Priscila Bezerra Torres

Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas
em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira)
Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz

Analysis of photosynthetic pigments and phenolic compounds in
Gracilariopsis tenuifrons (C. J. Bird & E. C.
Oliveira) Fredericq & Hommersand at different light intensities

São Paulo

2012

Priscila Bezerra Torres

Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas
em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira)
Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz

Analysis of photosynthetic pigments and phenolic compounds in
Gracilariopsis tenuifrons (C. J. Bird & E. C.
Oliveira) Fredericq & Hommersand at different light intensities

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

Orientadora: Déborah Yara Alves Cursino
dos Santos

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Torres, Priscila

Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz .

104 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Gracilariopsis tenuifrons* 2. Intensidade de luz 3. Pigmentos fotossintetizantes 4. Micosporinas 5. Folin-Ciocalteu

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Déborah Yara A. C. dos Santos
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais e meu irmão.
Sem vocês, a vida simplesmente passaria, não haveria brilho.

(Watterson, B. There's Treasure Everywhere: A Calvin and Hobbes Collection. 1996)

Agradecimentos

À orientadora querida desta pesquisa, Deborah, pela amizade, paciência e ensinamentos valiosos. Obrigada por ter me acolhido mesmo eu sendo uma pessoa extremamente tímida que raramente falava. Acho que agora eu falo por nós duas...

À colaboradora deste projeto, Fungyi, por ser sempre empolgada até quando tudo dava errado e pelas horas de ensinamento sobre algas.

Aos queridos técnicos: Paula, Henrique e Max; em especial, Mourisa e Rosário. Sem a ajuda de vocês, eu não terminaria este projeto! Obrigada.

À Profa. Dra Adriana Zerlotti Mercadante e sua aluna de doutorado Fernanda Mandelli da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP) pela ajuda nas identificações dos carotenoides e pela receptividade.

Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge e sua aluna de doutorado Adriana Grandis do LAFIECO (IBUSP) pela ajuda na quantificação de açúcares e pela atenção.

À Claudia por ter me ajudado muito nesta etapa com valiosos ensinamentos.

Não posso deixar de agradecer á Estela, Lucimar, Salatino e Maria Luiza pelos conselhos.

Aos amigos e amigas do Laboratório de fitoquímica por terem me alegrado em momentos críticos, especialmente, Adne, Augusto, Bruno, Carol, Edegar, Fernanda, Janaina, Kátia, Liss, Milena, Natália, Toshi. Obrigada pela amizade!

Aos amigos e amigas do LAM por terem me acolhido com braços abertos, especialmente, Bia, Carol, Iago, Lagosta e Manu.

À Alice, Carmen, Fadia e Sarah, cujas companhias me fizeram tão bem!

À Bruna Pimentel, sem você eu teria morrido de fome. Obrigada pela paciência e pelos puxões de orelha!

À Daniele Serra pelas horas que sofremos e, principalmente, rimos juntas. Foi assim que você se tornou uma grande amiga.

Não posso deixar de agradecer aos amigos de longa data, especialmente, Marcelo Nunes e Wesley Bispo.

À minha família querida pelo apoio! Em especial, minhas avós: Joana (*In memoriam*) e Antonia e meus tios: Pedro (*In memoriam*) e João. Amo vocês!

Obrigada a todos. Este trabalho não seria o mesmo sem vocês!

Índice

Introdução Geral	8
Capítulo I. Efeitos da intensidade de luz nas taxas de crescimento e nas concentrações de clorofila <i>a</i> e de carotenoides totais em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta)	24
Capítulo II. Efeitos da intensidade de luz sobre a composição pigmentar em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta).....	44
Capítulo III. Metodologia de análise e extração de compostos fenólicos para avaliar efeitos da intensidade de luz em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta).....	71
Discussão Geral e Conclusão	96
Resumo Geral.....	99
Abstract	100
Apêndice I.....	101
Apêndice II	104

Introdução Geral

Revisão geral sobre a fotossíntese oxigênica

A fotossíntese oxigênica é o principal processo produtor de oxigênio e matéria orgânica na Terra. Com seu surgimento, a superfície da Terra se tornou oxidante, impondo um novo ritmo à evolução, permitindo o aparecimento do processo de respiração e formação da camada de ozônio (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011).

Basicamente, a fotossíntese oxigênica trata-se de um processo biológico, no qual a energia luminosa entre 400-700 nm dita fotossinteticamente ativa (PAR, do inglês *Photosynthetic Active Radiation*) é absorvida e convertida em energia química, em estruturas formadas por complexos proteínas-pigmentos chamadas de fotossistemas (Blankenship, 2002). Todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica possuem dois fotossistemas: o fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII) (Fromme & Grotjohann, 2008). Os fotossistemas são constituídos de uma forma geral por um complexo antena e um centro de reação. O complexo antena é formado pela antena núcleo e antena externa (Fig. 1) (Heldt & Heldt, 2005).

Figura 1: Esquema geral de um fotossistema. Modificada de Heldt & Heldt (2005).

A conversão de energia luminosa em química ocorre mais especificamente no centro de reação, em um par especial de clorofilas *a* que recebem o nome de P680 no PSII e P700 no PSI. O P680 e o P700 ao serem excitados liberam elétrons. O P680 re-

cupera o elétron perdido via oxidação da molécula de água em um processo onde há formação de oxigênio, já o P700 recebe o elétron perdido do P680, via o complexo citocromo B₆F e vários carregadores de elétrons (Fig. 2). Neste processo, há geração de um gradiente de próton (ΔpH), no qual a energia estocada é utilizada para produção de ATP, via ATPsintase (Fromme & Grotjohann, 2008; Shen *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2009). O elétron perdido do PSI reduz $NADP^+$ a NADPH. As moléculas resultantes ATP e NADPH são utilizadas na manutenção do metabolismo ou na produção de novas moléculas, como glicose (Fig. 2) (Fromme & Grotjohann, 2008; Shen *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2009).

Figura 2: Esquema geral da fotossíntese mostrando os fotossistemas I e II (PSI e PSII), a ATP-sintase (ATPase), o complexo citocromo B₆F (b₆f) e alguns carregadores de elétrons: PQ e PQH₂ (*Pool* de plastoquinona), PC (Plastocianina), Fd (Ferredoxina) e FNR (Ferredoxina-NADP redutase). As linhas tracejadas representam os movimentos dos prótons, as linhas sólidas representam a transferência de elétron e a membrana em laranja representa a membrana do tilacóide.

Por outro lado, é baixa a probabilidade de um fóton atingir diretamente o P680 ou P700 e excitá-los. A importância do complexo antena é exatamente absorver energia, direcioná-la para o centro de reação e tornar a fotossíntese um processo energeticamente produtivo (Heldt & Heldt, 2005).

A clorofila *a* do centro de reação é o pigmento mais importante na fotossíntese, pois está diretamente envolvida na conversão de energia luminosa em química. No entanto, nos complexos antenas, este pigmento exerce outra função que é a de coleta luz,

da mesma forma que outras clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas que são ditos pigmentos acessórios (Raven *et al.*, 2007).

A diversidade de pigmentos acessórios é importante para amplificar a faixa de absorção de energia, ou seja, a região do espectro de luz onde um determinado pigmento não absorve, outros pigmentos podem absorver, assim aproveitando o máximo possível de PAR.

Diferentes pigmentos acessórios estão presentes entre os diferentes grupos de organismos fotossintetizantes. Estas variações pigmentares ocorrem, principalmente, em nível de antena externa, pois a antena núcleo e o centro de reação são mais conservados, dentro de cada grupo de organismo, constituídos principalmente de clorofila *a* e de β -caroteno (Telfer *et al.*, 2008; Boehm *et al.*, 2011).

Aparato fotossintetizante de algas vermelhas

Algas vermelhas ou Rhodophyta é um filo de organismos eucariontes fotossintetizantes principalmente marinhos, que abrange organismos unicelulares e multicelulares. Este clado é caracterizado pela ausência de estágios flagelados e por apresentar reservas glicídicas formadas por grãos citoplasmáticos de amido florideano (Woelkerling, 1990; Reviers, 2010).

Algas vermelhas possuem um dos aparatos fotossintetizantes mais ancestrais. Basicamente, trata-se de uma transição entre cianobactérias e eucariontes. A antena externa do PSII é similar a de cianobactérias, sendo formada por um complexo proteína-pigmento extrínseco à membrana e conhecido por ficobilissomos, diferente da maioria dos eucariontes como algas verdes e plantas terrestres que possuem a antena externa formada por complexo proteína-pigmento intrínseco a membrana (Fig. 3) (Grossman *et al.*, 1993).

Os ficobilissomos são formados por ficobiliproteínas (exemplo, ficoeritrina; Fig. 4) ligadas covalentemente à ficobilinas (Blankenship, 2002), que são cromóforos e, assim como as clorofilas (exemplo, clorofila *a*; Fig. 4), são cadeias tetrapirrólicas, mas diferentes destas últimas apresentam os anéis pirrólicos dispostos linearmente (Grossman *et al.*, 1993).

Já a antena externa do PSI de algas vermelhas é similar a de eucariontes, constituída por complexos proteínas-pigmentos intrínseco às membranas. Os pigmentos

que compõem esta antena externa são clorofila *a* e carotenoides, como zeaxantina e β -caroteno (Gantt, 2003).

O pigmento clorofila *a* está presente principalmente no PSI e em menor quantidade, cerca de 7%, está presente nas antenas núcleos e centros de reações do PSII. Em algas vermelhas, a função dos carotenoides como pigmentos acessórios ainda é controversa, exceto pelo β -caroteno (Gantt, 1990). Apesar das diferenças no aparato fotossintetizante, o mecanismo geral de funcionamento da fotossíntese, como exposto anteriormente, parece ser válido para algas vermelhas.

Figura 3: Representação esquemática comparando a antena externa do fotossistema II de algas vermelhas e cianobactérias com a antena externa de algas verdes e plantas terrestres. O complexo nuclear está representando o centro de reação e a antena núcleo.

Figura 4: Estrutura molecular de clorofila *a* (modificada de Streit *et al.*, 2005) e de ficoeritrina (modificada de Blankenship, 2002). Cys na molécula de ficoeritrina se refere ao resíduo de aminoácido cisteína.

Efeito do estresse luminoso e respostas de fotoproteção em algas vermelhas

No ambiente aquático, condições de excesso de luz são comuns ao longo dos dias, das estações do ano, do ciclo de marés ou como mudanças repentinas no tempo (Schubert, 2001). Dessa forma, como quaisquer outros organismos fotossintetizantes, algas vermelhas, durante seu ciclo de vida, podem ser expostas a intensidades de luz fotossinteticamente ativa superior à energia necessária para os processos fotoquímicos, gerando um estresse luminoso.

Nestas circunstâncias, apesar de organelas como as mitocôndrias serem suscetíveis a mudanças dependentes da intensidade de luz, os cloroplastos são evidentemente os mais afetados, pois as antenas dos aparatos fotossintetizantes podem absorver esta energia em excesso, sobrecarregando o sistema (Yoshida *et al.*, 2011). Consequentemente, essa sobrecarga conduz a um desequilíbrio aumentando a produção de substâncias derivadas de oxigênio (O_2) conhecidas por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Müller *et al.*, 2001). Entre as EROs há radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$), e não radicais, como o oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Ambos fotossistemas são importantes sítios de produção de EROs (Asada, 2006). No PSI, a produção de EROs ocorre, principalmente, quando há falta de $NADP^+$ comoceptor final de elétron. Nesta situação, moléculas de O_2 recebem os elétrons e geram O_2^- pela reação de Mehler. Por outro lado, no PSII, a principal fonte de EROs é via estado tripleto da clorofila *a* do P680 que pode reagir com o oxigênio molecular, que naturalmente ocorre no estado tripleto, formando 1O_2 . A formação de 1O_2 também ocorre nos complexos antenas, porém o estado tripleto da clorofila *a* é formado via decaimento energético por conversão intersistema, já no centro de reação é formado via recombinação de carga (ver a revisão de Krieger-Liszkay, 2005).

As EROs são moléculas altamente danosas e instáveis que podem danificar macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos, podendo levar a célula, parte do organismo ou até mesmo o organismo todo à morte (Asada & Takahashi, 1987; Krieger-Liszkay, 2005). Por isso, organismos fotossintetizantes apresentam diversas respostas de fotoproteção. Em algas vermelhas, muitas destas respostas necessitam ser elucidadas e possivelmente diferem em relação ao que se conhece para plantas terrestres e algas verdes, devido às diferenças nos aparatos fotossintetizantes.

Entre as respostas de fotoproteção em algas vermelhas, já foram observadas diversas alterações morfológicas, anatômicas, mecânicas entre outras, em nível de organelas e/ou talos. Alguns exemplos são mudanças na espessura da parede celular, aumento nas ramificações do talo e no número de sulcos nas superfícies das células como visto na delicada rodófito filamentosa *Audouinella saviana* (Meneghini) Woelkerling, quando cultivada em alta intensidade de luz (Talarico, 1996).

No presente estudo será dada ênfase a respostas químicas, nas quais podem ser observadas variações qualitativas e/ou quantitativas na concentração de algumas substâncias. Algumas destas substâncias podem apresentar uma redução na concentração, como observado em estudos com ficobiliproteínas, sugerindo uma estratégia de redução na absorção de luz (Levy & Gantt, 1988; Carnicas *et al.*, 1999). Por outro lado, há substâncias que apresentam uma alta correlação positiva com a intensidade luminosa, indicando uma possível função antioxidante. Dentre estes antioxidantes, há componentes enzimáticos como superóxido dismutase e catalase, já estudados em algas vermelhas por Aguilera *et al.* (2002) e Rossa *et al.* (2002), e componentes não enzimáticos, como carotenoides e compostos fenólicos, que são foco deste estudo. Estes últimos, os compostos fenólicos, são raramente estudados em algas vermelhas.

Carotenoides

Carotenoides são tetraterpenos amplamente distribuídos na natureza, biossintetizados a partir do diterpeno geranylgeranyl-pirofosfato nos plastídios dos eucariontes. Estes pigmentos podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, que são substâncias constituídas apenas por esqueleto de carbono e hidrogênio e as xantofilas que são oxigenadas (Fig. 5) (Harborne, 1998).

Figura 5: Estrutura molecular de um caroteno (β -Caroteno) e de uma xantofila (Zeaxantina). Modificadas de Rodriguez-Amaya (1999).

A maioria das algas vermelhas tem como principal carotenoide a xantofila luteína, porém, em algumas espécies há predomínio das xantofilas zeaxantina ou anteraxantina. Os carotenos β -caroteno e α -caroteno também estão presentes na maioria das espécies, porém, não são majoritários, com raras exceções. Os carotenoides mais derivados β -criptoxantina e/ou violaxantina são encontrados em menores concentrações em algumas espécies (Andersson *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2006). Apesar desta composição bem diversa, pouco se sabe sobre a função destes compostos nestes organismos.

Por outro lado, é bem difundido na literatura estudos *in vitro* ou *in vivo* que observaram que alguns carotenoides atuam como antioxidantes e estão envolvidos na desativação direta das clorofilas *a* do estado tripleto das antenas e na desativação das EROs.

Já as clorofilas *a* do estado tripleto do centro de reação não são desativadas, pois estão distantes das moléculas de carotenoides nesta região. Neste caso, uma estratégia observada, principalmente no PSII, é a dissipação térmica do excesso de energia luminosa absorvida, evitando, assim, o sobrecarregamento do centro de reação do PSII e, concomitantemente, evitando a formação de clorofila *a* tripleto do P680 (Krieger-Liszky, 2005). A dissipação térmica parece estar associada ao ciclo das xantofilas. Em plantas terrestres, este ciclo ocorre nas antenas externas do PSII e consiste no acúmulo, em questão de minutos, de uma xantofila como, por exemplo, zeaxantina, via conversão de violaxantina (Demmig-Adams & Adams, 1992).

No entanto, como visto anteriormente, a antena externa do PSII de algas vermelhas não possui carotenoides. Essa diferença é a razão da incerteza quanto à presença funcional de um ciclo das xantofilas em algas vermelhas, ou da função destes pigmentos na dissipação térmica no PSII nestes organismos. Contudo, há raros relatos de algas

vermelhas com um ciclo das xantofilas completo semelhante ao de plantas terrestres, como em *Gracilaria birdiae* Plastino & E. C. Oliveira estudada por Ursi *et al.* (2003), deixando esta questão ainda em aberto.

É importante ressaltar que alguns estudos de longa duração têm demonstrado variações de carotenoides dependentes da luz, como estudos em *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang & Xia por Carnicas *et al.* (1999) e em *Corallina elongata* J. Ellis & Solander por Esteban *et al.* (2009). Nestes trabalhos, foi observado o aumento na concentração de zeaxantina com o aumento da luz. Já Schubert & García-Mendoza (2008), estudando diferentes algas vermelhas com distinta composição de carotenoides, verificaram que as espécies com maior conteúdo de zeaxantina têm menor sensibilidade à luz.

Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos que apresentam pelo menos um anel aromático ligado a uma hidroxila funcional (Strack, 1997). São sintetizados por diferentes vias, porém as mais amplamente estudadas são a do ácido chiquímico e a do acetato malonato, devido à sua grande importância na síntese dessas substâncias em plantas terrestres. Entre estes compostos, incluem-se, por exemplo, flavonoides e ácidos fenólicos (Fig. 6).

Figura 6: Estrutura molecular de um ácido fenólico (ácido *p*-cumárico) e de um flavonoide (quercetina).

Tem sido proposto que a propriedade antioxidante dos compostos fenólicos é mediada pela capacidade de suprimir a formação de EROs através da capacidade quelante de metais, ou pela capacidade de estabilizar EROs via grupos hidroxilas propensos a doar hidrogênio ou elétrons (Fig. 7) (Dai & Mumper, 2010). Muitos compostos fenólicos, como ácido *p*-cumárico e quercetina, possuem uma capacidade antioxidante maior do que carotenoides e vitaminas C e E, que são antioxidantes amplamente conhecidos (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Figura 7: Esquema de um dos mecanismos propostos de atuação dos compostos fenólicos como antioxidantes representando a capacidade de estabilizar as espécies reativas de oxigênio (representado aqui por $R^\bullet$) via grupos hidroxilas propensos a doar hidrogênio ou elétrons.

Na literatura, compostos fenólicos típicos de plantas terrestres também são relatados em algas vermelhas. Novoa *et al.* (2001) estudando a macroalga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe encontraram ácidos fenólicos (ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) e Onofrejová *et al.* (2010) estudando a macroalga vermelha *Porphyra tenera* encontraram hidroxibenzaldeídos (*p*-hidroxibenzaldeído, 3,4-dihidroxibenzaldeído e vanilina) e ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido salicílico, entre outros).

