UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

DINAELZA CASTELO PEREIRA

Efeito dos parâmetros ambientais sobre a
macroalga *Gracilaria domingensis*: estratégias de
aclimação e fotoproteção na espécie

Versão Corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 18/08/2014

DINAELZA CASTELO PEREIRA

Efeito dos parâmetros ambientais sobre a
macroalga *Gracilaria domingensis*: estratégias de
aclimação e fotoproteção na espécie

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo

São Paulo

2014

DINAELZA CASTELO PEREIRA

Efeito dos parâmetros ambientais sobre a macroalga *Gracilaria domingensis*:
estratégias de aclimação e fotoproteção na espécie

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436e Pereira, Dinaelza Castelo
Efeito dos parâmetros ambientais sobre a macroalga *Gracilaria domingensis* : estratégias de aclimação e fotoproteção na espécie / Dinaelza Castelo Pereira. -- São Paulo, 2014.
180p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Colepicolo, Pio

1. Bioquímica 2. Radiação ultravioleta : Fotobiologia I. T. II. Colepicolo, Pio, orientador.

574.192 CDD

AGRADECIMENTOS

À Fapesp pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou o estágio na Alemanha.

À Universidade de São Paulo e Instituto de Química por todo o suporte oferecido.

Ao querido orientador Dr. Pio Colepicolo, pela confiança, estímulo e carinho nestes cinco anos aprendizado.

A Profa. Dra. Eliane Marinho Soriano, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que abriu as portas do laboratório com grande generosidade, oferecendo todo material necessário para realização do cultivo em Rio do Fogo. Além de valiosas sugestões para implantação e melhoramento do cultivo da *G. domingensis*.

Ao Dr. Sergio Ricardo, do laboratório de macroalgas, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela imensurável colaboração durante todo o experimento de cultivo, nas duas estações. Obrigada por entrar comigo na água, antes mesmo do Sol nascer e pelo seu bom humor, essencial nos momentos mais cansativos.

A querida amiga Angela pela colaboração, amizade e estímulo. Sua participação e dedicação foram importantíssimas para que este trabalho fosse concluído.

Ao Dr. Dieter Hanelt (*Institut für Botanik, Hamburg-Universität*, Hamburg, Alemanha), a Dra Inka Bartsch e ao Dr. Christhian Wienkie (*Institut Alfred Wegener, Bremerhahen*, Alemanha) pela colaboração e ensinamentos científicos. Obrigada pelas generosas discussões, incentivo e apoio durante o tempo de residência na Alemanha.

A Aline pela amizade, carinho e preciosa contribuição nas análises de lipídeos e ácidos graxos. Todos esses anos de convivência mostraram que poucas pessoas podem ser como você: sincera, amiga e com um coração enorme.

Ao pescador Ninho que me ajudou durante todo o experimento em Rio do Fogo.

A comunidade de Rio do Fogo, especialmente as marisqueiras, que me apoiaram e me receberam sempre com carinho.

A Lu pela colaboração com a análise de MAA e a revisão do texto.

Aos companheiros de laboratório de diferentes épocas: João, Diogo, Patrícia, Karina, Renato, Erechim, Erika, Tatiana, Diego, Helena, Cicero, Cintia, Tatiana e Amanda pela convivência e amizade.

Aos meus queridos amigos que fiz durante meu estágio na Alemanha que me acolheram tão bem e me ajudaram em tudo que fosse possível: Karin, Ludmila, Andreas, Sandra, Dominique, Ricardo, Conchi e Maria que tornaram minha vida na Alemanha muito mais fácil e inesquecível.

Ao Ed, pelo carinho e ajuda valiosa em todos os momentos.

A Sandrinha pela grande amizade e carinho em todos os momentos.

Ao Leo, pela grande ajuda nas análises no massas.

Aos motoristas do fretado (Campinas – USP), que diariamente me receberam com grande carinho.

A minha avó, meus pais, meus irmãos e familiares pelo amor, compreensão e apoio de sempre.

A Ygor pelo amor, incentivo e compreensão. Sem sua ajuda eu não teria conseguido. A sua presença faz com que minha vida seja plena.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou o estágio na Alemanha.

À Fapesp pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e Instituto de Química por todo o suporte oferecido.

Let us try to teach generosity and altruism, because we are born selfish.

“There's real poetry in the real world. Science is the poetry of reality”

Richard Dawkins

Castelo-Pereira, D. Efeito dos parâmetros ambientais sobre a macroalga *Gracilaria domingensis*: estratégias de aclimação e fotoproteção na espécie. 2014. 180p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em seu habitat natural as algas estão sujeitas a ação simultânea de vários fatores, como radiação (fotossinteticamente ativa e ultravioleta), temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes, entre outros. A variação desses fatores no ambiente natural ocorre de forma coletiva e uma rápida resposta do organismo é determinante pra sua sobrevivência.

Neste trabalho foram conduzidos experimentos relacionados aos efeitos da variação nos parâmetros ambientais sobre a macroalga *Gracilaria domingensis*. Três linhagens cromáticas dessa espécie foram cultivadas no mar, em diferentes épocas do ano (estações chuvosa e seca). Os dados fotossintéticos e bioquímicos foram acessados em uma escala de tempo referente às variações observadas durante o período de luz do dia e em uma escala referente às variações observadas em semanas. Os resultados obtidos a partir de análises dos parâmetros fotossintéticos, conteúdo pigmentar, concentração de glutatona, concentração de aminoácidos tipo micosporina, conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e fósforo, teor de lipídeos e ácidos graxos e rendimento do ágar mostraram alterações no perfil bioquímico e fisiológico da macroalga. Essas alterações foram correlacionadas com os fatores abióticos e sugerem alterações no metabolismo como uma das estratégias de aclimação da espécie.

Palavras-chave: Macroalgas, Parâmetros ambientais, Composição bioquímica, Fotossíntese.

Castelo-Pereira, D. Effects of environmental parameters on macroalgae *Gracilaria domingensis*: acclimation and photoprotection strategy on specie. 2014. 180p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In their natural habitat algae are exposed to simultaneous action of various factors, as radiation (photosynthetically active radiation and ultraviolet), temperature, salinity, nutrient availability and others. The variation in these factors in the natural environment occurs collectively and the algae capability for quick response is determinant for survival.

In this work, studies related to the effects of environmental variation on the macroalgae *Gracilaria domingensis* were performed. Three chromatic strains were cultivated in the sea, at different times of the year (dry and rainy seasons). Biochemical and photosynthetic responses were accessed on a daylight time scale and on a week time scale. The reached results for photosynthetic parameters, pigment content, glutathione concentrations, mycosporine-like amino acids concentrations, carbon, nitrogen and phosphorus tissue content, lipids and fatty acids levels and agar yield, revealed the altered biochemical and physiological profile of macroalgae. These changes were environment related and suggest metabolism changes as a strategy used by this organism to acclimate.

Keywords: Macroalgae, Environmental parameters, Biochemical composition, Photosynthesis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Linhagens cromáticas de *G. domingensis* (vermelha, verde e marrom)..... 31
- Figura 2: Localização da área onde foi realizado o cultivo de *G.domingensis* (Rio do Fogo-RN)..... 32
- Figura 3: Esquema da estrutura utilizada para o cultivo das algas no mar em diferentes profundidades e detalhe do recipiente de pet utilizado. Durante o experimento foi utilizado uma estrutura para cada linhagem..... 33
- Figura 4: Medidas de radiação PAR ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) no experimento de variação durante o período de luz do dia . (a) Estação chuvosa e (b) Estação seca..... 49
- Figura 5: Variação da radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento de variação no período de luz do dia, nas duas estações. . 51
- Figura 6: Variação nos níveis de precipitação pluviométrica (acumulado de três dias) durante o experimento variação durante o período de luz do dia, na estação chuvosa e seca..... 53
- Figura 7: Oscilação nos valores de RQE nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 59
- Figura 8: Oscilação nos valores do α nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 61
- Figura 9: Oscilação nos valores do rETRmax nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 63
- Figura 10: Oscilação nos valores de I_k nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor

vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 64	
Figura 11: Oscilação nos valores de ficoeritrina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 66	
Figura 12: Oscilação nos valores de ficocianina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 68	
Figura 13: Oscilação nos valores de proteína solúvel total nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 70	
Figura 14: Oscilação nos valores de clorofila-a nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 72	
Figura 15: Oscilação na concentração dos pigmentos carotenoides totais nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 74	
Figura 16: Dinâmica dos pigmentos carotenoides nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. 76	

Figura 17: Oscilação na concentração de micosporinas totais nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).	79
Figura 18: Dinâmica das micosporinas nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia.	81
Figura 19: Variação na concentração de glutathione reduzida (GSH) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia . Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).	83
Figura 20: Variação na expressão gênica durante a estação seca em relação ao total de expressão observada na estação chuvosa. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (estação chuvosa). A escala utilizada está em log. O controle interno foi um gene codificante para uma actina.	87
Figura 21: Variação na expressão gênica nas algas cultivadas na superfície em relação ao total de expressão observada nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (algas cultivadas em 70 cm de profundidade). A escala utilizada está em log. O controle interno foi um gene codificante para uma actina.	89
Figura 22: Variação na expressão gênica nas algas coletadas durante o meio-dia (A) e no entardecer (B) em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante o amanhecer. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (algas coletadas durante o amanhecer). A escala utilizada está em log. O controle interno foi um gene codificante para a actina.	92
Figura 23: Medidas de radiação PAR ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo. (A) Estação chuvosa e (B) estação seca.	95
Figura 24: Medidas de radiação UV (mW/m^2) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo.	96
Figura 25: Níveis de precipitação pluviométrica (mm) nas estações chuvosa e seca, durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo.	96

Figura 26: Variação no rendimento quântico efetivo (RQE) nas linhagens cultivadas na profundidade de 70 cm (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 101

Figura 27: Variação na eficiência fotossintética (α) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 103

Figura 28: Variação na taxa máxima de transporte de elétrons (rETRmax) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 105

Figura 29: Variação na irradiância de saturação (I_k) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 107

Figura 30: Variação na concentração de ficoeritrina, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), a verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 109

Figura 31: Variação na concentração de ficocianina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor

vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 111

Figura 32: Variação na concentração de proteína solúvel total, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. ((A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 113

Figura 33: Variação na concentração de clorofila-a nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 115

Figura 34: Variação na concentração de carotenoides totais, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 117

Figura 35: Variação na proporção dos pigmentos carotenoides em relação à concentração total, nas algas cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd), e marrom (M).

..... 120

Figura 36: Variação na concentração de micosporina total nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 122

Figura 37: Variação na proporção de MAA em relação a concentração total, nas algas cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação

chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd), e marrom (M).

..... 124

Figura 38: Variação na concentração de glutathione reduzida (GSH) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

127

Figura 39: Variação no conteúdo total de carbono nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 129

Figura 40: Variação no conteúdo de nitrogênio, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 131

Figura 41: Variação no conteúdo de fósforo, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

..... 133

Figura 42: Variação na concentração de lipídeos totais, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

136

- Figura 43: Variação na concentração de ácidos graxos, nas linhagens cultivadas em 70 cm de profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 138
- Figura 44: Variação na proporção de ácidos graxos em relação a concentração total, nas algas cultivada na profundidade (1) e na superfície (2); na estação chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd) e marrom (M). 140
- Figura 45: Variação no rendimento do ágar, nas linhagens cultivadas na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc). 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ($\mu\text{mol. fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação no período de luz do dia , nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e <i>F</i> (ANOVA <i>three-way</i>).	50
Tabela 2. Radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento <i>variação durante o período de luz do dia</i> , nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e <i>F</i> (ANOVA <i>two-way</i>).	52
Tabela 3. Variação do coeficiente de atenuação da penetração da luz na água (K_d) no local de cultivo das algas, durante o experimento <i>variação durante o período de luz do dia</i> , nas duas estações.....	54
Tabela 4: Características da coluna d'água durante o período de cultivo (estação chuvosa e seca) no experimento de variação durante o período de luz do dia	55
Tabela 5: Variação na concentração dos nutrientes na coluna d'água durante o período de cultivo (estação chuvosa e seca) no experimento de variação durante o período de luz do dia.	57
Tabela 6: Variação na expressão gênica durante a estação seca em relação ao total de expressão observada na estação chuvosa.	87
Tabela 7: Variação na expressão gênica nas algas cultivadas na superfície em relação ao total de expressão observada nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade.	89
Tabela 8: Variação da expressão gênica nas algas coletadas durante o meio-dia, em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante amanhecer.	93
Tabela 9: Variação da expressão gênica nas algas coletadas durante o entardecer, em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante amanhecer.....	93
Tabela 10: Variação da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo, nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e <i>F</i> (ANOVA <i>three-way</i>). ..	94
Tabela 11: Variação da radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo, nas duas estações.	95
Tabela 12: Variação do coeficiente de atenuação da penetração da luz na água (K_d) no local de cultivo das algas no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo, nas duas estações.	97
Tabela 13: Variação dos parâmetros ambientais durante as estações chuvosa e seca, no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo.	98
Tabela 14: Variação na concentração dos nutrientes na água do mar durante as duas estações de cultivo (seca e chuvosa), no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo.	99
Tabela 15: Resumo dos principais resultados obtidos neste estudo.	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alfa (α): Eficiência Fotossintética	m/z: razão massa-carga
ANOVA: análise de variância	MAAs: Aminoácidos tipo
ATP: adenosina trifosfato	micosporinas (mycosporine-like
cDNA: DNA complementar	amino acids)
C: carbono	MeOH: metanol
CHCl ₃ : clorofórmio	N: Nitrogênio
Chl-a: clorofila-a	P: Fósforo
CRL: curva rápida de luz	PAM: fluorescência de pulso de
DAD: detector de arranjo de	amplitude modulada
diodos	PAR: radiação fotossinteticamente
DNA: ácido desoxirribonucleico	ativa
F: fluorescência mínima da	PID: Fósforo inorgânico dissolvido
clorofila-a medidas em amostras	PC: ficocianina
iluminadas	PE: ficoeritrina
Fm': fluorescência máxima da	PS: peso seco
clorofila-a obtida após a incidência	PTS: proteínas totais solúveis
de um pulso saturante de luz	rETRmax: Taxa máxima de
branca em amostras iluminadas	transporte de elétrons relativa
GC-MS: cromatografia gasosa	pH: potencial hidrogeniônico
acoplada a espectrometria de	PS II: fotossistema II
massas	PS I: fotossistema I
GSH: glutathiona reduzida	RQE: rendimento quântico efetivo
GSSG: glutathiona oxidada	do PS II
HPLC: cromatografia líquida de	RNA: ácido ribonucleico
alta eficiência (High performance	TDS: sólidos totais dissolvidos
liquid chromatography)	TR: tempo de retenção
Ik: Irradiância de Saturação	UV: ultravioleta
Kd: Coeficiente de atenuação da	UVA: radiação ultravioleta A
luz na água	UVB: radiação ultravioleta B
LC-MS: cromatografia líquida	UVC: radiação ultravioleta C
acoplada a espectrometria de	UVR: radiação ultravioleta
massas	

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	18
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Espécie de estudo:	30
3.2. Local do Cultivo	31
3.3. Experimento de Cultivo	32
3.3.1. Variação durante o período de luz do dia :	34
3.3.2. Variação durante quatro semanas de cultivo:.....	35
3.4. Curvas Rápidas de Luz (CRL) e Rendimento Quântico Efetivo (RQE)	36
3.5. Coeficiente de atenuação da luz na água (K_d)	37
3.6. Conteúdo pigmentar	37
3.6.1. Ficobiliproteínas	37
3.6.2. Clorofila-a e Carotenoides	38
3.7. Aminoácido tipo Micosporina (MAA)	39
3.8. Conteúdo proteico	39
3.9. Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).....	40
3.10. Lipídeos Totais.....	41
3.11. Ácidos Graxos.....	41
3.12. Análise de Carbono, Nitrogênio e Fósforo Total tecidual.....	42
3.13. Ágar.....	42
3.14. Técnicas em Biologia Molecular	43
3.14.1. Extração RNA	43
3.14.2. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	43
3.14.3. Primers.....	44
3.15. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Experimento de Variação durante o período de luz do dia.....	49
4.1.1. Radiação PAR.....	49
4.1.2. Radiação UV	50
4.1.3. Precipitação Pluviométrica.....	52
4.1.4. Características da coluna d'água.....	53
4.1.5. Curvas Rápidas de Luz e RQE	58
4.1.5.1. Rendimento Quântico Efetivo (RQE)	58
4.1.5.2. Eficiência Fotossintética (α)	60
4.1.5.1. Taxa máxima de transporte de elétrons (rETRmax)	62
4.1.5.1. Irradiância de Saturação (I_k).....	63
4.1.6. Ficobiliproteínas	65

4.1.6.1.	Ficoeritrina.....	65
4.1.6.2.	Ficocianina	67
4.1.7.	Proteína Solúvel Total.....	69
4.1.8.	Clorofila-a	71
4.1.9.	Pigmentos carotenoides.....	73
4.1.10.	Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs)	77
4.1.11.	Glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	81
4.1.12.	Expressão gênica.....	84
4.1.12.1.	Estação seca x chuvosa	85
4.1.12.2.	Profundidade de 70 cm x Superfície	87
4.1.12.1.	Amanhecer x Meio-dia e Amanhecer x Entardecer	90
4.2.	Experimento de variação durante quatro semanas de cultivo	94
4.2.1.	Radiação PAR.....	94
4.2.2.	Radiação UV	95
4.2.3.	Precipitação pluviométrica	96
4.2.4.	Características da coluna d'água	97
4.2.5.	Curvas Rápidas de Luz e Rendimento Quântico Efetivo (RQE).....	100
4.2.5.1.	Rendimento Quântico Efetivo (RQE)	100
4.2.6.	Eficiência Fotossintética (α)	102
4.2.7.	Taxa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$)	104
4.2.8.	Irradiância de Saturação (I_k)	106
4.2.9.	Ficobiliproteínas	108
4.2.9.1.	Ficoeritrina.....	108
4.2.9.2.	Ficocianina	110
4.2.10.	Proteína Solúvel Total.....	112
4.2.11.	Clorofila-a	114
4.2.12.	Pigmentos carotenoides.....	116
4.2.13.	Micosporina tipo aminoácido (MAA)	121
4.2.14.	Glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	125
4.2.15.	Conteúdo tecidual total de Carbono (C), Nitrogênio (N) e Fósforo (P) 128	
4.2.15.1.	Carbono (C).....	128
4.2.15.2.	Nitrogênio (N).....	130
4.2.15.3.	Fósforo (P)	132
4.2.16.	Lipídeos Totais e Ácidos Graxos	134
4.2.17.	Rendimento do Ágar	141
5.	DISCUSSÃO	144
5.1.	Experimento de Variação durante o período de luz do dia.....	145
5.2.	Experimento de Variação durante quatro semanas de cultivo	154
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
8.	ANEXO.....	180

1. *INTRODUÇÃO*

A radiação solar é essencial para a vida na superfície da Terra, mas paradoxalmente é também um fator de estresse ambiental para os organismos vivos. Atualmente o planeta enfrenta um de seus maiores problemas ambientais, que é a destruição da camada de ozônio, o que tem resultado no aumento da radiação, principalmente UVB, o que é prejudicial à vida de homens, animais e plantas (Kirchhoff et al., 2000).

A partir dos anos 60, percebeu-se uma nítida diminuição do conteúdo da camada de ozônio. Esta diminuição, que é da ordem de 4% por década, em média, continua ainda hoje, e deve permanecer nesta tendência por várias décadas (Kirchhoff et al., 2000).

O aumento da radiação solar, como consequência da diminuição do ozônio estratosférico, tem sido indicado como o maior fator de estresse para muitos organismos fototróficos no ecossistema aquático (Franklin & Forster, 1997; Aguilera et al., 1999; Karsten et al., 2001). Além da concentração de ozônio a radiação solar na superfície terrestre é função de outras variáveis, como o ângulo solar zenital, o que determina radiações muito mais elevadas em menores latitudes (Kirchhoff et al., 2000).

Estudos de aclimação a radiação são muito importantes, especialmente em regiões tropicais. Nessas regiões os organismos são mais afetados, especialmente os fotossintetizantes.

Macroalgas que habitam a zona intertidal, constituem um grupo de organismo que está especialmente exposto a radiação solar, pois enfrentam diariamente grandes variações na incidência de luz. Essa maior flutuação na radiação está relacionada às variações na maré. Na maré baixa a alga fica

completamente exposta à radiação solar e na maré alta completamente submersa. Diante disso, essas algas desenvolveram uma série de estratégias fisiológicas para suportar as diferentes condições impostas pelo ambiente. Essas estratégias incluem a capacidade de se fotoproteger e reparar os danos sofridos, reprimindo os efeitos adversos do estresse oxidativo celular, causado por diferentes fatores de estresse ambiental (Aguilera, 2002).

Os aspectos ambientais e do organismo tornam relevantes os estudos de fotoaclimação com macroalgas marinhas, pois algumas espécies exibem estratégias de fotoadaptação que resultam no seu sucesso em colonizar diferentes áreas.

Há na literatura muitos estudos sobre o efeito da radiação no metabolismo das plantas e eles mostram, dentre outros efeitos, a inibição da fotossíntese e do crescimento. No entanto, a maior parte desses estudos é realizada em plantas superiores (Bischof, 2000). Já no ambiente marinho a maioria dos estudos ecofisiológicos dos produtores primários é referente ao fitoplâncton (Davidson et al., 1996; Lesser, 1996; Buma et al., 1997; Riegger & Robinson, 1997; Neale et al., 1998; Jeffrey et al., 1999) e aos corais (Dunlap & Shick, 1998), enquanto estudos com macroalgas, especialmente rodofíceas, são poucos.

Embora as macroalgas sejam ecologicamente importantes na produtividade primária dos ambientes costeiros, servindo como fonte de alimento a herbívoros e detritívoros e como berçário para invertebrados e peixes, há ainda muitas lacunas no conhecimento de como esses organismos são constantemente afetados pelos fatores ambientais e como eles se

aclimatam. Poucos estudos consideram a ação sinérgica dos fatores sobre macroalgas e um número ainda menor considera a ação desses fatores nas algas, em seu ambiente natural.

O Estado do Rio Grande do Norte, localizado na região litorânea do nordeste brasileiro (latitude 05°30'00" Sul e longitude 35°15'00" Oeste), apresenta os mais elevados índices de radiação do Brasil, inclusive UVB, com valores similares até mesmo aos registrados em regiões montanhosas da Bolívia (Kirchhoff, 2000). Esta região por estar próxima à linha do equador tem a camada de O₃ naturalmente mais delgada e a radiação solar é muito mais intensa e grande parte é difusa e com alta luminosidade (Silva et al., 2008).

Nas praias do Rio Grande do Norte há uma grande diversidade de macroalgas. A rodofícea *Gracilaria domingensis* é comumente encontrada por todo o litoral e no município de Rio do Fogo (RN) apresenta-se em três cores (variantes cromáticas): verde, vermelha e marrom. Esta espécie é facilmente observada na zona intertidal e é capaz de resistir às variações ambientais impostas ao longo do dia e ao longo do ano, sendo encontrada em todas as estações.

A resistência desta espécie às diferentes e extremas condições ambientais de radiação, temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e hidratação enfrentadas durante a maré baixa é resultado do desenvolvimento de diversas estratégias de aclimação e fotoproteção. Portanto, essas estratégias são aspectos chaves na sobrevivência desta espécie, o que a torna interessante do ponto de vista científico, para estudos

de fotoaclimatação e fotoproteção. Além disso, a ocorrência de variantes cromáticas (resultado de mutação espontânea, que ocorreu devido a condições ambientais impostas ou por uma combinação particular de genes) torna a espécie ainda mais atrativa para estudos fotobiológicos. Alguns estudos têm sugerido que as diferentes cores exibidas pelas variantes são resultados de diferentes concentrações pigmentar, o que resulta em diferentes estratégias de fotoproteção e fotoaclimatação dentro da espécie (Guimarães et al., 2003; Yokoya et al., 2007).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo das alterações bioquímicas e ecofisiológicas na macroalga marinha *Gracilaria domingensis* submetida a diferentes condições ambientais.

Com esta finalidade foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- i. Realização de experimento de cultivo no mar com três linhagens cromáticas de *G. domingensis*, em diferentes profundidades e duas estações do ano;
 - a. Determinação dos parâmetros abióticos tais como, temperatura, salinidade, irradiância (PAR e UV), pH, sólidos totais dissolvidos, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio e nutrientes dissolvidos (amônia, nitrato, nitrito e fósforo)
 - b. Quantificação de lipídeos totais;
 - c. Determinação quantitativa e qualitativa do teor de ácidos graxos;
 - d. Determinação quantitativa e qualitativa dos aminoácidos tipo micosporina;
 - e. Determinação da concentração de ficobiliproteínas e clorofila-*a*;
 - f. Determinação e quantificação de pigmentos carotenoides;
 - g. Determinação da concentração de glutatona oxidada e reduzida;
 - h. Determinação do conteúdo tecidual total de nitrogênio, carbono e fósforo;
 - i. Determinação da eficiência fotossintética do PSII e curvas rápidas de luz, utilizando técnica de fluorescência de pulso de amplitude modulada (PAM);
 - j. Extração do RNA e determinação da expressão gênica dos seguintes genes: actina, rbcL, psbA, psaA e HSP 90.
 - k. Rendimento do Ágar

3. *MATERIAIS E MÉTODOS*

3.1. Espécie de estudo:

A rodofícea *Gracilaria domingensis* (Sonder ex Kützinger) Dickie (**Figura 1**) é uma espécie comumente encontrada na costa brasileira, ocorrendo desde o Estado do Ceará até Santa Catarina, frequentemente em associação com outras espécies de *Gracilaria* na zona intertidal (Oliveira, 1998; Guimarães et al, 2003). Esta espécie ocorre durante todo o ano e apresenta um forte potencial econômico, pois é produtora de ficocolóide e utilizada como alimento *in natura* na dieta humana (Oliveira, 1998).

Gracilaria domingensis pode chegar a 35 cm de altura e é densamente ramificada em um só plano, principalmente junto à base. Esta alga é amplamente distribuída no litoral do Rio Grande do Norte, facilmente encontrada fixa a arrecifes, onde está exposta a fatores de estresses que exigem respostas fisiológicas rápidas. Variantes cromáticas (vermelho, verde, roxo e marrom) e morfológicas são facilmente observadas na maré baixa.

