efeito da radiação UV-B

Em geral, o desenvolvimento e sobrevivência de *Mazzaella laminarioides* não foram afetados quando segmentos foram expostos à radiação UV-B solar direta a longo prazo (18 dias). A curto prazo (2 dias), observou-se um aumento de MAAs, principalmente shinorina e palitina, em ápices expostos à UV-B e UV-A (Capítulo 3). Esse aumento teria ocorrido já durante o primeiro dia de exposição, como verificado no Capítulo 4. No entanto, nossos experimentos não permitem conclusões sobre o efeito da UV-B na indução de MAAs em *M. laminarioides*, uma vez que o aumento desses compostos foi também observado na presença de UV-A. Nesse sentido, alguns autores têm sugerido a atuação de dois fotorreceptores, um para UV-A e outro para UV-B, na indução de MAAs (KRÄBS *et al.*, 2002).

O aumento de MAAs foi também verificado para *Mazzaella laminarioides* quando cultivada em PAR (Capítulos 3 e 4), embora em proporções menores ao observado em cultivos na presença de UV, o que sugere a possibilidade de outros comprimentos de onda específicos da PAR na indução da síntese desses compostos, como por exemplo, a luz azul (FRANKLIN *et al.* 2001; HOYER *et al.*, 2002; KORBEE *et al.*, 2005b). Assim, é possível que o acúmulo de MAAs tenha sido promovido pelo estresse ocasionado pela alta irradiância, tanto PAR quanto UV, a que foram submetidos os ápices durante os experimentos. Os MAAs atuam não apenas como fotoprotetores absorvendo radiação UV, mas também como antioxidantes, neutralizando ROS produzidas pela exposição a altas irradiâncias.

Em *Porphyra columbina*, embora a exposição a altas irradiâncias de UV-B tenha resultado em um aumento de MAAs em relação ao valor inicial, o acúmulo desses compostos foi maior quando as algas foram cultivadas apenas em PAR. Nesse tratamento, a síntese desses compostos teria ocorrido como resposta para neutralizar ROS, uma vez que os espécimes usados no experimento estavam aclimatados à sombra. Exemplos cultivados na presença de PAR+UV-A+UV-B não teriam alcançado altos níveis de MAAs, uma vez que a energia e o nitrogênio disponíveis poderiam estar sendo utilizados para reparar danos promovidos pela UV-B. De fato, a adição de NO₃ promoveu a maior concentração de MAAs registrada no tratamento PAR+UV-A+UV-B. Os MAAs seriam responsáveis pela sobrevivência de *P. columbina*, embora tenham sido verificados

efeitos ultra-estruturais, tais como, aumento no tamanho e no conteúdo de vesículas mucilaginosas e o aumento na espessura da parede celular, além de alterações nas membranas dos cloroplastos. Os efeitos ultra-estruturais seriam causados não apenas pela exposição à UV-B, mas também pelas altas intensidades de UV-A e PAR.

Nossos dados sugerem que em um cenário de depleção de ozônio mais drástico e contínuo, *Mazzaella laminarioides* poder-se-ia aclimatar a altas irradiâncias de UV-B e PAR pela de síntese de MAAs e por uma adequação de sua maquinaria bioquímica a fim de manter o crescimento. A distribuição da espécie na natureza sugere uma ampla tolerância térmica e também a diferentes intensidades de UV-B e PAR, uma vez que *M. laminarioides* ocorre desde a latitude 30° até a 56° Sul (VÁSQUEZ & VEGA, 2004; MANSILLA & NAVARRO, 2003a). Em situações de irradiância solar variável, frondes dessa espécie poderiam manter níveis de pigmentos fotoprotetores dentro de certos limites para se proteger e poderiam ainda sintetizar *de novo* proteínas danificadas utilizando reservas de nitrogênio, como a FE e a FC. De fato, frondes tetrasporofíticas de *M. laminarioides* coletadas em diferentes períodos para a realização dos experimentos dos Capítulos 2 e 3 apresentaram diferenças quanto ao conteúdo de pigmentos fotossintetizantes. Assim, aquelas amostras coletadas no início de setembro (final do inverno - menor irradiância solar) apresentaram maiores concentrações de FE e FC (Fig. 10, Capítulo 2) do que amostras coletadas no final de setembro (início da primavera - maior irradiância solar) (Fig. 8 e 9, Capítulo 3). Entretanto, as concentrações de Cl *a* e MAAs foram semelhantes entre os períodos.

Porphyra columbina, apesar de apresentar efeitos ultra-estruturais relacionados à alta irradiância PAR e UV, mostrou uma grande versatilidade no acúmulo de MAAs. Essa espécie pode colonizar ambientes variados, desde o médiolitoral superior (algas de sol) até o infralitoral (algas de sombra) em diferentes latitudes. Sua distribuição parece contribuir para uma aclimação num cenário de depleção de ozônio. Entretanto, pesquisas *in situ* são necessárias a fim de avaliar se a produção de MAAs está relacionada com padrões diários e sazonais de produção de ROS e a atividade antioxidante de outras substâncias, enzimáticas e não enzimáticas.

Dinâmica na síntese e acúmulo de MAAs

Tem sido sugerido que o conteúdo e acúmulo de MAAs é espécie-específico, e que sua síntese pode ser influenciada pela qualidade espectral, intensidade da radiação, disponibilidade de nutrientes, entre outros fatores. Neste trabalho, comprovou-se que a

síntese de MAAs em *Mazzaella laminarioides* variou com o tipo e a intensidade da radiação, com a disponibilidade de NO₃ e principalmente com o tempo de exposição à radiação solar. Em curtos períodos de tempo (ciclo diário - Capítulo 4), o conteúdo de MAAs variou não apenas com o tempo de exposição, mas também com o tipo de radiação e com a disponibilidade de nitrogênio. Após dois dias de exposição (Capítulo 3), o conteúdo de MAAs variou principalmente com o tipo de radiação, sendo que as maiores concentrações de MAAs foram observadas em tratamentos contendo UV-A e UV-B. Já a longo prazo (18 dias, Capítulo 3), o tipo de radiação não promoveu efeitos no conteúdo de MAAs, sugerindo que essa espécie atingiu valores de MAAs suficientes para se proteger contra a radiação em excesso. A análise de MAAs em amostras coletadas nas populações naturais durante ciclos diários e durante o período de um ano poderiam fornecer informações relevantes sobre a variação desses compostos, principalmente no que diz respeito a uma relação entre acúmulo de MAAs e variação na intensidade de radiação solar (PAR+UVR).

A indução de diferentes MAAs não é um processo simples, uma vez que poderia haver uma inter-conversão entre esses diferentes compostos. Essa inter-conversão poderia levar a um conjunto de diferentes MAAs, como respostas de ajustes às condições as quais as algas são submetidas (FRANKLIN *et al.*, 1999; KRÄBS *et al.*, 2002). Dessa maneira, tanto *Mazzaella laminarioides* quanto *Porphyra columbina* poderiam se aclimatar a diferentes níveis de radiação solar através da variação no seu conjunto de MAAs. Sugere-se estudos que visem conhecer o desempenho funcional de cada um desses MAAs presentes nas duas espécies, e como esses compostos contribuem para a proteção contra a alta irradiância.

Neste trabalho, observou-se também que, enquanto alguns MAAs foram sintetizados rapidamente em curtos períodos de tempo, por exemplo, shinorina em *Porphyra columbina* e shinorina e palitina em *Mazzaella laminarioides*, outros somente foram acumulados após longos períodos. Observou-se que a micosporina-glicina em *M. laminarioides* foi sintetizada preferencialmente a longo prazo (12 dias) independentemente do conteúdo de NO₃ (Capítulo 2) e do tipo de radiação (Capítulo 3). Já, em *Porphyra columbina*, houve um aumento no conteúdo da micosporina-glicina a partir do meio dia quando expostas a PAR e UV-A em presença de NO₃. Sugere-se assim, que a síntese desse composto em *P. columbina* dependa da presença de nitrogênio na água, e que comprimentos de onda de PAR poderiam induzir sua síntese. Como esse

composto tem maior absorbância em UV-B (310nm), é possível que sua síntese esteja relacionada à capacidade antioxidante.

Os diferentes MAAs variaram também durante um ciclo diário de exposição à radiação solar (Capítulos 4 e 5). Sugere-se que a síntese desses compostos, ou pelo menos de alguns desses, ocorra obedecendo-se um ciclo diário. Essa dinâmica não era conhecida em *Mazzaella laminarioides* e *Porphyra columbina*. É conhecida apenas para *Ceramium* sp. (HELBLING *et al.*, 2004) e *Anabaena* sp. (SINHA *et al.*, 2001). O aumento de MAAs durante a exposição à radiação solar em um único ciclo diário não permite generalizações, pois a radiação solar é diferente em termos de intensidade e energia por comprimentos de onda entre um dia e outro. Por essa razão, há necessidade de averiguar esse ciclo também em dias de diferentes períodos do ano. Independentemente disso, nossos resultados permitem afirmar que *M. laminarioides* e *P. columbina* possuam a capacidade de aumentar o conteúdo de pigmentos fotoprotectores em curtos períodos de tempo, sugerindo uma resposta contra as altas intensidades de radiação solar, principalmente radiação UV. Em *P. columbina* o acúmulo de MAAs foi maior em altas irradiâncias (ao meio dia), quando as algas foram cultivadas com adição de NO₃, sugerindo um efeito sinérgico desses fatores. O nitrato teria também um efeito estimulador para a síntese de MAAs em *M. laminarioides* em curtos períodos de tempo.

O efeito da adição do nitrogênio na fotoproteção

O nitrogênio é apontado como o nutriente que limita a produtividade primária (FALKOWSKI, 1997; TYRRELL, 1999). As concentrações de NO₃ utilizadas no Capítulo 2 (Von Stoch com NO₃ variando de 0 até 0,75 mM), não promoveram diferenças no crescimento de *Mazzaella laminarioides* durante 18 dias de cultivo. O crescimento em baixas concentrações de NO₃ teria sido mantido pelo deslocamento de N a partir de outras macromoléculas nitrogenadas, como FE. Isso sugere que essa espécie possa modificar seu metabolismo em condições de deficiência de NO₃ e estresse por alta irradiância, não só para manter o crescimento, mas também para manter seu sistema de fotoproteção, como a síntese de MAAs.

Os MAAs dependeriam da disponibilidade de nitrogênio na água, uma vez que são compostos nitrogenados, constituindo-se ainda em reservas de nitrogênio dentro da célula (KORBEE-PEINADO *et al.*, 2004, KORBEE *et al.*, 2005a; HUOVINEN *et al.*, 2006; FIGUEROA *et al.*, 2008). A dependência de uma fonte de nitrogênio para a síntese de MAAs foi evidenciada nos experimentos de ciclo diário (Capítulos 4 e 5). *Mazzaella*

laminarioides apresentou aumento no conteúdo de MAAs quando o NO_3 foi adicionado, independentemente do tipo de radiação. Já, no caso de *Porphyra columbina*, a adição de NO_3 promoveu um aumento de MAAs nas algas expostas ao tratamento PAB. Essas diferenças seriam resultantes das condições prévias as quais essas espécies foram submetidas. *M. laminarioides* foi mantida durante uma semana em tanques sem adição de NO_3 antes do início do experimento. Assim, a adição de NO_3 teria promovido aumento de MAAs. Já, *P. columbina* foi coletada um dia antes do início do experimento, e a exposição a altas irradiâncias teria promovido o aumento de MAAs. Com a adição de NO_3 , os MAAs apresentaram um maior aumento em presença de UV-B. Destaca-se, portanto, a importância da disponibilidade de uma fonte de nitrogênio para a fotoproteção dessas espécies. Seria interessante investigar sobre as variações no conteúdo de MAAs com relação a outras fontes de nitrogênio como nitrato, amônio e uréia.

Variações inter e intraespecífica

Embora *Mazzaella laminarioides* e *Porphyra columbina* pertençam a grupos filogenéticos distintos e possuam morfologias diferentes, ambas compartilham características fisiológicas semelhantes, como a indução de MAAs. Antes de iniciar os experimentos sobre ciclo diário, frondes de *M. laminarioides* e *P. columbina* apresentaram concentrações de MAAs inferiores a $2,5 \text{ mg.g MS}^{-1}$. Entretanto, após exposição à UV-B, houve um aumento de até 4 mg.g MS^{-1} em *M. laminarioides* e de até 10 mg. MS^{-1} em *P. columbina*. As diferenças observadas quanto às concentrações de MAAs poderiam resultar da maior sensibilidade de *P. columbina* a altas irradiâncias, incluindo UV-B, uma vez que essas algas foram coletadas no infralitoral, e estariam aclimatadas à sombra. A exposição à radiação UV-B solar direta teria promovido mecanismos de proteção, como a alta concentração de MAAs, além de efeitos ultra-estruturais.