Além destes compostos polifenólicos típicos de plantas terrestres, algas vermelhas apresentam fenólicos únicos, halogenados e/ou terpenoides (Maschek & Baker, 2008; Blunt *et al.*, 2009). Porém, compostos fenólicos são raramente estudados em algas vermelhas, principalmente, em estudos com estresse com luz.

Sob esta perspectiva, em algas vermelhas ainda há necessidade de mais estudos analisando tanto perfis químicos de pigmentos fotossintetizantes, além de antioxidantes como compostos fenólicos, correlacionando estes perfis com condições de estresse luminoso a fim de melhorar a compreensão da biologia deste grupo.

Considerações sobre o material de estudo: *Gracilariopsis tenuifrons*

Gracilariopsis tenuifrons (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand é uma espécie de macroalga vermelha agarófita pertencente a Gracilariales - Gracilariaceae. Foi pela primeira vez descrita na literatura científica em Alagoas (Brasil) por Bird & Oliveira em 1986, nomeando-a como *Gracilaria tenuifrons* C. J. Bird & E. C. Oliveira. Mais tarde, Fredericq & Hommersand (1989) propuseram a revalidação do gênero *Gracilariopsis* e esta alga foi reclassificada com o nome atual.

O ciclo de vida de *Gracilariopsis tenuifrons* é trifásico isomórfico apresentando fase gametofítica (n), carposporofítica (2n) e tetrasporofítica (2n), com o gametófito e o tetrasporófito similares em morfologia e independentes e o carposporófito dependente do gametófito feminino (Critchley, 1993; Brito & Silva, 2005).

Quanto à distribuição, esta alga está presente no litoral oeste do oceano Atlântico abrangendo países do mar caribenho (exemplo, Cuba, Venezuela e México) e a costa brasileira, onde há registros desde a costa do Ceará até águas mais frias de Santa Catarina (Fig. 8) (Oliveira *et al.*, 2006).

Figura 8: Distribuição geográfica de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Em destaque amarelo, estados brasileiros onde indivíduos dessa espécie já foram coletados, segundo Oliveira *et al.* (2006).

No Brasil, *Gracilariopsis tenuifrons* é uma das poucas algas exploradas economicamente para extração de ágar (ficocoloide). A exploração no território brasileiro deste ficocoloide ainda é realizada principalmente de forma extrativista e dependente da

produção externa. Associada a esta conjuntura, esta alga vem despertando interesse econômico e científico, pois possui uma alta taxa de crescimento, um ágar de boa qualidade (Brito & Lemus, 1998) e não é exótica, apresentando alto potencial para cultivo em grande escala. Para tanto, há necessidade de melhor compreensão de sua biologia, produtividade e influência de fatores abióticos, como luz (Critchley, 1993).

Respostas à luz são de grande interesse econômico e científico, pois este tipo de estresse está diretamente correlacionado com a produtividade, com a qualidade nutricional dos cultivos comerciais e fornecem informações básicas para a compreensão da biologia e distribuição das populações naturais. Estas informações podem ser utilizadas para manejo e uso do recurso de forma racional (Hanelt, 1996; Taiz & Zeiger, 2009).

Muitos estudos vêm sendo realizados no Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM) do Instituto de Biociências da USP com *Gracilariopsis tenuifrons*. Plastino *et al.* (1998) estudaram os efeitos da temperatura e da salinidade no crescimento em laboratório, Rossa *et al.* (2002) estudaram a caracterização da atividade *in vitro* das enzimas nitrato redutase e superóxido dismutase, Wanderley (2009) estudou a influência de nitrato sobre o crescimento, a atividade da nitrato redutase, a composição química e na captação de nitrato e fosfato e Harada & Chow (2009) estudaram o efeito da luz sobre enzimas antioxidantes. No entanto, são poucos os estudos a respeito da composição química desta alga, principalmente, quando relacionada a estresse luminoso.

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho, em colaboração com a **Profa. Dra. Fungyi Chow** (Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" - IBUSP), foi analisar o crescimento, a composição de pigmentos fotossintetizantes e de compostos fenólicos em *Gracilariopsis tenuifrons* em condições controladas de cultivo e submetidas a condições de diferentes intensidades de luz.

Os objetivos específicos serão tratados em cada capítulo e foram os seguintes:

- a) Avaliar os efeitos do aumento da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre as taxas de crescimento e nas concentrações de clorofila *a* e de carotenoides totais;
- b) Identificar os carotenoides e clorofila *a* presentes nesta macroalga e, em seguida, avaliar os efeitos do aumento da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre estes pigmentos;
- c) Padronizar uma metodologia de extração e quantificação por meio do ensaio de Folin-Ciocalteu, verificando possíveis interferentes como açúcares solúveis. Analisar o extrato em CLAE e identificar os possíveis compostos fenólicos presentes. Avaliar os efeitos do aumento da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre o teor de fenóis totais e sobre os possíveis compostos fenólicos.

Referências bibliográficas

- Aguilera, J.; Dummermuth, A.; Karsten, U.; Schriek, R. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biology*, v. 25, n. 6, p. 432-441, 2002.
- Andersson, M.; Schubert, H.; Pedersén, M.; Snoeijs, P. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology*, v. 149, n. 3, p. 653-665, 2006.
- Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- Asada, K.; Takahashi, M. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle, D. J.; Osmond, C. B.; Arntzen, C. J. (Eds) *Photoinhibition*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987. p. 227-288.
- Bird, C. J.; Oliveira, E. C. *Gracilaria tenuifrons* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta), a species from the tropical western Atlantic with superficial spermatangia. *Phycologia*, v. 25, n. 3, p. 313-320, 1986.
- Blankenship, R. E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 1. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002. 336p.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009.
- Boehm, M.; Romero, E.; Reisinger, V.; Yu, J.; Komenda, J.; Eichacker, L. A.; Dekker, J. P.; Nixon, P. J. Investigating the early stages of photosystem II assembly in *Synechocystis* sp. PCC 6803: isolation of CP47 and CP43 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 17, p. 14812-14819, 2011.
- Brito, L.; Silva, S. Fenología y ciclo de vida del alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae) en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, v. 53, p.67-73, 2005.
- Brito, L.; Lemus, A. Variación anual en el rendimiento y fuerza de gel del agar de *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird et Oliveira) Fredericq et Hommersand de la Península de Araya, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, v. 37, n. 1-2, p. 74-79, 1998.
- Carnicas, E.; Jiménez, C.; Niell, F. X. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. liui Zhang et Xia. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 50, v. 2-3, p. 149-158, 1999.
- Critchley, A. T. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): an economically important agarophyte. In: Ohno, M.; Critchley, A.T. (Eds.). *Seaweed cultivation and marine ranching*. Yokosuka: Kanagawa International Fisheries Training Center and JICA, p. 89-112, 1993.

- Dai, J.; Mumper, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 43, n. 1, p. 599-626, 1992.
- Esteban, R.; Martínez, B.; Fernández-Marín, B.; Becerril, J. M.; García-Plazaola, J. I. Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *European Journal of Phycology*, v. 44, n. 2, p. 221-230, 2009.
- Fredericq, S.; Hommersand, M. H. The comparative morphology and taxonomic status of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.*, v. 25, n. 2, p. 228-241, 1989.
- Fromme, P.; Grotjohann, I. Overview of photosynthesis. In: Fromme, P. (Ed.). *Photosynthetic protein complexes: a structural approach*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 1-66.
- Gantt, E. Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K. M.; Sheath, R. G. (Eds.), *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 203-219.
- Gantt, E.; Grabowski, B.; Cunningham, F. X. C. Antenna systems of red algae: phycobilisomes with photosystem II and chlorophyll complexes with photosystem I. In: B. R. Green; W. W. Parson (Eds.). *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 307-322.
- Grossman, A. R.; Schaeffer, M. R.; Chiang, G. G.; Collier, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.*, v. 57, n. 3, p. 725-749, 1993.
- Harada, D.; Chow, F. Efeito da luz nos sistemas antioxidantes da alga *Gracilariopsis tenuifrons*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, Ribeirão Preto. *Anais eletrônicos*. São Paulo: USP, 2009. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2181&numeroEdicao=17>>. Acesso em: 07 mai. 2012.
- Hanelt, D. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. In: F. L. Figueroa; C. Jiménez; J. L. Pérez-Lloréns; F. X. Niell (Eds.); *Underwater Light and Algal Photobiology*. Barcelona: Sci. Mar. 60 (Suppl.1), 1996. p. 243-248.
- Harborne, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3. ed. New York: Chapman & Hall CO, 1998. 320p.
- Heldt, H.-W. Heldt F. *Plant biochemistry*. 3. ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. 656p.
- Hohmann-Marriott, M. F.; Blankenship, R. E. Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 62, p. 515-48, 2011.

- Krieger-Liszkay, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 411, p. 337-346, 2005.
- Levy, I.; Gantt, E. Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis, and phycobilisomes. *J. Phycol.*, v. 24, n. 4, p. 452-458, 1988.
- Maschek, J. A.; Baker, B. J. The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler, C. D. (Ed.). *Algal chemical ecology*. Berlin: Springer Verlag,. 2008. p. 1-23.
- Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.
- Novoa, A. V.; Motidome, M.; Mancini-Filho, J.; Linares, A. F.; Tanae, M. M.; Torres, L. M. B.; Lapa, A. J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina. *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, 2001.
- Onofrejová, L.; Vašíčková, J.; Klejdus, B.; Stratil, P.; Mišurcova, L.; Kráčmar, S.; Kopecký, J.; Vacek, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.
- Oliveira, E. C.; Horta, P. A.; Torrano-Silva, B. N. *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. 2006. Disponível em: <<http://www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/busca3.php?id=357>>. Acesso em: 07 mai. 2012.
- Plastino, E. M.; Ursi, S.; Heimbecker, A. M. C. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: IV Congresso Latinoamericano de Ficologia, 1998, Caxambú. *Programa e Resumos*. Caxambú, p. 169, 1998.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856p.
- Reviers, B. Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo. In: Franceschini, I. M.; Burliga, A. L.; Reviers, B.; Prado, J. F.; Rézig, S. H.(Eds.). *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 19-57.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic. *Trends in Plant Science*, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.
- Rodriguez-Amaya, D.B. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI Press, 1999. 64p.
- Rossa, M. M.; Oliveira, M. C.; Okamoto, O. K.; Lopes, P. F.; Colepicolo, P. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, v. 14, n. 3, p. 151-157, 2002.

- Schubert, N.; García-Mendoza, E. Photoinhibition in red algal species with different carotenoid profiles. *Journal of Phycology*, v. 44, n. 6, p. 1437-1446, 2008.
- Schubert, N.; García-Mendoza, E.; Pacheco-Ruiz, I. Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology*, v. 42, n. 6, p. 1208-1216, 2006.
- Schubert, H.; Sagert, S.; Forster, R. M. Evaluation of the different levels of variability in the underwater light field of a shallow estuary. *Helgoland Marine Research*, v. 55, n. 1, p. 12-22, 2001.
- Shen, J. R.; Henmi, T.; Kamiya, N. Structure and function of photosystem II. In: Fromme, F. (Org.). *Photosynthetic protein complexes, a structural approach*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 83-106.
- Strack, P.M. Phenolic metabolism. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. *Plant biochemistry*. London: Academic Press, 1997. p. 387-416.
- Streit, N. M.; Canterle, L. P.; Canto, M. W.; Hecktheuer, L. H. H. As clorofilas. *Cienc. Rural.*, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 820p.
- Talarico, L. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. In: F. L. Figueroa; C. Jiménez; J. L. Pérez-Lloréns; F. X. Niell (Eds.); *Underwater Light and Algal Photobiology*. Barcelona: Sci. Mar. 60 (Suppl.1), 1996. p.205-222.
- Telfer, A.; Pascal, A.; Gall, A. Carotenoids in Photosynthesis. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.), *Carotenoids, Volume 4: Natural Functions*. Birkhäuser Verlag, 2008. p. 265-308.
- Ursi, S.; Pedersén, M.; Plastino, E.; Snoeijs, P. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales : Rhodophyta). *Marine Biology*, v. 142, n. 5, p. 997-1007, 2003.
- Wanderley, A. *Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta)*. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Woelkerling, W. J. An Introduction. In: Cole, K. M.; Sheath, R. G. (Eds.), *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 1-6.
- Yoshida, K.; Terashima, I.; Noguchi, K. How and why does mitochondrial respiratory chain respond to light? *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 6, p. 864-866, 2011.

Capítulo I

Efeitos da intensidade de luz nas taxas de crescimento e nas concentrações de clorofila *a* e de carotenoides totais em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta)

Resumo

O estresse de luz pode afetar consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento dos organismos fotossintetizantes. Nestas situações, podem ser observadas variações nas concentrações de clorofila *a* e de carotenoides totais. Sob esta perspectiva, a alga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* foi cultivada *in vitro* em três intensidades de luz: 60 (Controle), 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foi verificado que o aumento na intensidade de luz não provocou redução na biomassa desta alga, ao contrário houve um maior incremento. Concomitantemente, os ápices apresentaram uma alteração da coloração, passando de vermelho a amarelo, que se intensificou com o aumento da intensidade da luz e ao longo dos dias. Esta alteração na coloração reflete mudanças na concentração dos pigmentos. Clorofila *a* apresentou sempre tendência de queda nos experimentos de alta intensidade de luz, enquanto carotenoides totais ficaram constantes ou apresentaram um aumento nos dias iniciais, sugerindo que alguns carotenoides tem um efeito na fotoproteção.

Abstract

The high-light stress can adversely affect growth and development of photosynthetic organisms, leading to changes in chlorophyll *a* and total carotenoid concentrations. In this regard, the red seaweed *Gracilariopsis tenuifrons* was grown *in vitro* at different light intensities: 60 (Control), 600 and 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The increase in light intensity has not caused reduction in algal biomass; on the contrary, promoted a greater production. Concomitantly, the algal apices showed a yellowing tendency which was intensified by the increase in light intensity and over days. This change in color reflects modification in the concentration of pigments. The concentrations of chlorophyll *a* showed a downward trend in treatment with high light intensity, while total carotenoids concentrations were constant or increased in the initial days, suggesting that some carotenoids could be involved in photoprotection.

1.1 Introdução

Dentro do espectro eletromagnético da luz solar, a região entre 400 até 700 nm (radiação fotossinteticamente ativa ou simplesmente PAR, do inglês *Photosynthetic Active Radiation*) é a mais importante para a vida na Terra, pois organismos fotossintetizantes são capazes de capturar e converter a energia solar desta região em energia química (Ross & Sulev, 2000; Taiz & Zeiger, 2009). Esta conversão ocorre em complexos proteínas-pigmentos chamados fotossistemas que são constituídos, de uma forma geral, de um centro de reação e um complexo antena (Heldt & Heldt, 2005).

A energia convertida é usada nos processos vitais, como na produção de moléculas orgânicas. Contudo, a PAR pode ser altamente danosa quando a intensidade de luz é superior à energia necessária para os processos fotoquímicos da fotossíntese. Nesta situação, o excesso de energia pode conduzir a uma sobrecarga do sistema fotossintetizante e, conseqüentemente, acarretar em um aumento na produção de moléculas instáveis altamente danosas, principalmente do tipo espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em casos extremos, podem ocasionar a morte do indivíduo (Müller *et al.*, 2001; Asada, 2006).

As clorofilas, apesar de serem pigmentos chaves na fotossíntese, contribuem na formação de EROs. Em condições de alta intensidade de luz, há um aumento da probabilidade das clorofilas passarem para o estado tripleto (Müller *et al.*, 2001). Este estado pode reagir com o oxigênio livre formando oxigênio singleto, um dos principais EROs que reagem danificando lipídios, proteínas e pigmentos (Krieger-Liszkay, 2005).

Organismos fotossintetizantes, durante seus ciclos de vidas, enfrentam condições de excesso de luz ao longo dos dias, das estações do ano ou em mudanças repentinas no tempo (Schubert, 2001). Desta forma, o estresse gerado por alta intensidade de luz é um evento comum e pode afetar consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento dos organismos (Taiz & Zeiger, 2009). No entanto, estes organismos possuem respostas de fotoproteção com o objetivo de limitar ou até mesmo reverter este quadro danoso.

Respostas à intensidade de luz podem ser bem variadas conforme a espécie, porção do talo, estado reprodutivo, distribuição geográfica, período sazonal e dose, entre outros. Em algas vermelhas, têm sido observadas respostas imediatas, como a dissipação térmica da energia já absorvida, ou respostas a um estresse duradouro. Neste último caso, podem ser vistas várias alterações anatômicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas em nível do talo e/ou celular (Talarico & Maranzana, 2000). Alguns

exemplos são mudanças na espessura da parede celular, como visto na delicada rodófito filamentosa *Audouinella saviana* (Meneghini) Woelkerling (Talarico, 1996), ou a redução dos tilacoides, como visto na rodófito cilíndrica pseudoparenquimatosa *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Kosovel & Talarico, 1979).

Os pigmentos fotossintetizantes são essenciais para a realização da fotossíntese. Dessa forma, em estresse de alta intensidade de luz são observadas comumente variações qualitativas e quantitativas na concentração destes compostos. Estas variações pigmentares estão diretamente correlacionadas com as diferentes estratégias de fotoproteção adotadas pelo organismo fotossintetizante e, portanto, são essenciais para a melhor compreensão da fisiologia destes organismos em situações de estresse. Em algas vermelhas, muitos experimentos têm demonstrado que a composição pigmentar varia com a alta intensidade luminosa. No entanto, estes trabalhos deram ênfase principalmente às clorofilas e às ficobiliproteínas (Levy & Gantt, 1988; Cunningham *et al.* 1989; Bernard *et al.* 1996), sendo raros os trabalhos que associam a variação pigmentar com as taxas de crescimentos.

Inevitavelmente, respostas à luz são de grande interesse econômico e científico, pois este tipo de estresse está diretamente correlacionado com a produtividade e com a qualidade nutricional dos cultivos comerciais, além de fornecer informações básicas para a compreensão da biologia e da distribuição das populações naturais. Estas informações podem ser utilizadas para manejo e uso do recurso de forma racional (Hanelt, 1996; Taiz & Zeiger, 2009).

Sob essa perspectiva, pretendemos avaliar os efeitos do aumento da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre as taxas de crescimento e as concentrações de clorofila *a* e de carotenoides totais na macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Esta alga foi escolhida para execução deste estudo por ser um modelo biológico estudado no Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" - IBUSP, por ser de fácil cultivo em laboratório, estar presente ao longo do litoral brasileiro, possuir ágar de boa qualidade e apresentar altas taxas de crescimento. Estas qualidades tornam esta alga de interesse econômico e pode ser considerada uma espécie potencial para ser produzida em larga escala (Oliveira, 1998). Assim, pretendemos contribuir para a melhor compreensão da biologia desta espécie, complementando os dados já existentes, como os de Yokoya (1996), Plastino *et al.* (1998), Rossa (1999), Rossa (2002), Wanderley (2009), entre outros.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Material e condições gerais do cultivo

Foram estabelecidos cultivos estoques unialgais de talos da fase gametofítica feminina (n) de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand a partir da cepa 39 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM) do Instituto de Biociências da USP (Fig. 1).