Figura 1: Linhagens cromáticas de *G. domingensis* (vermelha, verde e marrom).

3.2. Local do Cultivo

O estudo foi realizado no Município de Rio do Fogo (5° 16'37.54" Sul; 35° 22'37.34" Oeste), localizado no litoral Oriental do Rio Grande do Norte, a 81 km de Natal (RN) (**Figura 2**). Rio do Fogo apresenta uma grande extensão de praias semidesertas, prevalecendo na economia local a pesca artesanal e o turismo. Junto com os municípios de Touros e Maxaranguape, Rio do Fogo faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) dos Recifes de Corais e é uma importante região de preservação da biodiversidade marinha.

Figura 2: Localização da área onde foi realizado o cultivo de *G.domingensis* (Rio do Fogo-RN).

O município possui um clima do tipo tropical chuvoso com verão seco e estação chuvosa de março a agosto, temperatura média anual em torno de 25,8 °C e umidade relativa média anual de 75%, possuindo menos de 100 metros de altitude (IDEMA, 2008).

As praias de Rio do Fogo apresentam uma grande diversidade de macroalgas marinhas, sendo observada uma grande quantidade de espécies do gênero *Gracilaria* crescendo fixa a arrecifes de arenito por toda a zona intertidal.

3.3. Experimento de Cultivo

O experimento foi realizado com a confecção e implantação da estrutura de cultivo no mar. A estrutura utilizada foi confeccionada com

cordas nylon, canos de PVC, blocos de concreto e recipiente de pet transparente (onde foram acondicionadas as algas). Para cada linhagem foram utilizados três recipientes (contendo inicialmente ~30 g de alga) na superfície e três em 70 cm de profundidade. As algas da estrutura superior foram mantidas constantemente na superfície, enquanto em 70 cm as algas sofreram uma ligeira variação na profundidade (± 10 cm) em função do nível da maré (**Figura 3**). A estrutura foi projetada de forma a manter a constante circulação e troca da água com o meio nos recipientes contendo as algas.

As algas utilizadas durante o experimento foram coletadas e triadas nas praias de Rio do Fogo. Após a triagem as algas foram colocadas imediatamente na estrutura de cultivo, permanecendo por um período de 10 dias (aclimatação) para que todas estivessem na mesma condição no início do experimento.

Figura 3: Esquema da estrutura utilizada para o cultivo das algas no mar em diferentes profundidades e detalhe do recipiente de pet utilizado. Durante o experimento foi utilizado uma estrutura para cada linhagem.

3.3.1. Variação durante o período de luz do dia :

Para o experimento de variação durante o período de luz do dia , foram feitas medidas de fotossíntese e coleta de amostra das três linhagens ao longo do dia (amanhecer, meio-dia e entardecer), durante três dias seguidos. Durante o amanhecer, as medidas foram realizadas às 5 h, 6 h e 7 h; durante o meio-dia, às 11 h, 12 h e 13 h; e ao entardecer, às 16 h, 17 h e 18 h. Este experimento para verificação da variação durante o período de luz do dia foi realizado em duas etapas, a primeira etapa na estação chuvosa (Julho, 2011) e a segunda, alguns meses depois, na estação seca (Fevereiro, 2012).

Dados abióticos, tais como temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio e sólidos totais dissolvidos (TDS) foram verificados durante todas as etapas do experimento, utilizando um aparelho multiparâmetros (HI-9828, HANNA). Os dados de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (400 - 700 nm) na superfície e coluna d'água foram determinados usando o medidor de quanta Li-250A e Li-2500 com o sensor (PAR) Li-193. Os níveis de radiação ultravioleta A (315 – 400 nm) e B (315 – 280 nm) foram monitorados e fornecidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Também foi feita coleta de água para análise de nutrientes dissolvidos (fósforo inorgânico dissolvido (PID), nitrato, nitrito e amônio), que foi realizada no Laboratório de Macroalgas (Departamento de Oceanografia e Limnologia, UFRN) de acordo com a metodologia proposta por Strickland & Parsons (1972).

Simultaneamente às medidas de fotossíntese, amostras de alga foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, exceto as amostras destinadas a determinação da expressão gênica, que foram submergidas em tubo *falcon* estéril contendo *RNA later*[®] (Applied Biosystems), seguindo protocolo do reagente. Posteriormente as amostras foram acondicionadas a -20°C até o momento do transporte para o Laboratório de Macroalgas (Departamento de Oceanografia e Limnologia, UFRN), onde foi armazenado a -80°C. O armazenamento em Rio do Fogo foi feito em um freezer de uma peixaria local (durante esse período as amostras foram acondicionadas em recipiente plástico fechado). No fim do experimento, todo o material foi transportado para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas no Instituto de Química da USP, São Paulo-SP. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo seco para garantir a manutenção da baixa temperatura.

3.3.2. Variação durante quatro semanas de cultivo:

O experimento de variação durante quatro semanas de cultivo foi executado sob a mesma metodologia descrita para o experimento de variação durante o período de luz do dia, exceto os horários e intervalos de medidas. Nesta etapa do experimento, após o período de aclimação, as medidas de fotossíntese (e simultânea coleta do tecido algal) foram realizadas entre 9 h e 12 h, um dia por semana, durante quatro semanas seguidas.

3.4. Curvas Rápidas de Luz (CRL) e Rendimento Quântico Efetivo (RQE)

Os parâmetros fotossintéticos foram obtidos a partir de medidas de fluorescência da clorofila realizadas *in vivo* com o fluorômetro subaquático com pulso de amplitude modulada, DIVING-PAM (WALZ, Germany). Para cada tratamento foram utilizadas três amostras individuais e em cada amostra, dois parâmetros principais foram determinados: a taxa de transporte de elétrons relativa (*rETR*):

$$rETR = \frac{\Delta F}{F_m'} \times PAR \times 0,5$$

e o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (RQE),

$$\frac{\Delta F}{F_m'} = \frac{(F_m' - F)}{F_m'}$$

onde *F* e *F_m'* correspondem a fluorescência máxima e mínima da planta aclimatada a luz. O RQE fornece um valor aproximado da proporção de energia absorvida sendo utilizada na fotoquímica.

Foram realizadas curvas de fotossíntese vs. irradiância com base nos valores de *rETR* obtidos em níveis crescentes de irradiância. Os parâmetros derivados da curva foram calculados pela equação de Platt et al. (1980): eficiência (α) e capacidade (*rETR*_{max}) da fotossíntese. CRL mostram a aclimação do aparato fotossintético a uma faixa de intensidade luminosa (Ralph & Gademenn, 2005)

3.5. Coeficiente de atenuação da luz na água (K_d)

O coeficiente de atenuação da luz na água (K_d) foi calculado de acordo com a equação:

$$K_d = \frac{(\ln(E_o) - \ln(E_z))}{z}$$

Onde, E_o é a irradiância na superfície e E_z é a irradiância na profundidade z . Os valores de K_d foram calculados sempre ao meio dia, pois esse valor é alterado pela ângulo de incidência solar. O coeficiente de atenuação é um parâmetro importante, pois quantifica a presença da luz na água.

3.6. Conteúdo pigmentar

Para extração dos pigmentos e de todos os outros compostos, as algas foram liofilizadas (Liofilizador Labconco, Free Zone 12) até obtenção de um peso constante. Em seguida foram trituradas até obtenção de um pó fino com o auxílio de *beads* (inox, 5mm) no triturador (Retsch, MM301) em frequência máxima por 2 min. Todas as amostras foram mergulhadas em N_2 líquido, para garantir a baixa temperatura durante todo o processo de trituração.

Todo o processo (liofilização, trituração e extração) foi feito evitando-se a incidência de luz, através do uso de papel alumínio e tubos âmbar.

3.6.1. Ficobiliproteínas

A extração das ficobiliproteínas foi feita com 5 mg de alga triturada e suspensa em 1 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 6,8). Com o

auxílio de *vortex* a solução foi agitada por 1 min e mantida a 4 °C por 24 h. Após esse período a amostra foi centrifugada por 20 min (10000 g; 4 °C) e o sobrenadante coletado e quantificado no leitor de microplacas (Tecan Infinite 200) nos comprimentos de onda 455, 564, 592, 618 e 645 nm.

As concentrações foram calculadas de acordo com as equações propostas por Beer & Eshel (1985):

$$E = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) 0,20] 0,12$$

$$C = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) 0,51] 0,15$$

onde E é a ficoeritrina (mg.mL⁻¹) e C a ficocianina (mg.mL⁻¹).

3.6.2. Clorofila-a e Carotenoides

A extração dos pigmentos carotenoides e clorofila-a foi realizada com 75 mg de alga triturada, suspensa em 1,5 mL metanol:dimetilformamida (1:1). A mistura foi homogeneizada em *vortex*, submetida ao banho de ultrassom por 15 min (10 °C) e mantida a 4 °C por 24 h. A amostra foi então, centrifugada (10000 rpm, 5 min, 4 °C) e 1,3 mL do sobrenadante foi coletado e submetido ao *speed-vac* para total evaporação do solvente. O pó resultante foi ressuspenso em 400 µL de metanol, misturado em *vortex* (1 min) e submetido ao banho ultrassom (10 °C; 15 min). A solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e 50 µL foram injetados em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), seguindo o método descrito por Guarantini et al (2009).

Soluções estoque de anteraxantina e violaxantina, em etanol, foram obtidas da DHI Water & Environmental (Copenhagen, Denmark) e

estocadas a -80°C . β -caroteno zeaxantina e clorofila-*a*, foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA).

3.7. Aminoácido tipo Micosporina (MAA)

A determinação e quantificação das micosporinas foi feita através da adição de 1 mL de metanol a 20 mg de biomassa (liofilizada e triturada). Após misturar por 1 min em *vortex*, a amostra foi mantida a 4°C (protegida da luz) por 24 h. Após esse período, foi centrifugada (10000 rpm; 10 min) e o sobrenadante coletado e evaporado em *speed-vac* (sistema de temperatura desligado). O extrato seco foi ressuspendido em 300 μL de ácido fórmico 0,1% contendo 5 mmol.L^{-1} de acetato de amônio e 200 μL de clorofórmio. A amostra foi misturada em *vortex* e centrifugada (10000 rpm; 10 min; 25°C). A fase aquosa foi coletada e analisada em LC-MS, seguindo metodologia desenvolvida por Marques et al., 2014.

A quantificação foi feita de forma comparativa entre os tratamentos, tendo como base a área dos picos identificados. Os valores das áreas dos picos foram normalizados, considerando o valor mínimo obtido como 1 e o máximo 10.

3.8. Conteúdo proteico

O teor de proteínas solúveis totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando o *Kit BioRad Protein Assay* (BioRad, Germany). A quantificação foi feita recolhendo-se 50 μL do sobrenadante obtido na extração das ficobiliproteínas, que foi adicionados a 750 μL de água ultra pura (*Milli-Q*). A essa solução foram acrescentados 200 μL do reagente

BioRad. Após o desenvolvimento da cor (5 min) foram realizadas as leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 595 nm, utilizando leitor de microplacas (Tecan Infinite 200). Os resultados foram comparados com soluções padrões de albumina bovina (BSA) na faixa de concentração de 0 a 10 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

3.9. Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A extração de glutathiona foi feita com a adição de 1 mL de metanol e 40 μL de N-etilmaleimida (NEM) a 7 mg de alga triturada. O NEM reage com GSH e forma um complexo estável impedindo sua oxidação durante o processo de extração e quantificação. O γ -glutamil glutamato (γ -Glu-Glu) foi utilizado como padrão interno.

A amostra foi homogeneizada em *vortex* (1 min) e submetida a banho ultrassom por 30 min (10 °C) e em seguida centrifugado por 3 min (10000 g a 4 °C). O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo, onde foram adicionados 750 μL de clorofórmio e 500 μL de água ultra pura (*Milli-Q*). A solução foi homogeneizada em *vortex* (1 min) e centrifugada por 3 min (10000 g a 4 °C). A fase metanol-água foi coletada e analisada em sistema LC-MS, com sistema de cromatografia (1200 series, Agilent) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP LC/MS/MS, Applied), seguindo método descrito em Decleva (2012).

3.10. Lipídeos Totais

O teor de lipídeos totais foi determinado seguindo o método descrito por Bligh & Dyer (1959). A 33 mg de biomassa (liofilizada e triturada) foram adicionados 200 μL de tampão PBS, 12,5 μL de tritridecanoína em hexano 5 mg.mL^{-1} (padrão interno), 500 μL de metanol e 250 μL de clorofórmio com BHT. A solução foi agitada por 1 min em *vortex*. Seguiu-se a adição de 250 μL de clorofórmio e 250 μL de água. A amostra foi centrifugada (1000 g, 5 min, 4 °C) e a fase clorofórmica transferida para novo frasco e submetida a atmosfera de N_2 até obtenção de peso constante. O conteúdo total de lipídeos foi determinado gravimetricamente e o resíduo foi transmetilado para determinação do conteúdo de ácidos graxos.

3.11. Ácidos Graxos

A reação de metilação dos ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, *fatty acid methyl ester*) foi feita dissolvendo-se o extrato seco de lipídeos em 1 mL de BF_3 (diluído em metanol, 7 %) e 500 μL de tolueno. A solução foi submetida a 100 °C por 1 h. Após esfriar em temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de hexano e 2,5 mL de água. A solução foi agitada em *vortex* e a fase hexânica coletada e injetada em sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), seguindo metodologia descrita em Martins 2013.

A quantificação dos FAME foi feita a partir da equação da reta da curva padrão (Supelco 37). Para os FAME ausentes no padrão Supelco, a

quantificação foi feita considerando a concentração do padrão interno (C13:0), já que a área do pico é proporcional à concentração de FAME.

3.12. Análise de Carbono, Nitrogênio e Fósforo Total tecidual

A análise de Carbono, Nitrogênio e Fósforo total tecidual foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP, a partir de biomassa seca.

3.13. Ágar

O ágar foi quantificado a partir de 20 mg de biomassa (liofilizada e triturada) ressuspensa em 1 ml de água ultra pura (*Milli-Q*), pH 6,3. O extrato foi mantido sob agitação vertical, em temperatura ambiente, por 12 h. Após esse período, a amostra foi submetida a 110 °C por 2 h. O extrato foi filtrado com auxílio de seringa e filtro de papel a 70 °C. O filtrado foi congelado por 3 h, descongelado e lavado com água ultra pura. O gel resultante foi seco a 60 °C até obtenção de peso constante.

O rendimento do ágar foi determinado apenas nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, durante a estação chuvosa e na superfície, durante a estação seca. A redução nas amostras analisadas ocorreu em função do pouco tempo, sendo escolhidas as amostras de condições mais contrastantes.

3.14. Técnicas em Biologia Molecular

3.14.1. Extração RNA

A espécie *G. domingensis*, produz uma grande quantidade de ágar, sendo a contaminação do RNA com o ágar, um problema persistente. Dessa forma, foi realizada a otimização da extração através do uso do reagente de extração PureLink Plant RNA Reagent (Invitrogen) e purificação com o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Durante o processo de purificação foi feita a digestão do DNA utilizando o kit RNase-Free DNase (Qiagen). Dessa maneira, o problema de contaminação foi solucionado garantindo uma ótima qualidade do RNA para as etapas posteriores.

A expressão gênica entre os diferentes tratamentos foi feita em três etapas, inicialmente comparando os níveis de expressão entre as algas cultivadas em diferentes épocas do ano, estação chuvosa e seca; posteriormente comparando entre as algas cultivadas no mesmo momento, na superfície e na profundidades de 70; e por último as algas cultivadas ao mesmo tempo, na mesma condição ambiental, coletadas durante três períodos do dia, amanhecer, meio dia e entardecer.

3.14.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total purificado e descontaminado de DNA seguindo o protocolo do Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System SuperMix (Invitrogen).

3.14.3. Primers

Os *primers* foram construídos manualmente e analisados no software OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Neste software foram analisados a proporção de GC, a temperatura de *melting* (T_m), as condições em que a sequência do *primer* poderia formar dobramentos como *hairpin* e dímeros de primer, como *selfdimer*.

Os *primers* foram desenhados através da sequência de nucleotídeos disponibilizadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), da própria *G. domingensis* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*)). Os *primers* que foram construídos para os outros genes, que não tinham sequência disponível para a espécie em estudo, foram construídos com base nas sequências de outras espécies de *Gracilaria* ou rodófitas. As sequências foram alinhadas e as regiões conservadas foram identificadas com a utilização do software ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os *primers* foram então construídos baseados nas sequências mais conservadas.

Neste estudo foram utilizados os seguintes genes:

- Actina, como controle interno.
- *rbcL*, que codifica a subunidade maior de ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenasse (RuBisCo). A RuBisCo tem 8 subunidades grandes, codificada pelo gene *rbcL* e 8 subunidades pequenas, codificadas pelo gene *rbcS*. Em

algas vermelhas, diferentemente de plantas terrestres e algas verdes, as duas subunidades são codificadas no cloroplasto e a expressão gênica das duas subunidades é altamente coordenada (Rodermel et al., 1996).

- psbA (photosystem II thylakoid membrane protein D1), que codifica a proteína D1 que faz parte do fotossistema II. Essa proteína é codificada pelo genoma do cloroplasto e é o primeiro alvo de dano durante o processo de foto-oxidação (Witzel et al., 2010).
- psaA (photosystem I P700 apoprotein A1), que codifica a apoproteína A do fotossistema I (P700). O fotossistema I é um complexo transmembrana composto por 12 proteínas diferentes que produzem o NADPH utilizado na redução do CO₂ durante as reações do ciclo de calvin. PsaA e PsaB coordenam as duas clorofilas formando o dímero P700, portanto, PsaA forma o *core* do PSI (Frias-Lopes et al., 2004).
- HSP 90 (heat shock protein 90), que codifica uma proteína de choque térmico, cuja função principal em resposta a estresse é renovar proteínas desnaturadas. A síntese de HSP 90 em condições de estresse é aumentada, podendo redirecionar o metabolismo celular para uma maior tolerância ao estresse (Becker, 1994).

Esses *primers* foram inicialmente testados com PCR convencional usando o DNA genômico de *G. domingensis*. O protocolo utilizado foi o AmpliTaq GOLD PCR Master Mix (Applied Biosystems). Após confirmação de amplificação em PCR convencional foi feita a curva de diluição em PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A curva foi construída usando 5 diluições de dez vezes com amostras de cDNA de *G. domingensis*. O valor de ΔC_T obtido para cada diluição foi plotado em um gráfico com o logaritmo da diluição. Uma reta foi ajustada para os pontos afim de verificar a eficácia do experimento. Além disso, foram analisadas as curvas de *melting*, confirmando a ausência de contaminantes e/ou dímeros de *primers*.

Neste experimento, as algas foram submetidas a diferentes condições ambientais, em diferentes épocas do ano, não sendo possível estabelecer um calibrador. Dessa forma o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ não pôde ser aplicado e o método mais adequado para este estudo foi:

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-(C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ gene usado como controle interno})}$$

A partir dos valores obtidos com esse método foram então calculados a média e o desvio padrão para cada gene nos diferentes tratamentos. A diferença na expressão dos genes entre os tratamentos foi analisada a partir da razão entre os valores médio (Schmittgen & Livak, 2008).

3.15. Análise Estatística

Os dados foram inicialmente analisados por meio de medida de tendência central (média), medidas de dispersão (desvio padrão) e

verificação da normalidade e homocedasticidade da distribuição. A diferença nos valores dos parâmetros ambientais, entre os diferentes tratamentos, foi testada através de análise de variância, ANOVA *two-way* e as diferenças nos valores dos parâmetros fotossintéticos e bioquímicos entre as diferentes linhagens de *G. domingensis* e os tratamentos foram testados através da análise de variância, ANOVA *three-way*. Essas análises foram acompanhadas de testes Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas (testa as diferenças entre as amostras par a par). Os parâmetros fotossintéticos e bioquímicos de cada linhagem foram correlacionados com os parâmetros ambientais correlacionados (através da correlação de Pearson), para estimar o efeito destes parâmetros em cada linhagem estudada.

Os gráficos foram construídos em *box plot* seguindo sugestão de Krzywinski e Altman (2014) em *Nature Methods*. Os autores recomendam a substituição dos gráficos de coluna por *box plot*. Diferente de gráficos de coluna onde observa-se apenas a média e o desvio padrão, no gráfico tipo *box plot* é possível observar a distribuição dos dados através do valor mínimo (primeiro quartil), mediana (segundo quartil) e valor máximo (terceiro quartil).

4. *RESULTADOS*

4.1. Experimento de Variação durante o período de luz do dia

4.1.1. Radiação PAR

Os valores médios de radiação PAR obtidos na estação seca foram quatro vezes superiores aos obtidos na estação chuvosa (**Tabela 1**). Além disso, a dinâmica da radiação solar durante o dia também diferiu (**Figura 4**). Na estação chuvosa os valores mais elevados foram registrados às 7 h e às 16 h. Na estação seca foram registrados às 11 h, 12 h e 13 h. Essa diferença nos horários está relacionada à ocorrência de chuvas na estação chuvosa principalmente no período do meio-dia (**Figura 6**).

Figura 4: Medidas de radiação PAR ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) no experimento de variação durante o período de luz do dia . (a) Estação chuvosa e (b) Estação seca.

Tabela 1. Variação da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ($\mu\text{mol. fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação no período de luz do dia, nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e F (ANOVA *three-way*).

Horários	PAR			
	Chuvoso		Seco	
	<i>Superfície</i>	<i>70 cm</i>	<i>Superfície</i>	<i>70 cm</i>
<i>Amanhecer</i>				
5 hs	0,11±0,04	0,07±0,02	0,21±0,097	0,16±0,01
6hs	289,70±87,89	239,6±55,44	106,0±17,39	31,48±8,02
7hs	699,32±126,39	426,33±16,93	1450,0±287,08	164,95±6,01
<i>Meio dia</i>				
11hs	558,47±28,67	198,28±16,29	3613,33±494,83	1329,07±357,84
12hs	478,05±52,54	194,24±125,94	3858,50±94,46	1264,01±264,46
13hs	288,2±17,11	65,30±12,51	3153,0±411,53	1246,16±460,64
<i>Entardecer</i>				
16hs	657,45±184,75	460,7±99,4	590,54±33,32	261,45±153,12
17hs	30,53±11,17	20,13±8,57	86,29±9,38	26,09±10,99
18hs	0,005±0,002	0,009±0,001	1,87±0,88	0,42±0,32
<i>ANOVA Three-way</i>				
Fatores				
<i>Efeito Principal</i>				
Estação (A)	$F_{[1;107]}=562,712^{**}$			
Profundidade (B)	$F_{[1;107]}=350,995^{**}$			
Horário (B)	$F_{[8;107]}=191,120^{**}$			
<i>Interação</i>				
AxB	$F_{[1;107]}=181,289^{**}$			
AxC	$F_{[8;107]}=146,409^{**}$			
BxC	$F_{[8;107]}=46,325^{**}$			
AxBxC	$F_{[8;107]}=29,053^{**}$			

(**): Variações altamente significativas ($p<0,001$)

4.1.2. Radiação UV

As radiações ultravioleta A (UVA) e B (UVB) também variaram de forma significativa entre as duas estações e entre os horários de medida (**Tabela 2**). Os valores mais elevados foram observados na estação seca (**Figura 5**). Nesta estação os maiores índices de UVA e UVB foram registrados às 12 h e não diferiram de forma significativa dos valores

observados às 10h30, 11 h, 11h30 e 12h30 (**Tabela 2**). Já na estação chuvosa, o valor de radiação UVA observado às 12 h foi significativamente ($p<0,001$) superior a todos os outros valores observados nos demais horários. A radiação UVB registrada às 12 h na estação chuvosa também apresentou valor superior a todos os outros horários, exceto ao observado às 10h30 (**Tabela 2**). Os valores de radiação UV antes das 7 h e depois das 16 h, foram excluídos, pois eram iguais a zero.

Figura 5: Variação da radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento de variação no período de luz do dia, nas duas estações.

Tabela 2. Radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento *variação durante o período de luz do dia*, nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e *F* (ANOVA *two-way*).

Horários	Radiação			
	UV-A		UV-B	
	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco
7h	0,026±0,001	0,054±0,005	0,0013±0,0001	0,0026±0,0003
7h30	0,050±0,005	0,096±0,009	0,0042±0,0001	0,0071±0,0004
8h	0,087±0,007	0,126±0,017	0,0091±0,0009	0,0166±0,0020
8h30	0,076±0,002	0,158±0,024	0,0140±0,0017	0,0245±0,0023
9h	0,106±0,007	0,210±0,007	0,0172±0,0028	0,0356±0,0012
9h30	0,114±0,002	0,228±0,006	0,0211±0,0024	0,0470±0,0017
10h	0,109±0,012	0,263±0,002	0,0231±0,0017	0,0559±0,0005
10h30	0,157±0,023	0,268±0,010	0,0433±0,0006	0,0630±0,0022
11hs	0,184±0,007	0,273±0,017	0,0347±0,0111	0,0655±0,0029
11h30	0,144±0,006	0,277±0,006	0,0311±0,0037	0,0664±0,0026
12h	0,210±0,012	0,285±0,006	0,0447±0,0024	0,0676±0,0017
12h30	0,172±0,046	0,277±0,004	0,0344±0,0105	0,0634±0,0011
13h	0,147±0,038	0,243±0,021	0,0290±0,0059	0,0578±0,0002
13h30	0,116±0,024	0,239±0,008	0,0204±0,0040	0,0486±0,0005
14h	0,132±0,011	0,204±0,002	0,0202±0,0022	0,0376±0,0001
14h30	0,088±0,002	0,169±0,003	0,0130±0,0011	0,0269±0,0006
15h	0,072±0,015	0,133±0,005	0,0071±0,0012	0,0168±0,0005
15h30	0,049±0,007	0,095±0,003	0,0034±0,0005	0,0090±0,0004
16h	0,026±0,001	0,062±0,003	0,0009±0,0000	0,0035±0,0002

ANOVA Two-way

Fatores

Efeito Principal

Estação (A) $F_{[1;113]}=966,630^{**}$

$F_{[1;113]}=953,999^{**}$

Horário (B) $F_{[18;113]}=119,444^{**}$

$F_{[18;113]}=210,320^{**}$

Interação

AxB $F_{[18;113]}=9,101^{**}$

$F_{[18;113]}=19,308^{**}$

(**): Variações altamente significativas ($p<0,001$)

4.1.3. Precipitação Pluviométrica

Os níveis de precipitação pluviométrica variaram de forma significativa entre as duas estações ($F=27,22$; $p<0,001$) e foram mais elevados durante a estação chuvosa (**Figura 6**). O aumento da precipitação pluviométrica

observado às 10 h e principalmente às 13 h coincidiu com a baixa radiação PAR observada neste período.