Mazzaella laminarioides foi coletada no médiolitoral, onde está frequentemente exposta a altas irradiâncias. Possivelmente, para ocorrer nesse ambiente, *M. laminarioides* desenvolveu características adaptativas às variações de irradiância, temperatura e dessecação a que estão sujeitas as algas que ocorrem nessa faixa do costão. Dentre essas características poderiam estar a fotoinibição dinâmica, a presença de carotenóides e as barreiras físicas como a estrutura do talo. Resultados semelhantes têm sido reportados para espécies de Gigartinales com morfologia semelhante que ocupam diferentes faixas do litoral do Atlântico norte (*Mastocarpus stellatus* e *Chondrus crispus*)

(ROLEDA *et al.*, 2004a) e do sul do Chile (*Mazzaella laminarioides* e *Sarcothalia crispata*) (NAVARRO *et al.*, 2008). Nesses trabalhos verificou-se que as espécies do médiolitoral foram mais tolerantes (*Mastocarpus stellatus* e *Mazzaella laminarioides*) que as do infralitoral (*Chondrus crispus* e *Sarcothalia crispata*) quando expostas a altas irradiâncias de UV-B.

Neste trabalho, observaram-se diferenças entre gametófitos e tetrasporófitos quando expostos a altas irradiâncias de UV-A e UV-B. A tolerância dos gametófitos de *M. laminarioides* a altas irradiâncias PAR e UV estaria no fato em que esse estágio reprodutivo se distribui principalmente na zona média e superior do médiolitoral, enquanto que os tetrasporófitos ocorrem principalmente na zona inferior. Dessa maneira, os gametófitos estariam mais aclimatados a mudanças de radiação ocorridas durante o dia e durante longos períodos de tempo. A diferença na sensibilidade à radiação solar poderia então explicar a dominância da fase gametofítica em populações de *M. laminarioides* do estreito de Magallanes (MANSILLA & NAVARRO, 2003b). Estudos detalhados a fim de conhecer a estratégia de gametófitos e tetrasporófitos frente à radiação UV-B são ainda necessários para a melhor interpretação dessa distribuição na natureza, uma vez que a alternância de gerações poderia ser interrompida causando um desequilíbrio nas proporções entre essas fases.

Implicações ecológicas e biotecnológicas

As duas espécies estudadas neste trabalho são freqüentemente coletadas no Chile para fins de alimentação (*Porphyra columbina*) e extração de carragenanas (*Mazzaella laminarioides*). Como consequência da diminuição da camada de ozônio, essas algas estão sujeitas a mudanças nas condições ambientais, principalmente aumento de radiação UV-B. No entanto, nossos dados não proporcionaram evidências claras sobre possíveis efeitos negativos da UV-B na produção de *Mazzaella laminarioides*.

Entretanto, deve-se salientar que nossos experimentos foram feitos em curtos períodos de tempo e não avaliaram as possíveis consequências de uma exposição prolongada à radiação UV. Dados sobre produção são necessários para *Porphyra columbina*, tanto para aquelas que ocorrem no infralitoral, como aquelas que ocupam o médiolitoral. Entretanto, a partir dos nossos resultados, foi possível verificar que essa espécie pode produzir altas quantidades de MAAs, e essa síntese depende de fatores como tipo e intensidade de radiação, tempo de exposição e disponibilidade de nitrogênio. Dessa maneira, *P. columbina*, por seu alto conteúdo de MAAs, poderia ser selecionada

com a finalidade aplicada de obtenção de um extrato bruto desses compostos, ainda que primeiramente sua estabilidade e pureza devam ser rigorosamente testadas.

Vários estudos vêm apontando a disponibilidade de nitrogênio como um fator importante na produção de MAAs. Recentemente, foi utilizada água residual de cultivo de peixes como fonte de nitrogênio alternativa para a produção desses compostos pelas algas (FIGUEROA *et al.*, 2010), obtendo-se valores máximos de 2,5-2,7 mg MAA por grama de massa seca em *Asparagopsis armata* (FIGUEROA *et al.*, 2008). Nesse contexto, o uso de algas nativas como biofiltros e a produção de compostos de alto valor comercial, possivelmente MAAs, é desejável, a fim de evitar a introdução de espécies exóticas. *Porphyra columbina* poderia ser testada como biofiltro, avaliando-se suas concentrações de MAAs, embora estudos sobre capacidade de filtração e a preferência por compostos nitrogenados (nitrato, uréia, amônio) sejam ainda necessários. Deve-se ressaltar, entretanto, a necessidade desse tipo de estudo uma vez que a indústria da salmonicultura no Chile eventualmente aportaria enormes quantidades de compostos nitrogenados na água de mar, afetando os ecossistemas costeiros. Dessa maneira, aquelas algas que apresentem conteúdo variável de MAAs de acordo com a disponibilidade de N, poderiam ser testadas como biofiltros, visando à obtenção de matéria prima para extração de MAAs ou outros extratos com propriedades bioativas.

Perspectivas

A partir das informações obtidas neste trabalho surge a necessidade de pesquisas *in situ*, a fim de avaliar se a produção de MAAs está relacionada a padrões diários e sazonais de produção de ROS, e atividade antioxidante de outras substâncias, enzimáticas ou não. Estudos visando compreender a biologia de algas frente a interação de fatores num cenário de mudanças climáticas são ainda necessários. Neste sentido, a acidificação dos oceanos, o aporte de nutrientes e aumento da temperatura são essenciais para tentar prognosticar efeitos reais da UV-B em organismos fotossintetizantes aquáticos.

Finalmente, estudos focados na busca de espécies com capacidade de acumular altas concentrações de MAAs, ou outras substâncias bioativas, e que ainda atuem como biofiltro, são imprescindíveis num cenário de aumento da concentração de nitrogênio nos ambientes onde existam instalações de cultivos de peixes em escala produtiva. Esse cenário poderia vir a acontecer num futuro próximo, caso o governo do Chile aprove o grande número de solicitações de produtores para concessões marinhas referentes à salmonicultura.

Conclusões

A partir dos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- O crescimento de *Mazzaella laminarioides*, como parâmetro fisiológico integrador, não foi alterado pela radiação UV-B solar (tratamento PAB) nem em diferentes concentrações de NO_3 . Assim, os níveis de UV-B solar relacionados a eventos curtos de redução da camada de ozônio e ocorridos na região de Magallanes, Chile, não comprometem a sobrevivência de *M. laminarioides*.
- A exposição à UV-B solar não prejudicou a produção de carragenanas de gametófitos e de tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides*.
- Respostas diferenciadas entre gametófitos e tetrasporófitos de *Mazzaella laminarioides* foram observadas em altas irradiâncias de UV-B. Esses resultados foram compatíveis com a ocupação desses estádios no costão rochoso. Gametófitos foram mais tolerantes a altas irradiâncias e ocorrem no médiolitoral superior, enquanto que tetrasporófitos foram menos tolerantes a irradiância e ocorrem no médiolitoral inferior.
- A disponibilidade de nitrogênio, na forma de nitrato, favoreceu a fotoproteção de *Porphyra columbina* e *Mazzaella laminarioides* através da síntese e do acúmulo de MAAs. Esses compostos foram principalmente sintetizados quando essas algas foram cultivadas na presença de NO_3 .
- A curto prazo (2 dias), a exposição à radiação UV (PAR+UV-A e PAR+UV-A +UV-B) promoveu a síntese de MAAs em *Mazzaella laminarioides*. Já, a longo prazo, essa radiação não promoveu diferenças no conteúdo desses compostos entre os tratamentos de radiação testados, nem promoveu efeitos deletérios.
- Os MAAs podem ser sintetizados em curtos períodos de tempo (horas) em *Porphyra columbina* e *Mazzaella laminarioides*, evidenciando um possível ciclo diário com maior acúmulo durante as horas de maior irradiância.
- A exposição de *Porphyra columbina* à radiação solar promoveu um aumento de MAAs ao meio dia, sendo maior no tratamento P e menor no tratamento PAB. Já a adição de NO_3 promoveu um maior acúmulo de MAAs no tratamento PAB quando comparados aos demais tratamentos, evidenciando a importância de uma fonte de nitrogênio na fotoproteção dessa espécie.

- A exposição à radiação UV solar promoveu alterações ultra-estruturais em *Porphyra columbina*, principalmente o aumento no tamanho e no conteúdo de vesículas mucilaginosas e o aumento na espessura da parede celular. Alterações nos tilacóides foram observadas em todos os tratamentos e não podem ser consideradas única e exclusivamente como resposta à UV-B.

Resumo

Este trabalho analisou os efeitos da radiação solar UV (UV-A e UV-B) em duas espécies de importância comercial do Chile, *Mazzaella laminarioides* e *Porphyra columbina* durante a primavera, período no qual frequentemente tem sido verificado um aumento de radiação UV-B decorrente da diminuição da camada de ozônio. A interação entre a radiação UV e o suprimento de N foi também investigada. Essa interação estimulou a síntese de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) nas duas espécies, durante a exposição a altas irradiâncias de UV em curtos períodos. Esses resultados sugerem um ciclo diário na síntese desses compostos. A longo prazo (18 dias de cultivo), a adição de diferentes concentrações de NO_3 não promoveu diferenças no conteúdo de MAAs e no crescimento de *M. laminarioides*, sugerindo uma adequação do metabolismo da espécie às condições experimentais. Discute-se a mobilização do N intra-celular para a manutenção da capacidade de fotoproteção das algas. Em geral, a UV-B não promoveu efeitos deletérios no crescimento e na produção de carragenanas em tetrasporófitos e gametófitos de *M. laminarioides*, o que seria esperado para uma espécie do médiolitoral que está exposta a variações na quantidade e qualidade de radiação solar. Entretanto, observou-se uma resposta diferenciada entre esses estádios em altas intensidades de irradiâncias de PAR e UV-B, sugerindo que gametófitos podem se aclimatar mais rapidamente a mudanças na irradiância solar do que tetrasporófitos. As radiações UV-B e UV-A promoveram alterações ultraestruturais em *P. columbina*. No entanto, após um período no escuro, foi observada uma recuperação parcial dessas estruturas. A partir dos resultados deste trabalho, pode-se concluir que os níveis de UV-B solar que atingiram a região de Magallanes, Chile, não causaram efeitos negativos para a produção de *M. laminarioides*. Entretanto, promoveram um grande acúmulo de MAAs em *P. columbina*, principalmente em experimentos com disponibilidade de nitrogênio.

■

Abstract

This work analyzed the effects of solar UV radiation (UV-A and UV-B) on two commercial important species from Chile, *Mazzaella laminarioides* and *Porphyra columbina*, during the spring when it has often been reported a ozone layer depletion, and consequently increased UV-B radiation. Additionally, the interactive role of nitrogen supply and UV radiation was also investigated. This interaction stimulated synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in both species when exposed to high UV irradiance in short-term cultivation. These results suggest the presence of a daily cycle in the MAAs production. In the long-term (18 days), different concentrations of N supply did not cause differences neither in MAAs content nor in growth, suggesting a metabolic acclimation to the experimental conditions. The shift of intracellular N from photosynthetic pigments to MAAs to maintain the capacity of photoprotection is discussed. In general, the UV-B did not cause differences neither in growth nor in carrageenan production in tetrasporophytes and gametophytes of *M. laminarioides*, once a intertidal species is exposed to variations in solar radiation quality and quantity. However, differentiated responses between gametophytes and tetrasporophytes were observed in high UV and PAR irradiances, suggesting that gametophytes can acclimate more quickly to solar radiation changes than tetrasporophytes. The UV-B and UV-A radiation promoted ultra-structural changes in *P. columbina*. However, a partial recovery was observed after a period in dark. Based on these results we concluded that UV-B levels that were reaching Magallanes Region, Chile, did not affect biomass production of *M. laminarioides*, but promoted a greater accumulation of MAAs in *P. columbina* when cultivated with N addition.

Referências Bibliográficas

- ABDALA-DIAZ, R.T.; A. CABELLO-PASINI; E. PEREZ-RODRIGUEZ; R.M. CONDE-ALVAREZ & F.L. FIGUEROA. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 148: 459-465.
- ADAMSE, P. & S. BRITZ. 1992. Spectral quality of two fluorescent UV sources during long-term use. *Photochem. Photobiol.* 56: 641-644.
- AGUILERA, J.; A. DUMMERMUTH; U. KARSTEN; R. SCHRIEK & C. WIENCKE. 2002. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.* 25: 432-441.
- AGUILERA, J.; C. JIMÉNEZ; F. FIGUEROA; M. LEBERT & D. HÄDER. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photoch. Photobiol. B.* 48: 75-82.
- AGUIRRE-VON-WOBESER, E.; F.L. FIGUEROA & A. CABELLO-PASINI. 2000. Effects of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *J. Appl. Phycol.* 12: 159-168.
- ALGARRA, P. & W. RÜDIGER. 1993. Acclimatation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environ.* 16: 149-159.
- ALLEN DJ, MCKEE IF, FARAGE PK, BAKER NR (1997) Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UVB. *Plant Cell Envir.* 20: 633-640.
- ALLEN, D.J.; S. NOGUÉS & N.R. BAKER. 1998. Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 49: 1775-1788.
- ALSCHER, R.G.; N. ERTURK & L.S. HEATH. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.
- ALTAMIRANO, M.; A. FLORES-MOYA & F. FIGUEROA. 2002. Effects of the radiation and temperature on growth of germling of three species of *Fucus* (Phaeophyta). *Aquat. Bot.* 1606: 1-12.
- ALTAMIRANO, M.; A. FLORES-MOYA & F.L. FIGUEROA. 2000b. Growth seasonality, photosynthetic pigments, and C and N content in relation to environmental factors: a field study on *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia* 39: 50-58
- ALTAMIRANO, M.; A. FLORES-MOYA & F.L. FIGUEROA. 2000a. 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: 19-126.
- AMSLER, C.D. & V.A. FAIRHEAD. 2005. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv. Bot. Res.* 43: 1-91
- ANDRIA, J.R.; J.J. VERGARA & L.P. LLORÉNS. 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
- ANG, P.O.JR. 1991. Natural dynamics of a *Fucus distichus* (Phaeophyta, Fucales) population: reproduction and recruitment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 78: 71-85.
- ANGGADIREDJA, J.; R. ANDYANI; HAYATI & MUAWANAH. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.* 9: 477-479.
- ARO, E.M.; I. VIRGIN & B. ANDERSSON. 1993a. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.