O cultivo estoque foi mantido no mínimo por um mês em condições controladas: temperatura de 25 ± 1 °C, taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo de 60 ± 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro e aeração em períodos intermitentes de 30 min ligado e 30 min desligado. O meio de cultivo foi utilizado na proporção de 3 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar esterilizada (salinidade de 32), enriquecida com solução Von Stosch (50%) (Edwards, 1970). A troca do meio de cultivo e a limpeza dos talos foram realizadas uma vez por semana.

Figura 1. Aspecto geral do cultivo de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand.

A água do mar utilizada nos cultivos foi proveniente do município de São Sebastião (São Paulo, Brasil). Sua esterilização foi feita por meio de dupla filtragem (filtro de pressão CUNO, porosidade de 5 e 1 μm) e aquecimento em banho-maria a 90°C por 1 h. A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia, 40 W) cuja

taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo foi determinada por sensor esférico (Li-Cor, modelo LI-1935B) conectado a medidor de quanta (Li-Cor, modelo LI-250). A aeração foi fornecida por compressor odontológico Schulz de diafragma, isento de óleo.

1.2.2 Delineamento experimental e crescimento

A partir do cultivo estoque, ápices foram padronizados a 3 cm e transferidos para as condições experimentais por 7 dias. As condições foram semelhantes ao cultivo estoque, porém a proporção de cultivo foi alterada para 1 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar, visando evitar a limitação de nutriente durante o experimento e assim não prejudicar a interpretação de respostas relacionadas apenas à variação na intensidade de luz, como sugerido por Urabe & Sterner (1996).

Foram estruturados três tratamentos: um controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e dois tratamentos que tiveram a intensidade de luz aumentada para $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi estudado por separado devido ao volume de material e a logística laboratorial, sendo realizando três experimentos independentes. Para cada um destes conjuntos foram mantidos 21 frascos de cultivo. A cada dia, três destes frascos (réplicas) eram retirados das condições experimentais. Assim, cada coleta representou o Dia 0, o Dia 1, o Dia 2, etc., até completar uma semana de tratamento, Dia 7.

A biomassa dos frascos foi pesada antes e após o período experimental com o objetivo de registrar a variação em biomassa fresca. Esses dados foram usados para calcular a taxa de crescimento (TC) e o incremento de massa (IM) diário. Enquanto a TC informa a velocidade de crescimento, o incremento médio informa o ganho de massa. A TC (Lignell & Pedersén, 1989) e o IM foram calculados com as seguintes equações:

$$TC (\%) = \left[\left(\frac{Mf}{Mi} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right] \times 100\%$$

$$IM (\%) = \left[\frac{Mf - Mi}{Mi} \right] \times 100\%$$

Onde, Mf = Massa final (g), Mi = Massa inicial (g), t = tempo (dias)

Após a biomassa dos frascos serem pesadas, os ápices foram cortados novamente para 3 cm para padronizar seu tamanho. Em seguida, foram retiradas de cada frasco amostras de 50 mg e de 400 mg para as análises de pigmentos (CAPÍTULO I e CAPÍTULO II) e compostos fenólicos (CAPÍTULO III), respectivamente. Essas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. É importante ressaltar que no dia de montagem de cada experimento para cada tipo de análise química (Pigmentos ou compostos fenólicos) foram pesadas 3 réplicas de ápices de 3 cm do cultivo estoque para representar o Dia 0.

1.2.3 Extração de carotenoides e clorofila *a* e análise por espectrofotometria de UV/visível

Para extração e análise de carotenoides totais e clorofila *a* foi seguido um protocolo otimizado em nosso laboratório (Torres *et al.*, 2009). Em penumbra, amostras de 50 mg de biomassa fresca congelada foram trituradas em nitrogênio líquido até formar um pó fino. A este pó, foram adicionados 1,5 mL de metanol. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 14000 RPM por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi imediatamente submetido à varredura em espectrofotômetro de UV/visível (Shimadzu, modelo UV-1650 PC) entre comprimentos de onda de 400 a 700 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico. As absorbâncias obtidas foram usadas para calcular os teores de carotenoides totais (C) e clorofila *a* (Chl *a*) com as seguintes equações (Fungyi Chow, comunicação pessoal):

$$C \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{1000 \times A_{470} - 2,86 \times \text{Chl } a}{245}$$

$$\text{Chl } a \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = 12,5078 \times A_{666}$$

Onde, A470 = absorbância em 470 nm e A666 = absorbância em 666 nm

1.2.4 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias diárias de cada variável analisada. A partir da detecção da diferença, foi empregado o teste *a posteriori* de Tukey para identificar quais dias tiveram comportamentos distintos em cada variável. Todas as análises tiveram α fixado a 5% e foram realizadas no software Minitab® 16.1.0. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

1.3 Resultados

No controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), os ápices não apresentaram variação na cor ao longo dos dias. Os ápices do Dia 0 apresentaram cor semelhante aos ápices do Dia 7 (Fig. 2). Já com o aumento da intensidade de luz houve uma clara diferença fenotípica em relação à cor em ambos os tratamentos com maior luminosidade (600 e $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com os ápices apresentando alteração na coloração avermelhada para amarelada (Fig. 3). Esta variação na coloração foi mais intensa no experimento de maior intensidade de luz e cumulativa ao longo dos dias (Fig. 3). Os ápices do Dia 7 foram os mais afetados (Fig. 4), ficando completamente amarelados no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 2. Ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand após a exposição à $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (experimento controle) no Dia 0 e no Dia 7.

Figura 3. Ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand após a exposição à 600 e $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em diferentes dias de cultivos. Os números acima das fotos correspondem ao tempo, em dias, após o início do experimento (Dia 0 - 7).

Figura 4. Ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, após a exposição por 7 dias à diferentes intensidades de luz: $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C).

Com relação às taxas de crescimento, o controle apresentou um aumento significativo do Dia 1 ($6,4 \pm 0,08\%.\text{dia}^{-1}$) para o Dia 3 ($9,8 \pm 1,37\%.\text{dia}^{-1}$), ficando constante ao longo dos outros dias (Fig. 5A). Este resultado foi semelhante para os dias iniciais no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, aumentando do Dia 1 ($12,6 \pm 1,75 \%.\text{dia}^{-1}$) para o Dia 3 ($15,9 \pm 0,91\%.\text{dia}^{-1}$). No entanto, a partir Dia 4 ($13,7 \pm 0,84\%.\text{dia}^{-1}$) houve uma redução significativa até o Dia 6 ($12,7 \pm 1,16\%.\text{dia}^{-1}$) e 7 ($13,5 \pm 0,65\%.\text{dia}^{-1}$), quando as taxas se igualaram ao Dia 1 (Fig. 5C). As taxas de crescimento para o tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não apresentaram variações significativas, ficando constante ao longo dos dias com médias diárias de $11,34 \pm 0,78\%.\text{dia}^{-1}$ (Fig. 5B). As taxas de crescimento foram maiores com o aumento da intensidade de luz (Fig. 5), desde o Dia 1: $11,7\%.\text{dia}^{-1}$ para o tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $12,6\%.\text{dia}^{-1}$ para o tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em comparação aos $6,4\%.\text{dia}^{-1}$ para o controle.

O incremento da biomassa aumentou seguindo um padrão linear para as três intensidades luminosas com $R^2 > 0,95$ (Fig. 6). A inclinação da reta aumentou com a intensidade da luz. Estes resultados indicam que os ápices cresceram ao longo de todos os experimentos nas três intensidades estudadas, porém no experimento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve uma redução na velocidade de crescimento nos últimos dias.

Figura 5. Variação das taxas de crescimento (%.dia⁻¹) (médias $\pm$ desvio padrão) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 6. Efeitos de diferentes intensidades de luz (60, 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sobre o incremento diário da biomassa (%) (médias $\pm$ desvio padrão) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Cada reta apresentou $R^2 > 0,95$ (regressão linear).

Para os pigmentos fotossintetizantes foram analisados clorofila *a* e carotenoides totais. No experimento controle não houve variações significativas para estes pigmentos ao longo dos dias (Fig. 7A). A concentração média para clorofila *a* foi de $458,15 \pm 16,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ e para carotenoides totais foi de $92,09 \pm 2,82 \mu\text{g.g}^{-1}$. No experimento de 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração da clorofila *a* permaneceu constante do Dia 0 ($380,79 \pm 16,25 \mu\text{g.g}^{-1}$) ao Dia 2 ($392,82 \pm 11,3 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Fig. 7B). Em seguida, houve uma redução até o Dia 7 atingindo $249,7 \pm 8,2 \mu\text{g.g}^{-1}$, com redução de 34,4% em relação ao Dia 0 (Fig. 7B). Já a concentração dos carotenoides totais apresentou um aumento significativo do Dia 0 ($77,82 \pm 3,47 \mu\text{g.g}^{-1}$) até o Dia 2 ($96,002 \pm 5,2 \mu\text{g.g}^{-1}$), em seguida diminuindo até o Dia 7 ($71,44 \pm 4,80 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Fig. 7B). No experimento 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração da clorofila *a* diminuiu desde o Dia 0 até o Dia 7, com redução de 48,5%. A concentração de carotenoides totais foi constante do Dia 0 ($95,66 \pm 4,33 \mu\text{g.g}^{-1}$) até o Dia 3 ($96,62 \pm 4,22 \mu\text{g.g}^{-1}$), em seguida caindo significativamente até o Dia 7 ($71,89 \pm 2,82 \mu\text{g.g}^{-1}$), com redução de 24,8% em relação ao Dia 0 (Fig. 7C). A relação carotenoides totais por clorofila *a* permaneceu constante para o experimento controle. No entanto, essa relação sempre aumentou ao longo dos dias para os experimentos de alta intensidade de luz (Fig. 8), apesar da queda na concentração dos carotenoides totais, principalmente, nos últimos dias dos experimentos de alta intensidade de luz.

Figura 7. Variação das concentrações de clorofila *a* e carotenoides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 8. Efeito de diferentes intensidades de luz (60, 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sobre a relação entre a concentração de carotenoides totais e de clorofila *a* (médias $\pm$ desvio padrão) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand.

1.4 Discussão

Comparados ao controle, os tratamentos com altas intensidades de luz apresentaram variações nos parâmetros aqui analisados indicando que, provavelmente, essas variações são respostas relativas à luminosidade. A intensidade de 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (dez vezes maior do que no controle) foi o suficiente para provocar estas respostas, que foram intensificadas no tratamento de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nos tratamentos com altas intensidades de luz, as concentrações de carotenoides totais e clorofila *a* tiveram uma queda significativa, principalmente nos últimos dias do experimento. Essa queda também foi observada nas ficobilinas com a mesma macroalga por Daniele Serra (comunicação pessoal), porém realizado com amostras coletadas apenas após uma semana de tratamento. Resultados semelhantes também já foram obtidos para diferentes algas vermelhas, como em Levy & Gantt (1988) estudando *Porphyridium purpureum* (S. F. Gray) Nägeli, Carnicas *et al.* (1999) estudando *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia e Yakovleva & Titlyanov (2001) estudando *Chondrus crispus* Stackh.

Esta redução nos pigmentos foi acompanhada pela redução na coloração avermelhada nos ápices, sendo que na condição mais extrema do experimento (Dia 7 do tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), estes ápices ficaram completamente amarelados (Fig. 4). Na literatura, quedas na concentração pigmentar associada com a descoloração intensa em altas intensidades de luz vêm sendo descritas, principalmente para plantas terrestres, como sinal de fotoinibição crônica em um processo chamado foto-oxidação, no qual os pigmentos fotossintetizantes são degradados via EROs (Powles, 1984; Deming-Adams & Adams, 1992; Osmond, 1994; Ridge, 2002). Neste estágio, a capacidade fotossintetizante e, conseqüentemente, a biomassa, são reduzidas indicando que o organismo está morrendo. No entanto, ao analisar os resultados das taxas de crescimento e do incremento da biomassa (Fig. 5 e 6), verificou-se que a alga continua crescendo com o aumento da intensidade de luz. Assim, podemos sugerir que em *Gracilariopsis tenuifrons* a despigmentação dos ápices não necessariamente está relacionada com a morte foto-oxidativa, pelo menos na situação aqui analisada, mas sim, pode refletir uma estratégia de fotoaclimação.

Perda na coloração avermelhada em algas vermelhas parece ser comum em situações de alta intensidade de luz. Em campo, por exemplo, algas vermelhas podem apresentar coloração amarelada ou amarronzada no verão, em substituição ao tom vermelho do inverno, estando mesmo assim saudáveis e se reproduzindo normalmente (Jones & Williams, 1966; Waaland *et al.*, 1974).

A tendência da concentração de clorofila *a* foi diferente do padrão da concentração dos carotenoides totais. A concentração de clorofila *a* apresentou sempre tendência de queda nos tratamentos de alta intensidade de luz. Já a concentração de carotenoides, no tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ teve um aumento inicial seguido de queda, enquanto no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ os carotenoides permaneceram constantes entre os Dias 0-3, havendo queda significativa após esse período (Fig. 7).

A queda na concentração dos pigmentos fotossintetizantes nos tratamentos de alta intensidade de luz pode estar diretamente relacionada com o papel destes pigmentos na fotossíntese. O pigmento clorofila *a*, além de estar envolvido diretamente na conversão de energia luminosa em química no centro de reação de ambos os fotossistemas, apresenta papel importante na coleta de luz nos complexos antenas (Heldt & Heldt, 2005). Assim, a diminuição da clorofila *a*, observada em *Gracilariopsis tenuifrons*, reduziria a probabilidade de formação de oxigênio singleto e absorção de energia luminosa, diminuindo, conseqüentemente, a pressão sobre o sistema.

Diversos trabalhos têm demonstrado que carotenoides ligados às proteínas dos complexos antenas ou livres na membrana dos tilacoides são pigmentos importantes na fotoproteção, pois podem atuar na desativação de EROs, na extinção das clorofilas tripletos das antenas ou agir em sinergismo com outros antioxidantes, como por exemplo, a zeaxantina com tocoferol protegendo as membranas lipídicas contra peroxidação (Hurry *et al.*, 1997; Wrona *et al.*, 2004; Rissler & Durnford, 2005; Telfer *et al.*, 2008). Dessa maneira, o aumento inicial de carotenoides totais nos tratamentos de alta intensidade de luz pode refletir uma resposta desta macroalga na tentativa de diminuir os efeitos deletérios da luz.

Além de serem importantes como fotoprotetores, os carotenoides podem atuar como pigmentos acessórios (Demmig-Adams & Adams, 2002). Dessa forma, a redução na concentração destes pigmentos nos últimos dias dos tratamentos de alta intensidade de luz pode sugerir outra estratégia para redução de absorção de energia luminosa. Cabe salientar, porém, que essa função de coleta (captação de energia luminosa) destes pigmentos em algas vermelhas é controversa, mas sabe-se que carotenoides como β -caroteno e zeaxantina estão presentes nas antenas (Gantt, 1990; Tan *et al.*, 1997; Grabowski *et al.*, 2001).

Apesar da redução no conteúdo dos carotenoides nos últimos dias dos tratamentos, a relação entre estes compostos com clorofila *a* aumentou ao longo dos dias (Fig. 8), diferente da situação controle. Esses dados sugerem que a fotoaclimação de *Gracilariopsis tenuifrons* envolve um aumento na quantidade de carotenoides em relação à clorofila *a*, corroborando a ideia do papel fotoprotetor dos carotenoides.

Vários estudos têm demonstrado que há um aumento na concentração de carotenoides específicos com a intensidade de luz, indicando que algumas substâncias, como a violaxantina, são mais eficientes na absorção de luz e outras, como a zeaxantina, são mais importantes na fotoproteção (Frank *et al.*, 1994). Por isso, um próximo passo é verificar quais carotenoides estão presentes em *Gracilariopsis tenuifrons* e como essas substâncias variam com a intensidade da luz. Carnicas *et al.* (1999) verificaram em *Gracilaria tenuistipitata* que a concentração de zeaxantina tem um aumento significativo inicialmente com aumento da luz, seguido de queda ao longo dos dias.

Além do sugerido acima, pesquisas futuras também poderiam investigar quais estratégias de fotoaclimação adotadas por essa alga estariam envolvidas na descoloração dos ápices, como por exemplo, redução no número ou no tamanho de cloroplastos

e dos complexos antenas. Estes eventos já foram observados para *Porphyridium cruentum* por Waaland *et al.* (1974), Cunningham *et al.* (1989) e Mustardy *et al.* (1992).

1.5 Referências bibliográficas

- Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- Bernard, C.; Etienne, A.-L.; Thomas, J.-C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): compared effects of high light and translation inhibitors. *Journal of Phycology*, v. 32, n. 2, p. 265–271, 1996.
- Carnicas, E.; Jiménez, C.; Niell, F. X. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 50, v. 2-3, p. 149-158, 1999.
- Cunningham, F. X.; Dennenberg, R. J.; Mustardy, L.; Jursinic, P. A.; Gantt, E. Stoichiometry of Photosystem I, Photosystem II, and Phycobilisomes in the Red Alga *Porphyridium cruentum* as a Function of Growth Irradiance. *Plant physiology*, v. 91, n. 3, p. 1179-1187, 1989.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 43, n. 1, p. 599-626, 1992.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2149-2153, 2002.
- Edwards, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions in Marine Science*, v. 15, p. 1-228, 1970.
- Frank, H. A.; Cua, A.; Chynwat, V.; Young, A.; Gosztola, D.; Wasielewski M. R. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, v. 41, n. 3, p. 389-395, 1994.
- Gantt, E. Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K. M.; Sheath, R. G. (Eds.), *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 203-219.
- Grabowski, B.; Cunningham, F. X.; Gantt, E. Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 5, p. 2911-2916, 2001.
- Hanelt, D. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. In: F. L. Figueroa; C. Jiménez; J. L. Pérez-Lloréns; F. X. Niell (Eds.); *Underwater Light and Algal Photobiology*. Barcelona: Sci. Mar. 60 (Suppl.1), 1996. p. 243-248.