Figura 6: Variação nos níveis de precipitação pluviométrica (acumulado de três dias) durante o experimento variação durante o período de luz do dia, na estação chuvosa e seca.

4.1.4. Características da coluna d'água

O K_d apresentou variação significativa entre as duas estações de cultivo ($F=303,6$; $p<0,001$). (**Tabela 3**). Valores de K_d superiores na estação chuvosa indicam uma maior atenuação da luz na água neste período, o que significa menor transparência e menor penetração da luz.

O K_d apresentou correlação positiva com o TDS ($r=0,64$; $p<0,05$) e os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=0,62$; $p<0,05$), nitrato ($r=0,52$; $p<0,05$), nitrito ($r=0,77$; $p<0,001$) e PID ($r=0,55$; $p<0,05$).

Tabela 3. Variação do coeficiente de atenuação da penetração da luz na água (K_d) no local de cultivo das algas, durante o experimento variação durante o período de luz do dia, nas duas estações.

Dia	$K_d (m^{-1})$	
	Chuvosa	Seca
D1	$2,20 \pm 0,25$	$1,43 \pm 0,27$
D2	$2,45 \pm 0,28$	$3,17 \pm 0,89$
D3	$5,16 \pm 0,22$	$2,34 \pm 0,56$

Os parâmetros ambientais de temperatura, saturação do oxigênio e oxigênio dissolvido, variaram de forma significativa ($p < 0,05$) entre os horários de medida (**Tabela 4**).

Comparando-se os valores dos parâmetros ambientais obtidos nas duas estações, verifica-se uma diferença significativa entre todos os parâmetros mensurados, exceto o pH. Os valores de temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e saturação do oxigênio foram superiores na estação seca, enquanto a concentração de sólidos totais dissolvidos (TDS) foi superior na estação chuvosa (**Tabela 4**).

A temperatura apresentou correlação positiva com a radiação PAR ($r = 0,52$; $p < 0,05$); o TDS com a precipitação pluviométrica ($r = 0,48$; $p < 0,05$); e a salinidade apresentou correlação negativa com a precipitação pluviométrica ($r = -0,69$; $p < 0,001$).

Tabela 4: Características da coluna água durante o período de cultivo (estação chuvosa e seca) no experimento de variação durante o período de luz do dia .

Tratamento	Temperatura (°C)		Salinidade (PSU)		pH		Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)		Saturação do oxigênio (%)		TDS (PPT)	
	Variação	Média±DP	Variação	Média±DP	Variação	Média±DP	Variação	Média±DP	Variação	Média±DP	Variação	Média±DP
Chuvoso												
Amanhecer	25,8-26,2	26,0±0,2	28,5-28,6	28,5±0,1	7,8-8,0	7,97±0,1	3,8-6,0	4,59±1,3	46,2-73,3	57,9±13,9	28,2-27,4	28,1±0,4
Meio-dia	26,2-27,3	26,6±0,6	20,3-27,7	24,8±3,9	7,7-7,9	7,8±0,1	5,2-7,0	6,3±0,9	70,3-87,7	80,2±8,9	27,0-29,4	28,1±1,2
Entardecer	26,9-27,4	27,1±0,2	24,4-28,5	26,8±2,1	7,8-8,0	7,90±0,1	4,6-7,4	6,2±1,4	76,8-91,8	82,1±8,3	27,5-28,9	28,34±0,7
Seco												
Amanhecer	27,9-28,4	28,2±0,2	35,0-35,3	35,2±0,1	7,6-8,0	7,8±0,1	6,1-6,7	6,5±0,4	96,7-108,2	103,9±6,3	26,6-26,8	26,7±0,1
Meio-dia	29,0-29,3	29,1±0,15	34,5-35,1	34,8±0,2	8,0-8,4	8,1±0,2	8,3-10,3	9,5±1,0	134,3-165,9	153,6±16,9	26,3-26,6	26,4±0,2
Entardecer	29,0-29,3	29,2±0,1	33,7-35,3	34,8±0,8	7,8-8,0	8,1±0,3	7,1-8,18	7,7±1,05	115,4-133,0	124,9±8,9	25,7-26,8	26,5±0,6
ANOVA Two-way												
Fatores												
Efeito Principal												
Estação (A)	F _[1;17] =243,6**		F _[1;17] =87,4**		F _[1;17] =0,85		F _[1;17] =21,9**		F _[1;17] =105,3**		F _[1;17] =43,1**	
Horário (B)	F _[2;17] =18,7**		F _[2;17] =1,823		F _[2;17] =1,006		F _[2;17] =8,6*		F _[2;17] =15,8**		F _[2;17] =1,396	
Interação												
AxB	F _[2;17] =1,121		F _[2;17] =1,282		F _[2;17] =2,373		F _[2;17] =1,122		F _[2;17] =3,409		F _[2;17] =0,843	

(*): Variações significativas (p<0,05); (**): Variações altamente significativas (p<0,001)

As concentrações dos nutrientes dissolvidos, amônio, nitrato, nitrito e fósforo inorgânico dissolvido (PID), não apresentaram diferença significativa entre os três horários de medidas (**Tabela 5**). Entretanto, foi observada diferença altamente significativa ($p < 0,001$) entre os valores registrados nas duas estações, para todos os nutrientes, exceto o nitrato ($p = 0,18$). As concentrações mais elevadas foram observadas na estação chuvosa (**Tabela 5**). Nesta estação o amônio foi o nutriente de maior disponibilidade e sua concentração foi mais de cem vezes superior à registrada na estação seca (**Tabela 5**).

A elevada concentração dos nutrientes na água do mar durante a estação chuvosa, possivelmente está relacionada às chuvas do período, que aumentaram o aporte de água do Rio Do Fogo. Este rio desemboca a alguns metros do local de cultivo. Essa correlação positiva entre a disponibilidade de nutrientes e os níveis de precipitação pluviométrica foi confirmada estatisticamente. Todos os nutrientes analisados, amônio ($r = 0,65$; $p < 0,001$), nitrato ($r = 0,74$; $p < 0,001$), nitrito ($r = 0,73$; $p < 0,001$) e PID ($r = 0,54$; $p < 0,05$), apresentaram correlação positiva com a precipitação pluviométrica.

Tabela 5: Variação na concentração dos nutrientes na coluna água durante o período de cultivo (estação chuvosa e seca) no experimento de variação durante o período de luz do dia.

Tratamento	Amônio ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		Nitrito ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		Nitrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		PID ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp
Chuvoso								
Amanhecer	14,4-42,3	23,9±15,9	0,07-0,12	0,09±0,03	0,87-1,05	0,98±0,10	0,17-0,24	0,20±0,03
Meio-dia	14,7-48,0	26,9±1,3	0,09-0,18	0,15±0,05	1,11-3,80	2,22±1,38	0,29-0,88	0,60±0,30
Entardecer	21,8-42,3	28,9±11,5	0,13-0,18	0,15±0,03	0,62-3,80	1,71±1,78	0,29-0,88	0,49±0,34
Seco								
Amanhecer	0,27-1,00	0,55±0,39	0,02-0,02	0,02±0,00	0,70-1,67	1,16±0,48	0,07-0,08	0,08±0,01
Meio-dia	0,17-0,38	0,30±0,11	0,01-0,03	0,02±0,01	0,86-1,18	0,98±0,17	0,04-0,13	0,09±0,05
Entardecer	0,34-0,65	0,47±0,16	0,01-0,03	0,02±0,01	0,49-1,20	0,85±0,35	0,05-0,10	0,07±0,02
ANOVA Two-way								
Fatores								
Efeito Principal								
Estação (A)	$F_{[1;17]}=26,21^{**}$		$F_{[1;17]}=72,86^{**}$		$F_{[1;17]}=2,02$		$F_{[1;17]}=15,51^{*}$	
Horário (B)	$F_{[2;17]}=0,07$		$F_{[2;17]}=0,127$		$F_{[2;17]}=0,46$		$F_{[2;17]}=1,81$	
Interação								
AxB	$F_{[2;17]}=0,09$		$F_{[2;17]}=0,114$		$F_{[2;17]}=0,88$		$F_{[2;17]}=1,67$	

(*): Variações significativas ($p<0,05$); (**): Variações altamente significativas ($p<0,001$)

4.1.5. Curvas Rápidas de Luz e RQE

4.1.5.1. Rendimento Quântico Efetivo (RQE)

Os valores de RQE diferiram significativamente entre as duas estações, exceto em alguns horários (**Figura 7**). Os valores mais elevados foram registrados na estação chuvosa.

Em ambas as estações, chuvosa e seca, apenas a linhagem vermelha apresentou valores de RQE significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre as algas cultivadas na superfície e na profundidade (70 cm). Entretanto, essa diferença deve-se principalmente aos valores registrados no amanhecer e no entardecer (**Figura 7**).

Durante a estação chuvosa as três linhagens apresentaram valores de RQE similares ($p > 0,05$) (**Figura 7**). Entretanto, na estação seca as linhagens diferiram significativamente e isso foi observado nas duas profundidades de cultivo, mas apenas no período do meio-dia. A linhagem verde apresentou o maior valor médio de RQE e a vermelha o menor. Os valores inferiores no período do meio-dia observados na linhagem vermelha indicam um processo de fotoinibição mais severo que os observados na verde e na marrom.

O RQE observado ao amanhecer apresentou diferença significativa dos demais quando consideradas apenas as medidas efetuadas às 5 h ($p < 0,001$). Por outro lado, os valores obtidos às 7 h nas três linhagens e nas duas condições de cultivo (superfície e 70 cm de profundidade) apresentaram grande similaridade ($p > 0,05$) com os valores registrados no períodos do meio-dia e início da tarde. Esse resultado indica que às 7 h essas algas já estavam

com o aparato fotossintético funcionando com a mesma eficiência que em horários posteriores e por isso não é observada diferença significativa entre os períodos.

Figura 7: Oscilação nos valores de RQE nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Os valores de RQE foram relacionados de forma significativa e positiva com a precipitação pluviométrica ($r=0,63$; $p<0,05$) e os nutrientes, amônio ($r=0,71$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,75$; $p<0,001$), nitrito ($r=0,82$; $p<0,001$) e PID ($r=0,71$; $p<0,001$), o Kd ($r=0,75$; $p<0,001$), e o TDS ($r=0,56$; $p<0,05$) e de forma negativa com a radiação PAR ($r=-0,65$; $p<0,05$), UVB ($r=-0,47$; $p<0,05$) UVA ($r=-0,42$; $p<0,05$), temperatura ($r=-0,77$; $p<0,001$), salinidade ($r=-0,84$; $p<0,001$), oxigênio dissolvido ($r=-0,629$; $p<0,05$) e saturação do oxigênio ($r=-0,77$; $p<0,05$).

O resultado das correlações mostra que a radiação (PAR e UV), a disponibilidade de nutrientes, a salinidade e a temperatura foram os fatores que mais afetaram o RQE.

4.1.5.2. Eficiência Fotossintética (α)

Os valores de eficiência fotossintética apresentaram diferença significativa entre os horários, aumentando gradativamente das 5 h às 7 h da manhã. Durante o meio-dia os valores continuaram mais elevados, reduzindo a partir das 17 h. (**Figura 8**).

Os valores de α não diferiram de forma significativa entre as duas estações, entre as duas profundidades de cultivo ou entre as três linhagens ($p>0,05$) (**Figura 8**). Os valores mais elevados foram registrados na estação chuvosa.

Figura 8: Oscilação nos valores do α nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

4.1.5.1. Taxa máxima de transporte de elétrons (rETRmax)

Assim como o α , os valores de rETRmax aumentaram gradualmente entre 5 h e 7 h, o que era esperado, já que o rETRmax tipicamente aumenta com o aumento na irradiância. Os valores registrados às 7 h não diferiram significativamente ($p>0,05$) dos valores observados às 11 h e 12 h (**Figura 9**). O rETRmax também diferiu de forma significativa entre as duas estações ($p<0,05$). Assim como observado para o RQE, os valores mais elevados foram observados na estação chuvosa (**Figura 9**).

As três linhagens apresentaram diferença significativa na capacidade fotossintética apenas na estação seca, durante o período do meio-dia, quando a linhagem vermelha apresentou os menores valores e durante o entardecer na estação chuvosa, quando a verde apresenta valores mais elevados (**Figura 9**).

Os valores de rETRmax foram correlacionados positivamente com a precipitação pluviométrica ($r=0,62$; $p<0,05$), K_d ($r=0,55$; $p<0,05$), os nutrientes, amônio ($r=0,71$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,73$; $p<0,001$), nitrito ($r=0,71$; $p<0,05$) e o PID ($r=0,63$; $p<0,05$) e negativamente com a temperatura ($r=-0,58$; $p<0,05$) e a salinidade ($r=-0,73$; $p<0,001$).

Figura 9: Oscilação nos valores do rETRmax nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

4.1.5.1. Irradiância de Saturação (I_k)

Os valores de I_k registrados entre as duas estações diferiram de forma significativa ($p < 0,05$) apenas nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade e

no período do amanhecer e meio-dia. As algas cultivadas durante a estação chuvosa apresentaram valores mais elevados (**Figura 10**).

Figura 10: Oscilação nos valores de I_k nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Em geral, os valores de I_k apresentados pela linhagem vermelha foram inferiores aos observados na verde e marrom, especialmente na estação seca. Isso indica uso ineficiente da elevada irradiância na estação seca, o que remete a uma menor eficiência fotossintética da linhagem vermelha, sob condição de intensa luminosidade.

4.1.6. Ficobiliproteínas

4.1.6.1. Ficoeritrina

Os valores de ficoeritrina variaram de forma significativa entre as duas estações ($p < 0,0001$; $F = 241,12$). Essa diferença foi mais acentuada na linhagens verde e marrom que na estação seca apresentaram concentrações 3 vezes menores que o observado na estação chuvosa (**Figura 11**).

Dentre as linhagens, a vermelha apresentou o maior conteúdo de ficoeritrina ($p < 0,001$; $F = 57,29$). Essa diferença foi mais acentuada na estação seca, na qual as linhagens verde e marrom apresentaram concentrações até 3 vezes menores que a vermelha (**Figura 11**). Entre as duas profundidades de cultivo, também foi observada diferença significativa ($p < 0,001$; $F = 88,68$). As algas cultivadas na superfície apresentaram menores concentrações que as cultivadas em 70 cm de profundidade.

Dentre os horários de medida, apenas a linhagem vermelha, cultivada durante a estação seca, apresentou diferença significativa entre as concentrações ($p = 0,01$; $F = 4,39$). Durante o período do meio dia a concentração foi reduzida em 30% nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade e 40%

nas cultivadas na superfície em relação ao amanhecer. No entardecer há um aumento na concentração.

Figura 11: Oscilação nos valores de ficoeritrina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de ficoeritrina nas três linhagens foi correlacionada de forma negativa com a radiação UVA ($r=-0,60$; $p=0,008$) UVB ($r=-0,58$; $p=0,01$) e PAR ($r=-0,56$; $p=0,01$), a salinidade ($r=-0,74$; $p<0,001$), a temperatura ($r=-0,80$; $p<0,001$) e oxigênio dissolvido ($r=-0,75$; $p<0,001$) e de forma positiva com a precipitação pluviométrica ($r=0,54$; $p=0,01$), o Kd ($r=0,56$; $p=0,01$), o TDS ($r=0,81$; $p<0,001$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r=0,66$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,74$; $p<0,001$) nitrito ($r=0,66$; $p<0,001$) e PID ($r=0,53$; $p=0,02$). Dentre os parâmetros fotossintéticos, foi observada correlação positiva com o RQE ($r=0,55$; $p=0,02$).

4.1.6.2. Ficocianina

A ficocianina também apresentou concentração mais elevada nas algas cultivadas durante a estação chuvosa ($p<0,001$; $F=318,64$) (**Figura 12**). Em geral, a concentração observada na estação seca reduziu 60% em relação a estação chuvosa. Entretanto, diferente do observado para ficoeritrina, a linhagem verde, durante a estação chuvosa apresentou concentração mais elevada que a vermelha ($p<0,001$; $F=14,91$). Na estação seca as três linhagens apresentaram concentrações similares.

As algas cultivadas em 70 cm de profundidade apresentaram concentrações superiores nas duas estações ($p<0,001$; $F=66,7$) e não foi observada diferença na concentração de ficocianina entre os diferentes horários de medida.

A concentração de ficocianina nas três linhagens foi correlacionada com os mesmo parâmetros observados para a ficoeritrina, exceto a radiação UVA e

UVB. Além disso, correlação negativa com radiação PAR ($r=-0,56$; $p=0,01$) foi observada apenas para as algas cultivadas na superfície.

Figura 12: Oscilação nos valores de ficocianina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A temperatura ($r=-0,81$; $p<0,001$) e salinidade ($r=-0,74$; $p<0,001$) apresentaram forte correlação negativa e o Kd ($r=0,63$; $p=0,005$), o TDS ($r=0,76$; $p<0,001$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r=0,66$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,51$; $p=0,03$) nitrito ($r=0,69$; $p<0,001$) e PID ($r=0,63$; $p=0,001$), correlação positiva com as concentrações de ficocianina. As duas ficobiliproteínas apresentaram forte correlação positiva ($r=0,93$; $p<0,001$).

4.1.7. Proteína Solúvel Total

A concentração de proteína variou de forma significativa entre as duas estações ($p<0,001$; $F=553,84$). Na estação seca a linhagem vermelha apresentou redução de até 85% em relação ao observado na estação chuvosa. no teor de proteínas (**Figura 13**).

Na estação chuvosa, a linhagem verde cultivada na superfície apresentou concentração inferior às linhagens vermelha e marrom ($p<0,001$; $F=16,01$). Entretanto essa diferença é resultado principalmente da baixa concentração observada no amanhecer (**Figura 13**). Durante as duas estações de cultivo, o teor de proteína foi superior nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade ($p<0,001$; $F=14,45$).

Na estação seca, as três linhagens, nas duas profundidades apresentaram redução significativa na concentração de proteína no período do meio-dia ($p=0,008$; $F=4,98$). Os valores observados no amanhecer são similares ao entardecer e a redução no meio-dia é superior a 40% nas três linhagens cultivadas na superfície. Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade essa diferença fica em torno de 20%.

Figura 13: Oscilação nos valores de proteína solúvel total nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de proteína nas algas foi correlacionada de forma negativa com a radiação PAR ($r=-0,51$; $p=0,003$), temperatura ($r=-0,90$; $p<0,001$) e salinidade ($r=-0,90$; $p<0,001$) e de forma positiva com o Kd ($r=0,72$;

$p < 0,001$), o TDS ($r = 0,86$; $p < 0,001$), e os nutrientes dissolvidos amônio ($r = 0,80$; $p < 0,001$), nitrato ($r = 0,70$; $p < 0,001$) nitrito ($r = 0,86$; $p < 0,001$) e PID ($r = 0,66$; $p < 0,001$). Dentre os parâmetros fotossintéticos, a concentração de proteínas foi correlacionada de forma positiva, com o RQE ($r = 0,82$; $p < 0,001$) e rETRmax ($r = 0,82$; $p < 0,001$). O teor de proteína também foi correlacionado de forma positiva com a ficoeritrina ($r = 0,93$; $p < 0,001$) e a ficocianina ($r = 0,92$; $p < 0,001$).

4.1.8. Clorofila-a

A concentração de clorofila-a variou de forma significativa entre as duas estações de cultivo, na linhagem vermelha e marrom ($p < 0,001$; $F = 73,01$;). A concentração observada na estação chuvosa foi superior à da seca (**Figura 14**). Na linhagem verde, a concentração de clorofila-a na estação seca não diminuiu em relação à chuvosa ($p > 0,05$).

As três linhagens apresentaram concentrações similares ($p > 0,05$), exceto na estação seca, em que, a verde apresentou concentração mais elevada ($p < 0,001$; $F = 72,35$). Isso está relacionado ao fato dessa linhagem ter mantido a concentração de clorofila elevada entre as duas estações, diferentemente da vermelha e da marrom.

As algas cultivadas na superfície apresentaram concentração inferior às as cultivadas em 70 cm de profundidade, apenas na estação seca ($p < 0,001$; $F = 22,50$). As linhagens vermelha e verde apresentaram redução de 30% e a marrom de 50%.

Dentre os horários de medida a concentração de clorofila-a não variou de forma significativa ($p > 0,05$).

Figura 14: Oscilação nos valores de clorofila-a nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Na linhagem verde a concentração de clorofila não se correlacionou com qualquer parâmetro abiótico. Já nas linhagens vermelha e marrom esse pigmento foi correlacionado de forma negativa com a salinidade ($r=-0,90$;

$p < 0,001$), a temperatura ($r = -0,90$; $p < 0,001$) e oxigênio dissolvido ($r = -0,66$; $p < 0,001$) e de forma positiva com a precipitação pluviométrica ($r = 0,58$; $p = 0,01$), o Kd ($r = 0,72$; $p < 0,001$), o TDS ($r = 0,81$; $p < 0,001$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r = 0,66$; $p = 0,003$), nitrato ($r = 0,69$; $p < 0,001$) nitrito ($r = 0,81$; $p < 0,001$) e PID ($r = 0,68$; $p = 0,02$). Dentre os parâmetros fotossintéticos, foi observada correlação positiva com o RQE ($r = 0,77$; $p < 0,001$) e o ETR ($r = 0,67$; $p < 0,001$).

4.1.9. Pigmentos carotenoides

Na espécie *G. domingensis* foram registrados 4 pigmentos carotenoides: o β -caroteno (pigmento mais abundante) e 3 xantofilas, violaxantina, anteraxantina e zeaxantina. Inicialmente será feita a descrição da dinâmica desses pigmentos em sua totalidade, em seguida trataremos deles individualmente.

A concentração dos carotenoides totais foi superior na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 84,73$). Em média foi observada uma redução de 30% entre as duas estações. Assim como ocorreu com a clorofila-a, a concentração de carotenoides totais foi inferior nas algas cultivadas na superfície, apenas na estação seca ($p < 0,001$; $F = 14,60$). Isso pode estar relacionado ao fato de as algas cultivadas na superfície durante esta estação terem sido expostas a irradiâncias muito mais elevadas que na chuvosa. Dessa forma, a redução na intensidade causada pela coluna d'água resulta em uma maior proteção que a observada na estação chuvosa (**Figura 15**).

As linhagens apresentaram concentrações similares na estação seca ($p > 0,05$). Já na estação chuvosa, as algas cultivadas na superfície diferiram de forma significativa. A verde apresentou a concentração média mais elevada e a

vermelha, a menor. As concentrações não diferiram entre os três horários de medida ($p>0,05$).

Figura 15: Oscilação na concentração dos pigmentos carotenoides totais nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Considerando os pigmentos individualmente, a violaxantina ($F=152,51$; $p<0,001$), a anteraxantina ($F=62,3$; $p<0,001$) e o β -caroteno ($F=127,95$; $p<0,001$), apresentaram concentrações mais elevadas na estação chuvosa, nas três linhagens. Já a concentração de zeaxantina não diferiu de forma significativa entre as duas estações ($p>0,05$). A concentração de violaxantina reduziu em média 70% na linhagem vermelha, 80% na verde e 65% na marrom. A anteraxantina reduziu 45% na vermelha, 47% na verde e 36% na marrom e o β -caroteno reduziu 30% na vermelha, 50% na verde e 41% na marrom.

A concentração desses pigmentos também variou entre as linhagens, mas a violaxantina e o β -caroteno apenas na estação chuvosa. A linhagem verde apresentou concentrações mais elevadas desses pigmentos.

Entre as profundidades também foi observada diferença significativa. As concentrações de violaxantina ($F=5,71$; $p=0,01$) anteraxantina ($F=64,12$; $p<0,001$) e β -caroteno ($F=6,29$; $p=0,01$) foram superiores nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Já a concentração de zeaxantina ($F=64,55$; $p<0,001$) foi superior nas algas cultivadas na superfície, especialmente na estação seca. Nessas algas (submetidas a elevada irradiância), além de haver um aumento na concentração de zeaxantina houve redução na concentração de anteraxantina (**Figura 16**).

Nas algas cultivadas durante a estação seca, em 70 cm de profundidade, a concentração de anteraxantina aumentou gradativamente, do amanhecer ao entardecer ($F=5,53$; $p=0,005$). Essas algas também

apresentaram concentração superior de violaxantina ($F=7,20$; $p=0,001$) e zeaxantina ($F=4,13$; $p=0,01$) no entardecer.

Figura 16: Dinâmica dos pigmentos carotenoides nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia.

As concentrações de violaxantina, antheraxantina e β -caroteno apresentaram a mesma tendência, correlacionando-se de forma negativa com a temperatura ($r=-68$; $p<0,001$), a salinidade ($r=-0,72$; $p<0,001$), oxigênio

dissolvido ($r=-0,64$; $p=0,004$) e de forma positiva com o Kd ($r=0,48$; $p=0,04$), o TDS ($r=0,57$; $p=0,01$) e os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=0,60$; $p=0,001$), nitrato ($r=0,60$; $p=0,008$), nitrito ($r=0,61$; $p=0,006$) e PID ($r=0,72$; $p<0,001$). Nas algas cultivadas em 70 cm esses pigmentos também apresentaram correlação positiva com o RQE ($r=0,58$; $p=0,01$) e o rETRmax ($r=0,64$; $p=0,003$).

4.1.10. Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs)

Na espécie *G. domingensis* foram identificadas as seguintes micosporinas: porphyrina-334, paliteno e/ou usujireno (par cis/trans, não resolvido pelo método utilizado), chinorina e palitina. Entretanto, os picos de palitina e chinorina não foram resolvidos, durante a análise e, portanto foi considerada a área total dos dois picos integrados.

Os resultados estão descritos como foi feito para os carotenoides. Inicialmente considerando as micosporinas totais e posteriormente tratados individualmente.