- ARO, E.M.; S. MCCAFFERY & J.M. ANDERSON. 1993b. Photoinhibition and D1 Protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 104: 1033–1041.
- ASADA, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. IN: *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses*. SCANDALIOS, J. G. (ED). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York, EE. UU. pp. 715-735.
- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 50: 601–39.
- 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.
- BAKER, C. J. & E.W. ORLANDI. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299–321.
- BAÑARES, E.; A. ALTAMIRANO; F.L. FIGUEROA & A. FLORES-MOYA. 2002. Influence of UV radiation on growth of sporelings of three non-geniculate coralline red algae from Southern Iberian Peninsula. *Phycol. Res.* 50: 23-30.
- BANASZAK, A.T. & P.J. NEALE. 2001. Ultraviolet radiation sensitivity of photosynthesis in phytoplankton from an estuarine environment. *Limnol. Oceanogr.* 46:592–603.
- BANDARANAYAKE, W.M. 1998) Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat. Prod. Rep.* 15: 159-172.
- BAR, E.; M. RISE; M. VISHKAUTSAN & A. SHOSHANA. 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.* 146: 527-34.
- BARNES, P.; S. FLINT & M. CADWELL. 1990. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *Amer. J. Bot.* 77: 1354-1360.
- BARNES, P.W.; C.L. BALLARÉ & M.M. CALDWELL. 1996. Photomorphogenetic effects of UV-B radiation on plants: consequences for light competition. *J. Plant Physiol.* 148: 15-20.
- BARNES, P.W.; P.W. JORDAN; W.C. GOLD; S.D. FLINT & M. CALDWELL. 1988. Competition, morphology and canopy structure in wheat (*Triticum aestivum* L.) and wild oat (*Avena fatua* L.) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Funct. Ecol.* 2: 319-330.
- BARR, N.G. & T.A.V. REES. 2003. Nitrogen status and metabolism in the green seaweed *Enteromorpha intestinalis*: an examination of three natural populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249: 133-144.
- BARROS, M.P.; E. PINTO; P. COLEPICOLO & M. PEDERSÉN. 2001. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288: 225-232.
- BEACH, K.S.; C.M. SMITH & R. OKANO. 2000. Experimental analysis of rhodophyte photoacclimation to PAR and UV-radiation using *in vivo* absorbance spectroscopy. *Bot. Mar.* 43: 525-536.
- BEARDALL, J.; P. HERAUD; S. ROBERTS; K. SHELLY & S. STOJKOVIC. 2002. Effects of UV-B radiation on inorganic carbon acquisition by the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Phycol.* 41: 268-272.
- BEER, S. & A. ESHEL. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36: 785-792.
- BEN-AMOTZ, A. & M. AVRON. 1988. The wavelength dependence of massive of carotene synthesis in *Dunaliella bardawil*. *J. Phycol.* 25: 178-83.
- BENTLEY, R. 1990. The shikimate pathway- a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 307-384.

- BERNER, T & I. IZHAKI. 1994. Effects of exogenous nitrogen levels on ultrastructure of zooxanthellae from the hermatypic coral *Pocillopora damicornis*. *Pc. Sci.* 48: 254-262.
- BIANCIOOTTO, O.A.; L.B. PINEDO; N.A. SAN ROMAN; A.Y. BLESSIO & M.B. COLLANTES. 2003. The effects of natural UV-B radiation on a perennial *Salicornia* salt-marsh in Bahía San Sebastián, Tierra del Fuego, Argentina: a 3-year field study. *J. Photoch. Photobiol. B.* 70: 177-185.
- BISCHOF, K.; D. HANELT & C. WIENCKE. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211: 555-562.
- BISCHOF, K.; D. HANELT; H. TÜG; U. KARSTEN; P.E.M. BROUWER & C. WIENCKE. 1998. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.* 20:388-395.
- BISCHOF, K.; G. KRÄBS; C. WIENCKE & D. HANELT. 2002c. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta* 215: 502-509.
- BISCHOF, K.; G. PERALTA; G. KRÄBS; W.H. VAN DE POLL; J.L. PÉREZ-LLORÉNS & A. M. BREEMAN. 2002d. Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva* communities from southern Spain. *J. Exp. Bot.* 53: 2411-2421.
- 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.; I. GÓMEZ; M. MOLIS; D. HANELT; U. KARSTEN; U. LÜDER; M.Y. ROLEDA; K. ZACHER & C. WIENCKE. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5: 141-166
- BLOKHINA, O.; E. VIROLAINEN & K. FAGERSTEEDT. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
- BOJKOV R.D.; V.E. FIOLETOV & S.B. DÍAZ. 1995. The relationship between solar UV irradiance and total ozone from observations over southern Argentina. *Geophys. Lett.* 22: 1249-1252
- BONOMI, J. 2010. *Fotoproteção em Gracilaria tenuistipitata (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular*. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, xiv, 325p
- BONOMI, J.; M.T. MATA; M.C. OLIVEIRA & F.L. FIGUEROA. 2011. Nitrate reduces the negative effect of UV radiation on photosynthesis and pigmentation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): the photoprotection role of mycosporine-like amino acids. *Phycologia* (in press)
- BONOMI, J.; N. KORBEE; M.C. OLIVEIRA & F.L. FIGUEROA. 2010. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photo protectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-010-9603-x
- BORNMAN, J.F. 1989. Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *Photochem. Photobiol.* 4: 145-158.
- BORNMAN, J.F. 1996. Interaction of UV radiation with the photosynthetic systems. In: JENNINGS, R.C.; G. ZUCHELLI; F. GLERETTI & G. COLOMBETTI (eds). *Light as an energy source and information carrier in plant physiology*. Plenum Press, New York.
- BOTHWELL, M.; D. SHERBOT; A. ROBERGER & R. DALEY. 1993. Influence of natural ultraviolet-radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: short-term versus long-term effects. *J. Phycol.* 29: 24-35.

- BOUCHARD, J.N.; S. ROY & D.A. CAMPBELL. 2006. UVB effects on the photosystem II-D1 protein of phytoplankton and natural phytoplankton communities. *Photochem. Photobiol.* 82: 936-951.
- BOUSSIBA, S. & A. E. RICHMOND. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.
- BOWLER, C.; M. VAN MONTAGU & D. INZÉ. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- 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.
- BRANDLE, J.R.; W.F. CAMPBELL; W.B. SISSON & M.M. CALDWELL. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 60: 165-169.
- BRAUNE, W. & G. DÖHLER. 1996. Impact of UV-B radiation on ¹⁵N-ammonium and ¹⁵N-nitrate uptake by *Haematococcus lacustris* (Volvocales). II. The influence of a recovery period. *J. Plant Physiol.* 149: 349-357.
- BRAWLEY, S.H. & L.E. JOHNSON. 1991. Survival of fucoid embryos in the intertidal zone depends upon developmental stage and microhabitat. *J. Phycol.* 27: 179-186.
- BRITT, A.B. 1995. DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 75-100.
- BRITT, A.B. 2004. Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynth. Res.* 81: 105-112.
- BUCHANAN, B.B.; W. GRUISSEM & R.L. JONES. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. Plant Physiol., USA. 1367 p.
- BUFFONI, R.S.; J.F. BORNMAN & L.O. BJÖRN. 2002. UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* spp. *mitis*. *J. Photoch.. Photobiol. B.* 66: 13-20.
- BUMA, A.G.J.; E.J. VAN HANNEN; L. ROZA; M.J.W. VELDHUIS & W.W.C. GIESKES. 1995. Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J. Phycol.* 31: 314-321.
- BUMA, A.G.J.; T. VAN OIJEN; W.H. VAN DE POLL; M.J.W. VELDHUIS & W.W.C. GIESKES. 2000. On the high sensitivity of the marine Prymnesiophyte *Emiliania huxleyi* to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 36: 296-303.
- BURRITT, D. J.; J. LARKINDALE & K. HURD. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215: 829-838.
- BUSCHMANN, A.H.; J. CORREA; R. WESTERMEIER; M. HERNANDEZ & R. NORAMBUENA. 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220.
- CABRERA, S.; S. BOZZO & H. FUENZALIDA. 1995. Variation in UV radiation in Chile. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28: 137-142.
- CALDWELL, M.H.; A.H. TERAMURA & M. TEVINI. 1989. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol. Evol.* 4: 363-367.
- CALDWELL, M.H.; R. ROBBERECHT & S.D. FLINT. 1983. Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plant. *Physiol. Plant.* 58: 445-450.
- CALDWELL, M.M. & S.D. FLINT SD. 1994. Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Clim. Change* 28: 375-394.
- CALDWELL, M.M. & S.D. FLINT. 1997. Uses of biological spectral weighting functions and the need for scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecol.* 128: 66-76.
- CALDWELL, M.M.; C.L. BALLARÉ; J.F. BORNMAN; S.D. FLINT; L.O. BJÖRN; T.H. TERAMURA; G. KULANDAIVELU & M. TEVINI. 2003. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet

- radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 29–38.
- CAMPBELL, D.; M.J. ERIKSSON; G. OQUIST; P. GUSTAFSSON & A.K. CLARKE. 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 364–369
- CARELL, T.; L.T. BURGDORF; L.M. KUNDU & M. CICHON. 2001. The mechanism of action of DNA photolyases. *Current Opinion Chem. Biol.* 5: 491-498.
- CARELL, T. & R. EPPLE. 1998. Repair of UV light induced DNA lesions: a comparative study with a model compounds. *Eur. J. Org. Chem.* 1245-1258.
- CARRETO, J.I.; M.O. CARIGNAN, & N.G. MONTOYA 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.
- CARRETO, J.I.; M.O. CARIGNAN; D. DALEO & S.G. DE MARCO. 1990. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavantum*: UV-protoprotective compounds? *J. Plankton Res.* 12: 909-922.
- CARROLL, A.K. & J.M. SHICK. 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Mar. Biol.* 124: 561- 69.
- CASICCIA, C., V.W.J.H. KIRCHHOFF & A. TORRES. 2003. Simultaneous measurements of ozone and ultraviolet radiation: spring 2000, Punta Arenas, Chile. *Atmos. Environ.* 37: 383-389
- CHEN, J.J.; D.L. MITCHEL & A.B. BRITT. 1994. A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6-4) pyrimidinone photoproducts in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1311-1317.
- CHOO, K.S.; J. NILSSON, M. PEDERSÉN & P. SNOEIJIS. 2005. Photosynthesis, carbon uptake and antioxidant defence in two coexisting filamentous green algae under different stress conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 292: 127–138.
- CHOPIN, T.; A.H. BUSCHMANN; C. HALLING; M. TROELL; N. KAUTSKY; A. NEORI; G.P. KRAEMER; J.A. ZERTUCHE-GONZÁLEZ; C. YARISH & C. NEEFUS. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J. Phycol.* 37: 975-986.
- CHOW, F.; J. MACCHIAVELLO; S. SANTA-CRUZ; E. FONCK & J. OLIVARES. 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters and sea urchins. *J. World Aquac. Soc.* 32: 215-220.
- CHOW, W.S.; A. STRID & J.M. ANDERSON. 1992. Short-term treatment of pea plants with supplementary ultraviolet-B radiation: Recovery time-course of some photosynthetic and components. *Plant Cell* 4: 129-134.
- CHRISTIE, J.M. & G.J. JENKINS. 1996. Distinct UV-B and UV-A/blue light transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 8: 1555–1567.
- COCKELL, C.S. & J. KNOWLAND. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74: 311–345.
- COLLÉN, J. & I.R. DAVISON. 1999a. Reactive oxygen production and damage in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 32: 54–61.
- COLLÉN, J. & I.R. DAVISON. 1999b. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35: 62–69.
- CONDE, F.R.; M.S. CHURIO & C.M. PREVITALI. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. *J. Photoch. Photobiol. B.* 56: 139-144.