- Heldt, H.-W. Heldt F. *Plant biochemistry*. 3. ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. 656p.
- Hurry, V.; Anderson, J. M.; Chow, W. S.; Osmond, C. B. Accumulation of zeaxanthin in abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis* does not affect chlorophyll fluorescence quenching or sensitivity to photoinhibition in vivo. *Plant Physiology*, v. 113, n. 2, p. 639-648, 1997.
- Jones, W. E.; Williams, R. The seaweeds of dale. *Field studies*, v. 2, n. 3, p. 303-330, 1966.
- Kosovel, V.; Talarico, L. Seasonal variations of photosynthetic pigments in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss (Florideophyceae, Gigartinales). *Bolletino Della Società Adriatica Di Scienze*, v. 63, p. 5-15, 1979.
- Krieger-Liszkay, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 411, p. 337-346, 2005.
- Levy, I.; Gantt, E. Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis, and phycobilisomes. *J. Phycol.*, v. 24, n. 4, p. 452-458, 1988.
- Lignell, A.; Pedersén, M. Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Botanica Marina*, v. 32, n. 3, p. 219-228, 1989.
- Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.
- Mustardy, L. Photosynthetic membrane topography: quantitative in situ localization of photosystems I and II. *Plant Biology*, v. 89, n. 21, p. 10021-10025, 1992.
- Oliveira, E. C. The seaweed resources of Brazil. In: Critchley, A. T.; Ohno, M. (Eds). *Seaweed Resources of the World*. Yokosuka: Japan International Cooperation Agency, 1998. p. 366-371.
- Osmond, C. B. What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In: Baker, R.R.; Bowyer, J.R., (Eds.). *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific Publications, 1994. p. 1-24.
- Plastino, E. M.; Ursi, S.; Heimbecker, A. M. C. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: IV Congresso Latinoamericano de Ficologia, 1998, Caxambú. *Programa e Resumos*. Caxambú, p. 169, 1998.
- Powles, S. B. Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 35, n. 1, p. 15-44, 1984.

- Rissler, H. M.; Durnford, D. G. Isolation of a novel carotenoid-rich protein in *Cyano-phora paradoxa* that is immunologically related to the light-harvesting complexes of photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell Physiol.*, v. 46, n. 3, p. 416-424, 2005.
- Rossa, M. M. *A luz como fator de regulação da atividade enzimática de nitrato redutase (NR) e superóxido dismutase (SOD) em Gracilariopsis tenuifrons (Rhodophyta)*. 1999. 109f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rossa, M. M.; Oliveira, M. C.; Okamoto, O. K.; Lopes, P. F.; Colepicolo, P. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, v. 14, n. 3, p. 151-157, 2002.
- Ross, J.; Sulev, M. Sources of errors in measurements of PAR. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 100, n. 2-3, p. 103-125, 2000.
- Schubert, H.; Sagert, S.; Forster, R. M. Evaluation of the different levels of variability in the underwater light field of a shallow estuary. *Helgoland Marine Research*, v. 55, n. 1, p. 12-22, 2001.
- Tan, S.; Cunningham, F. X.; Gantt, E. *LhcaR1* of the red alga *Porphyridium cruentum* encodes a polypeptide of the LHCI complex with seven potential chlorophyll a-binding residues that are conserved in most LHCs. *Plant Molecular Biology*, v. 33, n. 1, p. 157-167, 1997.
- Talarico, L. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. In: F. L. Figueroa; C. Jiménez; J. L. Pérez-Lloréns; F. X. Niell (Eds.); *Underwater Light and Algal Photobiology*. Barcelona: Sci. Mar. 60 (Suppl.1), 1996. p.205-222.
- Talarico, L.; Maranzana, G. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2000.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 820p.
- Ridge, I. *Pants*. Oxford: Oxford University Press, 2002. 352p.
- Telfer, A.; Pascal, A.; Gall, A. Carotenoids in Photosynthesis. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.), *Carotenoids, Volume 4: Natural Functions*. Birkhäuser Verlag, 2008. p. 265-308.
- Torres, P. B.; Santos, D. Y. A. C.; Chow, F.; Furlan, C. M. Análise de clorofila *a* e carotenoides em *Gracilaria tenuistipitata*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, Ribeirão Preto. *Anais eletrônicos*. São Paulo: USP, 2009. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=1178&numeroEdicao=17>>. Acesso em: 07 fev. 2010.

- Urabe, J.; Sterner, R. W. Regulation of herbivore growth by the balance of light and nutrients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 16, p. 8465-8469, 1996.
- Waaland, J. R.; Waaland, S. D.; Bates, G. Chloroplast structure and pigment composition in the red alga *Griffithsia pacifica*: Regulation by light intensity. *Journal of Phycology*, v. 10, n. 2, p. 193-199, 1974.
- Wanderley, A. *Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta)*. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Wrona, M.; Rózanowska, M.; Sarna, T. Zeaxanthin in combination with ascorbic acid or alpha-tocopherol protects ARPE-19 cells against photosensitized peroxidation of lipids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, n. 9, p. 1094-1101, 2004.
- Yakovleva, I. M.; Titlyanov, E. A. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus* : stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquatic Botany*, v. 71, n. 1, p. 47-61, 2001.
- Yokoya, N. S. *Controle do crescimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: Gracilariopsis tenuifrons, Grateloupia dichotoma e Solieria filiformis*. 1996. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto of Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Capítulo II

Efeitos da intensidade de luz sobre a composição pigmentar em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta)

Resumo

O estresse de luz pode afetar consideravelmente a concentração dos pigmentos fotossintetizantes. Esta resposta pode indicar diferentes estratégias de fotoproteção. No presente trabalho, foram identificados os carotenoides e clorofila que compõem o extrato da macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons*. Em seguida, avaliamos o efeito do aumento da intensidade da luz sobre estes compostos. Os pigmentos majoritários no extrato foram clorofila *a*, β -caroteno e zeaxantina. Ao longo dos experimentos com alta intensidade de luz e no controle, não foram encontradas mudanças qualitativas na composição pigmentar. Por outro lado, β -caroteno teve um comportamento altamente correlacionado com o pigmento clorofila *a*, apresentando concentrações reduzidas com o aumento da intensidade de luz, sugerindo que talvez ambos os pigmentos possuam uma mesma função na fotossíntese. Já a concentração do carotenoide zeaxantina aumentou de forma dependente da intensidade de luz nos dias iniciais, sugerindo uma função de fotoproteção deste pigmento nesta alga.

Abstract

The high-light stress can affect the concentration of photosynthetic pigments. This response may indicate different strategies of photoprotection. In this study, the carotenoids and chlorophyll in extracts of the seaweed red *Gracilariopsis tenuifrons* were identified, and the effect of high-light stress over these compounds was determined. Zeaxanthin, β -carotene and chlorophyll *a* were the major pigments present in the extract. There were not qualitative changes in pigment composition in the experiments (control and treatment). Although, the β -carotene and chlorophyll *a* concentrations were inversely correlated with the intensity of light, the concentration of the carotenoid zeaxanthin was dependent on the intensity of light in the early days, indicating a function of this pigment in photoprotection this alga. The similar behavior of β -carotene and chlorophyll *a* at high-light stress experiments suggests the similar roles for both pigments in photosynthesis.

2.1 Introdução

No ambiente aquático, condições de alta luminosidade são comuns ao longo dos dias, estações dos anos, ciclo de mares e em mudanças repentinas no clima (Schubert, 2001). Dessa forma, como quaisquer outros organismos fotossintetizantes, algas vermelhas, durante seu ciclo de vida, podem ser expostas a intensidades de luz superiores à energia necessária para os processos fotoquímicos da fotossíntese causando uma condição de fotoestresse.

Nesta situação, os complexos antenas dos aparatos fotossintetizantes podem absorver energia em excesso, que pode conduzir a um aumento na produção de moléculas instáveis altamente danosas, conhecidas por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Müller *et al.*, 2001). Estas moléculas instáveis podem afetar o aparato fotossintetizante, principalmente, a proteína D1 do centro de reação do fotossistema II e, conseqüentemente, prejudicar a fotossíntese. Em casos mais extremos, os danos podem levar a célula ou até mesmo o organismo à morte (Osmond, 1994).

Dessa forma, o estresse por luz pode afetar consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento dos organismos fotossintetizantes (Taiz & Zeiger, 2009; Murchie & Niyogi, 2011). Neste contexto, organismos fotossintetizantes, como algas vermelhas têm desenvolvido mecanismos de defesa com objetivo de se fotoproteger dessas situações de excessos de luz.

Muitas destas respostas de fotoproteção regulam a coleta de luz visando um equilíbrio entre absorção e utilização de energia luminosa para minimizar os danos foto-oxidativos (Müller *et al.*, 2001). Assim, em condições de estresse de alta luminosidade, podem ser observadas variações qualitativas e/ou quantitativas na concentração dos pigmentos fotossintetizantes, que estão diretamente correlacionadas com as diferentes estratégias de fotoproteção, visto que diferentes pigmentos possuem funções distintas em diferentes regimes de luz.

Os pigmentos carotenoides e clorofila *a* estão presentes em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, incluindo algas vermelhas (Archibald & Keeling, 2002; Mimuro & Akimoto, 2003). A clorofila *a* está presente no centro de reação, como responsável pela conversão de energia solar em química, e nas antenas, como pigmento acessório. Este pigmento tem um papel fundamental na formação de EROs. Em altas intensidades de luz há um aumento da probabilidade de moléculas de clorofila *a* passarem para o estado tripleto (Müller *et al.*, 2001). Este estado pode reagir com o oxigênio

livre formando oxigênio singlete, uma das principais EROs que reage danificando severamente lipídios, proteínas e pigmentos (Krieger-Liszkay, 2005).

Estudos realizados principalmente em plantas terrestres e algas verdes têm mostrado que carotenoides são importantes como pigmentos acessórios (Scholes *et al.*, 2011). Em alta intensidade de luz, carotenoides específicos parecem estar envolvidos em diversos mecanismos de fotoproteção como desativação direta de EROs ou amortização da clorofila tripleto, evitando formação de oxigênio singlete (Dall'Osto *et al.*, 2007). Em algas vermelhas, porém, não se sabe a exata função destes compostos.

Sob essa perspectiva, pretendemos quantificar e identificar os carotenoides e clorofila *a* e em seguida avaliar os efeitos do aumento da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre estes pigmentos na macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Esta macroalga foi escolhida para este estudo por ser um modelo biológico estudado no Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM), por ser de fácil cultivo em laboratório, apresentar grande potencial econômico com ágar de boa qualidade e possuir altas taxas de crescimentos.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material e condições gerais do cultivo

Foram estabelecidos cultivos estoques unialgais de talos da fase gametofítica feminina (n) de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand a partir da cepa 39 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM) do Instituto de Biociências da USP.

O cultivo estoque foi mantido no mínimo por um mês em condições controladas: temperatura de 25 ± 1 °C, taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo de 60 ± 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro e aeração em períodos intermitentes de 30 min ligado e 30 min desligado. O meio de cultivo foi utilizado na proporção de 3 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar esterilizada (salinidade de 32), enriquecida com solução Von Stosch (50%) (Edwards, 1970). A troca do meio de cultivo e a limpeza dos talos foram realizadas uma vez por semana.

A água do mar utilizada nos cultivos foi proveniente do município de São Sebastião (São Paulo, Brasil). Sua esterilização foi feita por meio de dupla filtragem

(filtro de pressão CUNO, porosidade de 5 e 1 μm) e aquecimento em banho-maria a 90°C por 1 h. A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia, 40 W) cuja taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo foi determinada por sensor esférico (Li-Cor, modelo LI-1935B) conectado a medidor de quanta (Li-Cor, modelo LI-250). A aeração foi fornecida por compressor odontológico Schulz de diafragma, isento de óleo.

2.2.2 Delineamento experimental

A partir do cultivo estoque, ápices foram padronizados a 3 cm e transferidos para as condições experimentais por 7 dias. As condições foram semelhantes ao cultivo estoque, porém a proporção de cultivo foi alterada para 1 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar, visando evitar a limitação de nutriente durante o experimento e assim não prejudicar a interpretação de respostas relacionadas apenas à variação na intensidade de luz, como sugerido por Urabe & Sterner (1996).

Foram estruturados três tratamentos: um controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e dois tratamentos que tiveram a intensidade de luz aumentada para $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi estudado por separado devido ao volume de material e a logística laboratorial, sendo realizando três experimentos independentes. Para cada um destes conjuntos foram mantidos 21 frascos de cultivo. A cada dia, três destes frascos (réplicas) eram retirados das condições experimentais. Assim, cada coleta representa o Dia 0, o Dia 1, o Dia 2, etc., até completar uma semana de tratamento, Dia 7.

Após serem retirados das condições experimentais, os ápices foram cortados novamente para 3 cm para padronizar seu tamanho. Amostras de 50 mg foram pesadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. É importante ressaltar que no dia de montagem de cada experimento foram pesadas três réplicas de 50 mg de ápices de 3 cm do cultivo estoque para representar o Dia 0.

2.2.3 Extração de carotenoides e clorofila *a* e análise e quantificação por CLAE

Para extração de carotenoides e clorofila *a* e análise por CLAE foi seguido um protocolo otimizado em nosso laboratório por Torres *et al.* (2009). Em penumbra, amostras de 50 mg de biomassa fresca congelada foram trituradas em nitrogênio líquido até formar um pó fino. A este pó, adicionou-se 1,5 mL de metanol. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 14000 RPM por 5 minutos a 4 °C. Alíquotas foram imediatamente analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um cromatógrafo HP1200 com coluna C₃₀ de fase reversa Ultracarb ODS (5µm, 250 x 4,6 mm i.d.) e com cromatogramas processados em $\lambda = 450$ nm. A fase móvel empregada foi composta por um gradiente linear de éter metil-terc-butílico (MTBE) (A) em metanol (B) com a seguinte programação: 5% A (0 min), 70% A (30 min), 50% A (50 min). O fluxo da fase móvel foi constante a 0,9 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna ajustada a 29 °C (Faria *et al.*, 2009).

Os pigmentos foram quantificados em CLAE usando curvas de calibração externa feitas para clorofila *a* e para zeaxantina (carotenoide majoritário). As curvas foram construídas a partir de soluções padrões de concentrações conhecidas, preparadas a partir de protocolos modificados de Mantoura & Repeta (1997), Craft (2001) e Rodriguez-Amaya & Kimura (2004) e analisadas em CLAE nas mesmas condições das amostras. Estas quantidades foram relacionadas por regressão linear simples ($R^2 \geq 0,99$) com as respectivas áreas obtidas.

2.2.4 Identificação dos pigmentos fotossintetizantes

As identificações dos carotenoides e clorofila *a* foram realizadas no Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas (UNICAMP), em colaboração com a Profa Dra Adriana Zerlotti Mercadante e a doutoranda Fernanda Mandelli, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM) em um cromatógrafo da marca Shimadzu (modelo LC-20AD) e espectrômetro de massas com analisador *ion trap* e fonte de ionização APCI (ionização química a pressão atmosférica) (Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000, Bremen, Alemanha). Os espectros UV/visível foram obtidos entre 200 a 800 nm e os

cromatogramas processados em $\lambda = 450$ nm. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados de acordo com Rosso e Mercadante (2007): APCI no modo positivo, corrente corona a 4000 nA, temperatura da fonte de 450 °C, N₂ como gás secante a temperatura de 350 °C e fluxo de 5 mL.min⁻¹, nebulizador a 60 psi e energia de fragmentação MS/MS de 1,4 V. Os espectros de massas foram adquiridos com intervalo de m/z de 100 a 1000. A separação dos carotenoides foi realizada em coluna C₃₀ YMC (5 µm, 250 x 4.6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, Estados Unidos) com fase móvel igual a descrita anteriormente.

Para identificação dos pigmentos, os extratos foram obtidos de maneira semelhante à descrita anteriormente, utilizando-se a proporção de biomassa de 50 mg.mL⁻¹ de solvente. Após extração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador ($t < 40$ °C), o resíduo foi ressuspensionado em metanol:MTBE (1:1). Uma alíquota de 40 µL deste extrato foi injetada no cromatógrafo líquido.

Com objetivo de facilitar a identificação dos carotenoides, foi realizada uma saponificação que consistiu em evaporar o extrato anterior e ressuspender em éter de petróleo. Em seguida, adicionou-se uma solução de KOH (10%) em metanol (1:1 v/v). A mistura bifásica resultante, protegida da luz, ficou em uma mesa agitadora a 84 RPM por 16 h em temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada uma partição em éter de petróleo:éter etílico (1:2 v/v), o álcali foi removido através da lavagem com água e o solvente evaporado em rotaevaporador ($t < 40$ °C). Em seguida, o resíduo foi ressuspensionado em metanol:MTBE (1:1) e injetado novamente em CLAE-EM/EM.

A identificação dos pigmentos foi posteriormente confirmada através da comparação dos tempos de retenção com padrões autênticos (clorofila *a* adquirida da Sigma-Aldrich e carotenoides adquiridos da CaroteNature).

2.2.5 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias diárias de cada variável analisada nos diferentes tratamentos. A partir da detecção da diferença, foi empregado o teste *a posteriori* de Tukey para identificar quais dias tiveram comportamentos distintos em cada variável. A correlação de Pearson foi utilizada entre as concentrações dos pigmentos ao longo dos dias nos diferentes tratamentos com luz.

A fim de uma compreensão global do padrão dos pigmentos nos diferentes experimentos, as concentrações dos pigmentos ao longo dos dias nos diferentes tratamentos com luz foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico por ligação simples (*single linkage*) com medida de distâncias por correlação de Pearson (1-r).

Todas as análises tiveram α fixado a 5% e foram realizadas no software Minitab® 16.1.0 exceto as análises multivariadas que foram realizadas no software STATISTICA 10. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.3 Resultados

2.3.1 Identificação dos pigmentos

Os carotenoides foram identificados em CLAE-EM/EM de acordo com o tempo de retenção na coluna C₃₀, com as características dos espectros UV/visível ($\lambda_{\max}$, estrutura fina, intensidade do pico *cis*) e de massas e através de comparação com dados da literatura (Rosso e Mercadante, 2007; Faria *et al.*, 2009). Os parâmetros para identificação são apresentados na Tabela 1 e a confirmação destes compostos foi realizada através da comparação com os respectivos padrões.

Dentre os pigmentos analisados foram identificados os carotenos β -caroteno (all-*trans*- β -caroteno) e seus isômeros 9-*cis* e 13-*cis*- β -caroteno, as xantofilas β -criptoxantina (all-*trans*- β -criptoxantina), zeaxantina (all-*trans*-zeaxantina) e seus isômeros 13-*cis* e 15-*cis*-zeaxantina e, como esperado para algas vermelhas, clorofila *a* (Fig. 1A).

Os picos 1, 6, 7 e 9 (Fig. 1A) não foram identificados. No perfil cromatográfico do extrato saponificado, os picos 7 e 9 (Fig. 1B) foram detectados, indicando que possivelmente esses dois picos não correspondem a ésteres de carotenoides. Por outro lado, a não detecção dos picos 1 e 6 (Fig. 1B) associado a presença de bandas de absorção similares a uma clorofila (Tabela 2) sugerem que possivelmente esses dois picos correspondam a derivados de clorofilas.

Figura 1. Cromatogramas obtidos do extrato não saponificado (A) e saponificado (B) de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em CLAE-EM/EM. Os números acima dos picos correspondem aos identificados na tabela 1. As imagens não são comparáveis em termos quantitativos.