A concentração das MAAs totais diferiu entre as duas estações apenas na linhagem vermelha e especialmente nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade ($p=0,008$; $F=7,14$). Nesta linhagem a concentração de MAAs foi superior na estação seca. Já nas linhagens verde e marrom, a concentração de MAAs não apresenta um aumento significativo entre as duas estações (**Figura 17**).

Considerando-se as duas profundidades de cultivo, só foi observada diferença significativa na concentração total de MAAs na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=21,84$). A linhagem vermelha, apesar de apresentar a menor concentração, exibiu um aumento de 39% nas algas cultivadas na superfície. A

verde aumentou 14% e a marrom 23%. Esse aumento pode estar relacionado à alta disponibilidade de nitrogênio neste período, que associada a um aumento na irradiância resultou em uma maior concentração de MAAs.

A concentração total de MAAs diferiu de forma significativa entre as três linhagens ($p < 0,001$; $F = 61,03$). A verde apresentou a maior concentração e a vermelha a menor. Essa diferença entre as duas linhagens foi mais acentuada na estação chuvosa, dentre as algas cultivadas em 70 cm de profundidade, onde a concentração de MAAs na linhagem verde foi 123% maior que a observada na linhagem vermelha. Na estação seca essa diferença diminuiu em função de um aumento da concentração na linhagem vermelha e apenas uma manutenção da elevada concentração na linhagem verde. Neste período a concentração na linhagem verde foi 30% mais elevada na verde. Esse resultado pode indicar que a linhagem verde utiliza as MAAs como estoque de nitrogênio, assim como a vermelha faz com a ficoeritrina.

Apenas na linhagem verde a concentração total de MAA foi correlacionada de forma positiva com a temperatura ($r = 0,66$; $p = 0,003$), a disponibilidade de nutrientes dissolvidos, amônio ($r = 0,60$; $p = 0,003$) e nitrito ($r = 0,48$; $p = 0,04$) e o RQE ($r = 0,65$; $p = 0,003$). A linhagem vermelha apresentou correlação apenas com a precipitação pluviométrica ($r = -0,66$; $p = 0,002$) e a marrom não apresentou correlação com qualquer fator. Esses resultados indicam a importância da concentração de micosporina no desempenho fotossintético da linhagem verde ao longo do dia, além de ser mais um indicativo da função desse composto, como reserva de nitrogênio, nesta linhagem.

Figura 17: Oscilação na concentração de micosporinas totais nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A MAA mais abundante nas três linhagens, durante todo o experimento, foi a porphyra-334. Durante as duas estações de cultivo, as linhagens vermelha e marrom mantiveram a mesma proporção, em torno de 60%, em relação a

concentração total de MAA. Entretanto na verde há uma redução nessa proporção, em 70 cm de profundidade passa de 66% na estação chuvosa, para 59% na seca e na superfície, de 59% para 52%. Já a MAA paliteno e/ou usujireno apresentou um aumento em relação à concentração total entre a estação chuvosa e seca, nas três linhagens. Esse aumento na proporção foi maior na linhagem verde, que em 70 cm de profundidade passou de 3% na estação chuvosa, para 9% na seca e na superfície, de 5% para 16%. Na linhagem vermelha em 70 cm de profundidade e na superfície, passou de 5% na estação chuvosa, para 8% na seca. Na marrom, em 70 cm de profundidade a proporção foi de 7% nas duas estações, mas na superfície, passou de 5% na chuvosa, pra 13% na seca (**Figura 18**).

A proporção de chinorina e palitina não apresentou diferença na proporção entre as duas estações, exceto na linhagem verde cultivada na superfície, que passou de 36% na estação chuvosa para 30% na estação seca.

Entre os horário de medida foi observada diferença significativa apenas para o paliteno e/ou usujireno, nas linhagens verde e marrom durante a estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 10,46$), que apresentou concentrações inferiores no amanhecer.

Figura 18: Dinâmica das micosporinas nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia.

4.1.11. Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Neste estudo, apesar do método aplicado na extração e quantificação de glutathionas (reduzida e oxidada) detectar baixas concentrações desses compostos (24 ng.mL^{-1}), foi detectada apenas a glutathiona reduzida. Essa baixa

concentração de glutathione oxidada durante todo o experimento aponta para um ambiente redox bastante balanceado e/ou um caminho alternativo para a glutathione reduzida. Portanto, apresento apenas resultados referentes a glutathione reduzida.

A concentração de GSH variou de forma altamente significativa entre as duas estações de cultivo ($p < 0,001$; $F = 248,88$). Dentre as algas cultivadas em 70 cm de profundidade a concentração de GSH aumentou 270% na estação seca e dentre as algas cultivadas na superfície, o aumento foi de 300%. Entre as duas profundidades foi observada diferença significativa apenas na estação seca ($p = 0,01$; $F = 6,22$). As linhagens verde e marrom apresentaram concentrações mais elevadas na superfície. Na linhagem vermelha não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figura 19**).

Dentre as linhagens, a concentração de GSH diferiu apenas no período chuvoso, no qual, a linhagem vermelha apresentou concentração inferior à observada na verde e na marrom.

Dentre os horários de medida, apenas a linhagem verde, cultivada na superfície durante a estação chuvosa, apresentou diferença significativa entre os horários ($p < 0,001$; $F = 42,10$). Nesta linhagem a concentração média observada no meio-dia foi 3 vezes maior que a observada no amanhecer e quase 5 vezes maior que o entardecer.

Figura 19: Variação na concentração de glutathiona reduzida (GSH) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante o amanhecer (A), meio-dia (B) e entardecer (C), durante o experimento de variação no período de luz do dia. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de GSH foi correlacionada de forma positiva com a temperatura ($r=0,77$; $p<0,001$), a salinidade ($r=0,77$; $p<0,001$) e oxigênio dissolvido ($r=0,61$; $p=0,002$) e de forma negativa com o TDS ($r=-0,80$; $p<0,001$),

o Kd ($r=-0,62$; $p=0,006$), a precipitação pluviométrica ($r=-0,50$; $p=0,030$) a disponibilidade de nutrientes dissolvidos, amônio ($r=-0,69$; $p<0,001$), nitrato ($r=-0,60$; $p=0,008$), nitrito ($r=-0,66$; $p<0,001$) e PID ($r=-0,53$; $p=0,02$), os pigmentos ficoeritrina ($r=-0,71$; $p<0,001$), ficocianina ($r=-0,75$; $p<0,001$), violaxantina ($r=-0,72$; $p<0,001$) e anteraxantina ($r=-0,73$; $p<0,001$) e as proteínas ($r=-0,58$; $p=0,01$). Além disso, a linhagem verde apresentou correlação positiva com a radiação UVA ($r=0,52$; $p=0,02$) e UVB ($r=0,53$; $p=0,02$) e PAR ($r=0,60$; $p=0,009$). Nas linhagens vermelha e marrom, a concentração de GSH foi correlacionada de forma negativa com o RQE ($r=-0,62$; $p=0,005$) e o rETRmax ($r=-0,55$; $p=0,01$).

4.1.12. Expressão gênica

A biomassa utilizada na extração foi em média, 265 ± 44 mg de biomassa fresca e a concentração final de RNA obtida foi 203 ± 18 ng. μL^{-1} em um volume final de 30-20 μL . A concentração final do RNA na amostra foi monitorada em nanofotômetro (BioSpec, Shimadzu®). A contaminação por proteínas foi verificada em 260/280 e esteve entre 1,8 e 2,1, o que indica um intervalo ótimo da pureza da amostra. Em 260/230 foi monitorada a contaminação por polissacarídeos, que apresentou valores inferiores a 2 ($1,7 \pm 0,1$), o que também representa baixa quantidade de polissacarídeos. A qualidade do RNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,3%, no qual foi claramente observado as bandas 28S e 18S de do RNA ribossômico, designando boa qualidade do RNA. Todas as amostras em questão foram submetidas a géis de agarose a fim de verificar se houve degradação do mesmo durante o processo de

armazenamento e extração do RNA e/ou contaminação por DNA, o que garantiu uma qualidade do mesmo para a próxima etapa.

Os resultados obtidos para o gene utilizado como controle interno, actina, foram submetidos a análise de variância (ANOVA *three-way*) e os valores $p > 0,05$ indicaram que a expressão desse gene não variou entre as condições experimentais, assegurando o seu uso como controle interno.

4.1.12.1. Estação seca x chuvosa

Para comparar a diferença na expressão entre as estações chuvosa e seca, foi calculada a razão seca/chuvosa dos valores obtidos em cada tratamento (**Figura 20**).

A expressão gênica da proteína RuBisCo, durante a estação seca, diferiu de forma significativa da chuvosa ($p < 0,001$), apenas nas algas cultivadas na superfície, coletadas no amanhecer, onde esse gene foi menos expresso e no entardecer, quando foi mais expresso. Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, a expressão da RuBisCo diferiu entre as duas estações ($p < 0,001$) apenas no período do entardecer, quando foi inferior à observada na estação chuvosa.

A expressão gênica da proteína HSP 90 não variou de forma significativa entre as duas estações, nas algas cultivadas em 70 cm. Entretanto, esse gene foi 2 vezes mais expresso ($p < 0,001$) nas algas cultivadas na superfície, durante o meio-dia e o entardecer.

Nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca, a proteína D1 foi 80 vezes menos expressa durante o amanhecer. Por outro lado a

expressão dessa proteína durante o meio-dia foi 4 vezes maior, e 12 vezes maior durante o entardecer ($p < 0,001$), nas algas cultivadas na estação seca (**Tabela 6**).

A expressão da proteína *core* do PSI também diferiu de forma significativa entre as duas estações de cultivo ($p < 0,001$). No período do meio-dia, esse gene foi menos expresso na estação seca, tanto nas algas cultivadas na superfície, quanto nas cultivadas em 70 cm de profundidade. No amanhecer, as algas cultivadas em 70 cm de profundidade apresentaram maior expressão desse gene (4 vezes) na estação seca ($p < 0,001$), assim como as algas cultivadas na superfície (3 vezes) durante o entardecer ($p < 0,001$).

Inversamente, as algas cultivadas na superfície, durante a estação seca e coletadas durante o amanhecer, apresentaram expressão dos genes, da proteína RuBisCo, da proteína D1 e da proteína *core* do PSI, bastante inferior ao observado na estação chuvosa (**Figura 20**).

Em geral a expressão gênica das proteínas analisadas foi superior na estação seca, entre as algas cultivadas na superfície. Algumas exceções são observadas, como no amanhecer. Já as algas cultivadas em 70 cm, em geral, apresentaram expressão igual ou inferior.

Figura 20: Variação na expressão gênica durante a estação seca em relação ao total de expressão observada na estação chuvosa. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (estação chuvosa). A escala utilizada está em log. O controle interno foi um gene codificante para uma actina.

Tabela 6: Variação na expressão gênica durante a estação seca em relação ao total de expressão observada na estação chuvosa.

Horários	Razão Seca/Chuvoso							
	Superfície				70 cm			
	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>
<i>Amanhacer</i>	1,44±0,33	0,08±0,03	0,01±0,005	0,14±0,10	1,13±0,07	1,04±0,92	1,20±0,73	3,73±1,41
<i>Meio dia</i>	2,37±0,26	0,73±0,23	4,50±0,47	0,19±0,06	0,71±0,12	1,43±0,67	0,68±0,44	0,16±0,07
<i>Entardecer</i>	2,52±0,36	2,46±1,39	12,24±3,96	2,47±0,34	1,07±0,22	0,23±0,03	0,44±0,04	0,61±0,23

4.1.12.2. Profundidade de 70 cm x Superfície

Para comparar a diferença na expressão gênica entre as duas profundidades nas quais as algas foram cultivadas, foi calculada a razão superfície/70 cm de profundidade dos valores obtidos em cada tratamento.

A proteína RuBisCo durante a estação seca, foi menos expressa nas algas cultivadas na superfície, durante o amanhecer e o meio-dia. Nesta mesma condição de cultivo e período de coleta, a proteína HSP 90 teve sua expressão aumentada em até 4 vezes em relação ao observado nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Essa proteína foi menos expressa durante o entardecer, na estação chuvosa (25 vezes) e na estação seca (5 vezes) (**Figura 21**).

As proteínas D1 e *core* do PSI apresentaram o mesmo perfil, nas duas estações. Essas proteínas durante a estação chuvosa, apresentaram maior expressão no amanhecer, que reduziu no entardecer, em relação às algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Durante a estação seca, a expressão dessas proteínas foi menor no amanhecer e maior durante o meio-dia (**Tabela 7**).

Figura 21: Variação na expressão gênica nas algas cultivadas na superfície em relação ao total de expressão observada nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (algas cultivadas em 70 cm de profundidade). A escala utilizada está em log. O controle interno foi um gene codificante para uma actina.

Tabela 7: Variação na expressão gênica nas algas cultivadas na superfície em relação ao total de expressão observada nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade.

Horários	Razão Superfície/70 cm							
	Chuvosa				Seca			
	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>
<i>Amanhacer</i>	1,26±0,14	1,29±0,74	91,67±61,78	15,10±5,06	3,80±1,54	0,37±0,24	0,04±0,02	0,41±0,15
<i>Meio dia</i>	1,19±0,38	1,57±0,26	0,46±0,21	1,43±0,54	3,86±1,43	0,35±0,01	2,26±1,16	5,52±0,25
<i>Entardecer</i>	0,04±0,003	0,60±0,37	0,04±0,01	0,33±0,12	0,26±0,13	1,09±0,07	1,07±0,00008	0,26±0,12

4.1.12.1. Amanhecer x Meio-dia e Amanhecer x Entardecer

Para comparar a diferença na expressão gênica entre os períodos do dia, em cada tratamento, foi calculada a razão meio-dia/amanhecer e entardecer/amanhecer dos valores obtidos para cada tratamento.

Durante o meio-dia, nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca (condição experimental de maior irradiância), o gene da proteína D1 foi aumentada em 200 vezes e da proteína *core* do PSI, 2 vezes, em relação à observada durante o amanhecer. A proteína HSP 90 teve a expressão reduzida em 4 vezes e a expressão da proteína RuBisCo não foi alterada (**Figura 22**).

Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, durante a estação chuvosa e seca, a expressão do gene da proteína HSP 90 foi aumentado em 5 e 6 vezes e da proteína D1, em 2 e 5 vezes, durante o período do meio-dia (em relação ao amanhecer). Já a expressão da proteína *core* do PSI, foi aumentada em 4 vezes, na estação chuvosa, mas reduzida pela metade na estação seca, durante o meio-dia. A expressão da proteína RuBisCo não foi alterada na algas cultivadas durante a estação chuvosa, entre o amanhecer e o meio-dia, mas foi reduzida em 4 vezes nas algas cultivadas na estação seca (**Tabela 8**).

A expressão gênica da proteína HSP 90, nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca e chuvosa, foi diminuída 4 vezes no entardecer (em relação ao amanhecer) e a expressão da proteína RuBisCo foi aumentada em 1,5 vez. Já a proteína D1, teve a expressão aumentada em 2,5 vezes nas algas cultivadas na superfície e a proteína *core* do PSI 3 vezes no

entardecer (em relação ao amanhecer). Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, a proteína D1 manteve o mesmo nível de expressão em relação ao amanhecer e a proteína *core* do PSI teve a expressão reduzida em 3 vezes (**Tabela 9**).

Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, na estação seca e chuvosa, durante o entardecer, a proteína HSP 90 apresentou o mesmo nível de expressão observado no amanhecer (portanto, diminuiu durante o período meio-dia entardecer). A expressão da proteína RuBisCo, durante o entardecer, foi diminuída 3 vezes nas algas cultivadas durante a estação seca (portanto, manteve o nível expressão entre o período, meio-dia e entardecer) e aumentada 10 vezes na estação chuvosa. A proteína D1 teve o nível de expressão gênica aumentado 68 vezes durante o entardecer e a proteína *core* do PSI, em 4 vezes, nas algas cultivadas na estação chuvosa (70 cm). Nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca, a expressão da proteína D1 no entardecer foi aumentada em 4 vezes e da proteína *core* do PSI 14 vezes, em relação à expressão observada no amanhecer. Portanto a proteína D1, proteína *core* do PSI e RuBisCo, apresentaram um aumento na expressão durante o período amanhecer -> meio-dia -> entardecer, nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade no período chuvoso e nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca.

Figura 22: Variação na expressão gênica nas algas coletadas durante o meio-dia (A) e no entardecer (B) em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante o amanhecer. A primeira coluna com valor igual a 1, representa o fator de comparação (algas coletadas durante o amanhecer). A escala utilizada está em *log*. O controle interno foi um gene codificante para a actina.

Tabela 8: Variação da expressão gênica nas algas coletadas durante o meio-dia, em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante amanhecer.

Horários	Razão Meio-dia/Amanhecer							
	Chuvosa				Seca			
	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>
70 cm	6,30±0,56	0,90±0,37	5,21±2,49	4,42±2,76	4,55±0,87	0,26±0,03	1,99±0,002	0,41±0,02
Superfície	2,88±0,44	0,16±0,07	0,52±0,43	10,09±6,17	0,23±0,01	1,43±0,46	202,62±57,79	2,50±1,44

Tabela 9: Variação da expressão gênica nas algas coletadas durante o entardecer, em relação ao total de expressão observada nas algas coletadas durante amanhecer.

Horários	Razão Entardecer/meio-dia							
	Chuvosa				Seca			
	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>	<i>HSP 90</i>	<i>rbcL (Rubisco)</i>	<i>psbA (D1)</i>	<i>psaA (core PSI)</i>
70 cm	1,23±0,77	10,12±5,10	68,65±57,82	4,80±2,64	1,33±0,63	0,34±0,03	4,16±0,26	14,86±3,87
Superfície	0,09±0,03	1,34±0,57	0,99±0,04	0,35±0,16	1,23±0,77	1,67±0,48	2,66±0,72	3,33±0,70

4.2. Experimento de variação durante quatro semanas de cultivo

4.2.1. Radiação PAR

Os valores de radiação PAR foram significativamente ($p < 0,001$) mais elevados na estação seca (**Figura 23**) e diferiram de forma significativa entre superfície e 70 cm de profundidade, entre as 4 semanas de cultivo. Na estação chuvosa, a radiação PAR diferiu de forma significativa entre superfície e 70 cm de profundidade (**Tabela 10**).

Tabela 10: Variação da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo, nas duas estações. Valores de média, desvio padrão e F (ANOVA *three-way*).

Semanas	PAR			
	Chuvoso		Seco	
	<i>Superfície</i>	<i>70 cm</i>	<i>Superfície</i>	<i>70 cm</i>
S1	782,62±21,60	301,26±47,95	3302,0±438,64	1187,74±177,88
S2	1519,21±272,62	1047,83±251,82	1750,89±799,49	746,36±132,35
S3	998,90±415,16	400,85±344,86	3404,01±237,34	1173,92±300,68
S4	1393,16±513,41	422,66±173,90	3932,63±245,74	673,53±133,71

<i>ANOVA Three-way</i>	
Fatores	
<i>Efeito Principal</i>	
Estação (A)	$F_{[1;47]}=141,83^{**}$
Profundidade (B)	$F_{[1;47]}=202,91^{**}$
Semana (C)	$F_{[3;47]}=2,194$
<i>Interação</i>	
AxB	$F_{[1;107]}=60,69^{**}$
AxC	$F_{[8;107]}=17,14^{**}$
BxC	$F_{[8;107]}=8,38^{**}$
AxBxC	$F_{[8;107]}=3,47^*$

(*): Variações significativas ($p < 0,05$); (**): Variações altamente significativas ($p < 0,001$)

Figura 23: Medidas de radiação PAR ($\mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo. (A) Estação chuvosa e (B) estação seca.

4.2.2. Radiação UV

As radiações UVA e UVB variaram de forma significativa entre as duas estações de cultivo (**Tabela 11**). Os valores mais elevados foram observados na estação seca (**Figura 24**).

Tabela 11: Variação da radiação UVA (320nm) e UVB (305nm) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo, nas duas estações.

Semanas	Radiação			
	UV-A		UV-B	
	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco
S1	0,21±0,04	0,26±0,03	0,037±0,007	0,061±0,007
S2	0,11±0,03	0,27±0,02	0,023±0,008	0,063±0,008
S3	0,15±0,04	0,25±0,02	0,033±0,009	0,058±0,006
S4	0,19±0,06	0,26±0,02	0,035±0,012	0,059±0,007

ANOVA Three-way

Fatores

Efeito Principal

Estação (A) $F_{[1;107]}=21,66^{**}$

$F_{[1;107]}=7,44^{*}$

Semanas (B) $F_{[8;107]}=0,82$

$F_{[8;107]}=5,55^{*}$

Interação

AxB $F_{[1;107]}=0,31$

$F_{[1;107]}=7,72^{**}$

(*): Variações significativas ($p<0,05$); (**): Variações altamente significativas ($p<0,001$)

Figura 24: Medidas de radiação UV (mW/m^2) durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo.

4.2.3. Precipitação pluviométrica

Os níveis de precipitação pluviométrica variaram significativamente entre as duas estações ($p < 0,001$; $F = 14,58$). A estação chuvosa apresentou os níveis mais elevados (**Figura 25**) que variaram durante as semanas de cultivos ($F = 3,33$; $p < 0,05$).

Figura 25: Níveis de precipitação pluviométrica (mm) nas estações chuvosa e seca, durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo.

4.2.4. Características da coluna d'água

Os valores de K_d obtidos na estação chuvosa foram superiores ($F=572,52$; $p<0,001$) aos observados na estação seca (**Tabela 12**), ou seja, na estação seca a luz penetrou mais na água. O K_d também variou de forma significativa entre as semanas de cultivo nas duas estações ($F=117,16$; $p<0,001$)

Tabela 12: Variação do coeficiente de atenuação da penetração da luz na água (K_d) no local de cultivo das algas no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo, nas duas estações.

Semanas	$K_d (m^{-1})$	
	Chuvosa	Seca
1	$2,20 \pm 0,25$	$1,43 \pm 0,27$
2	$1,27 \pm 0,16$	$2,02 \pm 0,49$
3	$3,70 \pm 1,03$	$1,29 \pm 0,14$
4	$4,32 \pm 0,57$	$2,28 \pm 0,32$

A temperatura, a salinidade e sólidos totais dissolvidos (TDS) variaram de forma significativa entre as duas estações (**Tabela 13**). Os valores de temperatura e salinidade foram superiores na estação seca. Já a concentração de TDS foi superior na estação chuvosa.

Comparando-se os valores dos parâmetros obtidos durante as quatro semanas de cultivo, a salinidade e o TDS foram os únicos parâmetros a apresentar variação significativa ($p<0,05$) entre as semanas (**Tabela 13**).

4. Resultados

Tabela 13: Variação dos parâmetros ambientais durante as estações chuvosa e seca, no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo.

Tratamento	Temperatura (°C)		Salinidade (PSU)		pH		Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)		Saturação do oxigênio (%)		TDS (PPT)	
	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp
Chuvoso												
Semana 1	26,2-27,4	27,0±0,7	27,0-28,9	27,9±1,3	7,9-8,1	8,0±0,1	3,9-7,0	5,2±1,6	76,8-87,7	82,3±7,7	27,1-28,5	28,0±0,8
Semana 2	26,5-27,5	27,0±0,5	26,2-27,3	26,7±0,5	7,9-8,0	8,0±0,1	7,0-8,0	7,5±1,0	95,4-95,5	95,5±0,1	27,7-27,9	27,8±0,1
Semana 3	25,7-26,5	26,2±0,5	22,5-23,6	23,0±0,5	8,0-8,1	8,1±0,05	4,9-5,9	5,4±0,5	95,7-95,8	95,8±0,05	23,1-23,2	23,2±0,1
Semana 4	26,0-27,0	26,5±0,5	27,4-28,5	28,0±0,5	7,9-8,0	7,9±0,05	8,4-9,4	8,8±0,5	99,9-100	100±0,05	27,6-27,8	27,7±0,1
Seco												
Semana 1	28,2-29,2	28,8±0,8	35,0-35,3	35,1±0,1	8,4-8,4	8,4±0,0	6,1-9,9	8,1±1,9	96,7-160,7	146,8±19,6	26,6-26,8	26,7±0,1
Semana 2	27,9-28,0	28,0±0,0	34,0-34,4	34,4±0,0	7,9-7,9	7,0±0,0	5,5-5,6	5,6±0,0	86,8-87,2	87,0±0,2	26,2-26,2	26,2±0,0
Semana 3	28,0-28,6	28,7±0,0	33,0-33,3	33,3±0,0	7,8-7,9	7,8±0,0	6,3-6,4	6,3±0,1	99,9-102,4	101,1±1,3	25,4-25,4	25,4±0,0
Semana 4	27,9-28,0	28,0±0,0	34,0-34,1	34,0±0,0	8,0-8,2	8,1±0,1	5,9-6,1	6,0±0,1	93,5-96,8	95,1±1,6	25,9-25,9	25,9±0,0
ANOVA Two-way												
Fatores												
Efeito Principal												
Estação (A)	F _[1;17] =76,35**		F _[1;17] =1240,4**		F _[1;17] =0,101		F _[1;17] =0,38		F _[1;17] =4,44		F _[1;17] =26,59**	
Semana (B)	F _[2;17] =2,09		F _[2;17] =44,93**		F _[2;17] =0,714		F _[2;17] =2,89		F _[2;17] =1,71		F _[2;17] =151,26**	
Interação												
AxB	F _[2;17] =2,57		F _[2;17] =15,88**		F _[2;17] =1,87		F _[2;17] =11,75**		F _[2;17] =7,56*		F _[2;17] =72,05**	

(*): Variações significativas (p<0,05); (**): Variações altamente significativas (p<0,001)

A concentração média dos nutrientes analisados na água do mar foi superior na estação chuvosa, especialmente do íon amônio (**Tabela 14**). Esses nutrientes apresentaram variação significativa entre as semanas de cultivo, nas duas estações. O amônio foi o nutriente de maior disponibilidade na estação chuvosa. Na estação seca o nitrato foi o nutriente de maior disponibilidade na primeira semana. Na segunda semana, o amônio apresentou concentrações similares e na quarta semana houve uma forte queda na concentração desses nutrientes (**Tabela 14**).