- CONDE, F.R.; M.S. CHURIO & C.M. PREVITALI. 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.
- CONTRERAS, L.; A. MOENNE & J.A. CORREA. 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments *J. Phycol.* 41: 1184-1195
- COOPER, J.C. & R.G. ZIKA. 1983. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science* 220: 711-712.
- CORDI, B.; M. DEPLEDGE; D. PRICE; L. SALTER & M. DONKIN. 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. *Mar. Biol.* 130: 41-49.
- CORZO, A. & F. X. NIELL, 1991. Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the in situ method. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 146: 181-191.
- COSTA, V.L. 2005. *Diversidade intraespecífica em gametófitos de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 100 p.
- CRAIGIE, J. 1990. Cell wall. In: COLE, K.L. & R.G. SHEATH (eds) *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, New York.
- CRITCHLEY, C. & W. RUSSELL. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: the role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.* 92: 188-196.
- CRUTZEN, P.J. 1992. Ultraviolet on the increase. *Nature* 356: 104-105.
- CUADRA, P. & J. HARBORNE. 1996. Changes in epicuticular flavonoid and photosynthetic pigments as a plant response to UV-B radiation. *Z. Naturforsch.* 51c: 671-680.
- CUADRA, P.; J. HARBORNE & P. WATERMAN. 1997. Increases in flavonoid and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* 45: 1377-1383.
- CULLEN, J.J. & M.P. LESSER. 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.
- DAT, J.F.; R. PELLINEN; T. BEECKMAN; B. VAN DE COTTE; C. LANGERBARTELS; J. KANGASJÄRVI; D. INZÉ & F. VAN BREUSEGEM. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J.* 33: 621-32.
- DAVISON, I.R. & G.A. PEARSON. 1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32: 197-211.
- DAVISON, I.R. & W.D.P. STEWART. 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 65-78.
- 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.
- DELIVOPOULUS, S.G.; M. POLNE-FULLER & B.E. DIANNELIDIS. 1999. Ultrastructural study of the differentiated blade of *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Nova Hedwigia* 68: 65-74.
- DESIKAN, R.; A.H. MACKERNES; J.T. HANCOCK & S.J. NEILL. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172.
- DIAZ, S.; C. CAMILIO; G. DEFERRARI; H. FUENZALIDA; R. ARMSTRONG; C. BOOTH; A. PALADINI; S. CABRERA; C. CASICCA; C. LOVENGREEN; J. PEDRONI; A. ROSALES; H. ZAGARESE & M. VERNET. 2006. Symposium-in-Print: UV effects on aquatic and coastal ecosystems ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies. *Photochem. Photobiol.* 82: 834-843

- DIFFEY, B. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological system. *Phys. Med. Biol.* 36: 299-328.
- DILLON, J.G. & R.W. CASTENHOLZ. 1999. Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC radiation: implications for early photosynthetic life. *J. Phycol.* 35: 673-681.
- DÖHLER, G. 1996. Effect of UV irradiance on utilization of inorganic nitrogen by the Antarctic diatom *Odontella weissflogii* (Janisch) Grunow. *Bot. Acta* 109: 35-42.
- DÖHLER, G.; E. HAGMEIER & C.H. DAVID. 1995 Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ¹⁵N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 30: 179-187.
- DRING, M.; A. WAGNER; J. BOESKOV & K. LÜNING. 1996b. 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.
- DRING, M.; V. MAKAROV; E. SCHOSCHINA; M. LORENZ & K. LÜNING. 1996a. Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of *Laminaria* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 126: 183-191.
- DUFFY, J.E. & M.E. HAY. 2000. Strong impacts of grazing amphipods on the organization of a benthic community. *Ecol. Monogr.* 70: 237-263
- DUMMERMUTH, A.L., U. KARSTEN, K.M. FISCH, G.M. KÖNIG & C. WIENCKE. 2003. Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289: 103-121.
- DUNLAP, W.C. & J.M. SHICK. 1998. UV radiation absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* 34: 418-430.
- DUNLAP, W.C. & YAMAMOTO, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B:105-114.
- EDGE, R.; D.J. MCGARVEY & T.G. TRUSCOTT. 1997. The carotenoids as antioxidants – a review. *J. Photoch. Photobiol. B.* 41: 189-200.
- EDWARDS, P. 1970. Illustrated guide to seaweeds and seagrasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contr. Mar. Sc. Austin.* 15: 1-228.
- EL-BAZ, F.K.; M.A. ABOUL-ENEIN; G.S. EL-BAROTY; A.M. YOUSSEF & H.H. ABD EL-BAKY, 2002. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. *Online J. Biol. Sci.* 2: 220-223.
- EL-BAKY, H.H.A; F.K. EL BAZ & GS. EL-BAROTY. 2004. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Agriculture & Biology* 6: 49-57.
- 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.
- ESWARAN, K.; P.V. SUBA RAO & O.P. MAIRH. 2001. Impact of ultraviolet-B radiation on a marine red alga *Kappaphycus alvarezii*. *Indian J. Mar. Sci.* 30: 105-107.
- FAIRHEAD, V.A.; D.A. AMSLER & J.B. MCCLINTOCK. 2006. Lack of defence or phlorotannin induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D. menziesii* (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 42: 1174–1183.
- FALKOWSKI, P.G. & J. LAROCHE. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27: 8-14.
- FALKOWSKI, P.G. 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* 387: 272-275.
- FARMAN, J.C.; B.G. GARDINER & J.C. SHANKLIN. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal Cl_x/No_x interaction. *Nature* 315: 207-210.
- FAVRE-BONVIN, J.; BERNILLON, J.; SALIN, N. & ARPIN, N. 1987. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 26: 2509-2514.

- FIGUEROA F.L.; L. ESCASSIA; E. PÉREZ-RODRÍGUEZ; N. KORBEE; A.D. GILES & G. JOHNSEN. 2003c. Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J. Photoch. Photobiol. B.* 69: 21–30
- FIGUEROA F.L.; R. CONDE-ÁLVAREZ; I. GÓMEZ. 2003a. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.* 75: 259–275.
- FIGUEROA, F.L. & B. VIÑEGLA. 2001. Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74: 237–249.
- FIGUEROA, F.L. 1996. Effects of light quality on nitrate reductase and glutamine synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jol. and other macroalgae. *Sci. Mar.* 60: 163–170.
- FIGUEROA, F.L., 2002. Bio-optical characteristics of Gerlache and Bransfield Strait waters during an Antarctic summer cruise. *Deep Sea Res. Part II* 49: 675–691.
- FIGUEROA, F.L., S. SALLES; J. AGUILERA; C. JIMÉNEZ; J. MERCADO; B. VIÑEGLA; A. FLORES-MOYA & M. ALTAMIRANO. 1997a. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81–90.
- FIGUEROA, F.L.; A. BUENO; N. KORBEE; R. SANTOS; L. MATA & A. SCHUENHOFF. 2008. Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream *Asparus aurata*. *Journal of World Aquaculture Society* 39: 692–699.
- FIGUEROA, F.L.; A. ISRAEL; A. NEORI; B. MARTÍNEZ; E.J. MALTA; A. PUT; S. INKEN; E.R. MARQUARDT; R. ABDALA & N. KORBEE. 2010. Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to a short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Mar. Pollut. Bull.* 60: 1768–1778.
- FIGUEROA, 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.
- FIGUEROA, F.L.; C. JIMENEZ; L.M. LUBIAN; O. MONTERO; M. LEBERT & D.-P. HÄDER. 1997b. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana* Lubian (Eustigmatophyceae). *J. Plant Physiol.* 151: 6–15.
- FIGUEROA, F.L.; C. NYGARD; N. EKLUND & I. GÓMEZ. 2003b. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *J. Photoch. Photobiol. B.* 72: 35–44.
- FISCUS, E.L. & F.L. BOOKER. 1995. Is increased UV-B a threat crop photosynthesis and productivity? *Photosynth. Res.* 43: 81–92.
- FLAMELING, I.A. & J. KROMKAMP. 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. & FIGUEROA, 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.; FIGUEROA, 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. Photoch. Photobiol. B.* 49: 129–35.

- FOYER, C.H.; M. LELANDAIS & K.J. KUNERT. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plantarum* 92: 696–717.
- FRANKLIN, L. & R. FORSTER. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32: 207–232.
- FRANKLIN, L.; I. YAKOVLEVA; U. KARSTEN & K. LÜNING. 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.
- FRANKLIN, L.A.; G. KRÄBS & R. KUHNENKAMP. 2001. Blue light and UVA radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *J. Phycol.* 37: 257–270.
- FREDERICK, J.E.; H.E. SNELL & E.K. HAYWOOD. 1989. Solar ultraviolet radiation at the Earth's surface. *Photochem. Photobiol.* 50: 443–450.
- FREDERICK, J.E.; S. B. DIAZ; I. SMOLSKAIA; W. ESPOSITO; T. LUCAS & C.R. BOOTH. 1994. Ultraviolet solar radiation in the high latitudes of South America. *Photochem. Photobiol.* 60: 356–362.
- FRIEDBERG, E.C.; G.C. WALTER & W. SIEDE. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC.
- GANTT, E. 1981. *Phycobilisomes*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 327–347.
- GANTT, E. 1990. Pigmentation and photoacclimation. In: COLE, K. & K.G. SHEATH (eds). *Biology of the red algae*. Cambridge. Cambridge University Press. pp. 203–221.
- GAO, W.; Y. ZHENG; J.R. SLUSSER & G.M. HEISLER. 2003. Impact of enhanced ultraviolet-B irradiance on cotton growth, development, yield, and qualities under field conditions. *Agr. Forest Meteorol.* 120: 241–248.
- GAO, Y.; G.J. SMITH & R.S. ALBERTE. 1992. Light regulation of nitrate reductase in *Ulva fenestrata* (Chlorophyceae). I. Influence of light regimes on nitrate reductase activity. *Mar. Biol.* 112: 691–696.
- GARCÍA-PICHEL, F.; C.E. WINGARD & R.W. CASTENHOLZ. 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 170–176.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M.J.; J.A. FERNÁNDEZ & F.X. NIELL. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plantarum* 88:631–637.
- GARDE, K. & K. GUSTAVSON. 1999. The impact of UV-B radiation on alkaline phosphatase activity in phosphorus-depleted marine ecosystem. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238: 93–105.
- GEIDER, R.J. & LA ROCHE, J. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37: 1–17.
- GENTY, B.; J.M. BRIANTAIS & N.R. BAKER. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.
- GERHARDT, K.E.; M.I. WILSONY & B.M. GREENBERG. 2005. Ultraviolet radiation and terrestrial ecosystems ultraviolet wavelength dependence of photomorphological and photosynthetic responses in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Photochem. Photobiol.* 81: 1061–1068.
- 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.
- GLYNN, P.W.; R. IMAI; K. SAKAI; Y. NAKANO & K. YAMAZATO. 1993. Experimental responses of Okinawan (Ryukyu Islands, Japan) reef corals to high sea temperature and UV radiation. Proceedings of the 7th International Coral Reef Symposium University of Guam Press, Guam, USA 1: 27–37.

- GÓMEZ, I.; E. PÉREZ-RODRÍGUEZ; B. VIÑEGLA; F.L. FIGUEROA & U. KARSTEN. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. *J. Photoch. Photobiol. B.* 47:46-57.
- GÓMEZ, I.; F. LÓPEZ-FIGUEROA; N. ULLOA; V. MORALES; C. LOVENGREEN; P. HUOVINEN & S. HESS. 2004. Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 270: 103–116
- GÓMEZ, I.; F.L FIGUEROA; I. SOUSA-PINTO; B. VIÑEGLA; E. PÉREZ-RODRÍGUEZ; C. MAESTRE; S. COELHO; A. FELGA & R. FERREIRA. 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.; F.L. FIGUEROA; P. HUOVINEN; N. ULLOA & V. MORALES. 2005. Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture* 244: 369– 382
- GÖTZ, T.; G. SANDMANN & S. ROMER. 2002. Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 50: 129-142.
- GÖTZ, T.; U. WINDHÖVEL; P. BÖGER & G. SANDMAN. 1999. Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC79421. *Plant Physiol.* 120: 599–604
- GREENBERG, B. M.; V. GABA; O. CANAANI; S. MALKIN; A. K. MATTOO & M. EDELMAN. 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction centre protein in the visible and UV spectral regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6617–6620.
- GREENBERG, B.M.; M.I. WILSON; X. HUANG; C.L. DUXBURY; K.E. GERHARDT & R.W. GENSEMER. 1997. The effect of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: WANG, W.; J.W. GORSUCH & J.S. HUGHES (eds). *Plants for environmental studies*, pp. 1-35. Lewis Publishers, Boca Raton.
- GROBE, C. & T. MURPHY. 1994. Inhibition of growth of *Ulva expansa* (Chlorophyta) by ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 30: 783-790.
- GROBE, C. & T. MURPHY. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. & G. (Chlorophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 225: 39 – 51.
- GRÖNIGER, A.; R.P. SINHA; M. KLISCH & D. HÄDER. 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae – a database. *J. Photoch. Photobiol. B.* 58: 115-122.
- GÜNTER, E.A. & Y.S. OVODOV. 2007. The effect of ultraviolet radiation on the growth and polysaccharide composition of a callus culture of *Silene vulgaris*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 465-472.
- HADER D.-P., H.D. KUMAR, R.C. SMITH, R.C. WORREST. 1998. Effects on aquatic ecosystems, *J. Photoch. Photobiol. B* 46 53–68.
- HÄDER D.P.; M. LEBERT & E.W. HELBLING 2003. *In situ* effects of solar radiation on photosynthesis in the Patagonian Rhodophyte, *Porphyra columbina* Montagne, *Recent Res. Devel. Biochem.* 4: 931–944.
- HÄDER, D.; H. KUMAR; R. SMITH & R. WORREST. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *J. Photoch. Photobiol. B.* 46: 53-68.
- HÄDER, D.; R. WORREST; H. KUMAR & R. SMITH. 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio.* 24: 174-180.
- HÄDER, D.P. & F.L. FIGUEROA. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. *J. Photoch. Photobiol. B.* 66:1-14.