Tabela 1: Características dos carotenoides em CLAE-EM/EM produzidos por *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand.

Pico	t _R (min)	carotenoide	$\lambda_{\max}$ (nm) ^a				% III/II ^b	% A _B /A _{II} ^c	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos de íons MS/MS (m/z)
1	10,7	não identifica- do	342	428	618- 619	663	n.d.	n.d.	647	não detectado
2	11,8	15- <i>cis</i> - zeaxantina	337	420	448	473	50	61	569	551 [M+H - 18] ⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺
3	12,6- 12,7	13- <i>cis</i> - zeaxantina	338	420	443	472	21	43	569	551 [M+H- 18] ⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺
4	14,3- 14,4	all- <i>trans</i> - zeaxantina		425	450	477	33	0	569	551 [M+H- 18] ⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺
5	16,4	clorofila <i>a</i>	338	432	620	665	n.d. ^d	n.d.	893	615 [M+H - 278] ⁺
6	18,1- 18,2	não identifica- do	338	431	620	663	n.d.	n.d.	647	não detectado
7	19,6	não identifica- do		420	442	472	72	0	551	não detectado
8	23,0	all- <i>trans</i> - β - criptoxantina		421	451	477	40	0	553	535 [M+H - 18] ⁺
9	25,9	não identifica- do		420	447	472	63	0	551	não detectado
10	27,5	13- <i>cis</i> - β - caroteno	338	420	445	471	29	32	537	481 [M+H - 56] ⁺ , 444 [M+H-92] ⁺
11	34,0	all- <i>trans</i> - β - caroteno		422	451	478	30	0	537	481 [M+H - 56] ⁺ , 444 [M+H-92] ⁺
12	36,1	9- <i>cis</i> - β - caroteno	338	420	447	472	60	n.c. ^e	537	481 [M+H - 56] ⁺ , 444 [M+H-92] ⁺

^a comprimentos de onda de absorção máxima; ^b grau de estrutura fina (%III/II); ^c intensidade do pico cis (% A_B/A_{II}); ^d não determinado (n.d.); ^e não calculado (n.c.)

2.3.2 Efeitos da intensidade de luz sobre a composição pigmentar

Neste estudo, foi dada ênfase aos pigmentos majoritários no extrato: clorofila *a*, β -caroteno e zeaxantina. As demais substâncias identificadas foram muito variáveis entre as réplicas, apresentando-se sempre em baixas concentrações (inferior a 1% da área total) ou ausentes. Dentre os carotenoides, a zeaxantina foi o componente majoritário em todos os tratamentos.

Ao longo dos três experimentos com diferentes intensidades de luz, não foram encontradas mudanças qualitativas na composição pigmentar. No entanto, mudanças quantitativas em respostas ao aumento da intensidade de luz foram significativas. A fim de dosar estes pigmentos, curvas de calibração foram construídas (Fig. 2), utilizando-se zeaxantina e clorofila *a* como substâncias de referência.

Figura 2. Curvas de calibração de zeaxantina (A) e de clorofila *a* (B) para doseamento em CLAE (regressão linear simples, $R^2 \geq 0,99$).

As concentrações da clorofila *a*, da zeaxantina e do β -caroteno no tratamento controle permaneceram constantes ao longo dos sete dias de experimento, com médias de $495,4 \pm 27,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ para clorofila *a* (Fig. 3A), $77,1 \pm 3,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ para zeaxantina (Fig. 4A) e $52,5 \pm 3,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o β -caroteno (Fig. 5A). A concentração de zeaxantina foi 1,5 vezes maior do que a concentração do β -caroteno, já a quantidade de clorofila *a* foi, aproximadamente, 3,8 vezes maior do que a concentração de carotenoides totais (zeaxantina + β -caroteno).

A concentração de clorofila *a* no tratamento $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ permaneceu constante até o Dia 3. A partir daí, apresentou quedas significativas, chegando a uma concentração cerca de 35% menor no Dia 7, quando comparado ao início da exposição (Dia

0) (Fig. 3B). Já no tratamento $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve uma queda linear ($R^2 = 0,998$, regressão linear simples) significativa ao longo dos dias, atingindo uma queda de mais de 50% no Dia 7 em relação ao Dia 0 (Fig. 3C). Dessa forma, verifica-se que as quedas na concentração de clorofila *a* foram maiores com o aumento da intensidade de luz.

Com relação à concentração de zeaxantina, no tratamento $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve um aumento significativo de cerca de 18% entre o Dia 0 ($68,9 \pm 2,1 \mu\text{g.g}^{-1}$) e o Dia 2 ($82,1 \pm 3,7 \mu\text{g.g}^{-1}$), permanecendo constante até o Dia 4. A partir do Dia 5 a concentração de zeaxantina começou a cair, atingindo no Dia 7 valor similar ao do Dia 0 (Fig. 4B). No início do tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração de zeaxantina apresentou o mesmo padrão observado em $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com um aumento significativo de cerca de 18% do Dia 0 ($76,6 \pm 2,0 \mu\text{g.g}^{-1}$) até o Dia 2 ($90,4 \pm 3,6 \mu\text{g.g}^{-1}$). Porém, a queda na concentração deste carotenoide foi mais acentuada no experimento com maior intensidade de luz, caindo a partir do Dia 3 e atingindo seu menor valor no Dia 7, 9% menor que o observado no Dia 0 (Fig. 4C).

No tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração de β -caroteno apresentou quedas significativas a partir do Dia 2, atingindo a maior queda, de cerca de 42,9%, no Dia 7 em relação ao Dia 0 (Fig. 5B). Já em $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve uma queda linear ($R^2 = 0,989$, regressão linear simples), significativa, ao longo dos dias atingindo uma redução de mais de 55% no Dia 7 em relação ao Dia 0 (Fig. 5C). Portanto, com o aumento na intensidade de luz há uma diminuição acentuada na concentração de β -caroteno ao longo de sete dias de exposição.

Figura 3. Variação das concentrações de clorofila *a* (µg.g⁻¹) (médias ± desvio padrão, n=3) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 µmol.m⁻².s⁻¹ (A), 600 µmol.m⁻².s⁻¹ (B) e 1000 µmol.m⁻².s⁻¹ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 4. Variação das concentrações de zeaxantina ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 5. Variação das concentrações de β -caroteno ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

2.3.3 Relação entre os teores diários dos pigmentos fotossintetizantes nos diferentes tratamentos

Nos últimos dias de experimentos de alta intensidade de luz, a concentração de zeaxantina apresentou quedas significativas, mas a relação deste composto com β -caroteno sempre aumentou ao longo dos dias (Fig. 6). No tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve um aumento dessa relação de 74%, aumentando de 1,5 (Dia 0) para 2,66 (Dia 7). Em $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve um aumento de 114%, passando de 1,5 (Dia 0) para 3,2 (Dia 7). Já no tratamento controle, a relação permaneceu constante com médias de 1,5.

O comportamento da relação zeaxantina com clorofila *a* foi semelhante ao comportamento da relação zeaxantina com β -caroteno. No tratamento controle foi constante, já nos tratamentos com alta intensidade de luz sempre aumentou ao longo dos dias (Fig. 6). No tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve um aumento de 57%, passando de 0,16 (Dia 0) para 0,25 (Dia 7), enquanto que em $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, houve um aumento de 87%, passando de 0,16 (Dia 0) para 0,30. No controle, esta relação teve médias de 0,16.

Já a relação β -caroteno com clorofila *a* foi constante para o tratamento controle, com médias de 0,10, porém nos tratamentos com maior intensidade de luz houve uma tendência à queda (Fig. 6). Em relação ao Dia 0, o Dia 7 teve no tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ uma queda de 9% e em $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ uma queda de 8%.

Estes resultados indicam que a concentração de zeaxantina está caindo em uma velocidade menor do que as concentrações do β -caroteno e da clorofila *a* ao longo dos dias.

Figura 6. Efeito de diferentes intensidades de luz (60, 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sobre a relação da concentração de zeaxantina por β -caroteno (gráficos superiores), zeaxantina por clorofila a (gráficos intermediários) e β -caroteno por clorofila a (gráficos inferiores) (médias $\pm$ desvio padrão) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand ao longo dos dias. Letras diferentes em uma mesma curva representam que diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

2.3.4 Análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico

Para compreensão global do comportamento dos pigmentos ao longo dos dias nos diferentes tratamentos de luz foi realizado uma análise de componentes principais (PCA) (Fig. 7A) e análise de agrupamento hierárquico (Fig. 7B). Os parâmetros consistiram das médias diárias das concentrações de cada pigmento nos diferentes tratamentos.

Na PCA, os dois componentes principais explicam 75,3% da variância total dos dados. Foi verificado um grupo distinto formado pelos pigmentos do tratamento controle (grupo 1) e dois grupos mais próximos em um mesmo quadrante (grupo 2 e 3) formado pelos pigmentos dos tratamentos com alta intensidade de luz, mostrando o efeito do

aumento da intensidade de luz sobre os pigmentos. O grupo 2 associou zeaxantina, mostrando que o comportamento deste pigmento foi similar em ambos os tratamentos com alta intensidade de luz. Como pode ser verificado anteriormente na Figura 4B e 4C; o grupo 3 associou clorofila *a* e o β -caroteno de ambos os tratamentos de alta intensidade de luz.

A análise de agrupamento hierárquico foi visualizada no dendrograma agrupado por ligação simples (*single linkage*) com medida de distâncias por correlação de Pearson (1-r). O resultado foi bastante congruente com os grupos definidos na PCA, ou seja, há uma clara separação, com base na quantidade de pigmentos fotossintetizantes, das amostras de algas cultivadas na condição controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) daquelas submetidas à estresse luminoso ($600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). No entanto, a análise por agrupamento hierárquico permitiu uma melhor visualização dos agrupamentos entre os pigmentos clorofila *a* e β -caroteno, indicando que estes pigmentos tiveram comportamentos similares (Fig. 7B), como pode ser verificado ao comparar o resultado das figuras 3 e 5 e a relação entre eles na Figura 6. Os grupos formados reforçam a alta correlação entre clorofila *a* com β -caroteno independentemente do tratamento com $r \geq 0,95$ (Tabela 2). O mesmo não acontece com a zeaxantina. Nas amostras de algas submetidas à alta intensidade de luz, o padrão de resposta com relação a esse pigmento foi bem diferente daqueles observados para clorofila *a* e β -caroteno. Apesar das respostas semelhantes desse pigmento nos estudos com alta intensidade luminosa, ou seja, um aumento inicial na concentração seguido de queda, o valor de $r = 0,63$ (Tabela 2) evidencia que a magnitude da resposta é dependente da intensidade de luz.

Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) (A) e dendrograma do agrupamento hierárquico (B) realizados sobre a composição das diferentes concentrações dos pigmentos ao longo dos dias (0-7) em relação aos diferentes tratamentos com luz. Siglas dos pigmentos: zea = zeaxantina, bc = β -caroteno e chl = clorofila *a*. Os números associados a cada pigmento se referem a intensidade de luz: 60, 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e os números de 1-3 se referem aos grupos formados.

Tabela 2: Parâmetros obtidos em teste de correlação de Pearson entre as concentrações dos diferentes pigmentos analisados (clorofila *a*, β -caroteno e zeaxantina) ao longo dos dias (0-7) nos diferentes tratamentos com luz.

	zea 60	bc 60	chl 60	zea 600	bc 600	chl 600	zea 1000	bc 1000	chl 1000
zea 60	1,00								
bc 60	0,81	1,00							
chl 60	0,83	0,95	1,00						
zea 600	0,11	0,05	0,15	1,00					
bc 600	-0,32	-0,45	-0,30	0,26	1,00				
chl 600	-0,26	-0,40	-0,24	0,36	0,96	1,00			
zea 1000	-0,03	-0,13	0,03	0,62	0,44	0,46	1,00		
bc 1000	-0,35	-0,48	-0,36	-0,05	0,87	0,82	0,42	1,00	
chl 1000	-0,28	-0,44	-0,32	-0,05	0,85	0,81	0,44	0,99	1,00

zea = zeaxantina, bc = β -caroteno e chl = clorofila *a*. Os números associados a cada pigmento se referem a intensidade de luz: 60, 600 e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

2.4 Discussão

Neste trabalho foram encontrados apenas carotenoides derivados a partir da via do β -caroteno em *Gracilariopsis tenuifrons*. No entanto, não foram detectados os carotenoides anteraxantina e violaxantina, componentes do ciclo das xantofilas típico de plantas terrestres (Fig. 8) (Demmig-Adams & Adams, 1996).

O carotenoide zeaxantina foi encontrado como carotenoide principal no tratamento controle e nos tratamentos com alta intensidade de luz, diferente do que é relatado para folhas de plantas terrestres e para a maioria das algas vermelhas, que possuem luteína como carotenoide majoritário (Fig. 8) (Young, 1993; Marquardt & Hanelt, 2004; Schubert *et al.*, 2006).

Outros trabalhos com diferentes espécies do gênero *Gracilariopsis* também encontraram zeaxantina como carotenoide majoritário. Porém, diferente do observado para *Gracilariopsis tenuifrons*, em *Gracilariopsis lemaneiformis* também foram detectados a violaxantina e anteraxantina (Schubert *et al.*, 2006) e, para outras duas espécies, com-

ponentes da via do α -caroteno estiveram presentes (Andersson *et al.*, 2006). Assim, mesmo em nível de gênero, já há uma grande diversidade de carotenoides nestes organismos, diferente do observado para folhas de plantas terrestres que apresentam uma composição de carotenoide altamente conservada entre as diferentes espécies (Young, 1993, Britton, 2008).

Sabe-se que os carotenoides têm distintas funções nas respostas de fotoproteção (Britton, 2008). Dessa forma, essa diversidade de pigmentos observada para algas vermelhas pode indicar diferenças comportamentais em respostas à alta intensidade de luz entre diferentes espécies com distinta composição pigmentar.

Figura 8. Biossíntese simplificada dos carotenoides. Em destaque, os carotenoides identificados em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand.

Nas respostas à luz aqui estudadas, em *Gracilariopsis tenuifrons* houve variações nas concentrações dos pigmentos, porém não houve mudanças qualitativas. Os pigmentos clorofila *a* e β -caroteno tiveram as concentrações diminuídas e inversamente dependentes da intensidade de luz. As respostas destes pigmentos à luz foram altamente correlacionadas ($r \geq 0,95$) (Fig. 7B) (Tabela 2), indicando que estes compostos foram afetados de forma semelhante pelo aumento da intensidade de luz e sugerindo que talvez possuam funções semelhantes na fotossíntese. Como houve a redução na concentração desses pigmentos, é possível sugerir que a manutenção das suas funções nesse processo quando essa espécie de alga é submetida à alta intensidade luminosa poderia prejudicar a fotossíntese.

Estes pigmentos são conhecidos em plantas terrestres e em algas verdes por desempenharem uma função de coleta de luz nas antenas (Ritz *et al.*, 2000). Para algas vermelhas, há fortes indícios que o β -Caroteno desempenhe o mesmo papel (Gantt, 1990). Assim, em situação de alta intensidade de luz, a redução na concentração destes pigmentos localizados nas antenas reduziria a absorção de energia e aliviaria a alta excitação sobre o sistema fotossintetizante como um todo. Reduções na área de tilacoides, no número de fotossistemas ou no tamanho das antenas seriam diferentes estratégias de fotoproteção que afetariam ambos os pigmentos de forma semelhante. Estas estratégias já foram descritas anteriormente para a microalga vermelha *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Nägeli (Cunningham *et al.*, 1989).

O comportamento do carotenoide zeaxantina foi diferente do comportamento da clorofila *a* e do β -caroteno, pois, nos tratamentos com alta intensidade luminosa houve um aumento nas concentrações nos dias iniciais, seguido de queda nos últimos dias (Fig. 3, 4 e 5). Apesar desta tendência a queda, a relação deste pigmento com a clorofila *a* e com o β -caroteno sempre aumentou ao longo do experimento (Fig. 6), indicando que na aclimação, houve uma maior síntese de zeaxantina em relação aos outros pigmentos. Sob esta perspectiva, há indícios que zeaxantina tenha um importante papel na fotoproteção desta alga.

Na literatura, diversos trabalhos têm avaliado a função fotoprotetora da zeaxantina, indicando que este pigmento é eficiente na extinção de clorofila tripleto, oxigênio singlete e outros EROs (Havaux & Niyogi, 1999; Betterle *et al.*, 2010; Dall'Osto *et al.*, 2010). Muitos trabalhos também indicam que a capacidade antioxidante da zeaxantina é maior do que de outras xantofilas (Havaux *et al.*, 2007). Schubert & García-Mendoza (2008), estudando diferentes algas vermelhas com distinta

composição de carotenoides, verificaram que as espécies com maior conteúdo de zeaxantina têm menor sensibilidade à luz. Outros trabalhos em algas vermelhas, como em *Gracilaria tenuistipitata* por Carnicas *et al.* (1999) e em *Corallina elongata* J. Ellis & Solander por Esteban *et al.* (2009) também observaram um aumento de zeaxantina com o aumento da luz em experimentos de longa duração. Além disso, em plantas terrestres e algas verdes, experimentos com mutantes acumulando zeaxantina demonstraram que este pigmento é um eficiente antioxidante e está relacionado à proteção das membranas lipoproteicas contra peroxidação (Havaux *et al.*, 2007).

Para plantas terrestres e algas verdes, o papel fotoprotetor da zeaxantina está relacionado, principalmente, à presença dessa substância nas antenas externas do fotossistema II e, especificamente, ao ciclo das xantofilas, como pode ser visto em trabalhos publicados por Niyogi *et al.* (1998), Holt *et al.* (2004), Dall'Osto *et al.* (2005), entre outros. No entanto, sabe-se que as antenas externas de algas vermelhas são bem diferentes, pois são constituídas de um complexo proteína-pigmento extrínseco às membranas dos tilacoides, que são conhecidos por ficobilissomos, ou seja, não possuem zeaxantina (Grossman *et al.*, 1993). Essa diferença é a razão da incerteza quanto à presença funcional de um ciclo das xantofilas típico em algas vermelhas, ou da função destes pigmentos na dissipação térmica imediata, por exemplo.

Estudos de Tan *et al.* (1997) e Grabowski *et al.* (2001) em algas vermelhas indicaram que a zeaxantina está presente nas antenas do fotossistema I. Assim, se a queda na concentração de clorofila *a* e β -caroteno em altas intensidades de luz estiver relacionada com redução nas antenas ou no número de fotossistemas, como sugerido anteriormente, seria possível afirmar que a zeaxantina associada às antenas também apresentaria o comportamento parecido com aqueles pigmentos com o aumento da intensidade luminosa, o que não foi observado, principalmente, nos dias iniciais.