Tabela 14: Variação na concentração dos nutrientes na água do mar durante as duas estações de cultivo (seca e chuvosa), no experimento de variação durante quatro semanas de cultivo.

Tratamento	Amônio ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		Nitrito ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		Nitrato ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		PID ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp	Variação	Média±Dp
Chuvoso								
Semana 1	14,4-48	28,4±17,5	0,08-0,18	0,13±0,05	0,7-1,8	1,2±0,5	0,17-0,29	0,25±0,06
Semana 2	8,1-11,3	16,6±8,8	0,04-0,04	0,04±0,0	0,94-0,98	0,96±0,02	0,18-0,22	0,20±0,02
Semana 3	78,1-94,4	86,25±8,12	0,10-0,15	0,12±0,02	2,2-2,4	2,33±0,07	0,35-0,42	0,39±0,03
Semana 4	23,1-28,2	25,7±2,5	0,03-0,04	0,03±0,01	0,94-1,17	1,06±0,12	0,58-0,65	0,62±0,03
Seco								
Semana 1	0,39-0,65	0,47±0,16	0,01-0,02	0,01±0,01	1,17-1,66	1,35±0,28	0,04-0,08	0,06±0,02
Semana 2	1,54-1,83	1,69±0,15	0,01-0,01	0,01±0,00	1,86-1,98	1,92±0,06	0,09-0,11	0,10±0,01
Semana 3	1,72-1,96	1,84±0,12	0,00-0,00	0,00±0,00	0,03-0,06	0,05±0,02	0,09-0,11	0,10±0,01
Semana 4	0,18-0,26	0,22±0,04	0,01-0,06	0,03±0,02	0,02-0,29	0,15±0,14	0,13-0,15	0,14±0,01
ANOVA Two-way								
Fatores								
Efeito Principal								
Estação (A)	$F_{[1;17]}=167,89^{**}$		$F_{[1;17]}=68,42^{**}$		$F_{[1;17]}=96,88^{**}$		$F_{[1;17]}=553,90^{**}$	
Semana (B)	$F_{[2;17]}=36,20^{**}$		$F_{[2;17]}=7,31^{*}$		$F_{[2;17]}=25,07^{**}$		$F_{[2;17]}=87,45^{**}$	
Interação								
AxB	$F_{[2;17]}=34,69^{**}$		$F_{[2;17]}=13,73^{**}$		$F_{[2;17]}=59,39^{**}$		$F_{[2;17]}=51,97^{**}$	

(*): Variações significativas ($p<0,05$); (**): Variações altamente significativas ($p<0,001$)

4.2.5. Curvas Rápidas de Luz e Rendimento Quântico Efetivo (RQE)

4.2.5.1. Rendimento Quântico Efetivo (RQE)

O RQE foi significativamente mais elevado na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 156,27$), exceto na segunda semana (**Figura 26**). Nesta semana, a radiação PAR entre as duas estações também não diferiu de forma significativa.

O RQE observado entre as duas profundidades não diferiu, exceto nas algas cultivadas durante a estação seca, após 4 semanas de cultivo, onde as algas da superfície (verde e marrom) apresentaram valores superiores (**Figura 26**).

O RQE foi significativamente maior na linhagem verde ($p < 0,05$; $F = 5,87$), dentre as algas cultivadas sob maior irradiância e menor disponibilidade de nutrientes (estação seca, superfície). Entretanto, a diferença entre os valores foi pequena (**Figura 26**).

Durante a estação chuvosa não houve variação significativa no RQE obtido semanalmente. Já nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade durante a estação seca, houve um declínio da primeira à quarta semana de cultivo, o que não foi observado nas algas cultivadas na superfície. Isso indica que as algas cultivadas na superfície estavam mais bem aclimatadas as condições da estação.

Figura 26: Variação no rendimento quântico efetivo (RQE) nas linhagens cultivadas na profundidade de 70 cm (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O RQE foi correlacionado positivamente com a precipitação pluviométrica ($r=0,50$; $p<0,05$), o K_d ($r=0,43$; $p<0,05$) e nutrientes dissolvidos, amônio ($r=0,44$; $p<0,05$), nitrato ($r=0,67$; $p<0,001$), nitrito ($r=0,64$; $p<0,05$) e PID ($r=0,42$; $p<0,05$) e negativamente com a radiação PAR ($r=-0,67$; $p<0,001$), UV-A ($r=-0,63$; $p<0,001$), UV-B ($r=-0,40$; $p<0,05$), a temperatura ($r=-0,66$; $p<0,001$) e a salinidade ($r=-0,71$; $p<0,001$).

4.2.6. Eficiência Fotossintética (α)

Em geral, a eficiência fotossintética também foi superior na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=32,15$), o que provavelmente está relacionado à menor intensidade luminosa do período e indica estratégia de aclimação (aumentar a eficiência fotossintética na condição de menor disponibilidade de luz) (**Figura 27**).

A linhagem verde apresentou valor de α superior, nas algas cultivadas sob menor intensidade luminosa (estação seca, 70 cm de profundidade) ($p<0,001$; $F=12,83$) (**Figura 27**), o que indica uma maior eficiência fotossintética em coletar a luz e convertê-la em energia fotoquímica, em relação às outras duas linhagens.

Figura 27: Variação na eficiência fotossintética (α) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O eficiência fotossintética apresentou correlação positiva com a precipitação pluviométrica ($r=0,45$; $p<0,05$), a disponibilidade de nitrito ($r=0,58$; $p<0,05$), amônio ($r=0,44$; $p<0,05$) e nitrato ($r=0,57$; $p<0,05$) e negativa com a radiação PAR ($r=-0,48$; $p<0,05$), UV-B ($r=-0,43$; $p<0,05$) e a salinidade ($r=-0,40$; $p<0,05$).

4.2.7. Taxa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$)

A taxa máxima de transporte de elétrons alcançada pelas algas cultivadas na estação chuvosa foi superior à observada na estação seca ($p<0,001$; $F=39,82$), especialmente após a primeira semana de cultivo. Entretanto, na quarta semana, nas algas cultivadas na superfície durante a estação seca, ocorreu um forte aumento, apresentando valores superiores aos da estação chuvosa (**Figura 28**).

A linhagem verde, além de apresentar o maior valor de α , também apresentou valor de $rETR_{max}$ superior ($p<0,001$; $F=7,71$) nas algas cultivadas sob baixa intensidade luminosa (estação chuvosa, 70 cm de profundidade) (**Figura 28**).

O $rETR_{max}$ não variou de forma significativa entre as duas profundidades, exceto em alguns pontos, como na quarta semana (**Figura 28**).

Figura 28: Variação na taxa máxima de transporte de elétrons (rETRmax) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Os valores de $rETR_{max}$ não variaram nas semanas de cultivo, de forma significativa, nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Inversamente, nas algas mantidas na superfície, o valor de $rETR_{max}$ diferiu entre as semanas. Isso pode ser explicado levando em consideração que a intensidade luminosa é um dos principais fatores a alterar a taxa fotossintética e as algas cultivadas na superfície estavam expostas a intensidades mais elevadas.

Os valores de $rETR_{max}$ foram correlacionados positivamente com a precipitação pluviométrica ($r=0,44$; $p<0,05$), o K_d ($r=0,61$; $p<0,05$), o amônio ($r=0,73$; $p<0,001$), o nitrato ($0,54$; $p<0,05$), o nitrito ($0,80$; $p<0,001$) e o PID ($r=0,55$; $p<0,05$) e negativamente com a radiação PAR ($r=-0,81$; $p<0,05$), UV-A ($r=-0,68$; $p<0,001$), UV-B ($r=-0,59$; $p<0,05$), temperatura ($r=-0,75$; $p<0,001$) e salinidade ($r=-0,91$; $p<0,001$).

4.2.8. Irradiância de Saturação (I_k)

Os valores de I_k nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade foram superiores na estação chuvosa. Dentre as algas cultivadas na superfície, o I_k também foi superior nas algas cultivadas durante a estação chuvosa, na semana 3, mas na semana 4 ocorreu o inverso ($p<0,01$; $F=11,06$). (**Figura 29**).

Figura 29: Variação na irradiância de saturação (I_k) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Na estação chuvosa as linhagens vermelha e marrom apresentaram diferença significativa nos valores de I_k entre o cultivo na superfície e em 70 cm de profundidade ($p < 0,001$; $F = 27,98$). Essas linhagens apresentaram valores mais elevados nas algas cultivadas na superfície. Isso indica que as algas cultivadas em 70 cm de profundidade requeriam menos luz para saturar a fotossíntese, o que nesta condição pode ser um indício de maior eficiência na absorção da radiação incidente (Henley, 1993).

Os valores de I_k não diferiram de forma significativa ($p > 0,05$) entre as linhagens.

O I_k apresentou correlação positiva com o K_d ($r = 0,48$; $p < 0,05$), o amônio ($r = 0,48$; $p < 0,05$), o nitrito ($r = 0,64$; $p < 0,001$), o PID ($r = 0,43$; $p < 0,05$) e negativa com a radiação PAR ($r = -0,54$; $p < 0,05$), UV-A ($r = -0,46$; $p < 0,05$), UV-B ($r = -0,65$; $p < 0,05$), a temperatura ($r = -0,55$; $p < 0,05$) e a salinidade ($r = -0,71$; $p < 0,001$).

4.2.9. Ficobiliproteínas

4.2.9.1. Ficoeritrina

A concentração média de ficoeritrina foi 3 vezes maior na algas cultivadas durante a estação chuvosa ($p < 0,0001$; $F = 337,79$). (**Figura 30**). Os níveis desse pigmento foram superiores na linhagem vermelha ($p < 0,001$; $F = 56,97$) e nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade ($p < 0,001$; $F = 54,38$).

Figura 30: Variação na concentração de ficoeritrina, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), a verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

As algas cultivadas durante a estação chuvosa apresentaram aumento gradativo na concentração de ficoeritrina em função das semanas de cultivo ($p < 0,001$; $F = 84,61$), sendo observada a concentração máxima na semana 4. Inversamente, nas algas cultivadas durante a estação seca, o valor máximo é observado na semana inicial e na semana 4, o mínimo.

A concentração de ficoeritrina nas três linhagens foi correlacionada de forma negativa com as radiações UVA ($r = -0,53$; $p = 0,008$) UVB ($r = -0,50$; $p = 0,01$) e PAR ($r = -0,74$; $p < 0,001$), a salinidade ($r = -0,77$; $p < 0,001$) e a temperatura ($r = -0,67$; $p < 0,001$) e de forma positiva com o Kd ($r = 0,62$; $p = 0,01$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r = 0,69$; $p < 0,001$), nitrato ($r = 0,48$; $p = 0,04$) nitrito ($r = 0,51$; $p = 0,01$) e PID ($r = 0,66$; $p < 0,001$). Dentre os parâmetros fotossintéticos, foi observada correlação positiva com o RQE ($r = 0,70$; $p = 0,02$) e o rETRmax ($r = 0,52$; $p = 0,009$).

4.2.9.2. Ficocianina

A concentração de ficocianina apresentou uma dinâmica muito parecida com a observada para a ficoeritrina. A concentração média foi 3 vezes maior ($p < 0,001$; $F = 430,19$) nas algas cultivadas durante a estação chuvosa (**Figura 31**), mas apenas na estação seca foi observada diferença significativa entre as duas profundidades de cultivo ($p < 0,001$; $F = 175,02$). A concentração mais elevada foi observada na condição de menor intensidade luminosa (70 cm de profundidade), que foi 2,5 vezes maior que nas algas da superfície.

Figura 31: Variação na concentração de ficocianina nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de ficocianina diferiu de forma significativa entre as linhagens apenas na estação chuvosa, nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, onde a linhagem vermelha apresentou concentração menor que a verde e a marrom ($p < 0,001$; $F = 8,48$).

Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, durante a estação chuvosa, também foi observado um aumento gradativo, entre as semanas 1 e 4 ($p < 0,001$; $F = 6,97$).

A concentração de ficocianina apresentou correlação negativa com as radiações UVA ($r = -0,64$; $p < 0,001$), UVB ($r = -0,60$; $p = 0,01$) e PAR ($r = -0,70$; $p < 0,001$), a salinidade ($r = -0,91$; $p < 0,001$) e a temperatura ($r = -0,78$; $p < 0,001$). Correlações positivas foram observadas com os nutrientes dissolvidos amônio ($r = 0,73$; $p < 0,001$), nitrato ($r = 0,54$; $p = 0,007$) nitrito ($r = 0,63$; $p < 0,001$) e PID ($r = 0,83$; $p < 0,001$), o RQE ($r = 0,72$; $p < 0,001$), o rETRmax ($r = 0,68$; $p < 0,001$) e a ficoeritrina ($r = 0,98$; $p < 0,001$).

4.2.10. Proteína Solúvel Total

A concentração de proteína solúvel total foi, em média, 10 vezes maior na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 974,53$), mas apenas na estação seca foi observada diferença significativa entre as duas profundidades de cultivo ($p < 0,001$; $F = 34,41$). Assim como ocorreu com a ficocianina, a concentração mais elevada foi observada nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade (**Figura 32**).

A concentração de proteína diferiu entre as linhagens apenas nas algas cultivadas durante a estação seca, em 70 cm de profundidade ($p = 0,01$; $F = 4,91$), onde a linhagem vermelha apresentou concentração superior.

Figura 32: Variação na concentração de proteína solúvel total, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. ((A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de proteína nas algas foi correlacionada de forma negativa com a radiação PAR ($r=-0,71$; $p<0,001$), temperatura ($r=-0,84$; $p<0,001$) e salinidade ($r=-0,92$; $p<0,001$) e de forma positiva com o Kd ($r=0,78$; $p<0,001$), os nutrientes dissolvidos amônio ($r=0,71$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,51$; $p=0,01$) nitrito ($r=0,56$; $p=0,004$) e PID ($r=0,69$; $p<0,001$), o RQE ($r=0,72$; $p<0,001$) e rETRmax ($r=0,80$; $p<0,001$), a ficoeritrina ($r=0,71$; $p<0,001$) e a ficocianina ($r=0,76$; $p<0,001$). Na linhagem verde, a concentração de proteína foi correlacionada de forma positiva com o α ($r=0,54$; $p=0,006$).

4.2.11. Clorofila-a

A concentração de clorofila-a variou de forma significativa entre as duas estações de cultivo ($p<0,001$; $F=102,35$). A concentração média observada na estação seca foi 2 vezes menor que na chuvosa (**Figura 33**).

Na estação seca, a concentração de clorofila-a não diferiu entre as duas profundidades, mas na estação chuvosa, as algas da superfície apresentaram concentrações superiores às cultivadas em 70 cm de profundidade ($p<0,001$; $F=18,40$).

As linhagens apresentaram diferença significativa na concentração de clorofila-a na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=57,53$) e na seca ($p<0,001$; $F=88,82$). Na estação chuvosa a linhagem vermelha apresentou concentração maior que a verde e a marrom (**Figura 33**). Na estação seca, as concentrações mais elevadas foram observadas na linhagem verde. Esse resultado indica diferença na estratégia de aclimação entre as duas linhagens.

Figura 33: Variação na concentração de clorofila-a nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Nas linhagens vermelha e marrom a concentração de clorofila-a foi correlacionada de forma negativa com as radiações UVA ($r=-0,72$; $p<0,001$), UVB ($r=-0,61$; $p=0,001$) e PAR ($r=-0,53$; $p=0,007$), a salinidade ($r=-0,68$; $p<0,001$) e a temperatura ($r=-0,44$; $p=0,02$) e de forma positiva com o Kd ($r=0,49$; $p=0,01$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r=0,57$; $p=0,003$), nitrato ($r=0,48$; $p=0,01$), nitrito ($r=0,51$; $p=0,01$) e PID ($r=0,66$; $p<0,001$).

Dentre os parâmetros fotossintéticos, foi observada correlação positiva com o RQE ($r=0,49$; $p=0,01$), o ETR ($r=0,41$; $p=0,04$) e o α ($r=0,48$; $p=0,01$). Na linhagem verde a concentração de clorofila-a correlacionou-se apenas com o TDS ($r=0,44$; $p=0,03$), o RQE ($r=0,42$; $p=0,04$) e o rETRmax ($r=0,55$; $p=0,005$).

4.2.12. Pigmentos carotenoides

A concentração de carotenoides totais diferiu entre as duas estações de cultivo ($p>0,001$; $F=79,23$). Assim como as ficobiliproteínas e clorofila-a, a concentração de carotenoides totais foi superior na estação chuvosa (**Figura 34**).

A concentração de carotenoides totais não diferiu de forma significativa entre as duas profundidades, nas algas cultivadas durante a estação chuvosa. Já nas algas cultivadas durante estação seca, a concentração de carotenoides foi menor nas algas cultivadas na superfície ($p<0,001$; $F=12,02$).

Figura 34: Variação na concentração de carotenoides totais, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A linhagem vermelha apresentou a menor concentração média ($p < 0,001$; $F = 34,67$), tanto nas algas cultivadas na estação chuvosa, quanto na seca.

As concentrações de violaxantina e anteraxantina apresentaram a mesma tendência ($r = 0,70$; $p < 0,001$). As concentrações mais elevadas foram observadas na estação chuvosa e nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Esses pigmentos apresentaram correlação negativa com as radiações UVA ($r = -0,56$; $p = 0,004$), UVB ($r = -0,50$; $p = 0,01$) e PAR ($r = -0,80$; $p < 0,001$), a temperatura ($r = -0,82$; $p < 0,001$) e a salinidade ($r = -0,84$; $p < 0,001$), e positiva com o K_d ($r = 0,67$; $p = 0,04$) e os nutrientes dissolvidos amônio ($r = 0,64$; $p = 0,001$), nitrato ($r = 0,48$; $p = 0,01$) nitrito ($r = 0,61$; $p = 0,006$) e PID ($r = 0,58$; $p = 0,002$). A concentração desses pigmentos também apresentou correlação positiva com o RQE ($r = 0,58$; $p = 0,01$) e o $rETR_{max}$ ($r = 0,43$; $p = 0,03$), a concentração de ficoeritrina ($r = 0,50$; $p = 0,01$), ficocianina ($r = 0,54$; $p = 0,006$), proteína ($r = 0,59$; $p = 0,005$) e clorofila-*a* ($r = 0,48$; $p = 0,02$).

O β -caroteno foi o carotenoide mais abundante durante todo o experimento (**Figura 35**). As concentrações mais elevadas foram observadas na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 80,96$). Esse pigmento apresentou correlação positiva com a anteraxantina ($r = 0,60$; $p = 0,002$) e violaxantina ($r = 0,58$; $p = 0,002$), mas apenas nas algas cultivadas na superfície. Dentre os parâmetros abióticos, foi correlacionado de forma negativa com a radiação PAR ($r = -0,49$; $p = 0,01$), a temperatura ($r = -0,44$; $p = 0,03$), a salinidade ($r = -0,53$; $p = 0,007$) e de forma positiva com o nitrato ($r = 0,57$; $p = 0,003$) e o PID ($r = 0,57$;

$p=0,003$). O β -caroteno também foi correlacionado com a clorofila-*a* ($r=0,42$; $p=0,04$) e o $rETR_{max}$ ($r=0,43$; $p=0,03$).

A zeaxantina apresentou dinâmica oposta aos outros pigmentos. A concentração mais elevada foi obtida nas algas cultivadas durante a estação seca ($p<0,001$; $F=56,10$). As concentrações observadas nas algas da superfície também foram superiores as cultivadas em 70 cm de profundidade, na estação seca ($p<0,001$; $F=209,80$) e na chuvosa ($p<0,001$; $F=62,32$). Além disso, nas algas cultivadas na superfície, durante a estação seca, houve um aumento gradativo entre as semanas 1 e 4 ($p<0,001$; $F=38,43$).

A zeaxantina apresentou correlação negativa com o amônio ($r=-0,43$; $p=0,03$), o nitrito ($r=-0,49$; $p=0,01$), o PID ($r=-0,46$; $p=0,02$) e de forma positiva com a radiação UVA ($r=0,56$; $p=0,003$), PAR ($r=0,59$; $p=0,002$), a temperatura ($r=0,59$; $p=0,002$) e a salinidade ($r=0,52$; $p=0,008$). A zeaxantina também foi correlacionada de forma negativa com a violaxantina ($r=-0,56$; $p=0,004$), a anteraxantina ($r=-0,58$; $p=0,002$), a ficoeritrina ($r=-0,48$; $p=0,02$) e a ficocianina ($r=-0,46$; $p=0,01$). Portanto, a concentração de zeaxantina aumentou nas condições de ambientais em que a concentração dos pigmentos violaxantina, anteraxantina, ficoeritrina e ficocianina diminuíram.

Figura 35: Variação na proporção dos pigmentos carotenoides em relação à concentração total, nas algas cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd), e marrom (M).

4.2.13. Micosporina tipo aminoácido (MAA)

A concentração das MAAs totais diferiu entre as duas estações apenas na linhagem vermelha ($p=0,008$; $F=23,15$). Nesta linhagem a concentração de MAAs foi superior na estação seca. Já nas linhagens verde e marrom, a concentração de MAAs não apresentou um aumento significativo entre as duas estações (**Figura 36**).

Na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=35,94$) e na seca ($p=0,02$; $F=3,5$), a concentração de MAA foi superior nas algas cultivadas na superfície. Assim como ocorreu com os carotenoides, a concentração de MAA foi menor na linhagem vermelha ($p<0,001$; $F=38,91$).

Durante a estação chuvosa foi observado um aumento na concentração de MAAs em função do tempo ($p<0,001$; $F=9,74$). A concentração de MAAs foi menor na semana inicial de cultivo.

A concentração de porphyrina-334 não diferiu de forma significativa entre as duas estações, mas a sua proporção em relação às outras micosporinas diminuiu na estação seca ($p<0,001$; $F=41,83$), especialmente na linhagem verde (**Figura 37**). Durante a estação chuvosa, as algas cultivadas na superfície apresentaram concentrações mais elevadas ($p<0,001$; $F=22,00$). Na estação seca, apenas a linhagem verde apresentou concentrações superiores nas algas cultivadas na superfície.

Figura 36: Variação na concentração de micosporina total nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de paliteno e/ou usujireno aumentou 2 vezes na estação seca ($p < 0,001$; $F = 41,84$). A proporção dessa MAA em relação ao total também aumentou de forma significativa ($p < 0,001$; $F = 93,74$), especialmente nas algas cultivadas na superfície (**Figura 37**). A linhagem verde apresentou as maiores concentrações ($p < 0,001$; $F = 18,98$) e também a maior proporção dessa MAA em relação ao total.

A concentração de chinorina e palitina diferiu de forma significativa entre as duas estações ($p = 0,009$; $F = 7,07$), sendo maior na estação chuvosa, nas algas cultivadas na superfície. A proporção dessas MAAs também foi superior na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 17,08$), mas não diferiu entre as profundidades (**Figura 38**). A concentração de chinorina e palitina diferiu de forma significativa entre as linhagens cultivadas na estação seca ($p < 0,001$; $F = 14,35$), e foi superior na linhagem marrom. Essa linhagem também apresentou proporção superior dessas MAAs, durante a estação seca.

A concentração de porphyrin-334 apresentou correlação com os fatores abióticos apenas na linhagem vermelha, sendo correlacionada de forma positiva com a radiação PAR ($r = 0,51$; $p = 0,01$), UVB ($r = 0,43$; $p = 0,03$) e a temperatura ($r = 0,41$; $p = 0,04$).

A concentração de chinorina e palitina na linhagem vermelha foi correlacionada positivamente com a radiação PAR ($r = 0,42$; $p = 0,03$), UVB ($r = 0,59$; $p = 0,002$) e de forma negativa com o K_d ($r = -0,47$; $p = 0,01$).

Figura 37: Variação na proporção de MAA em relação a concentração total, nas algas cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd), e marrom (M).

A concentração de paliteno e/ou usujireno nas linhagens vermelha e marrom foi correlacionada positivamente com a radiação UVA ($r=0,63$; $p=0,001$), UVB ($r=0,77$; $p<0,001$) e PAR ($r=0,69$; $p<0,001$), a temperatura ($r=0,57$; $p=0,003$) e a salinidade ($r=0,61$; $p=0,001$). Na linhagem marrom foi correlacionada negativamente com a proteína ($r=-0,43$; $p=0,03$) e na verde com a ficocianina ($r=-0,44$; $p=0,04$). A linhagem verde também apresentou correlação positiva com a radiação UVB ($r=0,44$; $p=0,02$).

A concentração dessas MAA, portanto, apresentou uma dinâmica diferenciada entre as linhagens ao longo das semanas de cultivo.

4.2.14. Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A glutathiona oxidada não foi detectada neste experimento, o que mais uma vez, aponta para um ambiente redox bastante balanceado e/ou um caminho alternativo para a GSH, nesta espécie. Portanto, apresento apenas resultados referentes a glutathiona reduzida.

A concentração de GSH diferiu de forma significativa entre as duas estações ($p<0,001$; $F=74,60$), sendo maior na estação seca (**Figura 38**).

Na estação chuvosa ($p=0,01$; $F=6,11$) e seca ($p<0,001$; $F=18,40$), apenas a linhagem verde apresentou diferença significativas entre as algas cultivadas na superfície e na profundidade de 70 cm. As algas em 70 cm apresentaram em média concentração 50% inferior (Figura 38). A linhagem vermelha apresentou concentrações de GSH em 70 cm tão alta quanto a observada na superfície. Inversamente, na linhagem marrom a concentração de GSH não aumentou de forma significativa nas algas cultivadas na superfície.

A concentração de GSH entre as linhagens, diferiu de forma significativa apenas na estação seca ($p < 0,001$; $F = 57,53$). A linhagem vermelha apresentou concentrações superiores, nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade e na superfície.

Nas algas cultivadas durante a estação seca, em 70 cm de profundidade, foi observado um aumento gradativo na concentração de GSH entre a semana 1 e 4, especialmente nas linhagens verde e vermelha. Já nas algas cultivadas na superfície, entre as semanas 1 e 2 e entre a 3 e a 4 a concentração não diferiu de forma significativa. Entretanto, a concentração de GSH entre a semana 2 e 3, aumentou 8 vezes na linhagem vermelha e 4 vezes na linhagem verde. A linhagem marrom teve a concentração de GSH reduzida pela metade, nesse período (**Figura 38**).