- HÄDER, D.P. & R.P. SINHA. 2005. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutat. Res.* 571: 221-233
- HAN, Y.S. & T. HAN. 2005. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41: 523-530.
- HANELT, D. & M.Y. ROLEDA. 2009. UVB radiation may ameliorate photoinhibition in specific shallow-water tropical marine macrophytes. *Aquat. Bot.* 91: 6-12.
- HANELT, D.; C. WIENCKE & K. BISCHOF. 2003. Photosynthesis in marine macroalgae. In: Larkum, A.; S.E. Douglas and J. Raven (Eds). *Advances in Photosynthesis and respiration*, Vol. 14: *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers.
- HANELT, D.; C. WINCKE; U. KARSTEN & W. NULTSCH. 1997. Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 33: 387-395.
- HANELT, D.; K. HUPPERTZ & W. NULTSCH. 1992. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Bot. Acta* 105: 278-284
- HANNACH, G. & B. SANTELICES. 1985. Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of *Iridaea* (Rhodophyta, Gigartinales). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 22: 291-303.
- HARBORNE, J.B. 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213: 14-24.
- HARM, W. 1980. *Biological effects of ultraviolet radiation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- HAVAUX, M. & K.K. NIYOGI. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8762-8767.
- HE, Y.Y.; M. KLISCH & D.P. HÄDER. 2002. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *J. Photoch. Photobiol. B.* 76: 188-196.
- HEGGLIN, M.I. & T.G. SHEPHERD. 2009. Large climate-induced changes in ultra violet index and stratospheric to troposphere ozone flux. *Nat. Geosci.* 2, doi:10.1038/NGE0604
- HELBING, W.; C.L. BALLARÉ & V.E. VILLAFANE. 2001. Impacts of ultraviolet radiation on aquatic and terrestrial ecosystems. *J. Photoch. Photobiol. B.* 62: vii-ix.
- HELBLING, E.W.; E.S. BARBIERI; R.P. SINHA; V.E. VILLAFANE & D.P. HÄDER. 2004. Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. *J. Photoch. Photobiol. B.* 75: 63-71.
- HELBLING, E.W.; MENCHI, C.F. & V.E. VILLAFANE. 2002. Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 820-25.
- HELBLING, E.W.; V. VILLAFANE; M. FERRARIO & O. HOLM-HANSEN. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 80: 89-100.
- HO, T.Y.; A. QUIGG; Z.V. FINKEL; A.J. MILLIGAN; K. WYMAN; P.G. FALKOWSKI & F.M. MOREL. 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. *J. Phycol.* 39: 1145-1159.
- HOLLÓSY, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- HOLZINGER A. & C. LÜTZ. 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37: 190-207
- HOLZINGER, A.; C. LÜTZ; U. KARSTEN & C. WIENCKE, 2004. The effect of ultraviolet radiation on ultrastructure and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic waters. *Plant Biol.* 6: 568-577.
- HOLZINGER, A.; M.Y. ROLEDA & C. LÜTZ. 2009. The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* 40: 831-838

- HOLZINGER, A.; U. KARSTEN; C. LÜTZ & C. WIENCKE. 2006. Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga *Prasiola crispa* from Spitsbergen (Norway) under UV exposure. *Phycologia* 45: 168–177.
- HOUGHTON, R.A. & G.M. WOODWELL. 1989. Global climatic change. *Sci. Am.* 260: 18–26.
- HOYER, K.; U. KARSTEN & C. WIENCKE. 2002. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Mar. Biol.* 41: 619–627.
- HOYER, K.; U. KARSTEN & C. WIENCKE. 2003. Inventory of UV-absorbin mycosporine-like amino acids in polar macroalgae and factors controlling their content. In: HUISKES, A.H.; W.W. GIESKES; J. ROZEMA; R.M. SCHORNO; S.M. VAN DER VIES & W.J. WOLFF (eds). *Antarctic Biology in a Global Context, Proceedings of the International 5th SCAR Biology Symposium 2001*, Amsterdam. Leiden: Backhuys (2003).
- HOYER, K.; U. KARSTEN; T. SAWALL & C. WIENCKE. 2001. Photoprotective substances in antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 117–29.
- HUDSON, J.B.; J.H. KIM; M.K. LEE; R.E. WREEDE & Y.K. HONG. 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: evidence for multiple activities. *J. Appl. Phycol.* 10: 427–434.
- HUOVINEN P., I. GÓMEZ & M. OROSTEGUI. 2007. Patterns and UV sensitivity of carbon anhydrase and nitrate reductase activities in south Pacific macroalgae. *Mar Biol.* 151: 1813–1821.
- HUOVINEN, P.; I. GÓMEZ; F.L. FIGUEROA; N. ULLOA; V. MORALES & C. LOVENGREEN. 2004. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Bot. Mar.* 47: 21–29.
- HUOVINEN, P.; J. MATOS; I.S. PINTO & F.L. FIGUEROA. 2006. The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquat. Bot.* 24: 308–316.
- HUOVINEN, P.S.; A.O.J. OIKARI; M.R. SOIMASUO & G.N. CHERR. 2000. Impact of UV radiation on the early development of the giant kelp (*Macrocystis pryrifera*) gametophytes. *Photochem. Photobiol.* 72: 308–313.
- ITO, S. & Y. HIRATA. 1977. Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* 28: 2429–4230.
- JANSEN, M.A.K.; V. GABA & B.M. GREENERG. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3: 131–135.
- JANSEN, M.A.K.; V. GABA; B. GREENBERG; K. A. MATTOO & M. EDELMAN. 1994. UVB driven degradation of the D1-reaction-center protein of photosystem II proceeds via plastosemiquinone. In H.Y. YAMAMOTO & C.M. SMITH (Eds). *Photosynthetic Responses to the Environment*, pp. 142–149. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- JANSEN, M.A.K.; V. GABA; B.M. GREENERG; A.K. MATTO & M. EDELMAN. 1996. Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem II. *Plant J.* 9: 693–699.
- JEFFREY, S.W. & G.F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plant, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191–194.
- JIMÉNEZ, C.; F.L. FIGUEROA; S. SALLES; J. AGUILERA; J. MERCADO; B. VIÑEGLA; A. FLORES-MOYA; M. LEBERT & D.P. HÄDER. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of Southern Spain. *Bot. Mar.* 41: 329–338.
- JOHNSTON, A.M.; S.C. MABERLY & J.A. RAVEN. 1992. The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae. *Oecologia* 92: 317–326.

- JONES, L.W. & B. KOK. 1966. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiol.* 41:1037-1043.
- JORDAN, B.B.; J. HE; W.S. CHOW & J.M. ANDERSON. 1992. Changes in mRNA levels and polypeptides subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ.* 15: 91-98.
- KARENTZ, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In: WEILER, C.S. & P.A. PENHALE (eds), *Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects*. *Antarctic Research Series* 62: 93-100, American Geophysical Union, Washington, DC.
- KARENTZ, D.; F.S. MCEUEN, K.M. LAND & W.C. DUMLAP. 1991b. A survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* 108: 157-166.
- KARENTZ, D.; J.E. CLEAVER & D.L. MITCHELL. 1991a. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 27: 326-341.
- KARSTEN, U. & C. WIENCKE. 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant Physiol.* 155: 407-415.
- 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. 2008. Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation. In: Charles D. AMSLER (Ed), *Algal Chemical Ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 283-296.
- KARSTEN, U., T. SAWALL; D. HANELT; K. BISCHOF; F.L. FIGUEROA; A. FLORES-MOYA & C. WIENCKE. 1998b. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. Mar.* 41: 443-453.
- KARSTEN, U.; A. WULFF; M.Y. ROLEDA; R. MÜLLER; F.S. STEINHOFF; J. FREDERSDORF & C. WIENCKE. 2009. Physiological responses of polar benthic algae to ultraviolet radiation. *Bot. Mar.* 52: 639-654
- 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. Plant.* 105:58-66.
- KARSTEN, U.; K. BISCHOF & C. WIENCKE. 2001. Photosynthetic performance of Arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow waters followed by exposure to natural solar radiation. *Oecologia* 127: 11-20.
- KARSTEN, U.; L.A. FRANKLIN; K. LÜNING & C. WIENCKE. 1998a. Natural ultraviolet and photosynthetic active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta* 205: 257-262.
- KARSTEN, U.; T. FRIEDL; R. SCHUMANN; K. HOYER & S. LEMBCKE. 2005. Mycosporine-like amino acids (MAAs) and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxioephyceae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41: 557-566
- KENDRICK, G.A. & D. WALKER. 1999. Dispersal distances for propagules of *Sargassum spinuligerum* (Sargassaceae, Phaeophyta) measured directly by vital staining and venturi suction sampling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 133-138.
- KIM, S. & A. SANCAR. 1993. Photobiology school: photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimmer repair by DNA photolyase. *Photochem. Photobiol.* 57: 895-904.

- KIRCHHOFF, V.W.J.H.; F. ZAMORANO & C. CASICCIA. 1997. UVB enhancements at Punta Arenas, Chile. *J. Photoch. Photobiol. B.* 38:174–177.
- KIRK, J.T.O. 1994. *Light and photosynthesis in the aquatic environment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KLISCH, M. & D.P. HÄDER. 2008. Mycosporine-like amino acids and marine toxins - The common and the different. *Mar. Drugs* 6: 147–163.
- KORBEE, N.; F.L. FIGUEROA & AGUILERA, J. 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micospolina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 79: 119-132.
- KORBEE, N.; F.L. FIGUEROA & J. AGUILERA. 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. Photoch. Photobiol. B.* 80:71-78.
- KORBEE, N.; P. HUOVINEN; F.L. FIGUEROA; J. AGUILERA & U. KARSTEN. 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-PAINADO, N.; R. ABDALA-DÍAZ & F.L. FIGUEROA. 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.; K. BISCHOF; D. HANELT; U. KARSTEN & C. WIENCKE. 2002. Wavelengthdependent 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.; M. WATANABE & C. WIENCKE. 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.
- KRAMER, G.F.; H.A. NORMAN; D.T. KRIZEK & R.M. MIRECKI. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamides, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochem.* 30: 2101-2108.
- KÜPPERS, J.A. & WEIDNER, M. 1980. Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperboreana*. *Planta* 148: 22-230.
- KUMAR, A. R. SINHA & D.P. HÄDER. 1996. Effect of UV-B on enzymes of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. *J. Plant Physiol.* 148: 86-91.
- LAPOINTE, B.E. & C.S. DUKE. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20:488-495.
- LAPOINTE, B.E. 1981. The effect of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria filiifera* v. *augustissima* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17: 90-95.
- LARKUM, A.W.D. & W.F. WOOD. 1993. The effects of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynth. Res.* 36: 17-23.
- LEE, T.M. & C.T. SHIU. 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.
- LESSER, M.P. 1996a. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and Inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41: 271-283.
- LESSER, M.P. 1996b. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132: 287-297.

- LESSER, M.P.; J.J. CULLEN & P.J. NEALE. 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.
- LIGNELL, A. & M. PEDERSÉN. 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.; P.J. NEALE & A.T. BANASZAK. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* 47: 86-94.
- LOBBAN, C. & P. HARRISON. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- LOPES, P.F.; M.C. OLIVEIRA & P. COLEPICOLO. 2002. Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 295: 50-54.
- LÓPEZ-FIGUEROA, F. & W. RÜDIGER. 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.
- LORENZ, M., H. SCHUBERT & R.M. FORSTER. 1997. In vitro- and in vivo-effects of ultraviolet-B radiation on the energy transfer in phycobilisomes. *Photosynthetica* 33: 517-527
- LÜNING, K. 1990. *Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology*. Wiley Interscience, New York.
- LUXORO, C. & B. SANTELICES. 1989. Additional evidence for ecological differences among isomorphic reproductive phases of *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.* 25: 206-212
- MACKERNES, S.A.H.; B.R. JORDAN & B. THOMAS. 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Photoch. Photobiol. B.* 48: 180-188.
- MACKERNES, S.A.H.; C. F. JOHN; B. JORDAN & B. THOMAS. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* 489: 237-242.
- MADRONICH, S.; R.L. MACKENZIE; L.O. BJÖRN & M.M. CALDWELL. 1998. Changes in biological active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photoch. Photobiol. B.* 46: 5-19.
- MAKAROV, M.V. & G.M. VOSKOBOINIKOV. 2001. The influence of ultraviolet-B radiation on spore release and growth of the kelp *Laminaria saccharina*. *Bot. Mar.* 44: 89-94.
- MALANGA, G. & S. PUNTARULO. 1995. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet- B radiation. *Physiol. Plant.* 94: 672-679.
- MALANGA, G.; G. CALMANOVICI & S. PUNTARULO. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 101: 455-462.
- MANSILLA, A. & N. NAVARRO. 2003a. Contribución al estudio de la flora ficológica de las Islas Diego Ramírez (Chile). En MANSILLA, NAVARRO & WERLINGER (Eds), *Memorias curso internacional de especialización en macroalgas de ambientes subantárticos*, Ediciones Universidad de Magallanes: 85-89.
- MANSILLA, A. & N. NAVARRO. 2003b. Estudio poblacional y dinámica de costras de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) en sector San Juan (Estrecho de Magallanes, XII Región). En MANSILLA, NAVARRO & WERLINGER (Eds), *Memorias curso internacional de especialización en macroalgas de ambientes subantárticos*, Ediciones Universidad de Magallanes: 73-83.