Por outro lado, trabalhos realizados em plantas terrestres têm indicado que a zeaxantina também pode ser encontrada livre nos tilacoides (Havaux *et al.*, 2007; Jahns *et al.*, 2009; Dall'Osto *et al.*, 2010), da mesma forma que nas membranas plasmáticas de cianobactérias que acumulam zeaxantina quando mantidas em alta intensidade de luz (Masamoto *et al.*, 1999). Dessa forma, seria plausível propor que há duas localizações possíveis para zeaxantina, enquanto nas antenas haveria redução, fora das antenas poderia haver um aumento na concentração, assim a competição entre essas duas localizações poderia explicar o comportamento de aumento nos dias iniciais e redução nos dias finais.

2.5 Conclusão

Com o aumento da intensidade de luz, zeaxantina mostrou ter uma função antioxidante, já clorofila *a* e β -caroteno mostraram que possivelmente exercem uma função prejudicial, tendo suas concentrações reduzidas. Propomos que zeaxantina tem uma dupla localização, da mesma forma que em cianobactérias e em plantas terrestres e que, clorofila *a* e β -caroteno provavelmente tem uma função de coleta na fotossíntese. Porém, é importante ressaltar que mais estudos são necessários pra confirmar tais hipóteses para algas vermelhas.

2.6 Referências bibliográficas

- Andersson, M.; Schubert, H.; Pedersén, M.; Snoeijs, P. Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology*, v. 149, n. 3, p. 653-665, 2006.
- Archibald, J. M.; Keeling, P. J. Recycled plastids: a “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics*, v. 18, n. 11, p. 577-584, 2002.
- Betterle, N.; Ballottari, M.; Hienerwadel, R.; Dall’Osto, L.; Bassi, R. Dynamics of zeaxanthin binding to the photosystem II monomeric antenna protein *Lhcb6* (CP24) and modulation of its photoprotection properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 504, n. 1, p. 67-77, 2010.
- Britton, G. Functions of intact carotenoids. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds). *Carotenoids, Volume 4: Natural Functions*. Birkhäuser Verlag, 2008. p. 189-212.
- Carnicas, E.; Jiménez, C.; Niell, F. X. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, v. 50, v. 2-3, p. 149-158, 1999.
- Craft, N. E. Chromatographic techniques for carotenoid separation. In: R. E. Wrolstad (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F2.3.1-F2.3.15.
- Cunningham, F. X.; Dennenberg, R. J.; Mustardy, L.; Jursinic, P. A; Gantt, E. Stoichiometry of Photosystem I, Photosystem II, and Phycobilisomes in the Red Alga *Porphyridium cruentum* as a Function of Growth Irradiance. *Plant Physiology*, v. 91, n. 3, p. 1179-1187, 1989.
- Dall’Osto, L.; Caffarri, S.; Bassi, R. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell*, v. 17, n. 4, p. 1217-1232, 2005.

- Dall'Osto, L.; Fiore, A.; Cazzaniga, S.; Giuliano, G.; Bassi, R. Different roles of alpha- and beta-branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 48, p. 35056-35068, 2007.
- Dall'Osto, L.; Cazzaniga, S.; Havaux, M.; Bassi, R. Enhanced photoprotection by protein-bound vs free xanthophyll pools: a comparative analysis of chlorophyll *b* and xanthophyll biosynthesis mutants. *Molecular Plant*, v. 3, n. 3, p. 576-593, 2010.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W. W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, v. 1, n. 1, p. 21-26, 1996.
- Edwards, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions in Marine Science*, v. 15, p. 1-228, 1970.
- Esteban, R.; Martínez, B.; Fernández-Marín, B.; Becerril, J. M.; García-Plazaola, J. I. Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *European Journal of Phycology*, v. 44, n. 2, p. 221-230, 2009.
- Faria, A. F. De; Hasegawa, P. N.; Chagas, E. A.; Pio, R.; Purgatto, E.; Mercadante, A. Z. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, n. 3, p. 196-203, 2009.
- Gantt, E. Pigmentation and photoacclimation. In: Cole, K. M.; Sheath, R. G. (Eds.), *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 203-219.
- Grabowski, B.; Cunningham, F. X.; Gantt, E. Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 5, p. 2911-2916, 2001.
- Grossman, A. R.; Schaeffer, M. R.; Chiang, G. G.; Collier, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.*, v. 57, n. 3, p. 725-749, 1993.
- Havaux, M.; Niyogi, K. K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 15, p. 8762-8767, 1999.
- Havaux, M.; Dall'osto, L.; Bassi, R. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiology*, v. 145, n. 4, p. 1506-1520, 2007.
- Holt, N. E.; Fleming, G. R.; Niyogi, K. K. Toward an Understanding of the Mechanism of Nonphotochemical Quenching in green plants. *Biochemistry*, v. 43, n. 26, p. 8281-8289, 2004.
- Jahns, P.; Latowski, D.; Strzalka, K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1787, n. 1, p. 3-14, 2009.

- Krieger-Liszkay, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 411, p. 337-346, 2005.
- Mantoura, R. F. C.; Repeta, D.J. Calibration methods for HPLC. In: Jeffrey, S. W.; Mantoura, R. F. C.; Wright, S. W. (Eds.). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris: UNESCO, 1997. p. 407-428.
- Masamoto, K.; Zsiros, O.; Gombos, Z. Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the *Cyanobacterium Synechococcus* sp. strain pcc7942 grown under high light condition. *Journal of Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 136-138, 1999.
- Marquardt, J.; Hanelt, D. Carotenoid composition of *Delesseria lancifolia* and other marine red algae from polar and temperate habitats. *European Journal of Phycology*, v. 39, n. 3, p. 285-292, 2004.
- Mimuro, M.; Akimoto, S. Energy transfer processes from fucoxanthin and peridinin to chlorophyll. In: Larkum, A. W. D.; Douglas, S.; Raven, J. A. (Eds.). *Photosynthesis in Algae*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 335-349.
- Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.
- Murchie, E. H.; Niyogi, K. K. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. *Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 86-92, 2011.
- Niyogi, K. K.; Grossman, A. R.; Björkman, O. *Arabidopsis* Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion. *The Plant Cell*, v. 10, n. 7, p. 1121-1134, 1998.
- Osmond, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In: Baker, R.R.; Bowyer, J.R., (Eds.). *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific Publications, 1994. p. 1-24.
- Rodriguez-Amaya, D. B.; Kimura, M. *Harvest plus handbook for carotenoid analysis*. Washington DC: International Food Policy Research Institute, 2004. 58p.
- Rosso, V. DE; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of agricultural and food*, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.
- Ritz, T.; Damjanović, A.; Schulten, K.; Zhang, J. Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynthesis Research*, v. 66, n. 1-2, p. 125-144, 2000.
- Schubert, N.; García-Mendoza, E. Photoinhibition in red algal species with different carotenoid profiles. *Journal of Phycology*, v. 44, n. 6, p. 1437-1446, 2008.
- Schubert, N.; García-Mendoza, E.; Pacheco-Ruiz, I. Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology*, v. 42, n. 6, p. 1208-1216, 2006.

- Schubert, H.; Sagert, S.; Forster, R. M. Evaluation of the different levels of variability in the underwater light field of a shallow estuary. *Helgoland Marine Research*, v. 55, n. 1, p. 12-22, 2001.
- Scholes, G. D.; Fleming, G. R.; Olaya-castro, A.; Grondelle, R. Van; Grondelle, R. V. Lessons from nature about solar light harvesting. *Nature Chemistry*, v. 3, n. 10, p. 763-774, 2011.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 820p.
- Tan, S.; Cunningham, F. X.; Gantt, E. *LhcaR1* of the red alga *Porphyridium cruentum* encodes a polypeptide of the LHCI complex with seven potential chlorophyll a-binding residues that are conserved in most LHCs. *Plant Molecular Biology*, v. 33, n. 1, p. 157-167, 1997.
- Torres, P. B.; Santos, D. Y. A. C.; Chow, F.; Furlan, C. M. Análise de clorofila *a* e carotenoides em *Gracilaria tenuistipitata*. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, Ribeirão Preto. *Anais eletrônicos*. São Paulo: USP, 2009. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=1178&numeroEdicao=17>>. Acesso em: 07 fev. 2010.
- Urabe, J.; Sterner, R. W. Regulation of herbivore growth by the balance of light and nutrients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 16, p. 8465-8469, 1996.
- Young, A. J. Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. In: Young, A. J. and Britton, G. (Eds) *Carotenoids in Photosynthesis*. London: Chapman & Hall, 2003. p. 16–71.

Capítulo III

Metodologia de análise e extração de compostos fenólicos para avaliar efeitos da intensidade de luz em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira)

Fredericq & Hommersand (Gracilariales, Rhodophyta)

Resumo

A atividade antioxidante é correlacionada positivamente com a intensidade luminosa. Compostos fenólicos são algumas das substâncias que apresentam alta atividade antioxidante. Neste estudo, foram otimizados protocolos para análise e extração de compostos fenólicos na macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento intensidade de luz sobre estes compostos. Foi verificado um aumento no teor de fenóis totais com o aumento das altas intensidades luminosas. No entanto, não foi possível afirmar se esse aumento foi realmente devido à síntese de compostos fenólicos, já que o ensaio de Folin-Ciocalteu não é específico para detecção desses compostos e sim mede a capacidade redutora do extrato. Por outro lado, as análises em CLAE revelaram que somente uma substância, no caso, um derivado da micosporina palitinol, apresentou uma resposta bem evidenciada com o aumento da intensidade de luz e esta resposta foi altamente correlacionada com os resultados no ensaio no Folin-Ciocalteu sugerindo que esta substância é um antioxidante que pode contribuir com a resposta deste ensaio.

Abstract

Antioxidant activity presents a strong positive correlation with light intensity. Phenolic compounds are one of the substances which has high antioxidant activity. In this study, a protocol for extraction and analysis of phenolic compounds in red seaweed *Gracilariopsis tenuifrons* was optimized. The optimized protocol was used to evaluate the effects of high light stress on total phenolic amounts and composition. Although the concentration of the total phenols based on Folin-Ciocalteu assay was dependent on the intensity of light, the results were not conclusive regarding the increase of the synthesis of phenolic compounds. Since the Folin-Ciocalteu assay is not a specific method for quantification of phenolics, but actually measures the reducing capacity of a sample, the positive correlation of Folin-Ciocalteu results may not unveil real increase in phenolic compounds amounts. Moreover, the HPLC analysis showed that only one derivative of the mycosporine palythanol presented a positive correlation to increase in light intensity. Since the response of this mycosporine was highly correlated with the results in Folin-Ciocalteu assay, we suggest that this substance could be an antioxidant that may contribute to explain the response shown in this assay.

3.1 Introdução

Durante seu ciclo de vida, organismos fotossintetizantes podem ser expostos a intensidades de luz fotossinteticamente ativa (PAR, do inglês *Photosynthetic Active Radiation*) superior à energia necessária para os processos fotoquímicos da fotossíntese. Nesta situação, pode haver um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Se o aumento destas moléculas altamente reativas exceder a capacidade de defesa antioxidativa do organismo, macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA serão destruídos, podendo levar a célula ou até o mesmo o organismo à morte (Asada & Takahashi, 1987). Organismos fotossintetizantes têm desenvolvido estratégias antioxidantes capazes de inibir e/ou desativar estas EROs, havendo uma alta correlação positiva entre intensidade luminosa e estes antioxidantes, entre eles compostos fenólicos (Mittler, 2002; Grace, 2005).

Os compostos fenólicos são metabólitos que apresentam pelo menos um anel aromático ligado a uma hidroxila funcional (Strack, 1997). São sintetizados por diferentes vias, porém as vias mais importantes para plantas terrestres e, consequentemente, as mais amplamente estudadas, são a do ácido chiquímico e a do acetato malonato. Ácidos fenólicos são exemplos de compostos derivados do ácido chiquímico, já flavonoides são exemplos de compostos de biossíntese mista com contribuição das duas vias citadas acima (Taiz & Zeiger, 2009).

Tem sido proposto que a propriedade antioxidante dos compostos fenólicos é mediada por vários mecanismos, como a capacidade de suprimir a formação de EROs via a propriedade quelante de metais, ou pela capacidade de estabilizar EROs via grupos hidroxilas propensos a doar hidrogênio ou elétrons (Dai & Mumper, 2010). Muitos compostos fenólicos, como ácido *p*-cumárico e rutina, possuem uma capacidade antioxidante maior do que carotenoides e vitaminas C e E, que são antioxidantes amplamente conhecidos (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Na literatura, compostos fenólicos típicos de plantas terrestres também são relatados em algas vermelhas. Novoa *et al.* (2001) estudando a macroalga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe encontraram ácidos fenólicos (ácido transcinâmico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) e Onofrejová *et al.* (2010) estudando a macroalga vermelha *Porphyra tenera* (nori) encontraram hidroxibenzaldeídos (*p*-hidroxibenzaldeído, 3,4-dihidro-xibenzaldeído e vanilina) e ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido salicílico, entre outros). Além destes compostos

polifenólicos típicos de plantas terrestres, algas vermelhas apresentam fenólicos únicos, principalmente halogenados (Maschek & Baker, 2008; Blunt *et al.*, 2009).

Quanto à análise de compostos fenólicos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) representa atualmente a mais popular e confiável técnica de separação destes compostos (Dai & Mumper, 2010). No entanto, esta técnica é pouco empregada para quantificação, já que dificilmente são detectados todos os compostos fenólicos de um extrato em uma mesma corrida (Roginsky & Lissi, 2005).

Na literatura há várias metodologias de quantificação para compostos fenólicos, sendo o ensaio de Folin-Ciocalteu o mais usado e amplamente estudado em plantas terrestres. Basicamente, este ensaio mede a capacidade de transferência de elétrons dos compostos fenólicos em meio alcalino para o reagente ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, resultando em complexos azuis que são detectados espectrofotometricamente (Singleton *et al.*, 1999).

Apesar da popularidade deste ensaio, outras substâncias antioxidantes similares aos compostos fenólicos ou açúcares podem interferir nas reações (Singleton *et al.*, 1999). De acordo com o princípio deste ensaio, o que é primariamente avaliado é a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e/ou de outros antioxidantes semelhantes presentes naquele extrato. A quantificação de fenóis totais acaba sendo uma avaliação secundária. No entanto, este tipo de quantificação é adequada para um trabalho de estresse com luz (Magalhães *et al.*, 2010). Em algas vermelhas, alguns autores têm aplicado este ensaio para calcular o teor de fenóis totais como Zhang *et al.* (2006) e Zubia *et al.* (2007; 2009), porém não avaliaram possíveis interferentes.

Sob esta perspectiva, no presente estudo, pretendemos avaliar os efeitos da intensidade da taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo sobre o teor de fenóis totais e sobre os possíveis compostos fenólicos na Rhodophyta *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Para isso, inicialmente pretendemos padronizar uma metodologia de extração e quantificação por meio do ensaio de Folin-Ciocalteu, verificando possíveis interferentes como açúcares solúveis. Além disso, será analisado o extrato em CLAE e identificado os possíveis compostos fenólicos. Esta macroalga foi escolhida para este estudo por ser um modelo biológico estudado no Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM), por ser de fácil cultivo em laboratório, apresentar grande potencial econômico com produção de ágar de boa qualidade e possuir altas taxas de crescimentos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material e condições gerais do cultivo

Foram estabelecidos cultivos estoques unialgais de talos da fase gametofítica feminina (n) de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand a partir da cepa 39 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas “Edison José de Paula” (LAM) do Instituto de Biociências da USP.

O cultivo estoque foi mantido no mínimo por um mês em condições controladas: temperatura de 25 ± 1 °C, taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo de 60 ± 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro e aeração em períodos intermitentes de 30 min ligado e 30 min desligado. O meio de cultivo foi utilizado na proporção de 3 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar esterilizada (salinidade de 32), enriquecida com solução Von Stosch (50%) (Edwards, 1970). A troca do meio de cultivo e a limpeza dos talos foram realizadas uma vez por semana.

A água do mar utilizada nos cultivos foi proveniente do município de São Sebastião (São Paulo, Brasil). Sua esterilização foi feita por meio de dupla filtragem (filtro de pressão CUNO, porosidade de 5 e $1\mu\text{m}$) e aquecimento em banho -maria a 90 °C por 1 h. A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes (modelo luz do dia, 40 W) cuja taxa de fluxo fotônico fotossinteticamente ativo foi determinada por sensor esférico (Li-Cor, modelo LI-1935B) conectado a medidor de quanta (Li-Cor, modelo LI-250). A aeração foi fornecida por compressor odontológico Schulz de diafragma, isento de óleo.

3.2.2 Padronização do material

Para os experimentos com luz, foram usados ápices, região que inclui a zona apical, padronizados em 3 cm, já para o estabelecimento dos protocolos de compostos fenólicos foram utilizados subápices de 5 cm, pois estes subápices são mais robustos e para os testes iniciais houve necessidade de grandes quantidades de biomassa (Fig. 1). Os protocolos obtidos com os subápices foram testados nos ápices de 3 cm, para depois, serem utilizados nos ápices submetidos ao experimento com luz.

Figura 1. Talo de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand especificando o ápice de 3 cm e o subápice de 5 cm.

3.2.3 Delineamento experimental

A partir do cultivo estoque, ápices foram padronizados a 3 cm e transferidos para as condições experimentais por 7 dias. As condições foram semelhantes ao cultivo estoque, porém a proporção de cultivo foi alterada para 1 g de biomassa fresca para cada 1 L de água do mar, visando evitar a limitação de nutriente durante o experimento e assim não prejudicar a interpretação de respostas relacionadas apenas à variação na intensidade de luz, como sugerido por Urabe & Sterner (1996).

Foram estruturados três tratamentos: um controle ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e dois tratamentos que tiveram a intensidade de luz aumentada para $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada tratamento foi estudado por separado devido ao volume de material e a logística laboratorial, sendo realizando três experimentos independentes. Para cada um destes conjuntos foram mantidos 21 frascos de cultivo. A cada dia, três destes frascos (réplicas) eram retirados das condições experimentais. Assim, cada coleta representa o Dia 0, o Dia 1, o Dia 2, etc., até completar uma semana de tratamento, Dia 7.

Após serem retirados das condições experimentais, os ápices foram cortados novamente para 3 cm para padronizar seu tamanho. Amostras de 400 mg foram pesadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises. É importante ressaltar que no dia de realização de cada experimento foram pesadas 3 réplicas de 400 mg de ápices de 3 cm do cultivo estoque para representar o Dia 0.

3.2.4 Extração e análise de compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi baseada em um protocolo para análises em microescala adaptado no Laboratório de Fitoquímica (IB-USP) (Watanabe & Furlan, 2009), já a quantificação foi realizada pelo ensaio de Folin-Ciocalteu baseado no protocolo de Waterman & Mole (1994) utilizando uma curva calibração feita com ácido *p*-cumárico (regressão linear simples, $R^2 \geq 0,99$).