A concentração de GSH foi correlacionada de forma positiva com a temperatura ($r = 0,51$; $p = 0,01$), a salinidade ($r = 0,50$; $p = 0,01$), as radiações PAR ($r = 0,70$; $p < 0,001$), UVA ($r = 0,56$; $p = 0,004$) e UVB ($r = 0,60$; $p = 0,002$). A linhagem vermelha apresentou correlação negativa apenas com o nitrato ($r = -0,58$; $p = 0,003$). Já as linhagens verde e marrom apresentaram correlação negativa com amônio ($r = -0,49$; $p = 0,01$), o nitrito ($r = -0,51$; $p = 0,01$) e PID ($r = -0,43$; $p = 0,03$).

Figura 38: Variação na concentração de glutathione reductase (GSH) nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Dentre os compostos bioquímicos analisados, a concentração de GSH nas linhagens apresentou correlação positiva com a MAA paliteno e/ou usujireno ($r=0,61$; $p=0,001$) e chinorina e palitina ($r=0,42$; $p=0,03$) e o pigmento zeaxantina ($r=0,53$; $p=0,01$); e de forma negativa com as proteínas ($r=-0,53$; $p=0,007$) e os pigmentos violaxantina ($r=-0,61$; $p=0,001$) e anteraxantina ($r=-0,58$; $p<0,001$). A linhagem verde e marrom foram ainda correlacionadas negativamente com os pigmentos ficoeritrina ($r=-0,52$; $p=0,01$), ficocianina ($r=-0,58$; $p=0,002$). Dentre os parâmetros fotossintéticos, a concentração de GSH nas três linhagens, foi correlacionada de forma negativa com o RQE ($r=-0,75$; $p<0,001$), o rETRmax ($r=-0,59$; $p=0,002$) e o α ($r=-0,63$; $p<0,001$).

4.2.15. Conteúdo tecidual total de Carbono (C), Nitrogênio (N) e Fósforo (P)

4.2.15.1. Carbono (C)

O conteúdo de carbono total variou de forma significativa entre as duas estações ($p<0,001$; $F=111,99$). Na estação seca foi observado maior percentual (**Figura 39**). Dentre as duas profundidades não foi observada diferença significativa.

Dentre as linhagens, na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=103,04$) o maior percentual foi observado na linhagem vermelha e na estação seca ($p=0,003$; $F=6,26$), na vermelha e marrom, que não diferiram.

Figura 39: Variação no conteúdo total de carbono nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O conteúdo tecidual de carbono foi correlacionado, na linhagem verde e marrom, de forma positiva com a radiação PAR ($r=0,71$; $p<0,001$), UVA ($r=0,64$; $p<0,001$) e UVB ($r=0,58$; $p=0,002$), a temperatura ($r=0,63$; $p<0,001$), a salinidade ($r=0,77$; $p<0,001$), concentração de zeaxantina ($r=0,60$; $p=0,002$) e GSH ($r=0,64$; $p<0,001$); e de forma negativa com o K_d ($r=-0,59$; $p=0,002$), a precipitação pluviométrica ($r=-0,44$; $p=0,03$), os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=-0,63$; $p<0,001$), nitrato ($r=-0,42$; $p=0,04$), nitrito ($r=-0,69$; $p<0,001$) e PID ($r=-0,59$; $p=0,002$), as proteínas ($r=-0,77$; $p<0,001$), os pigmento ficoeritrina ($r=-0,77$; $p<0,001$) e ficocianina ($r=0,73$; $p<0,001$), carotenoides totais ($r=-0,49$; $p=0,01$) e MAA total ($r=-0,42$; $p=0,03$), o RQE ($r=-0,56$; $p=0,004$) e o $rETR_{max}$ ($r=0,79$; $p<0,001$).

Na linhagem vermelha foi observada correlação negativa do conteúdo de carbono com o nitrato ($r=-0,47$; $p=0,02$) e positiva com a zeaxantina ($r=0,44$; $p=0,02$) e MAA total ($r=0,40$; $p=0,04$).

4.2.15.2. Nitrogênio (N)

O conteúdo tecidual de nitrogênio variou de forma significativa entre as duas estações e foi 2 vezes maior na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=1315,20$). Na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=61,27$) as algas cultivadas na superfície apresentaram conteúdo superior de nitrogênio. Inversamente, na estação seca ($p<0,001$; $F=51,13$) o maior conteúdo de nitrogênio foi observado nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade (**Figura 40**).

Dentre as linhagens, foi observada diferença significativa apenas na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=9,01$). O conteúdo tecidual de nitrogênio foi superior na linhagem vermelha.

Figura 40: Variação no conteúdo de nitrogênio, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O conteúdo tecidual de nitrogênio foi correlacionado, nas três linhagens, de forma negativa com a radiação PAR ($r=-0,74$; $p<0,001$), UVA ($r=-0,72$; $p<0,001$) e UVB ($r=-0,66$; $p=0,002$), a temperatura ($r=-0,81$; $p<0,001$), a salinidade ($r=-0,93$; $p<0,001$), concentração de zeaxantina ($r=-0,56$; $p=0,004$) e GSH ($r=-0,63$; $p<0,001$); e de forma positiva com o Kd ($r=0,49$; $p=0,01$), os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=0,70$; $p<0,001$), nitrato ($r=0,66$; $p<0,001$) nitrito ($r=0,67$; $p<0,001$) e PID ($r=0,72$; $p<0,001$), as proteínas ($r=0,88$; $p<0,001$), os pigmento ficoeritrina ($r=0,77$; $p<0,001$) e ficocianina ($r=0,83$; $p<0,001$), violaxantina ($r=0,82$; $p<0,001$), anteraxantina ($r=0,88$; $p<0,001$) β -caroteno ($r=0,52$; $p=0,008$), porphyra-334 ($r=0,57$; $p=0,03$), a chinorina e palitina ($r=0,60$; $p=0,001$), carotenoides totais ($r=-0,49$; $p=0,01$) e MAA total ($r=-0,42$; $p=0,03$), o RQE ($r=0,73$; $p<0,001$) e o rETRmax ($r=0,79$; $p<0,001$).

Nas linhagens verde e marrom o conteúdo de nitrogênio foi correlacionado negativamente com o conteúdo de carbono ($r=-0,78$; $p<0,001$) e nas linhagens vermelha e marrom com a clorofila-*a* ($r=0,52$; $p=0,009$),

4.2.15.3. Fósforo (P)

O conteúdo tecidual de fósforo total foi superior nas algas cultivadas durante a estação chuvosa ($p<0,001$; $F=156,49$) e apresentou tendência similar a do nitrogênio. Na estação chuvosa ($p<0,001$; $F=17,62$) as algas cultivadas na superfície apresentaram conteúdo superior de fósforo e na estação seca ($p<0,001$; $F=66,52$) foram as algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Entre as linhagens não foi observada diferença significativa (Figura 41).

Figura 41: Variação no conteúdo de fósforo, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O conteúdo tecidual de fósforo foi correlacionado de forma negativa com as radiações PAR ($r=-0,66$; $p<0,001$), UVA ($r=-0,64$; $p<0,001$) e UVB ($r=-0,67$; $p=0,002$), a temperatura ($r=-0,71$; $p<0,001$), a salinidade ($r=-0,82$; $p<0,001$), concentração de zeaxantina ($r=-0,71$; $p<0,001$) e GSH ($r=-0,63$; $p<0,001$) e de forma positiva com o Kd ($r=0,63$; $p<0,001$), os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=0,53$; $p=0,007$), nitrito ($r=0,68$; $p<0,001$) e PID ($r=0,68$; $p<0,001$), as proteínas ($r=0,77$; $p<0,001$), os pigmento ficoeritrina ($r=0,76$; $p<0,001$) e ficocianina ($r=0,82$; $p<0,001$), violaxantina ($r=0,74$; $p<0,001$), anteraxantina ($r=0,80$; $p<0,001$) β -caroteno ($r=0,45$; $p=0,02$), porphyrina-334 ($r=0,57$; $p=0,03$), a chinorina e palitina ($r=0,60$; $p=0,001$), o RQE ($r=0,53$; $p=0,003$) e o rETRmax ($r=0,49$; $p=0,01$).

Nas linhagens verde e marrom o conteúdo tecidual de fósforo foi correlacionado de forma positiva, com o conteúdo tecidual de nitrogênio ($r=0,86$; $p<0,001$) e de forma negativa, com o conteúdo de carbono ($r=-0,90$; $p<0,001$). Nas linhagens, vermelha e marrom o conteúdo de fósforo foi correlacionado de forma positiva com a clorofila-*a* ($r=0,53$; $p=0,008$).

4.2.16. Lipídeos Totais e Ácidos Graxos

A concentração de lipídeos totais variou de forma significativa entre as duas estações de cultivo, mas apenas nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade ($p<0,001$; $F=30,01$). A estação chuvosa apresentou concentrações superiores (**Figura 42**).

Na estação chuvosa não foi observada variação na concentração de lipídeos totais, nas algas cultivada na superfície e em 70 cm de profundidade. Entretanto, nas algas cultivadas durante a estação seca

($p < 0,001$; $F = 127,79$), as algas da superfície apresentaram concentrações maiores que as em 70 cm de profundidade (**Figura 42**).

As algas cultivadas na superfície, durante a estação seca, apresentaram um aumento gradativo na concentração de lipídeos totais, entre as semanas 1 e 4 ($r = 73,01$; $p < 0,001$).

Durante as quatro semanas de cultivo na estação seca, a linhagem vermelha apresentou concentrações inferiores a verde e marrom nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade. Entretanto, nas algas cultivadas na superfície, essa linhagem apresentou concentração inferior apenas nas semana 1 e 2. Entre a semana 2 e 3, a linhagem vermelha apresentou um forte aumento na concentração, mantendo a concentração elevada na semana 4 (**Figura 42**).

A concentração de lipídeos totais, nas linhagens vermelha e verde, foi correlacionado de forma negativa com PAR ($r = -0,53$; $p = 0,008$), UVA ($r = -0,59$; $p = 0,002$) e UVB ($r = -0,53$; $p = 0,007$), a temperatura ($r = -0,80$; $p < 0,001$) e a salinidade ($r = -0,83$; $p < 0,001$).

Na linhagem vermelha, cultivada em 70 cm de profundidade, foi correlacionada de forma positiva com os nutrientes dissolvidos, amônio ($r = 0,62$; $p = 0,001$), nitrato ($r = 0,49$; $p = 0,01$), nitrito ($r = 0,50$; $p = 0,01$) e PID ($r = 0,79$; $p < 0,001$), as proteínas ($r = 0,86$; $p < 0,001$), os pigmento ficoeritrina ($r = 0,70$; $p < 0,001$) e ficocianina ($r = 0,50$; $p = 0,01$), clorofila-*a* ($r = 0,65$; $p = 0,002$), conteúdo de nitrogênio ($r = 0,72$; $p < 0,001$), o RQE ($r = 0,54$; $p = 0,006$) e o $rETR_{max}$ ($r = -0,74$; $p < 0,001$); e de forma negativa com o rendimento do ágar ($r = -0,71$; $p < 0,001$).

Figura 42: Variação na concentração de lipídeos totais, nas linhagens cultivadas na profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

Na linhagem verde, cultivada em 70 cm de profundidade, a concentração de lipídeos totais foi correlacionada positivamente com a precipitação pluviométrica ($r=0,69$; $p<0,001$), o nitrito ($r=0,66$; $p<0,001$) e PID ($r=0,79$; $p<0,001$), a ficocianina ($r=0,48$; $p=0,01$), clorofila-*a* ($r=0,51$; $p=0,002$), conteúdo de nitrogênio ($r=0,44$; $p=0,03$).

Na linhagem marrom, cultivada na superfície, a concentração de lipídeos totais foi correlacionada negativamente com a precipitação pluviométrica ($r=-0,66$; $p<0,001$), o nitrito ($r=-0,47$; $p=0,02$) e o RQE ($r=-0,53$; $p=0,007$); e positivamente com a radiação PAR ($r=0,65$; $p<0,001$), a GSH ($r=0,74$; $p<0,001$) e a concentração de paliteno e/ou usujireno ($r=0,67$; $p<0,001$).

Na espécie de estudo foram indentificados 10 ácidos graxos na espécie *G. domingensis*: Ácido Tetradecanóico (C14), Ácido Hexadecanóico (C16), Ácido Hexadecenóico (C16:1 Δ 9), Ácido Octadecanóico (C18), Ácido Octadecenóico (C18:1 Δ 9c), Ácido Eicosatrienóico (C20:3 Δ 8, 11, 14), Ácido Eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5, 8, 11, 14), Ácido Eicosapentaenóico (C20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17) e o Ácido Erúcico (C22:1 Δ 13). A concentração desses ácidos graxos foi somada, resultando na concentração total de ácidos graxos. Além disso, foram classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Figura 43: Variação na concentração de ácidos graxos, nas linhagens cultivadas em 70 cm de profundidade (1) e na superfície (2), na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

A concentração de ácidos graxos totais não diferiu de forma significativa entre as duas estações. No entanto, a concentração observada nas algas cultivadas na superfície foi superior, durante a estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 13,94$). As linhagens também apresentaram diferença na concentração. Na estação chuvosa ($p < 0,001$; $F = 24,36$), e na seca ($p < 0,001$; $F = 14,34$), a vermelha apresentou concentrações inferiores (**Figura 44**).

A concentração de ácido graxos totais na linhagem marrom foi correlacionado positivamente com a radiação UVA ($r = 0,49$; $p = 0,01$) e PAR ($r = 0,49$; $p = 0,002$), a temperatura ($r = 0,41$; $p = 0,04$), a GSH ($r = 0,51$; $p = 0,01$) e os lipídeos ($r = 0,65$; $p < 0,001$); e negativamente com a precipitação pluviométrica ($r = -0,47$; $p = 0,01$), o TDS ($r = -0,50$; $p = 0,01$), o rETR_{mx} ($r = -0,41$; $p = 0,04$), o RQE ($r = -0,50$; $p = 0,01$), a clorofila-a ($r = -0,44$; $p = 0,03$), a zeaxantina ($r = -0,46$; $p = 0,02$), o conteúdo de nitrogênio ($r = -0,52$; $p = 0,009$) e fósforo ($r = -0,41$; $p = 0,04$). Na linhagem vermelha foi correlacionado de forma positiva com nitrato ($r = 0,43$; $p = 0,04$), a ficoeritrina ($r = 0,42$; $p = 0,03$), a ficocianina ($r = 0,46$; $p = 0,02$), a proteína ($r = 0,45$; $p = 0,03$) e negativamente com β -caroteno ($r = -0,45$; $p = 0,02$). Na linhagem verde não foi observada correlação com qualquer parâmetro.

Figura 44: Variação na proporção de ácidos graxos em relação a concentração total, nas algas cultivada na profundidade (1) e na superfície (2); na estação chuvosa (Ch) e na seca (Sc), durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana, nas linhagens vermelha (Vm), verde (Vd) e marrom (M).

A proporção de ácido graxo saturado na estação chuvosa foi menor na linhagem verde e reduziu gradativamente entre a semana 1 e 4. Na estação seca a proporção de ácido graxo saturado nas algas cultivadas na superfície foi inferior as cultivadas em 70 cm de profundidade. A proporção de monoinsaturados não alterou de forma significativa. No entanto a de poliinsaturados, na estação chuvosa, foi superior na linhagem verde. O percentual de ômega 6, durante a estação chuvosa, também foi superior na linhagem verde (exceto na semana 4), especialmente nas alga cultivadas na superfície. Omega 3 foi identificado em apenas uma amostra, a linhagem vermelha cultivada durante a estação seca, na superfície.

4.2.17. Rendimento do Ágar

O rendimento do ágar diferiu de forma significativa entre as duas estações ($p < 0,001$; $F = 266,72$). As algas cultivadas durante a estação seca apresentaram o dobro do rendimento observado na chuvosa (**Figura 45**). Não foi observada diferença entre as linhagens.

Na estação chuvosa é observado uma leve redução no rendimento a partir da semana 1 e na estação seca, um leve aumento (**Figura 45**).

Figura 45: Variação no rendimento do ágar, nas linhagens cultivadas na estação chuvosa e na seca, durante quatro semanas. (A) corresponde à semana inicial, (B) à segunda semana, (C) à terceira semana e (D) à quarta semana. Caixas em cor vermelha representam a linhagem vermelha (Vm), em verde, a linhagem verde (Vd) e em laranja, a linhagem marrom (M). As caixas preenchidas representam a estação chuvosa (Ch) e as vazias, a estação seca (Sc).

O rendimento do ágar foi correlacionado positivamente com a radiação PAR ($r=0,75$; $p<0,001$), UVA ($r=0,74$; $p<0,001$) e UVB ($r=0,56$; $p=0,002$), a temperatura ($r=0,72$; $p<0,001$), a salinidade ($r=0,79$; $p<0,001$), concentração de zeaxantina ($r=0,52$; $p=0,009$), a GSH ($r=0,66$; $p<0,001$) e o conteúdo de carbono ($r=0,74$; $p<0,001$); e de forma negativa com os nutrientes dissolvidos, amônio ($r=-0,52$; $p=0,009$), nitrato ($r=-0,43$; $p=0,03$), nitrito ($r=-0,46$; $p=0,02$) e PID ($r=-0,63$; $p<0,001$), as proteínas ($r=-0,69$; $p<0,001$), os pigmento ficoeritrina ($r=-0,64$; $p<0,001$) e ficocianina ($r=-0,67$; $p<0,001$), violaxantina ($r=-0,65$; $p=0,002$), anteraxantina ($r=-0,78$; $p<0,001$) β -caroteno ($r=-0,46$; $p=0,02$), o conteúdo de nitrogênio ($r=-0,81$; $p<0,001$), conteúdo de fósforo ($r=-0,78$; $p=0,001$), o RQE ($r=-0,59$; $p=0,002$) e o rETRmax ($r=-0,70$; $p<0,001$) e o α ($r=-0,44$; $p=0,03$).

5. *DISCUSSÃO*

Na natureza, as algas não estão expostas a fatores de estresse ambiental de forma independente, mas experimentam esses fatores de forma coletiva, que exercem um efeito fisiológico sinérgico. Consequentemente, estudar o efeito de apenas um fator, quando este normalmente atua junto a outros fatores, pode trazer respostas pouco uteis (Sampath-Willey, 2008).

Neste estudo as algas foram cultivadas no mar e expostas a condições ambientais reais. Os parâmetros bioquímicos e fisiológicos analisados revelam as estratégias reais dessa espécie para lidar com as alterações observadas ao longo das horas, dos dias e das estações.

5.1. Experimento de Variação durante o período de luz do dia

Os resultados do experimento de variação durante o período de luz do dia demonstraram que o RQE e os parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas rápidas de luz, eficiência fotossintética e $rETR_{max}$, variaram de forma significativa ao longo do dia. Esses parâmetros aumentaram gradativamente durante o amanhecer (entre 5 h e 7 h). Possivelmente, isso ocorreu porque durante a noite a passagem de H^+ para fora do lúmen do tilacóide e a síntese de ATP cessam, ocorrendo equilíbrio de H^+ e inativação da ATP sintase, que é reativada com um específico limiar energético. Imediatamente após a iluminação a síntese de ATP não ocorre em sua taxa máxima e o transporte de elétrons é necessário para criação do gradiente de pH. Além disso, várias enzimas chaves do Ciclo de Calvin são inativadas durante o período de escuridão e são reativadas em um processo que requer o transporte de elétrons via sistema ferredoxina/tiorredoxina no fotossistema

I. O resultado da combinação desses mecanismos é a diminuição da fluorescência da clorofila-a (aumento do RQE e ETRmax) com a progressiva ativação do Ciclo de Calvin, que ocorre com o aumento na intensidade e tempo de exposição a luz (White & Critchly, 1999).

Os valores de RQE, rETRmax e eficiência fotossintética obtidos às 7 h nas três linhagens e nas duas condições de cultivo (superfície e 70cm de profundidade) está entre os valores máximos observados. Esse resultado indica que às 7 h essas algas já estavam com o aparato fotossintético funcionando com a mesma eficiência que em horários posteriores. Além disso, comparando o RQE obtido às 7 h com os demais, é possível observar redução no período do meio-dia, especialmente às 13 h, em algumas algas cultivadas durante a estação seca, na superfície, o que indica fotoinibição. Nesse horário, a linhagem vermelha cultivada durante a estação seca, na superfície (condição de maior intensidade luminosa), apresentou RQE bastante inferior. Entretanto, o aumento no RQE às 16 h, indica recuperação. Esse resultado evidencia a ocorrência de fotoinibição dinâmica, um processo regulatório ativo que protege o aparato fotossintético, através da redução da taxa fotossintética, do fotodano (Häder et al., 1998). Por outro lado, as algas cultivadas, durante a estação seca, na superfície, apresentaram valores de RQE (durante todo o dia), inferiores aos observados na estação chuvosa, o que é um indicativo de fotodano (Häder et al., 1998).

Plantas exposta por um longo período a elevados níveis de irradiância, sofrem danos no aparato fotossintético, principalmente degradação da proteína D1, seguida pela foto-oxidação dos pigmentos (Choudhury and

Behera, 2001). Neste experimento, a expressão gênica da proteína D1 foi superior nas algas cultivadas durante a estação seca e mais ainda nas cultivadas na superfície. Além disso, a expressão dessa proteína cultivada nessa condição, comparada com as cultivadas na estação chuvosa, na superfície, foi 4 vezes maior durante o meio-dia e 12 vezes durante o período da tarde. Quando comparada a expressão da proteína D1, individualmente nos tratamentos, verificando-se apenas as mudanças em relação ao amanhecer, foi observado aumento na expressão gênica durante o meio-dia, nas duas estações e no entardecer a expressão dessa proteína foi ainda superior ao observado no amanhecer. Portanto, esse aumento na expressão esteve relacionado ao aumento da irradiância e indica danos no fotossistema II e degradação da proteína D1.

A expressão da proteína D1, da proteína *core* do fotossistema I (PSI), da HSP 90, e da RuBisCo, foi superior nas algas cultivadas durante a estação seca na superfície, no período da tarde. O aumento na expressão da HSP 90, indica um ambiente oxidante, em função da exposição a elevada intensidade de luz ao longo do dia. As proteínas HSP, além de promoverem a reativação de proteínas, atuam na proteção às condições oxidantes e são induzidas por condições de estresse oxidativo (Rossel, 2002). Esses resultados portanto indicam a formação de um ambiente oxidante, que possivelmente resultou na degradação das proteínas (D1, RuBisCo e *core* do PSI), aumentando a expressão de HSP90. Além disso, as proteínas D1 e *core* do PSI, também são expressas em resposta a sinais redox da membrana do tilacóide (Steiner et al., 2009).

Nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, durante a estação chuvosa (condição de menor intensidade luminosa), os genes da proteína D1, core do PSI e HSP 90 aumentaram a expressão do amanhecer ao meio-dia e a RuBisCo apresentou o mesmo nível de expressão. Já no entardecer, a RuBisCo, a proteína D1 e core do PSI aumentaram e a HSP manteve o mesmo nível. Esse resultado mostra a correlação dessas proteínas em resposta às alterações ambientais, uma vez que o PSII está conectado ao PSI e que este atua na redução do NADPH, usado nas reações do ciclo de Calvin, processo no qual a RuBisCo é a principal enzima (Frias-Lopez et al., 2004). O aumento na expressão da RuBisCo, após um longo (horas) período de exposição, indica degradação da proteína durante o período e associada ao aumento na expressão das outras proteínas configura o efeito das alterações diurnas no balanço redox da alga.

A proteína RuBisCo é a proteína mais abundante em plantas, representando 50% das proteínas totais solúveis (Ellis, 1979). Neste estudo, a concentração de proteína solúvel total foi bastante reduzida na estação seca, o que indica redução na RuBisCo. Além disso, nas algas cultivadas nessa estação, tanto na superfície quanto na profundidade, a concentração de PTS também reduziu no período do meio-dia e aumentou no entardecer, associado a isso, a expressão gênica da RuBisCo também aumentou no entardecer. Esse resultado indica a degradação das proteínas em função do aumento na irradiância. A sensibilidade da RuBisCo ao estresse oxidativo é bem conhecida. Altos níveis de irradiância podem produzir um ambiente oxidante no cloroplasto levando a oxidação dos resíduos de cisteína e

desnaturação da RuBisCo (Cohen et al, 2005). Além disso, a RuBisCo pode ser desnaturada pelo aumento da radiação UV, que absorvida pelo triptofano, único aminoácido que absorve na faixa UVB, forma o triptofano *triplet*. O triptofano *triplet* reage com o oxigênio *singlet* e forma outros fotoprodutos mais reativos (Igarashi et al., 2007). A fotólise do triptofano, que está presente no sítio ativo da RuBisCo e na interface entre a subunidade maior e menor desnatura a enzima (Wilson et al., 1995).

Associado ao aumento na expressão das proteínas relacionadas a atividade fotossintética em função da irradiância, foi observado aumento na concentração de GSH. Nas algas cultivadas na estação seca, em relação ao observado na estação chuvosa esse aumento foi de 300% e é mais um indicativo do estresse oxidativo nessas algas durante o período de elevada irradiância. Além disso, a linhagem verde aumentou em 5 vezes a concentração de GSH no período do meio dia e reduziu durante o entardecer. Essa dinâmica reflete o papel da glutathiona na manutenção do estado redox e sugere um estresse controlado, já que a concentração de GSSG permaneceu baixa. Em plantas, além do papel na manutenção do balanço redox, a glutathiona atua na detoxificação de xenobióticos, de metais pesados e de forma geral, como um sinalizador celular. Neste estudo, a alta concentração de GSH e baixa concentração de GSSG sugere um caminho alternativo para a GSH, especialmente nas condições de elevada irradiância.