- MANSILLA, A.; C. WERLINGER; M. PALACIOS; N.P. NAVARRO & P. CUADRA. 2006. Effects of UVB radiation on the initial stages of growth of *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* and *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 18: 451-459
- MARCHANT, H.J. 1997. Impacts of ozone depletion on Antarctic organisms. In: BATTAGLIA, B.; J. VALENICA & D.W.H. WALTON (Eds.), *Antarctic Communities: Species, Structure, and Survival*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 367-374.
- MARTINS, A.P. 2007. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour (Gigartinales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo. 118 p.
- MASON, D.S.; F. SCHAFER; J.M. SHICK & W.C. DUNLAP. 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 120: 587-98.
- MÁTÉ, Z.; L. SASS; M. SZEKERES; I. VASS & F. NAGY. 1998. UVB induced differential transcription of psbA genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* 273: 17439-17444.
- MATSUHIRO, B. & P. RIVAS. 1993. Second-derivative Fourier transform infrared spectra of seaweed galactans. *J. Appl. Phycol.* 5: 45-51.
- MATSUHIRO, B. 1996. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia* 326/327: 481-489.
- MATTOO, A.K.; H. HOFFMAN-FALK; J.B. MARDER & M. EDELMAN. 1984. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1380-1384.
- MCKENZIE, R.L.; L.O. BJÖRN; A. BAIS & M. ILYAS. 2003. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 5-15.
- MCKENZIE, R.L.; P.J. AUCAMP; A.F. BAIS; L.O. BJÖRN & M. ILYAS. 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's Surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6: 218-231.
- MCLEOD, AR. 1997. Outdoor supplementation systems for studies of the effects of increased UV-B radiation. *Plant Ecol.* 128: 78-92.
- MEHLNHORN, H.; M. LELANDIS; H.G. KORTH & C.H. FOYER. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases? *FEBS Letters* 378: 203-206.
- MEINDL, U. & C. LÜTZ. 1996. Effects of UV radiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. *J. Photoch. Photobiol. B.* 36: 285-292.
- MELIS, A.; J. A. NEMSON & M. A. HARRISON. 1992. Damage to the functional components and partial degradation of photosystem II reaction center proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 312-320.
- MICHLER, T.; J. AGUILERA; D. HANELT; K. BISCHOF & C. WIENCKE. 2002. Longterm effects of ultraviolet radiation on growth and photosynthetic performance of polar and cold-temperature macroalgae. *Mar. Biol.* 140: 1117-1127.
- MIDDLETON, E.M. & A.H. TERAMURA. 1993. The role of flavonoid glycoside and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant. Physiol.* 103: 741-752.
- MIDDLETON, E.M. & A.H. TERAMURA. 1994. Understanding photosynthesis, pigment and growth responses induced by UV-B and UV-A irradiances. *Phytochem. Photobiol.* 60: 38-45.
- MISONOU, T.; J. SAITOH; S. OSHIBA; Y. TOKIMOTO; M. MAEGAWA; Y. INOUE; H. HORI & T. SAKURAI. 2003. UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Mar. Biotechnol.* 5: 194-200.

- MITCHELL, D.L. & D. KARENTZ. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: YOUNG, A.R.; L.O. BJÖRN; J. MOAN & W. NULTSCH (eds). *Environment UV Photobiology*. Plenum Press, New York.
- MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TREDS Plant Sci.* 7: 405-410.
- MOISAN, T.A. & B.G. MITCHELL. 2001. UV absorption by mycosporine-like amino acids in *Phaeocystis Antarctica* Karsten induced by photosynthetically available radiation. *Mar. Biol.* 138: 217-227.
- MOLINA, M.J.; T. TSO; L.T. MOLINA & F.C.T. WANG. 1987. Antarctic stratospheric chemistry of chlorine nitrate, hydrogen chloride, and ice: release of active chlorine. *Science* 238: 1253-1257.
- MORONEY, J.V.; S.G. BARTLETT & G. SAMUELSSON. 2001. Carbonic anhydrases in plants. *Plant Cell Environ.* 24: 141-153.
- MÜLLER, R.; C. WIENCKE; K. BISCHOF & B. KROCK. 2009. Zoospores of three Arctic Laminariales under different UV radiation and temperature conditions: exceptional spectral absorbance properties and lack of phlorotannin induction. *Photochem. Photobiol.* 85: 970-977.
- MURPHY, T. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* 58: 381-388.
- MUSIL, C.F.; L.O. BJÖRN; M.W.J. SCOURFIELD & G.E. BODEKER. 2002. How substantial are ultraviolet-B supplementation inaccuracies in experimental square-wave delivery systems? *Environ. Exp. Bot.* 47: 25-38.
- NAVARRO, N.P., A. MANSILLA & M. PALACIOS. 2008. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. *J. Appl. Phycol.* 20: 897-906.
- NAVARRO, N.P.; A. MANSILLA & E.M. PLASTINO. 2010a. UVB radiation induces changes in the ultra-structure of *Iridaea cordata*. *Micron* 41: 899-903.
- NAVARRO, N.P.; A. MANSILLA & E.M. PLASTINO. 2010c. *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. *J. Appl. Phycol.* 22: 385-394.
- NAVARRO, N.P.; M. PALACIOS; A. MANSILLA & J. JOFRE. 2010b. Morphological and growth alterations on early development stages of *Iridaea cordata* (Rhodophyta) under different intensities of UVB radiation. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 45: 255-265.
- NORTON, T.A.; M. MELKONIAN & R.A. ANDERSEN. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326.
- OATES, B.R. & K.M. COLE. 1989. Organelle association in developing trichoblasts of *Polysiphonia hendryi* (Rhodophyta, Ceramiales). *Br. Phycol. J.* 24: 339-345.
- OKUNO, E.; T. NAKAJIMA; E.M. YOSHIMURA; F. HIODO; A.M.F. FAUSTO; W.S. PAES; N.K. UMISEDÓ & S. OTSUBO. 1996. Radiação ultravioleta solar em S. Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Pásqua. *RBE- Cuaderno de Engenharia Biomédica* 12: 143-153.
- OLIVEIRA, E.C.; E.J. DE PAULA; E.M. PLASTINO & R. PETTI. 1995. Metodologías para el cultivo no axénico de macroalgas marinas *in vitro*. In: ALVEAL, K.; M. FERRARIO; E. OLIVEIRA & E. SAR (eds). *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. pp. 429-447.
- ORCE, V.L. & W. HELBLING. 1997. Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the ozone hole. *Global Planetary Change* 15: 113-121.
- ORNELLAS, F. 2011. *Efeitos da radiação UVB no crescimento, conteúdo pigmentar e fotossíntese de Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, 96p.
- OSMOND, C.B. & S.C. GRACE. 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field : quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 46: 1351-1362.

- OSMOND, C.B. 1994. What is photoinhibition? some insights from comparisons of shade and sun plants, in: N.R. BAKER, J.R. BOWYER (Eds.), *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field*, Bios Scientific, Oxford, pp. 1–24.
- OURIQUES, L.C.; E.C. SCHMIDT & Z.L. BOUZON. 2011. The mechanism of adhesion and germination in the carpospores of *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (Rhodophyta, Bangiales). *Micron* (in press)
- PAKKER, H.; C.A.C. BEEKMAN & A. BREEMAN. 2000a. Efficient photoreactivation of UVBR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodomenia pseudopalmata* (Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 35: 109-114.
- PAKKER, H.; R.S.T. MARTINS; P. BOELEN; A.G.J. BUMA; O. NIKAIKO & A.M. BREEMAN. 2000b. Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 36: 334-341.
- PAL, M.; A. SHARMA; Y.P. ABROL & U.K. SENGUPTA. 1997. Exclusion of UV-B radiation from normal solar spectrum on the growth of mung bean and maize. *Agr. Ecosyst. Environ.* 61: 29-34.
- PANG, Q. & J.B. HAYS. 1991. UV-B-inducible and temperature sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 95: 536-543.
- PAPADAKIS, A.K. & K.A. ROUBELAKIS-ANGELAKIS. 2002. Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 549-559.
- PAVIA, H.; G. CERVIN; A. LINDGREN & P. ABERG. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157: 139-146.
- PEARCE, F. 1996. Big freeze digs a deeper hole in ozone layer. *New Scientist.* 149: 7.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, E.; J. AGUILERA; I. GÓMEZ & F.L. FIGUEROA. 2001. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Mar. Biol.* 139:633-639.
- PESANDO, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. In: AKATSUKA I. (ed.) *Introduction to Applied Phycology*. Academic Publishing bv, The Hague, Netherland. 3-26pp.
- PFUNDEL, E.E.; R.S. PAN & R.A. DILLEY. 1992. Inhibition of violaxanthin deep oxidation by ultraviolet-B radiation in isolated chloroplasts and intact leaves. *Plant Physiol.* 98: 1372-1380.
- PINTO, E.; T.C.S. SIGAUD-KUTNER; M.A.S. LEITÃO; O.K. OKAMOTO; D. MORSE & P. COLEPICCOLO. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39: 1008-1018.
- POPPE, F.; D. HANELT & C. WIENCKE. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigment in the Antarctic red alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Bot. Mar.* 45: 253-261.
- POPPE, F.; R.A. SCHMIDT; D. HANELT & C. WIENCKE. 2003. Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.* 51: 11-19.
- PORTWICH, A. & F. GARCÍA-PICHEL. 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. & F. GARCIA-PICHEL. 2000. A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Photochem. Photobiol.* 71: 493-98.
- POST, A. & A.W.D. LARKUM. 1993. UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV-exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.* 45: 231-243.
- PREDIERI, S.; H.A. NORMAN; D.T. KRIZEK; P. PILLAI; R.M. MIRECKI & R.H. ZIMMERMAN. 1995. Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene evolution in

- diyenne d'hiver pear shoots grown *in vitro* under different photosynthetic photon fluxes. *Environ. Exp. Bot.* 35: 151-160.
- PUESCHEL, C.M. 1979. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 15: 409-424.
- QUAITE, F.E.; S. TAKAYANAGI; J. RUFFINI; J.C. SUTHERLAND & B.M. SUTHERLAND. 1994. DNA damage levels determine cyclobutyl pyrimidine dimer repair mechanisms in alfalfa seedling. *Plant Cell* 6: 1635-1641.
- RASTOGI, R.P.; R.A. KUMAR; M.B. TYAGI & R.P. SINHA. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* ID 592980: 1-32. doi:10.4061/2010/592980.
- RAUTENBERGER, R. & K. BISCHOF. 2006. Impact of temperature on UV-susceptibility of two *Ulva* (Chlorophyta) species from Antarctic and Subantarctic region. *Polar Biol.* 29: 988-996.
- RAUTENBERGER, R.; A. MANSILLA; I. GÓMEZ; C. WIENCKE & K. BISCHOF. 2009. Photosynthetic responses to UV-radiation of intertidal macroalgae from the Strait of Magellan (Chile). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82: 43-61.
- RECH, M.; J.L.; MOUGET; A. MORANT-MANCEAU; P. ROSA & G. TREMBLIN. 2005. Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms. *Bot. Mar.* 48:407-420.
- REDFIELD, A.C.B.; B.H. KETCHUM & E.A. RICHARDS. 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In: HILL M.N. (ed) *The sea*, Vol 2. Wiley, New York, p 27-77.
- REINFELDER, J.R.; A.M. KRAEPIEL & F.M. MOREL. 2000. Unicellular C4 photosynthesis in a marine diatom. *Nature* 407: 996-999.
- RENGER, G.; H.J. VOLKER; R. FROMME; S. HOHM-VEIT & P. GRABER. 1989. On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 49: 97-105.
- REUBER, S.; J. LEITSCH; G. KRAUSE & G. WEISSENBOCK. 1993. Metabolic reduction of phenylpropanoid compounds in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.) leads to increased UV-B sensitivity of photosynthesis. *Z. Naturforsch.* 48c: 749-756.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- RICHTER, M.; W. RÜHLE & A. WILD. 1990. Studies on the mechanism of Photosystem II photoinhibition I. A two-step degradation of D1-protein. *Photosyn. Res.* 24: 229-235.
- RIEGGER, L. & D. ROBINSON. 1997. Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 160: 13-25.
- RIJSTENBIL, J.W., 2002. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *J. Plankton Res.* 24: 1277-1288.
- ROLEDA, M.; D. HANELT; G. KRÄBS & C. WIENCKE. 2004b. Morphology, growth, photosynthesis and pigment in *Laminaria ochroleuca* (Laminariales, Phaeophyta) under ultraviolet radiation. *Phycologia* 43: 603-613.
- ROLEDA, M.Y.; C. WIENCKE; D. HANELT & K. BISCHOF. 2007. Sensitivity of the early life stages of macroalgae from the northern hemisphere to ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* 83: 1-12.
- ROLEDA, M.Y.; C. WIENCKE; D. HANELT; W.H. VAN DE POLL & A. GRUBER. 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.; K. ZACHER; A. WULFF; D. HANELT & C. WIENCKE. 2008. Susceptibility of spores of different ploidy levels from Antarctic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) to ultraviolet radiation. *Phycologia* 47: 361-370.