A metodologia modificada para extração consistiu em triturar em nitrogênio líquido amostras de 400 mg de biomassa fresca até formar um pó fino e acrescentar 5 mL de etanol 70% (v/v). O extrato resultante foi levado a banho-maria a 50 °C por 1 h em tubo de centrifugação bem fechados. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 10 min a 10000 RPM em temperatura ambiente. O sobrenadante foi mantido em freezer (-20 °C) até posteriores análises.

O protocolo modificado para quantificação consistiu em misturar 0,5 mL de extrato em 0,5 mL de água, adicionar 0,06 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea®) e por último adicionar 0,375 mL de uma solução saturada de Na₂CO₃; 2 h depois, centrifugar a solução resultante (5000 RPM por 5 min a temperatura ambiente) e ler o sobrenadante a $\lambda=760$ nm no Espectrofotômetro de UV/visível (Shimadzu, modelo UV-1650 PC), usando cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico.

A análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi modificada de uma metodologia desenvolvida por Schieber *et al.* (2001) para compostos fenólicos. O presente trabalho fez uso de um cromatógrafo líquido HP1200 com uma coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 X 250 mm), com cromatogramas processados em $\lambda = 270$ nm. A fase móvel empregada consistiu de um gradiente entre A = ácido acético 0,1% e B = acetonitrila, com a seguinte programação: 88% A (0 min), 88% A (5 min), 80% A (8 min), 50% A (16 min), 35% A (26 min), 10% A (28 min), 0% A (55 min), 0% A (62 min), 88% A (65 min) e 88% A (75 min) com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, temperatura da coluna ajustada a 40 °C e com volume de injeção de 40 µL.

3.2.5 Identificação

A identificação dos compostos presentes no extrato etanólico de *Gracilariopsis tenuifrons* foi realizada em cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em tandem por interface de ionização por electrospray (CLAE-IES-EM) (Shimadzu M10AVP – Esquire 3000 Plus – Bruker Daltonics) na Central Analítica do Instituto de química (IQUSP).

As condições no espectrômetro de massas consistiram em voltagem do capilar de 4000 V, skimmer 40 V, fluxo para o massa de 90 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, fluxo do gás secante de 7 $\text{L}.\text{min}^{-1}$, temperatura dessolvatação de 320 °C e nebulizador a 27 psi. Já as condições cromatográficas foram às mesmas descritas acima em uma primeira análise. Para uma melhor resolução dos picos iniciais (0-10 min) foi realizada uma nova análise em que se empregou um sistema de eluição isocrática que consistiu de 90% de ácido acético 0,1% e 10% de acetonitrila com fluxo de 0,3 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ por 15 min.

3.2.6 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) unifatorial foi usada para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias diárias de cada variável analisada nos diferentes tratamentos. A partir da detecção da diferença, foi empregado o teste *a posteriori* de Tukey para identificar quais dias tiveram comportamentos distintos em cada variável. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado em comparações entre os resultados obtidos no ensaio de Folin-Ciocalteu e em CLAE. Todos os testes de experimentos foram realizados em triplicatas e adotados nível de significação inferior a 5 % ($p < 0,05$).

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Aperfeiçoamento da metodologia de extração e análise com subápices de 5 cm

Diferentes temperaturas foram testadas para aperfeiçoar a metodologia de extração. A maceração a temperatura ambiente ($320,89 \pm 6,7 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$) revelou resultados significativamente menores do que a maceração com temperatura de 50 °C ($611,0 \pm 8,6 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$) e de 80 °C ($654,22 \pm 129,2 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$), ambas estatisticamente semelhantes. Na ex-

tração com temperatura de 80 °C foram obtidos desvios padrões maiores, por isso optou-se pela maceração a 50 °C (Fig. 2A). A maceração com aquecimento é comum na maioria das metodologias para extração de compostos fenólicos, pois melhora a taxa de extração, permitindo, por exemplo, uma maior solubilidade do analito. No entanto, altas temperaturas podem degradar alguns compostos fenólicos mais sensíveis ao calor (Dai & Mumper, 2010).

Um procedimento bastante comum em protocolos de polifenóis é a eliminação do solvente até a secura (Kim & Lee, 2001) e depois a dissolução do resíduo em um volume menor, a fim de concentrar as substâncias. Foram feitos testes de quantificação com o extrato original e submetido à secura sob fluxo de nitrogênio.

Os resultados demonstraram uma redução significativa nos fenóis totais após a secura do extrato, passando de $611,0 \pm 8,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ para $492,1 \pm 17,3 \mu\text{g.g}^{-1}$, ou seja, uma redução de cerca de 20% (Fig. 2B). Este procedimento de concentração do extrato levou à alteração qualitativa do perfil cromatográfico obtido em CLAE (Fig. 8). Somente os picos de 1 a 6 permaneceram constantes, o pico 11 não foi detectado e todos os outros picos sofreram redução, consequentemente à área total sofreu uma diminuição de 31,69%.

A redução da quantidade de fenóis totais observada com a concentração do extrato, tanto nas análises em CLAE como no espectrofotômetro de UV/visível, usando amostras de massa fresca congelada, foram similares a quando se usa massa seca (secagem em estufa a 40 °C) para obtenção do extrato, havendo também redução de cerca de 20% nas quantificações. É possível que o processo de secagem da massa e de evaporação do solvente facilite a degradação de alguns desses compostos. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos realizados em plantas terrestres, como pode ser visto numa revisão de Abascal *et al.* (2005).

Com esses resultados, optamos por realizar as quantificações dos fenóis totais em extratos não concentrados e sempre de massa fresca.

Figura 2. Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos de subápices de 5 cm de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand obtidos por diferentes temperaturas de macerações (ambiente, 50 °C e 80 °C) (A), ou após concentrar ou não sob fluxo de nitrogênio (B). Letras iguais acima das barras indicam que os valores não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Ao se analisar os ápices de 3 cm (primeiro dia do cultivo estoque) observou-se um valor significativamente superior de fenóis totais ($757,1 \pm 7,6 \mu\text{g.g}^{-1}$), quando comparado com os subápices de 5 cm ($580,5 \pm 59,2 \mu\text{g.g}^{-1}$) cultivados em mesma condição (Fig. 3). Esta diferença também foi observada nas análises em CLAE, pois o pico 4 (Fig. 8) aumentou 55% nas análises com ápices em relação às análises com subápices. Para os outros picos que apresentaram área aumentada, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Schubert *et al.* (2011) também detectaram variação na composição química ao longo dos talos nas macroalgas vermelhas *Gracilaria damaecornis* e *Eucheuma*

isiforme. Granbom *et al.* (2004) verificaram maiores atividade da enzima nitrato redutase na região apical da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva. Estes resultados sugerem a importância de padronização das regiões a serem usadas nos experimentos e a importância de indicar na metodologia quais porções do talo ou se o indivíduo todo foi utilizado, a fim de poder estabelecer comparações entre os diferentes estudos. Esta diferença no teor de fenóis totais entre os ápices e subápices possivelmente é devido a maior taxa metabólica da zona apical (região de crescimento ativo).

Figura 3. Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos de subápices de 5 cm ou ápices de 3 cm de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Letras iguais acima das barras indicam que os valores não diferem entre si (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

3.3.2 Interferências nas análises com o reagente Folin-Ciocalteu

Durante a preparação dos extratos obtidos das algas para análise através do ensaio de Folin-Ciocalteu foi observada a formação de um precipitado, ausente nas preparações para a curva de calibração e nos brancos. Assim, após o repouso de 2 h necessário para o ensaio, antes das leituras no espectrofotômetro de UV/visível, as amostras foram centrifugadas. Verificou-se que a não separação do precipitado superestima as leituras em 47%; o teor de fenóis totais caiu de $757,1 \pm 7,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ para $395,3 \pm 7,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ para as análises com ápices (Fig. 4).

Interferência de substâncias apolares é uma possível causa desse precipitado. Após extração líquido-líquido do extrato com hexano (3x o volume do extrato), não

houve a formação deste precipitado no ensaio de Folin-Ciocalteu e a quantidade de fenóis totais foi semelhante aos resultados após a centrifugação. Assim, optou-se em centrifugar a solução resultante antes das leituras no espectrofotômetro de UV/visível. Este tipo de interferência também foi encontrada para os subápices, havendo redução similar no teor de fenóis totais de 47%, caindo de $580,5 \pm 59,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ para $304,7 \pm 41,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Fig. 4).

Figura 4. Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos de ápices de 3 cm e dos subápices de 5 cm de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand centrifugados e não centrifugados após 2 h do ensaio de Folin-Ciocalteu. Letras iguais acima das barras indicam que os valores não diferem entre si (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

Outras substâncias que não são compostos fenólicos podem interferir nos ensaios com o reagente Folin-Ciocalteu. Entre estas substâncias, açúcares solúveis redutores são os principais interferentes, porém só quando em sinergismo com compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999). Assim, em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Buckeridge e a doutoranda Adriana Grandis do Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (LAFIECO – USP), foi estimada a quantidade destes açúcares no extrato etanólico dos ápices através do método do fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Foi construída uma curva de calibração ($R^2 \geq 0,99$, regressão linear simples) a partir de uma solução-mãe de glicose ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e verificou-se que o teor de açúcar solúvel do extrato era de $204,17 \pm 37,84 \mu\text{g.g}^{-1}$, equivalente a 0,0204% (w/v). Segundo Waterhouse (2001) este valor é considerado baixo. Este autor sugere que para o vinho só é necessário fazer cor-

reções nos teores de fenóis totais quando este valor de açúcares solúveis é superior a 2% (w/v).

Na intenção de verificar o efeito do açúcar solúvel do extrato sobre a metodologia desenvolvida no presente trabalho, foram feitas duas curvas de calibrações: uma curva com concentrações conhecidas de ácido *p*-cumárico e outra curva com as mesmas concentrações acrescidas de glicose na proporção correspondente aos 0,0204% determinado para o extrato de *Gracilariopsis tenuifrons*. A comparação das duas curvas revelou que não há interferências significativas dessa quantidade de açúcar no teor de fenóis totais estimado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (Fig. 5).

Figura 5. Curvas de calibrações feitas com ácido *p*-cumárico com e sem acréscimo de glicose para verificar possíveis efeitos de um açúcar solúvel sobre o ensaio de Folin-Ciocalteu. Ambas as curvas com $R^2 \geq 0,99$ (regressão linear).

Com esta metodologia padronizada, para os ápices de 3 cm (primeiro dia do cultivo estoque) foram detectados $453,03 \pm 7,43 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de fenóis totais por massa fresca de alga. Em massa seca, esse valor é equivalente a 0,14% (quando seca, a massa fresca de 500 mg se reduz para aproximadamente 150 mg) valor bem inferior aos 2,1% encontrados na literatura com algas proveniente diretamente do campo (Zubia *et al.*, 2007). Era esperado que valores obtidos em campo fossem superiores aos obtidos de biomassa cultivada em laboratório, pois o teor de fenóis ou de outros compostos antioxidantes está diretamente correlacionado com fatores bióticos e abióticos como herbivoria e intensidade de luz.

3.3.3 Efeitos da intensidade de luz sobre o teor de fenóis totais em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons*

Os resultados obtidos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu no tratamento controle mostraram que o teor de fenóis totais aumentou de $355,35 \pm 8,24 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 1) para $414,13 \pm 7,80 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 6), um aumento de 17% em relação ao Dia 0 (Fig. 6A).

No tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve no primeiro dia um aumento intenso de 44% dos fenóis totais em relação ao Dia 0, aumentando de $415,66 \pm 9,76 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 0) para $601,48 \pm 8,74 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 1) (Fig. 6B). Ao longo dos outros dias, o teor de fenóis totais continuou aumentando, atingindo a maior concentração, $675,73 \pm 28,76 \mu\text{g.g}^{-1}$, no Dia 7, um aumento de 62% em relação ao Dia 0 (Fig. 6B).

No tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o comportamento do teor de fenóis totais foi similar ao tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, aumentando de $444,81 \pm 7,85 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 0) para $662,03 \pm 14,45 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Dia 1), um aumento de 48,87% (Fig. 6C). O teor de fenóis totais continuou aumentando ao longo dos dias atingindo no Dia 4 a concentração de $734,97 \pm 14,29 \mu\text{g.g}^{-1}$, um aumento de 65,29% e permanecendo praticamente constante até o Dia 7 (Fig. 6C).

Estes resultados sugerem que o teor de fenóis totais respondeu ao aumento da intensidade de luz e a resposta para produção destes compostos foi rápida. Logo no primeiro dia de tratamento com alta intensidade de luz houve um aumento significativo no teor de fenóis totais e, a partir do Dia 2, a concentração ficou praticamente constante. Esse padrão foi diferente do resultado para carotenoide zeaxantina que aumentou paulatinamente, mas no final da exposição apresentou uma redução significativa (CAPÍTULO II).

Quanto à interferente nos extratos etanólicos, o teor de açúcares solúveis aumentou com o incremento da intensidade de luz, porém este aumento não atingiu valores superiores a 0,1%. Uma curva de calibração de ácido *p*-cumárico acrescida de 0,1% de glicose superestimaria os valores em torno de somente 7%. Dessa forma, este resultado sugere que o aumento do teor de açúcares não foi responsável pelo grande aumento no teor de fenóis totais. Com os resultados obtidos no ensaio de Folin-Ciocalteu, concluímos que, provavelmente, o aumento da intensidade de luz provocou um aumento de antioxidantes fenólicos, ou de outros antioxidantes similares a compostos fenólicos.

Figura 6. Variação do teor de fenóis totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores assinalados pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

3.3.4 Identificação dos compostos em CLAE-IES-EM

Os compostos presentes no extrato etanólico foram identificados em CLAE-IES-EM de acordo com o tempo de retenção na coluna C₁₈, características dos espectros de UV-visível (λ_{max}) e de massas e através de comparação com dados da literatura (Cardozo *et al.*, 2009; Cardozo *et al.*, 2011). Os parâmetros para identificação são apresentados na tabela 1.

Dentre os compostos analisados, foram identificados: derivado de asterina-330 (Pico 1), derivado de palitinol (Pico 3) e paliteno ou seu isômero *cis*-usujireno (Pico 6) (Fig. 8) (Tabela 1). Os compostos que foram identificados são micosporinas. Com base nos espectros de absorção em UV-visível podemos sugerir que os picos 2, 4 e 5 também são micosporinas, com máximos de absorção em torno de 310-360 nm.

As micosporinas são substâncias nitrogenadas polares biossintetizadas a partir da via do ácido chiquímico (Fig. 7) (Karsten, 2008). Entre as macroalgas, são moléculas presentes principalmente em algas vermelhas.

Figura 7. Estruturas moleculares de algumas micosporinas presentes em macroalgas. Modificada de Karsten, (2008).

Já era esperado encontrar micosporinas no presente trabalho, pois a forma de extração (uso de solvente polar) e a metodologia de análise em CLAE (uso de solventes polares e acidificados como fase móvel) para estas substâncias são semelhantes àquelas usadas para compostos fenólicos (Yuan & Athukorala, 2011).

Não foram encontrados compostos fenólicos comuns de plantas terrestres como ácidos fenólicos e flavonoides (Robbins, 2003; Gardana *et al.*, 2007; Lin & Harnly, 2007). A falta de trabalhos sobre isolamento e composição química em algas vermelhas dificultou a identificação dos eventuais compostos fenólicos presentes no extrato etanólico. A maioria dos compostos encontrados em algas vermelhas é distinta de plantas terrestres, as quais são amplamente estudadas e apresentam uma grande diversidade de padrões comerciais.

Figura 8. Cromatograma obtido do extrato etanólico de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em CLAE-IES-EM. Os números acima dos picos correspondem aos da tabela 1.

Tabela 1. Características dos compostos em CLAE-IES-EM produzidos por *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand. Os fragmentos em negrito correspondem aos picos base. Os picos 8, 9, 12, 13 e 18 não apresentaram fragmentos.

Pico	Composto proposto	$\lambda_{\max}$ (nm)		$[M+H]^+$	Fragmentos (m/z)	Fragmentos do pico base (m/z) (MS2)
1	Derivado de Asterina-330	260	334	460,3	289,6	273,9; 229,9; 211,9; 196,8; 185,9
2	n.i. ^a		336	672,1	289,6; 293 ; 460; 531,1	n.d. ^b
3	Derivado de palitinol	258	330	690,9	303,3 ; 561,1; 583,1; 673,1	185,9; 243,8; 287,8
4	n.i.	254	326	651	141,1; 271; 347; 451,9; 613,1	210,8; 354,8; 465,8; 483,9; 595
5	n.i.	260	356	613,1	271,2 ; 451,9	n.d.
6	Paliteno ou usujireno		358	285	n.d.	196,8; 225,9; 240,8; 269,8
7	n.i.		279	680	455,2; 599,3; 657,1; 617,3	368,9; 437; 455; 507,2; 535,2; 563,1; 599,3
10	n.i.		n.d.	974	520,3; 544,3	526,2
11	n.i.	256	264	274	579,2	148,9; 204,8; 300,9; 301
14	n.i.		278	903,3	148,9; 409,1; 463,2; 507,3; 551,4; 595,4; 639,4; 683,5; 753,4 ; 815,6; 867,5	449,1; 545,2
15	n.i.		277	815,6	261,2; 551,2; 665,4; 705,4 ; 771,4	497,3
16	n.i.		n.d.	918,6	148,9; 391; 436,3; 486,4; 546,3; 639,1; 683,1; 803,5	301; 413,1
17	n.i.		n.d.	820,5	469,7; 722,5; 567,4 ; 634,3	172,9; 207,1; 222,1; 244; 289; 314,1; 365,3; 409; 439,1; 475,2; 549,4

^a não identificado (n.i.); ^b não determinado (n.d.)

3.3.5 Efeitos da intensidade de luz sobre os resultados em CLAE

Não houve uma mudança qualitativa no perfil cromatográfico com o aumento da intensidade de luz. No entanto, uma análise comparativa em termos quantitativos entre os resultados do ensaio de Folin-Ciocalteu e os resultados em CLAE necessitaria do conhecimento sobre quais picos obtidos na análise em CLAE do extrato etanólico correspondem a fenólicos que participam no ensaio de Folin-Ciocalteu.

Houve distintos perfis, em termos quantitativos, ao longo dos dias e dos diferentes tratamentos para os picos obtidos (APÊNDICE I); alguns picos, por exemplo, só tiveram suas áreas aumentadas no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, como o pico 11 (Fig. 2, APÊNDICE I), porém a maioria dos picos não teve uma resposta clara com o aumento da luz. Por exemplo, o pico 12 (Fig. 2, APÊNDICE I) apresentou aumento na área no experimento controle, diminuiu paulatinamente no tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, reduzindo 81% em relação ao Dia 0, porém, no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a área caiu até o Dia 3, em seguida aumentou nos Dias 4 e 5 e caiu novamente até o Dia 7.