A glutathiona é a molécula tiol de baixo peso molecular mais abundante nas células, atuando como um tampão redox capaz de manter o ambiente celular reduzido. Essa molécula tem papel essencial na detoxificação de

espécies reativas de oxigênio (ERO) e pode ser oxidada a GSSG por algumas ERO, como H_2O_2 . Entretanto a GSH tem caminhos alternativos e pode reagir com o óxido nítrico formando o derivado GSNO ou atuar na regeneração do ascorbato, outro importante antioxidante, ou ainda fornecer elétrons a diversas peroxidases (Rouhier et al, 2008). Além disso, a GSH, especialmente na presença de EROs, promove a glutathionilação de diversas proteínas. A glutathionilação pode proteger a proteína de inativações irreversíveis e alterar, de forma positiva ou negativa, a atividade de muitas proteínas (Meyer & Hell, 2005; Rouhier et al, 2008). Estudos tem demonstrado a glutathionilação em enzimas do ciclo de Calvin, do ciclo glicolítico, e também na tioredoxina e sugerem que a glutathionilação pode constituir um novo mecanismo de regulação das enzimas do ciclo de Calvin em condição de estresse oxidativo (Iwabuchi & Ogawa, 2003; Lemaire et al., 2007; Michelet et al, 2005). Michelet et al. (2008) observaram que a concentração total de glutathiona também foi aumentada em condições de estresse e identificaram mais de 20 proteínas glutathioniladas, especialmente no cloroplasto, em *Chlamydomonas*. O estudo descreveu a glutathionilação em proteínas do ciclo de Calvin, proteínas do complexo RB (ativa a tradução da proteína D1) e proteínas envolvidas no estresse oxidativo, como a peroxidase. Michelet et al. (2013), sugeriram que a glutathionilação de proteínas constitui um importante mecanismo redox de regulação, em condições de estresse oxidativo em organismos fotossintéticos. Possivelmente este foi o principal destino das altas concentrações de GSH observada em *G. domingensis*, quando submetidas a elevada irradiância.

A concentração dos pigmentos fotossintéticos, clorofila-*a*, violaxantina, anteraxantina e β -caroteno, foi reduzida na estação seca. Decréscimos na concentração pigmentar em condição de elevada irradiância está relacionada a estratégias de fotoproteção. A redução na absorção de irradiância, evita a excitação excessiva do PSII e, conseqüentemente, a formação de EROs. Em algas vermelhas, a maior parte da clorofila-*a* está associada com o complexo coletor de luz do PSI e apenas algumas clorofila-*a* com o PSII, que utiliza o ficobilissomo como principal coletor de luz (Gantt, 1981). A redução desses pigmentos também indica uma redução no número de fotossistemas.

Diferentemente dos pigmentos descritos anteriormente, a concentração da xantofila zeaxantina não foi alterada durante as duas estações, mas foi superior nas algas cultivadas na superfície, em relação as cultivadas em 70 cm de profundidade. Esse pigmento tem um importante papel na dissipação térmica do excesso de energia absorvida, em condições de elevada irradiância. O aumento na concentração de zeaxantina no cloroplasto tem como principal função aumentar a dissipação do excesso de energia absorvida na forma de calor e proteger o PSII (Demmig-Adams 1990).

O ciclo das xantofilas ainda não foi completamente descrito em algas vermelhas (Schubert & García-Mendoza, 2008), embora muitas espécies apresentem violaxantina anteraxantina e zeaxantina e a interconversão desses pigmentos em diferentes condições de luz tenha sido descrita (Rmiki et al, 1996; Ursi, et al 2003). Neste experimento a concentração de violaxantina foi baixíssima o que sugere a pequena importância deste

pigmento no processo de interconversão das xantofilas. Dessa forma, é possível que em *G.domingensis*, o processo ocorra de forma majoritária entre a anteraxantina e zeaxantina. Além disso o ciclo das xantofilas é descrito como uma rápida interconversão (minutos ou segundos) entre os pigmentos (Demming-Adams, 1990; Demming-Adams & Adams III, 1992). No entanto, nos resultados obtidos nesse experimento, não foi observada variação durante o período de luz do dia nesses pigmentos, o que sugere uma conversão mais lenta na espécie. Nas condições experimentais, a anteraxantina e violaxantina foram mais abundantes nas condições de menor irradiância e a zeaxantina nas de maior.

Neste experimento, com exceção da ficoeritrina os pigmentos não diferiram de forma significativa entre os horários de medida. A concentração da ficoeritrina na linhagem vermelha foi reduzida durante o período do meio dia. Essa rápida mudança no conteúdo de ficoeritrina pode constituir uma estratégia de aclimação em resposta a alterações na irradiância ao longo do dia. Sob condições de baixa irradiância a concentração pigmentar é aumentada afim de aumentar a absorção de luz e o transporte de elétrons, mantendo a eficiência fotossintética alta. Inversamente, sob condições de elevada irradiância, a eficiência fotossintética diminui e a concentração pigmentar é diminuída afim de proteger o PSII de danos irreversíveis (Lüning, 1990).

A concentração de MAA, especialmente na linhagem verde, foi o parâmetro que menos diferiu entre os tratamentos. A concentração desse composto, na linhagem verde, foi elevada durante todo o período. Já a

linhagem vermelha, apresentou concentração inferior nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, durante a estação chuvosa. Essa linhagem aumentou a concentração de MAA nas algas cultivadas na superfície, durante a mesma estação e também aumentou nas algas cultivadas durante a estação seca. Essa menor concentração de MAA na linhagem vermelha cultivada sob menor intensidade luminosa, revela o papel do acúmulo de MAAs no processo de aclimação as variações ambientais nesta linhagem (Hoyer et al. 2001). Em geral, o conteúdo celular de MAA é correlacionado positivamente com os níveis de UVB no ambiente natural (Karsten et al. 1998; Huovinen et al. 2004).

A elevada concentração de MAA na linhagem verde, nas diferentes condições experimentais, revelam que esta linhagem diferentemente da vermelha, possui elevadas concentrações de MAA sempre, o que indica diferente estratégia de aclimação. As MAAs, além de importante papel na proteção contra a radiação UVB, também atuam como antioxidantes, fazendo parte da resposta ao estresse oxidativo em algas vermelhas (de la Coba et al. 2009).

As linhagens verde e marrom cultivadas durante a estação chuvosa, apresentaram aumento na concentração de paliteno e/ou usujireno ao longo do dia, o que indica uma resposta rápida na biossíntese dessa MAA em função do aumento na irradiância ao longo do dia. Em geral, o aumento na concentração de MAA é descrito por ocorrer em dias (Korbee-Peinado et al. 2004). O resultado obtido nesse estudo coincide com resultados recentes de

Navarro et al. (2014), que observou aumento na concentração de MAA no período de 2-3h, também expostas a irradiância solar.

Nesse estudo a irradiância exerceu um forte efeito sobre o aparato fotossintético, sendo possível observar algumas alterações diurnas indicativas de um padrão fisiológico em *G.dominagensis*. O conjunto de fatores analisados revelam uma ação orquestrada, relacionada principalmente ao estresse oxidativo, que aumenta com o aumento na irradiância.

5.2. Experimento de Variação durante quatro semanas de cultivo

O rendimento quântico efetivo reflete a probabilidade do uso, pelo centro de reação do fotossistema II da energia de excitação disponível para a fotoquímica. Na temperatura ambiente esse parâmetro reflete principalmente a fluorescência emitida pelos pigmentos do fotossistema II. Esse parâmetro é dependente do estado fisiológico do organismo e não da concentração pigmentar. O rETR é uma aproximação da taxa de transporte de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons e pode refletir alterações na concentração e atividade das enzimas do ciclo de Calvin e/ou em componentes da cadeia transportadora de elétrons (Raven and Geider, 2003; Cruz and Serôdio, 2008). A eficiência fotossintética reflete diferenças na capacidade em coletar a luz e portanto diferenças no tamanho e/ou número de fotossistemas e/ou a eficiência no transporte de elétrons no fotossistema (Beach et al., 1995). Por último, o I_k , está relacionado a dissipação de energia, onde sob irradiâncias inferiores ao I_k , a dissipação fotoquímica é

dominante e sob irradiância superior, a dissipação não fotoquímica é dominante (Ralph and Gademann, 2005).

Neste estudo os parâmetros fotossintéticos apresentaram valores superiores na estação chuvosa, o que reflete o efeito das condições ambientais observadas na estação seca sobre o sistema fotossintético de *G. domingensis*. As algas cultivadas na condição de maior intensidade luminosa (estação seca, na superfície) apresentaram valores inferiores dos parâmetros fotossintéticos até a semana 3, mas na semana 4 esses parâmetros aumentaram de forma bastante significativa nas três linhagens (mais intensamente na verde). Esse aumento no RQE e rETRmax, principalmente, representam aclimação da espécie a condição, já que nesta semana não foi observada queda na irradiância. Ao contrário, na semana 4 foi observado o maior nível de irradiância PAR ($3932,63 \pm 245,64 \mu\text{mol.fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a UVA e UVB permaneceram alta e a concentração dos nutrientes permaneceu baixa. Dessa forma, esse período de quatro semanas pode representar o tempo necessário para a espécie realizar as alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, necessárias para aclimação nessas condições.

Batista & Nechi (2008) sugeriram que a aclimação da alga ocorre a partir de duas estratégias: uma envolve alteração no tamanho do fotossistema e a outra no número de fotossistema. Algas expostas por um longo período a elevada irradiância inicialmente reduzem o tamanho do fotossistema e com a exposição prolongada, reduzem o número de fotossistema, apresentando aumento no rETRmax e I_k e redução do α . Essa estratégia é observada nas algas cultivadas na superfície, durante a estação

seca. O rETRmax e o I_k na semana 4 aumentou de forma bastante significativa e o α diminuiu. Associado a isso o nível proteico e pigmentar também diminuiu no período.

Na semana 4 foi observada a menor concentração dos pigmentos ficoeritrina, ficocianina, anteraxantina e violaxantina e menor teor de nitrogênio tecidual em relação a semana 1. Inversamente foi observada maior concentração de lipídeos totais, zeaxantina, glutathione reduzida e rendimento do agar. As linhagens verde e marrom também apresentaram maior concentração de ácidos graxos. A concentração da MAA paliteno e/ou usujireno também aumentou na semana 4, em relação a semana 1. Essas alterações refletem a estratégia de aclimação da espécie que resultou na reestruturação do aparato fotossintético e aumento da capacidade fotossintética, nas condições de elevada irradiância.

Esses resultados indicam o quanto essa espécie é dinâmica e consegue se aclimatar as diferentes condições ambientais observadas. A alta tolerância de *G. domingensis* a variações nos parâmetros ambientais está relacionada ao seu habitat. *G. domingensis* habita a região intertidal, sendo facilmente encontrada durante a maré baixa, na praia onde foi coletada e desenvolvido o experimento. Algas que habitam a zona intertidal apresentam alta tolerância as flutuações ambientais, o que está relacionado a características morfológicas (Chapman, 1986), fisiológicas e bioquímicas da espécie (Lüning, 1990; Malm and Kautsky, 2003; Murru and Sandgren, 2004).

As algas cultivadas durante a estação seca, apresentaram baixos valores de rETR e I_k durante todo o período, com exceção da semana 4.

Associado a isso, essas algas apresentaram alta concentração de zeaxantina, que tem múltiplo papel fotoprotetor, incluindo dissipação da clorofila *triplet*, neutralização das espécies reativas de oxigênio e redução da atividade coletora de luz no fotossistema (Ballotari et al., 2014). A zeaxantina, no ciclo das xantofilas, é convertida a partir da violaxantina, a anteraxantina e então a zeaxantina. Nesta espécie essa conversão parece estar resumida a anteraxantina e zeaxantina. Essa conversão ocorre a partir da acidificação do lúmen do cloroplasto, sendo ΔpH dependente (Demmig-Adams, 1990). A zeaxantina se liga ao complexo do PSII e do PSI, induzindo a dissipação não fotoquímica e modifica a interação do complexo antena coletor de luz com o core do fotossistema, reduzindo a transferência de energia dos complexos coletores para o fotossistema e aumentando a dissipação não-fotoquímica (Ballotari et al., 2014).

O aumento na concentração de GSH observado neste experimento, mais uma vez reflete a estratégia de ação antioxidante da alga nas condições de intensa irradiância. A alta concentração na linhagem vermelha durante a semana 4, nas algas cultivadas na superfície (durante a estação seca) pode ser um indicativo de maior estresse nessa linhagem que nas outras. O aumento na concentração de GSH ao longo das semanas, especialmente nas algas cultivadas na superfície, revelam a importância dessa molécula no processo de aclimação de *G. domingensis*. A não detecção de GSSG também nesse experimento de exposição prolongada, é mais um indicativo de um caminho alternativo para a GSH nas condições observadas.

A concentração de MAA total entre as duas estações, diferiu apenas na linhagem vermelha, que apresentou baixa concentração durante a estação chuvosa e aumentou na estação seca. Por outro lado, na linhagem verde (que apresentou elevada concentração de MAAs durante todo o período) cultivada na superfície, durante a estação seca, a proporção (e a concentração) de paliteno e/ou usujireno foi maior e a de porphyra-334 e chinorina e palitina, foi menor. Essa proporção também aumentou ao longo das semanas, sendo maior na semana 4. Shick (2004) classificou as MAAs em primárias (micosporina-glicina, chinorina e porphyra-334) e secundárias, que seriam sintetizadas à partir das primárias. Portanto, os resultados observados na linhagem verde, sugerem que nas algas expostas a altos níveis de irradiância, as MAAs primárias foram convertidas em paliteno e/ou usujireno ao longo das semanas. Outros estudos (Navarro, 2014; Callone et al., 2006; Kräbs et al. 2002) também descreveram a interconversão das MAAs em resposta variações nas condições ambientais.

Outro fator de fotoproteção observado nas algas cultivadas durante a estação seca foi o aumento na síntese de ágar. Morfologicamente as algas cultivadas durante a estação seca diferiram bastante da chuvosa, especialmente nas últimas semanas de cultivo. As algas cultivadas na estação chuvosa, especialmente em 70 cm de profundidade, eram delicadas, apresentando várias ramificações fininhas e de cor muito intensa. Já as cultivadas durante a estação seca, na superfície, eram muito mais robustas, com poucas ramificações e de cor pálida. Essas alterações na cor possivelmente estão relacionadas ao declínio na concentração pigmentar

(especialmente a ficoeritrina) e aumento na concentração de zeaxantina que tem cor amarela. Já o aumento na rigidez pode está relacionado ao aumento na síntese de ágar, que na estação seca dobrou o rendimento. O ágar constitui um importante componente da parede celular das algas marinhas classificadas como agarófitas. Na literatura, a matriz de polissacarídeos é descrita com funções específicas, como proteção mecânica, osmótica e regulação iônica, especialmente em algas de região intertidal (Kloareg & Quatrano, 1988). Os resultados obtidos nesse estudo, sugerem que o ágar pode ter também função de fotoproteção, constituindo uma barreira física sobre a camada de células fotossintéticas.

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com dados da literatura (Romero et al., 2007; Marinho-Soriano, 2001 e 2003) que também observaram maior rendimento do ágar durante a estação seca. O aumento no rendimento do ágar também está relacionado as condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Nessa condição pode haver um desvio no metabolismo, privilegiando a síntese de polissacarídeos em função da limitação na síntese de proteínas (Dawes et al., 1974). Givernaud et al (1999) também observaram o aumento na síntese de ágar em condições de elevada irradiância e baixa disponibilidade de nutrientes. O rendimento obtido na estação chuvosa é similar ao descrito na literatura para esta espécie coletadas em praias do Rio Grande do Norte (Duraraitman et al., 1990). Entretanto o aumento observado durante a estação seca é bastante superior, o que indica a capacidade da espécie para modificar o metabolismo e aumentar de forma considerável a síntese desse produto, sob condições de

estresse. Além disso, apesar de não ter sido analisada a qualidade do ágar neste estudo, durante a extração foi possível observar que o ágar extraído das algas cultivadas durante a estação seca, era muito mais consistente (como uma gelatina), já os da estação chuvosa era menos consistente (como uma “baba”). Isso pode indicar um aumento também na qualidade do ágar.

O ágar extraído de *G. domingensis* é considerado de baixa qualidade e por isso pouco explorado no litoral brasileiro, apesar da abundância da espécie (Oliveira, 2006). Os resultados obtidos nesse experimento indicam que as condições ambientais podem aumentar o rendimento e possivelmente a qualidade do ágar na espécie, tornando-a uma forte candidata a exploração na maricultura comercial.

A concentração de lipídeos diferiu entre as duas estações apenas nas algas cultivadas em 70 cm de profundidade, sendo superior na estação chuvosa. Entretanto, nas algas cultivadas na superfície durante a estação seca, a concentração de lipídeos inicialmente foi menor nas algas cultivadas na superfície, mas aumentou gradativamente ao longo das semanas, alcançando na semana 4 valor igual ou superior ao observado na estação chuvosa.

A maior concentração de lipídeos nas algas cultivadas durante a estação chuvosa, pode estar relacionado a estrutura e número de cloroplasto nas células. Plantas cultivadas sob baixa ou moderada intensidade luminosa, apresentam cloroplastos grandes em elevado número. A membrana do tilacóide desses cloroplastos apresentam grande volume e um número maior de pilhas por grana. Inversamente, plantas submetidas a elevada irradiância

apresentam redução no número e no tamanho de cloroplastos, redução no volume da membrana do tilacóide e na quantidade de pilhas na grana (Maxwell et al, 1999). Em algas, a concentração dos lipídeos do cloroplasto é dominante no extrato de células totais, principalmente porque o tilacóide do cloroplasto é a principal membrana intracelular (Harwood, 1998). Dessa forma, a maior concentração de lipídeos nas algas cultivadas durante a estação chuvosa pode estar relacionada ao maior número e estrutura de cloroplastos. Já o aumento crescente na concentração de lipídeos nas algas cultivadas sob elevada intensidade luminosa (na superfície, durante a estação seca), pode estar relacionado ao acúmulo de lipídeos como material de reserva. Schmid et al. (2010), observaram aumento no número de estruturas lipídicas, plastoglobulinas, em *G. domingensis* expostas a radiação PAR+UVB e sugeriram que o aumento na síntese de lipídeos estaria relacionado a redução na síntese de proteínas, desviando o metabolismo para a síntese de lipídeos, especialmente em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com Khotimchenko & Yakovleva (2005), que observaram aumento na concentração de componentes lipídicos estruturais de membrana na alga vermelha *Tichocarpus crinitus* exposta a baixa irradiância e aumento nos níveis de lipídeos de reserva quando esta alga foi exposta a alta irradiância.

Neste estudo a concentração de ácidos graxos foi similar entre os tratamentos, havendo poucas alterações e portanto não foi possível observar uma tendência em relação aos parâmetros ambientais.

O maior percentual de carbono no tecido das algas durante a estação seca, está relacionado ao maior percentual de ágar observado no período e indica uma maior assimilação de carbono durante o período. Chapman and Craigie (1977, 1978), observaram o acúmulo de carboidratos como material de reserva durante o verão (elevada irradiância e baixa disponibilidade de nutrientes), quando ocorreu a maior assimilação fotossintética de carbono. Durante o inverno o carboidrato armazenado foi consumido, suprimindo o requerimento energético para o crescimento, durante a elevada disponibilidade de nutrientes e menor intensidade luminosa. Possivelmente esta é também a estratégia de *G. domingensis*.

O percentual de nitrogênio tecidual foi superior nas algas cultivadas durante a estação chuvosa. Essa maior concentração de nitrogênio esteve relacionada a abundante disponibilidade do nutriente na água do mar, durante toda a estação chuvosa. O maior percentual de nitrogênio nas algas da superfície (estação chuvosa), indicam um aumento na absorção de nitrogênio em função do efeito combinado de maior disponibilidade de nitrogênio e aumento (moderado) na irradiância. A luz afeta a absorção de nutrientes de forma indireta através da fotossíntese, que fornece energia (ATP) para o transporte ativo; produz esqueletos de carbono necessários para a incorporação dos íons em moléculas maiores, como proteínas e aminoácidos; fornece energia para a produção de cargas iônicas que estabelecem o potencial de Donnan (distribuição de íons entre duas soluções iônicas separadas por uma membrana semipermeável); e aumentam a taxa de crescimento, aumentando a necessidade de nutrientes.

Durante a estação seca, ocorreu o inverso, as algas cultivadas na superfície apresentaram percentual menor de nitrogênio, em relação as cultivadas em 70 cm de profundidade, na mesma estação. Isso, possivelmente está relacionado a alta irradiância nessa condição de cultivo, que resultou na degradação de proteínas, ficoeritrina e ficocianina, moléculas que desempenha papel de reserva de nitrogênio.

A linhagem vermelha apresentou concentração superior de nitrogênio em alguns momentos durante o experimento, o que possivelmente está relacionado a capacidade de síntese e acúmulo de ficobiliproteínas. Por outro lado, as linhagens verde e marrom apresentaram concentrações iguais ou superiores a vermelha, especialmente a partir da semana 2. Isso pode estar relacionada a alta concentração de MAA durante todo período, que nas linhagens verde e marrom podem também atuar como reserva de nitrogênio. Portanto, a síntese dessas moléculas nas linhagens verde e marrom, durante a estação chuvosa, pode ter sido estimulada pela disponibilidade de nitrogênio e durante a estação seca pela irradiância.

O conteúdo percentual de fósforo apresentou a mesma dinâmica observada para o nitrogênio entre os tratamentos, com concentração superior nas algas cultivadas durante a estação chuvosa, na superfície. O conteúdo deste nutriente também esteve correlacionado com a disponibilidade do nutriente na água do mar. A absorção de fósforo, ocorre na forma de fósforo inorgânico e depende da atividade de fosfatases extracelular (Hernandez et al., 2002) e assim como ocorre com o nitrogênio, em condição de elevada disponibilidade deste nutriente a alga absorve concentrações superiores as

necessidades imediatas e estocam o excesso para utiliza-lo em condições de baixa disponibilidade (Perdesen et al., 2010).

Neste estudo, os parâmetros ambientais atuaram de forma sinérgica sobre as três linhagens de *G. domingensis*. Durante o experimento de variação em quatro semanas de cultivo foi possível observar alterações no metabolismo, que descrevem a capacidade de aclimação da espécie em condições ambientais tão diferentes, como as observadas nesses estudo.

As três linhagens foram capazes de se aclimatar as condições impostas, apresentando leves diferenças. No entanto, os resultados indicam uma maior adaptação da linhagem verde a ambientes de intensa irradiância, o que está relacionada, principalmente ao alto conteúdo de MAA na linhagem e baixa concentração de ficobiliproteínas. Já a vermelha pode se beneficiar melhor de um ambiente com menor intensidade luminosa e a marrom apresentou condições intermediárias entre as duas linhagens.

6. *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

A tabela a seguir resume os principais resultados obtidos neste estudo:

Tabela 15: Resumo dos principais resultados obtidos neste estudo.

Estação Chuvosa	Estação Seca
Maior disponibilidade de nutrientes dissolvidos	Menor disponibilidade de nutrientes dissolvidos
Menor irradiância (PAR, UVA e UVB)	Maior irradiância (PAR, UVA e UVB)
Menor temperatura	Maior temperatura
Menor salinidade	Maior salinidade
Maior RQE e rETRmax	Menor RQE e rETRmax
Maior concentração pigmentar (ficobiliproteínas)	Menor concentração pigmentar (ficobiliproteínas)
Maior teor proteico	Maior conteúdo de ágar
Maior teor de Nitrogênio (tecidual)	Maior teor de Carbono (tecidual)
Maior teor de Fósforo (tecidual)	Maior concentração de zeaxantina
Maior concentração de anteraxantina	Maior proporção de paliteno-usujireno
	Maior concentração de GSH

- ✓ Os resultados obtidos apontam para uma mudança no metabolismo da macroalga *G. domingensis*, entre as estações chuvosa e seca. Na estação chuvosa os resultados indicam que o metabolismo está direcionado para a produção de proteínas e na seca para carboidratos.
- ✓ A reduzida concentração pigmentar observada nas algas cultivadas durante a estação seca, indica estratégia de fotoproteção. Este resultado associado ao aumento na concentração de MAAs, observado na linhagem vermelha, e manutenção de elevados valores desses compostos na linhagem verde e marrom e aumento na concentração de GSH mostram-se como as principais estratégia de aclimação da espécie.
- ✓ A maior proporção do carotenóide zeaxantina e da miscosporina paliteno-usujireno, durante a estação seca, indicam que estes compostos desempenham papel determinante na aclimação as condições de elevada irradiância.
- ✓ A espécie *G. domingensis* apresentou alta capacidade de aclimação as condições as quais foram submetidas, sendo observada pequena diferença entre as linhagens e um alto potencial econômico da espécie.

7. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aguilera, J., Karsten, U., Lippert, H., Vögele, B., Philipp, E., Hanelt, D., Wiencke, C. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Marine Ecology Progress Series* 191:109–119, 1999

Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D., Wiencke, C. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology* 140: 1087–1095, 2002

Ballottari, M., Alcocer, M. J. P., D'Andrea, C., Viola, D., Ahn, T. K., Petrozza, A., Fleming, D. P. R., Cerullo, G. e Bassi, R. Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin. *PNAS-Plant Biology*, 2014 (published ahead of print May 28, 2014)

Bautista A. I., Necchi-Júnior O. Photoacclimation in a tropical population of *Cladophora glomerata* (L.) Kützinger 1843 (Chlorophyta) from southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 68 (1): 129-36, 2008.

Beach, K. S., Smith, C. M., Michael, T. M. & Shin, H.-W. Photosynthesis in reproductive cells of *Ulva fasciata* and *Enteromorpha flexuosa*: implications for ecological success. *Marine Ecology Progress Series* 125:129–37, 1995.

Becker, J. e Craig, E. A. Heat-Shock Proteins as Molecular Chaperones. *European Journal of Biochemistry* 219 (1-2): 11-23, 1994.

Beer, S. e Eshel, A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 36: 785-792, 1985.

Bischof, K., Hanelt, D., Wiencke, C. Effects of ultraviolet on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211: 555–562, 2000

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.

Buma, A. G. J., Engelen, A. H., Gieskes, W. W. C. Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* 153: 91 – 97, 1997.

Callone, A. I., Carignan, M., Montoya, N. G. e Carreto, J. I. Biotransformation of mycosporine like amino acids (MAAs) in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 84 (3): 204-212, 2006.

Chapman, A., R., O. Population and community ecology of seaweeds. *Marine Biology* 23: 1-161, 1986.

Chapman, A. R. O., Craigie, J. S. Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Marine Biology* 40: 197-205, 1977.

Chapman, A. R. O. E Craigie, J. S. Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with reserve carbohydrate storage and nitrogen production. *Marine Biology* 46: 209-213, 1978.

Cohen, I., Knopf, J. A., Irihimovitch, V. e Shapira, M. A Proposed Mechanism for the Inhibitory Effects of Oxidative Stress on RuBisCo Assembly and Its Subunit Expression. *Plant Physiology*, 137: 738–746, 2005.