- ROLEDA, M.Y.; M.N. CLAYTON & CHRISTIAN WIENCKE. 2006. Screening capacity of UV-absorbing compounds in spores of Arctic Laminariales. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 338: 123-133.
- ROLEDA, M.Y.; U. LÜTZ-MEINDL; C. WIENCKE & C. LÜTZ. 2009. Physiological, biochemical, and ultrastructural responses of the green macroalga *Urospora penicilliformis* from Arctic Spitsbergen to UV radiation. *Protoplasma* doi:10.1007/s00709-009-0037-8.
- ROLEDA, M.Y.; W.H. VAN DE POLL; D. HANELT & C. WIENCKE. 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.
- ROMO, H. & E. DE PAULA. 1995. Métodos experimentales para el cultivo de *Porphyra*. In: ALVEAL, K.; M. FERRARIO; E. OLIVEIRA & E. SAR (eds). *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. pp. 551-562.
- ROY, S. 2000. Strategies for the minimisation of UV-induced damage. In: *The effects of UV radiation in the marine environment*. DE MORA, S.; S. DEMERS & M. VERNET (eds). Cambridge University Press 177-205.
- ROZEMA, J.; J. VAN DE STAAN; L.O. BJÖRN & CALDWELL M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.* 12: 22-28.
- RÜDIGER, W. & F. LÓPEZ-FIGUEROA. 1992. Yearly review: Photoreceptors in algae. *Photochem. Photobiol.* 55: 949-954.
- RUNDEL, R.D. 1983. Action spectra and estimation of biologically effective UV radiation. *Physiol. Plant.* 58: 360-366.
- SAGERT, S.; R.M. FORSTER; P. FEUERPFEL & H. SCHUBERT. 1997. Daily course of photosynthesis and photoinhibition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta) from different shore levels. *Eur. J. Phycol.* 32: 363-371
- SANCAR, A. & G.B SANCAR. 1988. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 29-67.
- SCHENK, H.E.A.; J. HANF & M. NEU-MÜLLER. 1983. The phycobiliproteins in *Cyanophora paradoxa* as accessory pigments and nitrogen storage proteins. *Z. Naturforsch* 38: 972-977.
- SCHMIDT, E.C., L.A SCARIOT, T. ROVER & Z. BOUZON. 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, doi:10.1016/j.micron.2009.06.003.
- SCHOENWAEELDER, M. & M. CLAYTON. 1998. Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* 34:969-980
- SCHOENWAEELDER, M. & M. CLAYTON. 2000. Physode formation in embryos of *Phyllospora comosa* and *Hormosira banksii* (Phaeophyceae). *Phycologia* 39:1-9.
- SCHOENWAEELDER, M.; C. WIENCKE; M. CLAYTON & K. GLOMBITZA. 2003. The effect of elevated UV radiation on *Fucus* spp. (Fucales, Phaeophyta) zygote and embryo development. *Plant Biol.* 5: 366-377.
- SCHREIBER, U.; W. BILGER & C. NEUBAUER. 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.
- SCHRIEK, R. 2000. Effects of light and temperature on the enzymatic antioxidative defense systems in the Antarctic ice diatom *Entomoneis kufferathii* Manguin. *Ber. Polarforsch. Meeresforsch.* 349: 1-130.
- SERNAPESCA. 2009. *Anuario estadístico de pesca*. Servicio Nacional de Pesca, Valparaíso-Chile. (www.sernapesca.cl).

- SETLOW, R.B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 3363-3366.
- SHELLY, K.; P. HERAUD & J. BEARDALL. 2003. Interactive effects of PAR and UVB radiation on the PSII electron transport in the marine alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 39: 509-512.
- SHELLY, K.; S. ROBERTS; P. HERAUD & J. BEARDALL. 2005. Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. i. effects on growth, phosphate uptake, and chlorophyll fluorescence *J. Phycol.* 41: 1204-1211.
- SHICK, J.M. & W.C. DUNLAP. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 223-62.
- SHICK, J.M.; S.D. ROMAINE-LIOUD; C. FERRIER-PAGES & J.P. GATTUSO. 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. & T.M. LEE. 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.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.
- SINGH, S.; S. KUMARI; R.P. RASTOGI; K.L. SINGH & R.P. SINHA. 2008. Mycosporine-like amino acids (MAAs): Chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian J. Exp. Biol.* 46: 7-17
- SINHA, R.P. & D.P. HÄDER. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 225-236
- SINHA, R.P.; M. KLISCH; A. GRÖNIGER & D.P. HÄDER. 1998. Ultraviolet-absorbing / screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photoch. Photobiol. B.* 47: 83-94.
- SINHA, R.P.; M. KLISCH; E.W. HELBLING & D.P. HÄDER. 2001. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J. Photoch. Photobiol. B.* 60: 129-135.
- SINHA, R.P.; M. LEBERT; A. KUMAR; H.D. KUMAR & D.P. HÄDER. 1995. Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobiliproteins of *Anabaena* sp. and *Nostoc carmum*. *Bot. Acta*, 108: 87-92.
- SINHA, R.P.; N. SINGH; A. KUMAR; H.D. KUMAR; M. HÄDER & D.P. HÄDER. 1996. Effects of UV-irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *J. Photoch. Photobiol. B.* 32: 107-113.
- SKERRATT, J.H.; A.D. DAVIDSON; P.D. NICHOLS & T.A. McMEEKIN. 1998. Effect of UV-B on lipid content of three antarctic marine phytoplankton. *Phytochem.* 49: 999-1007.
- SMIT, A.J. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): adaptations to a temporally variable nitrogen environment. *Bot. Mar.* 45: 196-209.
- SMITH, R.C.; B. PRÉZELIN; K. BAKER; R. BIDIGARE; N. BOUCHER; T. COLEY; D. KARENTZ; S. MACINTYRE; H. MATLICK; D. MENZIES; M. ONDRUSEK; Z. WAN & J. WATERS. 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic Waters. *Science* 255: 952-959.
- SMITH, R.C.; K.S. BAKER; O. HOLM-HANSEN & R. OLSON. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. *Photochem. Photobiol.* 31: 585-592.
- STAPLETON, A. 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell* 4: 1353-1358.

- STARCEVIC, A.; S. AKTHAR; W.C. DUNLAP; J.M. SHICK; D. HRANUELI & J. CULLUM. 2008. Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. *PNAS* 105: 2533-2537.
- STEINHOFF, F.S.; C. WIENCKE; R. MÜLLER & K. BISCHOF. 2008. Effects of ultraviolet radiation and temperature on the ultrastructure of zoospores of the brown macroalga *Laminaria hyperborea*. *Plant Biol.* 10: 388-397.
- STOLARSKI, R.; A.J. KRUEGER; M.R. SCHOEBERL; R.D. MCPETERS; P.A. NEWMAN & J.C. ALPERT. 1986. Nimbus 7 satellite measurements of the springtime Antarctic ozone decrease. *Nature* 322: 808-811.
- STOLARSKI, R.S. 1988. The Antarctic ozone hole. *Sci. American* 258: 20-26.
- STRID, A.; W.S. CHOW & J.M. ANDERSON. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochem. Biophys. Acta* 1020: 260-268.
- STRID, A.; W.S. CHOW & J.M. ANDERSON. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* 39: 475-489.
- SUBSECRETARIA DE PESCA. 2010. Estado de Pesquerías Chilenas: Pesquerías Bentónicas. Unidad de Recursos Bentónicos, División de Administración Pesquera, Subsecretaría de Pesca. XXI Congreso Nacional CONAPACH, Noviembre (2010).
- SUH, H.J.; H.W. LEE & J. JUNG. 2003. Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency. *Photochem. Photobiol.* 78: 109-13.
- SWANSON, A. & L. DRUEHL. 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquat. Bot.* 73:241-253
- TAKANO, S.; D. UEMURA & Y. HIRATA. 1978. Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* 26: 2299-2300.
- TALARICO, L. & G. MARANZANA. 2000. Light and adaptative responses in red macroalgae: an overview. *J. Photoch. Photobiol. B.* 56: 1-11.
- TALARICO, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptative responses to light. *Sci. Mar.* 60 (Supl. 1): 205-222.
- TERAMURA, A. & J. SULLIVAN. 1991. Potential impacts of increase solar UV-B on global plant productivity. In: RIKLIS, E. (ed). *Photobiology*. Plenum Press, New York. pp. 625-634.
- TERAMURA, A.; M. TEVINI; J. BORNMAN; M. CALDWELL; G. KULANDAIVELU & L. BJÖRN. 1991. Terrestrial plant. Chapter 3. In: United Nations Environment Programme. *Environmental effects of ozone depletion, 1991 update*. Nairobi.
- TEVINI, M. & A. TERAMURA. 1989. UV-B effects on terrestrial plants. *Phytochem. Photobiol.* 50: 479-487.
- TEVINI, M.; J. BRAUN & G. FIESE. 1991. The protective function of the epidermal later of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 53, 329-333.
- TEVINI, M.; W. IWANZIK & U. THOMA. 1981. Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants. *Planta* 153: 388-394.
- THOMAS, T.E. & P.J. HARRISON. 1985. Effect of nitrogen supply on nitrogen uptake, accumulation and assimilation in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Mar. Biol.* 85: 269-278
- THOMAS, T.E.; P.J. HARRISON & D.H. TURPIN. 1987. Adaptations of *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) to nitrogen procurement at different intertidal locations. *Mar. Biol.* 93: 569-580
- TODO, T.; H. TAKEMORI; H. RYO; M. IHARA; T. MATSUNAGA; O. NIKAIDO; K. SATO & T. NOMURA. 1993. A new photoreactivation enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 361: 371-374.

- TODO, T.; S.T. KIM; K. HITOMI; E. OTOSHI; T. INUI; H. MORIOKA; H. KOBAYASHI; E. OHTSUKA; H. TOH & M. IKENAGA. 1997. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase. *Nucleic Acids Res.* 25: 764–768.
- TSEKOS, I. 1981. Growth and differentiation of the Golgi apparatus and wall formation during carposporogenesis in the red alga *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *J. Cell. Sci.* 52: 71-84
- TSEKOS, I. 1985. The endomembrane system of differentiating carposporangia in the red alga *Chondria tenuissima*: occurrence and participation in secretion of polysaccharidic and proteinaceous substances. *Protoplasma* 129: 127-136.
- TSEKOS, I.; F.X. NIEL; J. AGUILERA; F. LÓPEZ-FIGUEROA & S. DELIVOPOULOS. 2002. Ultrastructure of the vegetative gametophytic cells of *Porphyra lecosticta* (Rhodophyta) grown in red, blue and green light. *Phycol. Res.* 50: 251-264.
- TSUJINO, I.; K. YABE & I. SEKEKAWA. 1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* 23: 65-68.
- TURPIN, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27: 14-20.
- TYRRELL, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400: 525-531.
- VALDENEGRO, A. & N. SILVA. 2003. Caracterización oceanográfica física y química de la zona de canales y fiordos australes de Chile entre el Estrecho de Magallanes y Cabo de Hornos (cimar 3 fiordos). *Cienc. Tecnol. Mar.* 26: 19-60
- VAN DE POLL, W. 2003. Patterns in ultraviolet radiation sensitivity of tropical, temperate and Arctic marine macroalgae. PhD thesis of Department of Marine Biology, Centre for Ecological and Evolutionary Studies, University of Groningen, Haren, The Netherlands. 117 paginas
- VAN DE POLL, W.; A. EGGERT; A. BUMA & A. BREEMAN. 2001. Effects of UV-B- induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat-relates differences in UV-B tolerance. *J. Phycol.* 37: 30-37.
- VAN DE POLL, W.H.; A. EGGERT; A.G.J. BUMA & A.M. BREEMAN. 2002. Temperature dependence of UV radiation effects in Arctic and temperate isolates of three red macrophytes. *Eur. J. Phycol.* 37: 59–68
- VAN DE POLL, W.H.; K. BISCHOF; A.G.J. BUMA & A.M. BREEMAN. 2003. Habitat related variation in UV tolerance of tropical marine red macrophytes is not temperature dependent. *Physiol. Plantarum* 118: 74–83.
- VASS, I. 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: PESSARAKLI M (ed) *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker Inc., New York, pp 931–949
- VASS, I.; L. SASS; C. SPETEA; A. BAKOU; D.F. GHANOTAKIS & V. PETROULEAS. 1996. UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence: Impairment of donor and acceptor side components. *Biochem.* 35: 8964-8973.
- VERGARA, J.J.; K.T. BIRD & F.X NIELL. 1995. Nitrogen assimilation following NH_4^+ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar.Ecol. Prog. Ser.* 122: 253-263.
- VIÑEGLA, B. & F.L. FIGUEROA. 2009. Effect of solar and artificial UV radiation on photosynthetic performance and carbonic anhydrase activity in intertidal macroalgae from southern Spain. *Ciencias Marinas* 35: 59-74.
- VIÑEGLA, B.; M. SEGOVIA & F.L. FIGUEROA. 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.