Por outro lado, o pico 3 (derivado da micosporina palitinol) apresentou uma clara resposta à luz (Fig. 9). Apesar da redução significativa nas áreas ao longo dos dias para o tratamento controle, houve um aumento nas áreas nos tratamentos com altas intensidades de luz, apresentando um comportamento similar aos resultados do ensaio do Folin-Ciocalteu (Fig. 6). Consequentemente, houve uma forte correlação entre os resultados nos tratamentos com altas intensidades de luz: no tratamento de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com $r=0,85$ e no tratamento de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com $r=0,93$. Este resultado sugere que talvez esta micosporina seja um dos compostos presentes no extrato etanólico responsáveis pelo padrão de resposta obtido no ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu.

As respostas ao aumento das intensidades de PAR do derivado da micosporina palitinol também sugerem que este composto possui uma atividade antioxidante. Na literatura há trabalhos que relatam que algumas micosporinas são antioxidantes como a micosporina-glicina, chinorina e usujireno (Dunlap & Yamamoto, 1995; Nakayama *et al.*, 1999; Coba *et al.*, 2009), mas a forma de atuação destes antioxidantes é pouco estudada.

A possibilidade do derivado da micosporina palitinol reagir com reagente Folin-Ciocalteu sugere que esta micosporina tenha sua eficácia como antioxidante por possuir um alto potencial redutor. Dunlap & Yamamoto (1995) também concluíram que a ativi-

dade antioxidante para outra micosporina, no caso, micosporina-glicina, se dá pelo alto potencial redutor.

Dessa forma, há indícios que o derivado de palitinol reagiu com o reagente Folin-Ciocalteu. Assim, podemos propor que houve uma correlação positiva entre a atividade antioxidante desta micosporina com a intensidade de PAR, evidenciando uma função protetora contra danos fotooxidativos.

A maioria das micosporinas é mais conhecida por sua função de absorver radiação UV e eliminá-la em forma de calor. No entanto, Hoyer *et al.* (2002) também observaram que a concentração total de micosporinas de algumas macroalgas vermelhas é dependente do aumento de PAR. Dessa maneira, micosporinas podem ter função dual na fotoproteção: absorver radiações UV e capacidade antioxidante. Esta função dual é análoga a de compostos fenólicos, como pode ser visto em Grace (2005).

Figura 9. Variação da relação área do pico 3 / massa (g) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores assinalados pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

3.4 Conclusão

O primeiro ponto deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para extração e análise de compostos fenólicos, ou similares, para a macroalga *Gracilariopsis tenuifrons*. Esse protocolo consiste, de maneira geral, do uso de amostras frescas de ápices, extraídas com etanol a 50 °C, uso de alíquotas desse extrato sem ser submetido à concentração na montagem da reação com reagente de Folin-Ciocalteu e centrifugação da solução de reação antes de leitura em espectrofotômetro de UV-visível.

Além disso, o presente trabalho demonstrou que há um aumento no teor de fenóis totais em amostras de *Gracilariopsis tenuifrons* submetidas a altas intensidades luminosas. No entanto, não foi possível afirmar se esse aumento foi realmente devido à síntese de compostos fenólicos. Como o ensaio de Folin–Ciocalteu não é específico para detecção de compostos fenólicos e sim mede a capacidade redutora do extrato, outras substâncias presentes com estas mesmas características podem na verdade ser responsáveis pelos teores medidos. No entanto, concluímos que o derivado de palitino pode ter contribuído com resposta evidenciada pelo ensaio de Folin-Ciocalteu. Dessa forma, pensamos que deve ser feito um maior esforço para identificação dos componentes desse extrato, a fim de confirmar outros componentes antioxidantes.

3.5 Referências bibliográficas

- Abascal, K.; Ganora, L.; Yarnell, E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 8, p. 655-660, 2005.
- Asada, K.; Takahashi, M. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle, D. J.; Osmond, C. B.; Arntzen, C. J. (Eds) *Photoinhibition*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987. p. 227-288.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 26, n. 2, p. 170-244, 2009.
- Cardozo, K. H. M.; Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Guaratini, T.; Gates, P. J.; Pinto, E.; Lopes, N. P.; Colepicolo, P. A fragmentation study of di-acidic mycosporine-like amino acids in electrospray and nanospray mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 9, p. 1625-1631, 2009.
- Cardozo, K. H. M.; Marques, L. G.; Carvalho, V. M.; Carignan, M. O.; Pinto, E.; Marinho-Soriano, E.; Colepicolo, P. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2011.

- Coba, F. de la; Aguilera, J.; Figueroa, F. L.; Gálvez, M. V.; Herrera, E. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, n. 2, p. 161-169, 2009.
- Dai, J.; Mumper, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebs, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- Dunlap, W. C.; Yamamoto, Y. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 112B, n. 1, p. 105-114, 1995.
- Edwards, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contributions in Marine Science*, v. 15, p. 1-228, 1970.
- Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, v. 45, n. 3, p. 390-399, 2007.
- Grace, S. Phenolics as antioxidants. In: Smirnoff, N. (Ed.). *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Scientific Publishers, 2005. p. 141-168.
- Granbom, M.; Chow, F.; Lopes, P. F.; Oliveira, M. C.; Colepicolo, P.; Paula, E. J.; Pedersén, M. Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany*, v. 78, n. 4, p. 295-305, 2004.
- Hoyer, K.; Karsten, U.; Wiencke, C. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Marine Biology*, v. 141, n. 4, p. 619-627, 2002.
- Karsten, U. Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation. In: Amsler, C. D. (Ed.). *Algal Chemical Ecology*. Berlin: Springer Verlag, 2008. p. 273-296.
- Kim, D.-O.; Lee, C. Y. Extraction and isolation of polyphenolics. In: R. E. Wrolstad (Ed.) *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. I1.2.1-I1.2.12.
- Lin, L.-Z.; Harnly, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 1084-1096, 2007.
- Magalhães, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, v. 83, n. 2, p. 441-447, 2010.

- Maschek, J. A.; Baker, B. J. The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler, C. D. (Ed.). *Algal chemical ecology*. Berlin: Springer Verlag, 2008. p. 1-23.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- Nakayama, R.; Tamura, Y.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 5, p. 649-653, 1999.
- Novoa, A. V.; Motidome, M.; Mancini-Filho, J.; Linares, A. F.; Tanae, M. M.; Torres, L. M. B.; Lapa, A. J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina. *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, 2001.
- Onofrejová, L.; Vašíčková, J.; Klejdus, B.; Stratil, P.; Mišurcova, L.; Kráčmar, S.; Kopecký, J.; Vacek, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic. *Trends in Plant Science*, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.
- Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.
- Roginsky, V.; Lissi, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- Schieber, A.; Keller, P.; Carle, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 910, n. 2, p. 265-273, 2001.
- Schubert, N.; García-Mendoza, E.; Enríquez, S. Is the photo-acclimatory response of Rhodophyta conditioned by the species carotenoid profile? *Limnology and Oceanography*, v. 56, n. 6, p. 2347-2361, 2011.
- Singleton, B. V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152-179, 1999.
- Strack, P.M. Phenolic metabolism. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. *Plant biochemistry*. London: Academic Press, 1997. p. 387-416.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 820p.
- Urabe, J.; Sterner, R. W. Regulation of herbivore growth by the balance of light and nutrients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 16, p. 8465-8469, 1996.

- Watanabe, T.; Furlan, C. M. Análise de substâncias fenólicas em micro escala utilizando espectrofotometria: otimização de solventes e reagentes. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, Ribeirão Preto. *Anais eletrônicos*. São Paulo: USP, 2009. Disponível em: < <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=459&numeroEdicao=17> >. Acesso em: 31 out. 2010.
- Waterhouse, A. L. Determination of total phenolics. In: R. E. Wrolstad (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. I.1.1.1-I.1.1.8.
- Waterman, P. G.; Mole, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 238p.
- Yuan, Y. V.; Athukorala, Y. Algal Mycosporine- Like Amino Acids (MAAs) as Potential Cosmeceuticals. In: Kim, S.-K. (Ed.). *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*. p.143-167, 2011. CRC Press.
- Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D. A.; Barrow, C. J. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, v. 18, n. 3-5, p. 445-450, 2006.
- Zubia, M.; Fabre, M.-S.; Kerjean, V.; Deslandes, E. Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Botanica Marina*, v. 52, n. 3, p. 268-277, 2009.
- Zubia, M.; Robledo, D.; Freile-Pelegrin, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 5, p. 449-458, 2007.

Discussão Geral e Conclusão

O objetivo geral deste projeto foi avaliar na macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* possíveis alterações na quantidade e na composição de algumas classes de substâncias frente ao aumento da intensidade de luz. De uma forma geral, foi possível observar que a luz realmente provocou alterações em nível químico que puderam ser observadas diretamente com uma perda intensa na coloração dos ápices. Estes resultados foram expostos em 3 capítulos, porém os principais resultados serão aqui destacados e conectados.

Ao contrário do observado para a maioria das plantas terrestres, a perda intensa da coloração do material vegetal quando se aumentou a intensidade da luz foi acompanhada por um maior incremento da biomassa. A descoloração dos ápices reflete uma diminuição dos pigmentos fotossintetizantes, principalmente de ficobiliproteínas, que são bem sensíveis à qualidade e quantidade de radiação (Talarico & Maranzana, 2000; Grossman *et al.*, 2001). Dessa forma, podemos sugerir que esta alga vermelha seja mais maleável a perda dos pigmentos do que plantas terrestres, apresentando esta perda como uma estratégia para reduzir a absorção de luz.

Análises em espectrofotômetro de UV/visível permitiram verificar uma redução no teor de clorofila *a* e, nos dias finais dos experimentos com luz, na concentração de carotenoides totais. Entretanto, apesar de ser mais econômica, menos poluente e mais acessível para a maioria dos laboratórios quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a espectrofotometria de UV/visível não foi suficiente para o entendimento do padrão de resposta de carotenoides específicos frente ao estresse luminoso, principalmente porque os diferentes carotenoides presentes na alga estudada apresentaram comportamentos distintos com o aumento da intensidade de luz.

É importante ressaltar, entretanto, que os resultados para clorofila *a* e carotenoides totais em espectrofotômetro de UV/visível e em CLAE, tanto no controle como nos tratamentos, apresentaram alta correlação ($r \geq 0,90$) permitindo alcançar mesmas conclusões em ambas às análises. No entanto, os valores das quantificações em CLAE foram maiores que aqueles obtidos em espectrofotômetro de UV/visível (Fig. 7 – CAPÍTULO I, Fig. 3 – CAPÍTULO II e Fig. 1 – APÊNDICE II). De qualquer maneira, análises em espectrofotômetro de UV/visível, dependendo do objetivo do projeto, são bastante eficientes para a análise de pigmentos fotossintetizantes.

O entendimento mais detalhado sobre os carotenoides só foi possível em análises em CLAE, na qual foi observado que o β -caroteno teve um comportamento altamente correlacionado com a clorofila *a*, tendo as concentrações reduzidas com o aumento da intensidade de luz e sugerindo que ambos os pigmentos possuam uma mesma função na fotossíntese. Já a concentração do carotenoide zeaxantina apresentou aumento dependente da intensidade de luz nos dias iniciais da exposição, indicando uma função de fotoproteção para este pigmento nesta alga. Esta função já é bem descrita na literatura, principalmente, em trabalhos realizados em plantas terrestres e algas verdes (Betterle *et al.*, 2010; Dall'Osto *et al.*, 2010).

No presente trabalho também foi estabelecida uma metodologia para extração e análise de compostos fenólicos, ou similares. Esse protocolo consiste, de maneira geral, do uso de amostras frescas de ápices, extraídas com etanol a 50 °C, uso de alíquotas desse extrato, sem ser submetido à concentração, na montagem da reação com reagente de Folin-Ciocalteu e centrifugação da solução de reação antes de leitura em espectrofotômetro de UV-visível.

Com este protocolo foi possível verificar que há um aumento no teor de fenóis totais com a maior exposição a altas intensidades luminosas. No entanto, não foi possível afirmar se esse aumento foi realmente devido ao aumento na síntese de compostos fenólicos, já que o ensaio de Folin-Ciocalteu não é específico para detecção de compostos fenólicos e sim mede a capacidade redutora do extrato (Singleton *et al.*, 1999; Magalhães *et al.*, 2010). As análises em CLAE revelaram que somente uma substância, no caso, um derivado da micosporina palitinol, apresentou uma clara resposta com o aumento da intensidade de luz. Esta resposta foi altamente correlacionada com os resultados no ensaio no Folin-Ciocalteu, sugerindo que esta substância é um antioxidante que pode influenciar os dados neste tipo de ensaio.

Dessa forma, podemos concluir que o uso do ensaio do Folin-Ciocalteu para análise de fenóis totais em extrato de algas vermelhas ainda necessita de mais estudos a respeito de interferentes. Porém, podemos sugerir que esse ensaio fornece sim uma boa ferramenta para avaliação da capacidade redutora do extrato, como sugere Magalhães *et al.* (2010). É importante enfatizar que no presente trabalho tentamos avaliar as metodologias de extrações e análises adaptando protocolos existentes. Com estes resultados para o ensaio de Folin-Ciocalteu esperamos alertar que as análises químicas em algas vermelhas devem ser tratadas com cautela, principalmente ao se usar protocolos provenientes de estudos com outros grupos de organismos fotossintetizantes.

Concluindo, sugerimos que a macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* responde a condições de estresse luminoso diminuindo, progressivamente, a quantidade de clorofila *a* e β -caroteno, restringindo a absorção de energia luminosa e com isso evitando o sobrecarregamento do sistema fotossintetizante, que resultaria na formação de EROs. Além disso, esse organismo apresenta uma resposta de fotoproteção associada ao aumento de zeaxantina e de substâncias antioxidantes como o derivado do palitinol. Assim, há uma combinação de estratégias de defesa a essa condição de estresse, associando respostas rápidas, no caso da zeaxantina, com outras de longo prazo como no caso do derivado do palitinol.

Referências bibliográficas

- Betterle, N.; Ballottari, M.; Hienerwadel, R.; Dall'Osto, L.; Bassi, R. Dynamics of zeaxanthin binding to the photosystem II monomeric antenna protein *Lhcb6* (CP24) and modulation of its photoprotection properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 504, n. 1, p. 67-77, 2010.
- Dall'Osto, L.; Cazzaniga, S.; Havaux, M.; Bassi, R. Enhanced photoprotection by protein-bound vs free xanthophyll pools: a comparative analysis of chlorophyll *b* and xanthophyll biosynthesis mutants. *Molecular plant*, v. 3, n. 3, p. 576-593, 2010.
- Grossman, A. R.; Bhaya, D.; He, Q. Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 15, p. 11449-11452, 2001.
- Magalhães, L. M.; Santos, F.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, v. 83, n. 2, p. 441-447, 2010.
- Singleton, B. V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152-179, 1999.
- Talarico, L.; Maranzana, G. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2000.

Resumo Geral

O estresse de luz pode afetar consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento dos organismos fotossintetizantes. Nestas situações, é comum verificar respostas químicas que podem indicar diferentes estratégias de fotoproteção adotado pelo organismo. No presente trabalho, foram desenvolvidas metodologias de análise e extração de pigmentos fotossintetizantes e compostos fenólicos na macroalga vermelha *Gracilariopsis tenuifrons* com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento intensidade de luz sobre estes compostos. Foi verificado que aumento da intensidade de luz não provocou redução na biomassa desta alga, ao contrário houve um maior incremento.

Os pigmentos majoritários no extrato foram clorofila *a*, β -caroteno e zeaxantina. O carotenoide β -caroteno teve um comportamento correlacionado com o pigmento clorofila *a*, tendo as concentrações reduzidas com o aumento da intensidade de luz, sugerindo que ambos os pigmentos possuam uma mesma função na fotossíntese. Já a concentração da zeaxantina aumentou com a intensidade de luz nos dias iniciais, indicando uma função fotoproteção deste pigmento nesta alga.

A capacidade redutora do extrato aumentou com a intensidade luminosa. No entanto, não foi possível afirmar se esse aumento foi realmente devido à síntese de compostos fenólicos ou a outras substâncias que desempenhem o mesmo papel. As análises em CLAE revelaram que um derivado da micosporina palitinol apresentou alta relação com o aumento da intensidade de luz, sendo essa resposta altamente correlacionada com os resultados no ensaio no Folin-Ciocalteu.

Em conclusão, das substâncias analisadas neste trabalho, a zeaxantina e o derivado do palitinol foram as que apresentaram os resultados mais evidentes como antioxidantes.

Abstract

The high-light stress can adversely affect growth and development of photosynthetic organisms. In these situations, it is common to note chemical responses that may indicate different strategies of photoprotection. In this study, protocols were optimized for analysis and extraction of phenolic compounds and photosynthetic pigments in macrophytic red algae *Gracilariopsis tenuifrons* in order of evaluating the effects of high-light stress on these compounds. It was found that an increase in light intensity has not caused decrease in biomass of algae; on the contrary, promotes a greater increase in biomass.

Zeaxanthin, β -carotene and chlorophyll *a* were the major pigments present in the extract. The β -carotene and chlorophyll *a* were inversely dependent on the intensity of light. Both pigments were highly correlated suggesting the same role in photosynthesis. The concentration of the zeaxanthin was dependent on the intensity of light in the initial days, indicating a photoprotection function for this pigment.

The reduction capacity of the extract increased with light intensity. However, it was not possible to state that this increase was actually due to the synthesis of phenolic compounds or other substances that perform the same role. The HPLC analyzes revealed that a derivative of micosporina palitinol showed high correlation with the increase in light intensity. This response was highly correlated with the results for Folin-Ciocalteu assay.

In conclusion, from all compounds analyzed in this work, zeaxanthin and the palitinol derivative presented clearer results as antioxidants.

Apêndice I

Gráficos referentes aos picos obtidos em CLAE para o extrato etanólico (Fig. 8, CAPÍTULO III). Os picos não representados, exceto pico 3 que foi representado na Figura 9 do CAPÍTULO III, foram muito variáveis entre as réplicas, apresentando-se em baixas concentrações ou ausentes.

Figura 1. Variação da relação área do pico 1, 4, 7 ou 10 / massa (g) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em uma mesma curva, valores assinalados pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 2. Variação da relação área do pico 11, 12 ou 14 / massa (g) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em uma mesma curva, valores assinalados pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Figura 3. Variação da relação área do pico 15, 16 ou 17 / massa (g) (médias $\pm$ desvio padrão, n=3) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em uma mesma curva, valores assinalados pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).

Apêndice II

Gráficos referentes aos resultados obtidos em CLAE para os carotenoides totais (soma das concentrações de β -caroteno e de zeaxantina).

Figura 1: Variação das concentrações de carotenoides totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (médias $\pm$ desvio padrão, $n=3$) em ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand, ao longo dos dias em diferentes intensidades de luz: 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A), 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) e 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C). Em uma mesma curva, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (ANOVA unifatorial e teste Tukey, $p < 0.05$).