Choudhury N. K., Behera, R. K. Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents. *Photosynthetica*, 39 (4): 481-488, 2001.

Cruz, S. e Serodio, J. Relationship of rapid light curves of variable fluorescence to photoacclimation and non-photochemical quenching in a benthic diatom. *Aquatic Botany* 88: 256–264, 2008.

Davidson, A. T., Marchant, H. J., De la Mare, W. K. Natural UV-B exposure changes the species composition of Antarctic phytoplankton in mixed culture. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 299–305, 1996

Dawes, C.J., Lawrence, J.M., Cheney, D.P., Mathieson, A.C. Ecological studies on Floridean *Euchema* (Rhodophyta: Gigartinales). III. Seasonal variation of carageenan, total carbohydrate, protein and lipid. *Bulletin of Marine Science*, 24: 286–299, 1974.

Declewa, D. V. L. Atividade dos sistemas antioxidantes da microalga *Minutocellus polymorphus* frente exposição a cádmio. Universidade de São Paulo, 2012.

Demming-Adams, B. e Adams, W. W. Photoprotection and other response of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 43: 599-626, 1992.

Demming-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020: 1-24, 1990.

de la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F. L., de Galvez, M. V., Herrera, E. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology* 21: 161-169, 2009.

Dunlap, W. C. e Shick, J. M. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology* 34:418–430, 1998.

Durairatnam, M., Medeiros, T. M. B., Sena, A. M. Studies on the yield and gel strength of agar from *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kuetzing (Gracilariales, Rhodophyta) following the addition of calcium. *Hydrobiologia*, 204-205 (1): 551-553, 1990.

Ellis, R. J. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* 4: 241-244, 1979.

Franklin, L. A., Forster, R. M. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology* 32:207–232, 1997.

Frias-Lopez, J., Bonheyo, G. T. e Fouke, B. W. Identification of Differential Gene Expression in Bacteria Associated with Coral Black Band Disease by Using RNA-Arbitrarily Primed PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3687-3694, 2004.

Gantt, E. Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32: 327–347, 1981.

Givernaud, T., Gourji, A. E., Mouradi-Givernaud, A., Lemoine, Y. e Chiadmi, N. Seasonal variations of growth and agar composition of *Gracilaria multipartita* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiologia*, 398-399: 167–172, 1999.

Guaratini, T., Cardozo, K. H. M., Pinto, E., Colepicolo, P. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C(30) reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20: 1609-1616, 2009.

Guimarães, M., Plastino, E. M. e Destombe, C. Green mutant frequency in natural population of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. *European Journal of Phycology* 38: 165-169, 2003.

Häder, D., P., Lebert, M., Figueroa, F. L., Jiménez, C., Viñegla, B., Perez-Rodriguez, E. Photoinhibition in Mediterranean macroalgae by solar radiation measured on site by PAM fluorescence. *Aquatic Botany*, 61 (3): 225–236, 1998.

Harwood, J. L. Membrane Lipids in Algae. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht : Springer, 6: 205-222, 1998.

Hernandez, I., Martinez-Aragon, J. F., Perez-Llorens, J. L., Vazquez, R., Vergara, J. J. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 1 Phosphate. *Journal of Applied Phycology* 14: 365–374, 2002.

Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T., Wiencke, C. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Marine Ecology Progress Series* 211: 117–129, 2001.

Huovinen, P., Gomez, I., Figueroa, F. L., Ulloa, N., Morales, V., Lovengreen, C. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Botanica Marina* 47:21–29, 2004.

Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte – IDEMA. Perfil do seu Município, Rio do Fogo volume 10: pag 1 a 23, 2008.

Iwabuchi, M. e Ogawa, K. The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione. *Plant & Cell Physiology*. 44:655–60, 2003.

Igarashi, N, Onoue, S, Tsuda, Y. Photoreactivity of amino acids: Tryptophan-induced photochemical events via reactive oxygen species generation. *Analytical Sciences* 23: 943-948, 2007.

Jeffrey, S. W., MacTavish, H. S., Dunlap, W. C., Vesik, M., Groenewoud, K. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. *Marine Ecology Progress Series* 189:35–51, 1999

Karsten, U., Bischof, K., Wiencke, C. Photosynthetic performance of Arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow Waters. *Oecologia*

127:11–20, 2001

Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F. L., Flores-Moya, A., Wiencke, C. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Botanica Marina* 41: 443–453, 1998.

Khotimchenko, S. V., Yakovleva, I. M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66 (1) 73–79, 2005.

Maxwell, K., Marrison, J. L., Leech, R. M. Griffiths, H. e Horton, P. Chloroplast Acclimation in Leaves of *Guzmania monostachia* in Response to High Light *Plant Physiology* 121 (1): 89-96, 1999.

Kirchhoff V.W.J.H., Echer E., Leme N.P., Silva A.A. A Variação Sazonal da Radiação Ultravioleta Solar Biologicamente Ativa. *Brazilian Journal of Geophysics* 18 (1): 63-73, 2000.

Kloareg, B., Quatrano, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 26: 259-315, 1998.

Korbee-Peinado, N., Abdala-Díaz, R. e Figueroa, F. L. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* 40: 248–259, 2004.

Kräbs, G., Bischof, K., Hanelt, D., Karsten U., Wiencke C. Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* under natural solar radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 69-82, 2002.

Krzywinski, M. e Altman, N. Points of Significance: Visualizing samples with box plots. *Nature Methods* 11: 119–120, 2014.

Lemaire, S. D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E. Thiore-doxins in chloroplasts. *Current Genetics*. 51:343–65, 2007.

Lesser, M. P. Acclimation of phytoplankton to UVB radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Marine Ecology Progress Series* 132:287–297, 1996.

Lüning, K. Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, New York, p. 527, 1990.

Martins, A. P. Avaliação do Potencial Biotecnológico de Macroalgas Marinhas. Universidade de São Paulo, 2013.

Meyer, A. J., Hell, R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*. 86:435–57, 2005.

Michelet, L, Zaffagnini, M., Vanacker, H., Le Maréchal, P., Marchand, C., Schroda, M., Lemaire, S. D. e Decottignies P. In Vivo Targets of S-Thiolation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 21571-21578, 2008.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J. M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., Lemaire, S. D. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *PNAS, USA* 102: 16478–83, 2005.

Marinho-Soriano, E., Bourret, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology* 90 (3): 329-33, 2003.

Marinho-Soriano, E., Silva, T. S., Moreira, W. S. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea*

from Brazil. *Bioresource Technology* 77 (2): 115-20, 2001.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C. H., Fermani, S., Trost, P. e Lemaire, S. D. Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Frontiers in Plant Science* 4 (470): 1-21, 2013.

Malm, T., Kautsky, L. Differences in life–history characteristics are consistent with the vertical distribution pattern of *Fucus serratus* and *Fucus vesiculosus* (Fucales, Phaeophyceae) in the central Baltic Sea. *Journal of Phycology* 39 (5): 880–887, 2003.

Marques, L. G., Zambotti-Villela, L., Stein, E. M., Colepicolo, P. Screening of mycosporine-like amino acids in seaweed from Southeastern Brazilian coastline. 2014. (em preparação).

Murru, M., e Sandgren, C. D. Habitat matters for inorganic carbon acquisition in 38 species of red macroalgae (Rhodophyta) from Puget Sound, Washington, USA. *Journal of Phycology* 40 (5): 837–845, 2004.

Navarro, N. P., Mansilla, A., Figueroa, F. L., Korbee, N., Jofre, J., Plastino, E. Short-term effects of solar UV radiation and NO_3^- supply on the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under spring ozone depletion in the sub-Antarctic region, Chile. *Botanica Marina* 57 (1): 9-20, 2014.

Neale, P. J., Banazak, A. T., Jarriel, C. R. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like-aminoacids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology* 34:928–938, 1998.

Oliveira, E. The seaweed resources of Brazil. In: Critchley, A. T. e Ohno, M. (eds). Seaweed resources of the world. *Japan International Cooperation Agency. Yokosuka, Japan.* 366-371pp, 1998.

Oliveira, E. C. The Seaweed resources of Brazil. In Critchley AT, Ohno M, Largo DB (Eds). World Seaweed Resources-An authoritative reference system. DVD, 2006.

Platt, T., Gallegos, C. L., Harrison, W. G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687-701, 1980.

Pedersen, M., Borum J., Fotel F. Phosphorus dynamics and limitation of fast- and slow- growing temperate seaweeds in Oslofjord, Norway. *Marine Ecology Progress Series* 399:103–115, 2010.

Ralph, P. J. e Gademann, R. Rapid Light Curves: A powerful tool for the assessment of photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82: 222-237, 2005.

Raven, J. A. e Geider, R. Adaptation, acclimation and regulation in algal photosynthesis, 2013. In: Larkum AWD, Douglas S. E., Raven J. A. (eds) Photosynthesis in algae. Kluwer, Dordrecht, 385–412.

Riegger, L., Robinson, D. Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Marine Ecology Progress Series* 160:13–25, 1997.

Rodermel, S., Haley, J., Jiang, C. Z., Tsai, C. H., Bogorad, L. A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose biphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. PNAS, USA 93: 3881–3885, 1996

Rmiki, N., Brunet, C., Cabioch, J., Lemoine, Y. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiologia*, 326/327: 407-413, 1996.

Romero J. B., Montaña, M. N. E., Merca, F. E., Villanueva, R. D., Liao, M. L., Bacic, A. Seasonal variations in the composition and gel quality of agar from *Gracilaria edulis* in the Philippines. *Botanica Marina*. 50 (3): 191–194, 2007.

Rossel, J. B., Wilson, I. W., Pogson, B. J. Global Changes in Gene Expression in Response to High Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130: 1109–1120, 2002.

Rouhier, N., Lemaire, S. D., Jacquot, J. P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 143–166, 2008.

Sampath-Wiley, P., Neefus, C. D., Jahnke, L. S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361: 83–91, 2008.

Schmittgen, T. D. e Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3: 1101–1108, 2008.

Schubert, N. e García-Mendoza, E. Photoinhibition in red algal species with different carotenoid profiles. *Journal of Phycology* 44: 1437-1446, 2008

Strickland, J. D. H. e Parsons, T. R. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada*, Ottawa, 310p, 1972.

Silva, F. R., Oliveira, H. S. M., Marinho G. S. Variação do índice de radiação solar ultravioleta em natal-rn entre 2001 e 2007. II Congresso Brasileiro de Energia Solar e III Conferência Regional Latino-Americana da ISES - Florianópolis, 18 a 21 de novembro de 2008.

Steiner, S., Dietzel, L., Schröter, Y., Wagner V. F. R. e Pfannschmidt T. The Role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard. *Molecular Plant*, 2 (3): 416-429, 2009.

Schmidt, E. C., dos Santos, R., Horta, P. A., Maraschin, M., Bouzon, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis*

(Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* 41(8): 919-30, 2010.

Schmittgen T. D. & Livak K. J. Analysing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*. 3(6):1101-8, 2008.

Shick, J. M. The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAS) in the coral *Stylophora pistillata*. *Limnology and Oceanography*, 49 (2): 442-458, 2004.

Ursi, S., Pedersén, M., Plastino, E. e Snoeijs, P. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology* 142: 997-1007, 2003.

Wilson, M. I., Ghosh, S., Gerhardt, K. E., Holland, N., Babu, T. S., Edelman M., Dumbroff, E. B., Greenberg, B. M. In vivo photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet B radiation: Formation of a 66-kilodalton variant of the large subunit. *Plant Physiology* 109:221-229, 1995.

Witzel, I.I., Koh, L.F., Perkins, N.D. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochemical Society Transactions* 38 (1):217-22, 2010.

White A.J. & Critchley, C. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 59 (1) 63-72, 1999.

Yokoya, N. S., Necchi, O., Martins, A. P., Gonzalez, S. F. & Plastino, E. M. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and pycoerythrin-deficient strains of *Hypneas musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19: 197-205, 2007.

8. *ANEXO*

Resultados parciais obtidos em colaboração com os pesquisadores, Prof. Dr. Dieter Hanelt (Hamburg University, Alemanha) Prof. Dra. Inka Bartsch e Prof. Dr. Christian Wiencke (Alfred Wegener Institut, Alemanha):

Efeito da variação na Temperatura e Irradiancia sobre duas linhagens de
Saccharina latíssima

Introdução

As mudanças globais tem resultado em um aumento da temperatura média global da superfície dos oceanos de $0,6 \pm 0,2$ °C no último século (Parry et al. 2007) e aumentos maiores estão sendo registrados nos polos, regiões temperadas e estuários. A distribuição global das algas marinhas é fortemente determinada pela temperatura (Luning, 1984) e esse aquecimento dos oceanos provavelmente causará alterações na distribuição e abundancia de muitas espécies de algas marinhas.

Produtores primários bentônicos contribuem de forma considerável para a produtividade primária de águas costeiras, oposto ao que ocorre no sistema oceânico, onde o fitoplâncton é o único produtor primário (Gattuso et al., 2006). As florestas de *kelp*, grande alga marrom da ordem Laminariales, cresce desde o ecossistema ártico onde longos invernos polares e uma extensa camada de gelo limitam a estação com luz a um pequeno período no verão (Borum et al, 2002). Apesar dessas condições, a produtividade primária dos kelps e outras macroalgas contribuem com até 20% da produtividade total de regiões costeiras no Ártico e excede a produtividade primária pelágica em áreas com profundidade de até 20 m. Além disso, as florestas de *kelp* promovem substrato para animais sésseis, abrigo e proteção contra

predação, ação das ondas e correntes. Dessa forma, *kelps* são espécies chave no ecossistema costeiro afetando o fluxo de carbono e biodiversidade (Steneck et al., 2002).

Saccharina latissima (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl e G.W. Saunders é uma espécie de alga marrom perene, comumente encontrada na região costeira temperada nórdica e forma densas floresta no ártico (Bartsch et al, 2008). Nos últimos anos esta espécie de *kelp* vem reduzindo drasticamente em algumas áreas (Moy & Christie, 2012), o que vem estimulando um forte debate sobre as causas potenciais. O aquecimento da água dos oceanos e a eutrofização tem sido apontados como os principais fatores.

Este estudo teve como objetivo investigar a capacidade de aclimação da espécie *Saccharina latissima*, provenientes de duas regiões diferentes e possíveis diferenças entre os indivíduos.

Materiais e Métodos

Culturas uni-algais de *S. latissima* coletada em Spitsbergen (Ártico) (linhagem *Spitsbergen* - Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, AWI cultura número 3123x3124) e *S. latissima* coletada na Suécia (linhagem *Swedish* - Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, AWI cultura número 3262x3263), foram cultivadas em meio enriquecido com Provasoli (Provasoli 1968) água estéril à 10 °C e fluxo de fóton em cerca de 35 $\mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Osram L36W/965; Germany) sob um ciclo de diário de 16 horas luz: 8 horas escuro e aeração continua com ar natural.

Esporófitos foram expostos a três diferentes irradiâncias (5, 35 and 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperaturas (2, 10 and 18 °C). Replicatas de *S. latissima* linhagem *Spitsbergen* e *Swedish* foram submetidas a essas condições durante um período de 15 dias.

Seis béqueres (2 L), com 6 replicatas, foram submetidas as condições experimentais. Uma replicata corresponde a uma única fronde de cada linhagem, aproximadamente 100 mg peso fresco. As algas foram cultivadas em água do mar estéril com salinidade de 32 e enriquecida com Provasoli. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias à fim de evitar depleção dos nutrientes e/ou contaminação. O experimento foi conduzido em salas com temperatura controlada e irradiâncias obtidas a partir de lâmpadas branca fluorescente (Osram, L36W/965, Germany), determinada à partir de um medidor de quanta (LI-COR Inc. LI-250A, USA). O meio foi constantemente aerado com ar artificial enriquecido com CO₂ (20% O₂, 80% N₂) em um misturador de gás automatizado (HTK GmbH, Hamburg, Germany). Todos os *béqueres* foram preparados inicialmente com água à 10 °C e então transferidos para as salas de 2 °C e 18 °C. Os experimentos foram executados sob ciclo de 16 h luz: 8 h escuro . A performance de ambas as linhagens de *S. latissima* foram avaliadas através da determinação do aumento da biomassa, taxa de crescimento relativa, Fv/Fm e evolução fotossintética do oxigênio.

O peso fresco (PF) e o comprimento das algas foram determinados no início do experimento e a cada 3 dias, juntamente com a troca da água do meio de cultura. O crescimento foi calculado como porcentagem na TCR

aumentada em PF por dia (%day⁻¹) acordo com a equação: $TCR = [(lnW_t - lnW_0)/t] \times 100$, de W_0 representa o PF inicial e W_t o PF final (g), e t corresponde ao intervalo de tempo em dias.

A taxa fotossintética bruta foi determinada à partir da evolução do oxigênio utilizando um *oxygen micro-optodes* (fibra-ótica medidora de oxigênio Microx TX3 com compensação de temperatura e um micro-sensor de oxigênio do tipo agulha (PreSens, Germany) em uma câmara de incubação, na ausência de ar (volume 0,025 L) e registrado com o *software* OxyView TX3-V6.20 (PreSens, Germany). Pedacos de alga foram cortados no 12° dia de cultivo (~ 4 cm) e no 15° pesadas e gentilmente acomodadas sobre uma grade. A câmara foi completamente preenchida com água do mar estéril, que foi constantemente misturada usando uma pequena barra magnética. A respiração foi medida por 10 min no escuro e em seguida foi medida a fotossíntese por 20 min, na mesma irradiância e temperatura relativa a condição experimental. Antes de cada medida, três brancos, apenas água do mar na câmara, foram medidos.

A fluorescência *in vivo* da clorofila do PSII foi determinada com o fluorímetro portátil de pulso de luz modulada (PAM-2100, Walz, Germany). A fluorescência basal (F_0) foi determinada após manter a alga no escuro por 5 min. As medidas foram realizadas sempre no mesmo indivíduo. Um pulso de luz actínica saturante foi aplicado afim de se obter a fluorescência máxima (F_m) no escuro em espécies adaptadas ao escuro. A fluorescência variável (F_v) foi determinada como sendo a diferença entre F_m e F_0 e o rendimento

quântico ótimo (F_v/F_m) foi calculado como a taxa de F_v para F_m (Schreiber et al. 1994).

Resultados

Taxa de crescimento (biomassa) considerando os 15 dias de cultivo, foi normalizada afim de comparar as duas linhagens. Nesta normalização, o valor máximo alcançado para cada linhagem foi considerado 100% e com referência a este, foi calculado os demais. À partir dos gráficos abaixo (Figura 1) podemos observar o melhor desempenho da linhagem *Spitsbergen* na temperatura de 2 °C e em 18 °C a linhagem *Swedish* apresenta melhor desempenho.

Figura 1. Taxa de crescimento (biomassa) normalizada, na espécie *Saccharina latissima* linhagem (A) *Spitsbergen* e (B) *Swedish*, nas diferentes combinações de temperatura e irradiância, após 15 dias de cultivo.

A taxa fotossintética observada na temperatura de 10 °C foi similar entre as duas linhagens na irradiância de 35 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em 5 e 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a linhagem *Swedish* apresentou valores levemente superiores. Na temperatura de 18 °C os valores observados para *Swedish* foram superiores aos observados para *Spitsbergen* e o inverso ocorre na temperatura de 2 °C, o que é mais uma indicação da melhor aclimação da linhagem *Swedish* a temperaturas mais elevadas e da *Spitsbergen* a temperaturas mais baixas (Figura 2).

A respiração foi bastante superior na linhagem *Swedish*, principalmente nas irradiâncias de 5 e 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nas três combinação de temperatura (Figura 2).

Figura 2. Taxa fotossintética (evolução do oxigênio) e respiração na espécie *Saccharina latissima* linhagem (A) *Spitsbergen* e (B) *Swedish*, nas diferentes combinações de temperatura e irradiância, após 15 dias de cultivo.

Os valores de Fv/Fm na linhagem *Spitsbergen* apresentaram queda nas primeiras 24 horas de cultivo na temperatura de 2 e 18 °C, em 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3). Na condição 2 °C e 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi observada uma nova queda no 9° dia de cultivo.

Figura 3. Fv/Fm na espécie *Saccharina latissima* linhagem (A) *Spitsbergen*, e (B) *Swedish* nas diferentes combinações de temperatura e irradiância, durante o período de cultivo. (1) Algas cultivadas em 10 °C, (2) 10 °C e (3) 18 °C.

Os valores de F_v/F_m observados na linhagem *Swedish* são bastante inferiores aos observados na linhagem *Spitsbergen* em 2 °C, 35 e 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Na irradiância de 80 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ os valores de F_v/F_m foram inferiores aos observados em 5 e 35 $\mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nas três combinações de temperatura .

Discussão e Conclusão

A temperatura ótima para crescimento e fotossíntese varia amplamente entre os organismos fotossintéticos. Muitos são capazes de se aclimatar a alterações na irradiância e temperatura, dentro de uma faixa de tolerância. A aclimação a essas alterações envolve a regulação na concentração pigmentar, quantidade e tamanho de unidades fotossintéticas e regulação da quantidade e atividade das enzimas (Davison, 1991, Wahid et al., 2007). A faixa de tolerância e os níveis ótimos de irradiância e temperatura também varia em função da faixa geográfica de crescimento da espécie, como uma função da adaptação genotípica, o que resulta em diferentes "eco-tipos" com diferentes faixas de tolerância e níveis ótimos de irradiância e temperatura (Davison, 1991).

Estudos anteriores mostram que *S. latíssima* tem uma alta capacidade de aclimação em diferentes temperaturas. Davison (1987) cultivou *S. latíssima*, coletada em Helgoland (Alemanha) numa faixa de temperatura entre 5 e 20 °C e correlacionou a aclimação a alterações em enzimas do ciclo de Calvin e concentração pigmentar.

A baixa performance da linhagem *Swedish* em 2 °C ficou evidente a partir dos dados de crescimento e fotossíntese obtidos nesse estudo. Entretanto em 18 °C, a performance desta linhagem foi melhor que a observada para *Spitsbergen*. Esses resultados mostram que *S. latissima* da Suécia foi capaz de otimizar o seu aparato fotossintético, apresentando uma faixa de tolerância a temperatura entre 10 e 18 °C. O inverso foi observado para a linhagem *Spitsbergen*, que apresentou faixa de tolerância entre 2 e 10 °C. Considerando a irradiância, *Spitsbergen* também apresentou melhor tolerância a irradiância de 80 $\mu\text{mol}.\text{photon}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O aumento na taxa respiração observado em *Spitsbergen* cultivada em 18 °C indica o estresse térmico nessa linhagem.

Neste estudo, encontramos algumas diferenças nas respostas fotossintéticas e taxa de crescimento entre a *S. latissima* coletada em Spitsbergen e na Suécia. Esses resultados sugerem que *S. latissima* de Spitsbergen tolera melhor baixa temperatura e elevada irradiância. Essas plantas apresentaram maior taxa fotossintética do que as da Suécia quando cultivadas em 2 °C. Além disso, em 2 °C as plantas da Suécia apresentaram redução na capacidade fotossintética causada pela combinação de elevada taxa respiratória e baixa taxa fotossintética, o que está relacionado a redução na eficiência do fotossistema II. Por outro lado, em 18 °C as plantas de Spitsbergen apresentaram menor taxa fotossintética combinada com alta taxa respiratória. Esses resultados indicam a melhor performance das algas de Spitsbergen em baixas temperaturas. Inversamente, as plantas da Suécia parecem tolerar melhor temperaturas mais elevadas.

Este estudo aponta diferenças na faixa de tolerância de temperatura e irradiância entre as algas de Spitsbergen e da Suécia, sugerindo que elas podem constituir diferentes "eco-tipos". Além disso, ficou evidente o quanto os *kelps* dos Ártico podem sofrer com aumentos na temperatura.

Referências

Bartsch I., Wiencke C., Bischof K., Buchholz C., Buck B., Eggert A., Feuerpfel P., Hanelt D., Jacobsen S., Karez R., Karsten U., Molis M., Roleda M., Schubert H., Schumann R., Valentin K., Weinberger F. & Wiese J., 2008. The genus *Laminaria* sensu lato: recente insights and developments. *European Journal of Phycology* 43: 1–86.

Borum J., Pedersen M.F., Krause-Jensen D., Christensen P.B., Nielsen K., 2002. Biomass, photosynthesis and growth of *Laminaria saccharina* in a High-Arctic Fjord, NE Greenland. *Marine Biology* 141: 11–19.

Davison, I. R. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27:2–8

Davison, I. R. 1987. Adaptation of photosynthesis in *Laminaria Saccharina* (Phaeophyta) to changes in growth temperature. *J. Phycol.* 23:273–83

Gattuso J.P., Gentili B., Duarte C.M., Kleypas J.A., Middelburg J.J., Antoine D., 2006. Light availability in the coastal ocean: impact on the distribution of benthic photosynthetic organisms and their contribution to primary production. *Biogeosciences* 3: 489–513.

Inskeep, W.P. and P. R. Bloom., 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-Dimethylformamide and 80 % acetone. *Plant Physiol.* 77: 483 – 485.

Lüning, K., 1984. Temperature tolerance and biogeography of seaweeds: the marine algal flora of Helgoland (North Sea) as an example. *Helgolander Meeresun.* 38:305–17.

Moy, F. E. & Christie, H. 2012. Large-scale shift from sugar kelp (*Saccharina latissima*) to ephemeral algae along the South and west coast of Norway. *Mar. Biol. Res.* 8:309–2

Parry M.L., Canziani O.F., Palutikof J.P., Van der Linden P.J. & Hanson C.E., 2007. Climate change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC Fourth Assessment Report (AR4), Vol. 2. Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, pp. 976.

Platt, T.; Gallegos, C.L. & Harrison, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38(4): 687-701

Schreiber U., W. Bilger, and C. Neubauer. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-destructive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis, p. 49–70. In: E.-D. Schulze and M.M. Caldwell (eds.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Ecological studies 100. Springer-Verlag, Berlin.

Steneck R.S., Graham M.H., Bourq B.J., Corbett D., Erlandson J.M., 2002. Kelp forest eco-systems: biodiversity, stability resilience and future. *Environmental conservation*: 29, 436–459.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. & Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Env. Exp. Bot.* 61:199–223