- VU, C.V.; L.H. ALLEN & L.H. GARRARD. 1984. Effects of enhanced UV-B radiation (280-320 nm) on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in pea and soybean. *Env. Exp. Bot.* 24: 131-143.
- WEATHERHEAD, E.C. & S.B. ANDERSEN. 2006. The search for signs of recovery of the ozone layer. *Nature* 441: 39-45
- 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.
- WESTERMEIER, R.; P.J. RIVERA; M. CHACANA & I. GOMEZ. 1987. Biological bases for the management of *Iridaea laminarioides* Bory in Southern Chile. *Hydrobiology* 151/152: 313-328.
- WHEELER, P.A. & M. WEIDNER, 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilatory enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. *J. Phycol.* 19: 92-96.
- WHITE, A.L. & L.S. JAHNKE. 2002. Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of beta-carotene in two *Dunaliella* spp. *Plant Cell Physiol.* 438: 877-884.
- WHITEHEAD R.F.; S.J. DE MORA & S. DEMERS. 2000. Enhanced UV radiation- a new problem for the marine environment. In: S.J. DE MORA, S. DEMERS AND M. VENERT (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, 1-34 pp
- WIENCKE, C. 1990. Seasonality of red and green macroalgae from Antarctica. A long-term culture study under fluctuating antarctic daylengths. *Polar Biol.* 10: 329-337.
- WIENCKE, C.; I. GÓMEZ; H. PAKKER; A. FLORES-MOYA; M. ALTAMIRANO; D. HANELT; K. BISCHOF & F.L. FIGUEROA. 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.
- WIENCKE, C.; M. CLAYTON & M. SCHOENWAEELDER. 2004. Sensitivity and acclimation to UV radiation of zoospores from five species of Laminariales from the Arctic. *Mar. Biol.* 145:31-39.
- WIENCKE, C.; M.N. CLAYTON; I. GÓMEZ; K. IKEN; U.H. LÜDER; C.D. AMSLER; U. KARSTEN; D. HANELT; K. BISCHOF & K. DUNTON. 2007. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 6: 95-126.
- WILLEKENS, H.; S. CHAMNOGOL; M. DAVEY; M. SCHRAUDNER & C. LANGEBARTELS. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO Journal* 16: 4806-4816.
- WILSON, M.; S. GHOSH; K.E. GERHARDT; N. HOLLAND; T.S. BABU; M. EDELMAN; E.B. DUMBROFF & GREENBERG, B. M. 1995. *In vivo* photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 119: 221-229.
- WISNIEWSKA, A. & W.K. SUBCYNISKI. 1998. Effects of the polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1368: 235-246.
- WMO. 1994. *Scientific assessment of ozone depletion*. Report 37, World Meteorological Organisation, Genova.
- WMO/UNEP. 2002. *Scientific assessment of ozone depletion: 2002*. Executive summary final, prepared by The Scientific Assessment Panel of the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer.
- WOOD, W. 1987. Effect of solar ultra-violet radiation on the kelp *Ecklonia radiata*. *Mar. Biol.* 96: 143-150.
- WOOD, W. 1989. Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma strictum* Schmitz (Gigartinales) to ultra-violet radiation. *Aquat. Bot.* 33: 41-51.

- WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (1999) Scientific Assessment of Ozone Depletion: 1998. United Nations Environment Program, World Meteorological Organization. Global Ozone Research and Monitoring Project (Edited by D. L. ALBRITTON, R. T. WATSON and P. J. AUCAMP). WMO/UNEP, Nairobi, Kenya.
- WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (WMO). 2006. Global Ozone Research and Monitoring Project—Report No. 50. Scientific assessment of ozone depletion.
- WULFF, A.; M.Y. ROLEDA; K. ZACHER & C. WIENCKE. 2008. UV radiation effects on pigments, photosynthetic efficiency and DNA of an Antarctic marine benthic diatom community. *Aquat. Biol.* 3: 167–177.
- XU, C. & JH. SULLIVAN. 2010. Reviewing the technical designs for experiments with ultraviolet-B radiation and impact on photosynthesis, DNA and secondary metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 377–387
- XUE, L.; Y. ZHANG; T. ZHANG; L. AN & X. WANG. 2005. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cianobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 79-89.
- YAKOVLEVA, I.M. & E.A. TITLYANOV. 2001. Effects of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquat. Bot.* 71: 47-61.
- YOUNG, A.J. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plant.* 83: 702-708.
- ZACHER, K.; A WULFF; M. MOLIS; D. HANELT & C. WIENCKE. 2007. Ultraviolet radiation and consumer effects on a field-grown intertidal macroalgal assemblage in Antarctica. *Global Change Biol.* 13: 1201–1215.
- ZACHER, K.; M.Y. ROLEDA; A. WULFF; D. HANELT & C. WIENCKE. 2009. Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores exposed to ultraviolet radiation. *Phycol. Res.* 57: 186–193
- ZAMORANO, J. & R. WESTERMEIER. 1996. Phenology of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) in Ancud Bay, southern Chile. *Hydrobiologia* 326/327:253–259.
- ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Fourth Edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 663 pp.
- ZAREMBA, T.G.; T.R. LEBON; D.B. MILLAR; R.M. SMEJKAL & R.J. HAWLEY. 1984. Effects of ultraviolet light on the *in vivo* assembly of microtubules. *Biochem.* 23: 1073-1080.
- ZEPP, R.G.; T.V. CALLAGHAN & D.J. ERICKSON. 1998. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *J. Photoch. Photobiol. B.* 46: 69-82.
- ZHAO, X.; LIU, J.; HSU, D.S.; ZHAO, S.; TAYLOR, J-S. & A. SANCAR. 1997. Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *J. Biol. Chem.* 272: 32580-32590.
- ZUBER, H. 1986. Structure of lihght harvesting antenna complex of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Bioch. Sci.* 11: 414-419.

NELSO PATRICIO NAVARRO MARTÍNEZ

Biólogo Marinho formado na Universidad de Concepción, Chile (2000) onde também obteve o grau acadêmico de Licenciado em Ciências do Mar. Em 2004, obteve o título de Mestre em Ciências, área de Botânica, pelo Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP. Durante a carreira profissional tem realizado estágios nas Universidades de Málaga, da Espanha, Santiago e Concepción, do Chile e participado em cursos internacionais no Brasil e Chile. Tem revisado trabalhos para: Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology, Aquaculture Research, Journal Experimental Marine Biology and Ecology, European Journal of Phycology e Revista de Biología Marina y Oceanografía. No âmbito da docência universitária tem ministrado aulas na Universidad de Magallanes, Chile. Tem participado em projetos de pesquisa e expedições científicas referentes à biologia, ecologia e fisiologia de algas marinhas tanto de regiões subantárticas quanto antárticas.

Artigos publicados durante o período de Doutorado

- **Nelso P. Navarro** & Andrés Mansilla & Estela M. Plastino. 2010. *Iridaea cordata* (Gigartinales, Rhodophyta): responses to artificial UVB radiation. Journal Applied Phycology 22: 385–394. DOI 10.1007/s10811-009-9470-5
- **Nelso P. Navarro**, Andrés Mansilla, Estela M. Plastino. 2010. UVB radiation induces changes in the ultra-structure of *Iridaea cordata*. Micron 41: 899–903
- **Nelso P. Navarro**, Mauricio Palacios, Andrés Mansilla and Jocelyn Jofre. 2010. Morphological and growth alterations on early development stages of *Iridaea cordata* (Rhodophyta) under different intensities of UVB radiation. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45: 255-265.
- Jocelyn Jofre, Francisca Massardo, Ricardo Rozzi, Bernard Goffinet, Paul Marino, Robert Raguso & **Nelso P. Navarro**. 2010. Fenología de *Tayloria dubyi* (Splachnaceae) en las turberas de la Reserva de Biosfera Cabo de Hornos. Revista Chilena de Historia Natural 83: 195-206
- **Nelso P. Navarro**, Andrés Mansilla & Mauricio Palacios. 2008. UVB effects on early developmental stages of commercially important macroalgae in southern Chile. Journal Applied Phycology, 20: 897-906. DOI 10.1007/s10811-007-9276-2.
- Andrés Mansilla, Mauricio Palacios, **Nelso P. Navarro** & Marcela Avila. 2008. Growth and survival performance of the gametophyte of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) under defined nutrient conditions in laboratory culture. Journal of Applied Phycology, 20: 889-896. DOI 10.1007/s10811-007-9279-z

Artigos publicados anteriormente

- Plana J., Mansilla A., Palacios M. & **Navarro NP**. 2007. Estudio poblacional de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Laminariales: Phaeophyta) en ambientes protegido y expuesto al oleaje en Tierra del Fuego. Gayana 71(1): 66-75.
- Mansilla A, C. Werlinger, M. Palacios, **Navarro NP** & Cuadra P. 2006. Effects of the UV-B radiation in the development of macroalgae of commercial interest, in the Magallanes Region. Journal Applied Phycology 18: 451-459.
- Mansilla A., **Navarro N.P.** & Fujii T.M. 2006. Presence of *Ceramium stichidiosum* (Ceramiaceae, Rhodophyta) in the Magellan Strait, Magellan Region, Chile. Gayana Botánica 70 (1): 73-79.

- Mansilla A., Palacios M, **Navarro NP.** & Riquelme V. 2005. Studies of the populations of *Macrocystis pyrifera* (L) C. Agardh in Tierra del Fuego, Chile. *Report on Polar and Marine Research* 507: 160-162 (Resumen expandido).
- **Navarro N.P.**, A. Mansilla & E.M. Plastino. 2003. A preliminary study of the vegetative cellular ultrastructure and cell wall production of the red macroalga *Iridaea cordata* (Gigartinales). *Acta Microscopica* (XIX Congress of Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis) vol. 12, suplement B: 627-628 (resumen expandido).
- **Capítulo de libros**
- **Navarro NP**, C Cárdenas, J Plana & A Mansilla. 2006. The Submarine Landscape of Cape Horn. En Rozzi, Massardo, Mansilla, Anderson & Plana (eds) *The Virgin Landscape of the cape Horn Biosphere Reserve*. Editorial Fantástico Sur. ISBN: 956-189-36-67. 209-224 pp.
- Mansilla A, **NP Navarro**, J Plana, M Palacios, F Massardo & R Rozzi. 2006. Charles Darwin: A Visionary Of The Submarine Forests Of Cape Horn. En Rozzi & Heidinger (eds) *The Route of Darwin Through the Cape Horn Archipelago*. Editorial Fantástico Sur. ISBN: 956-7189-35-8. 124-142.
- Mansilla, A. **Navarro, NP.** & Werlinger, C. 2003. Memorias de Curso Internacional de Postgrado y Especialización de macroalgas en ambientes subantárticos. Memorias de Curso Internacional de Postgrado y Especialización de macroalgas en ambientes subantárticos. Ediciones Universidad de Magallanes Punta Arenas-Chile.137 pp.
- Mansilla A. & N. **Navarro**. 2003. Estudio poblacional y dinámica de costras de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) en sector San Juan (Estrecho de Magallanes, XII Región). En Mansilla, Navarro & Werlinger (Eds), *Memorias curso internacional de especialización en macroalgas de ambientes subantárticos*, Ediciones Universidad de Magallanes: 73-83.
- Mansilla A. & N. **Navarro**. 2003. Contribución al estudio de la flora ficológica de las Islas Diego Ramírez (Chile). En Mansilla, Navarro & Werlinger (Eds), *Memorias curso internacional de especialización en macroalgas de ambientes subantárticos*, Ediciones Universidad de Magallanes: 85-89.

Outros Artigos

- **Navarro NP**, A. Mansilla & M. Palacios. 2006. Explorando el desconocido reino de las algas antárticas. *Boletín Antártico Chileno* 25: 16-20.
- Mansilla A., N. **Navarro** & C. Werlinger. 2002. Efecto del fotoperiodo e intensidad luminosa en el desarrollo experimental de tetrásporas y carpósporas de *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Anales Instituto de la Patagonia*, Serie Ciencias Naturales 30: 49-60.