

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



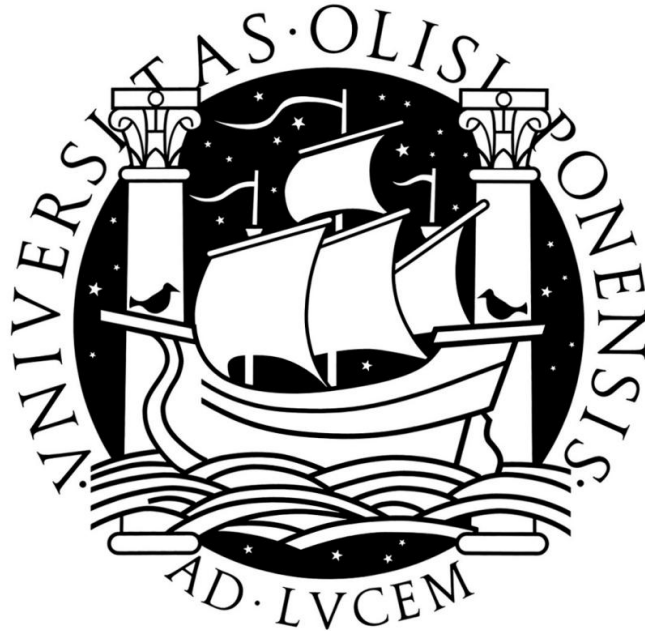
**INFLUÊNCIA DO AUMENTO DO CARBONO
INORGÂNICO DISSOLVIDO NA ACUMULAÇÃO DE
METAIS PESADOS EM *FUCUS VESICULOSUS*.**

Láise Ferreira Gomes

MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**INFLUÊNCIA DO AUMENTO DO CARBONO
INORGÂNICO DISSOLVIDO NA ACUMULAÇÃO DE
METAIS PESADOS EM *FUCUS VESICULOSUS*.**

Laíse Ferreira Gomes

Orientadores: Professor Doutor Ricardo Melo

Professora Doutora Maria Isabel Caçador.

MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores orientadores Doutor Ricardo Melo e Doutora Isabel Caçador, pela orientação na elaboração desta dissertação e por todos os ensinamentos, tempo e confiança, dispensados em mim, no decorrer do curso.

Ao Mestre Bernardo Duarte de quem recebi valiosas sugestões na realização deste trabalho.

À Joana Freitas, que gentilmente auxiliou com o trabalho em laboratório e teórico, e foi uma companhia muito agradável durante todo esse percurso.

Aos demais colegas do laboratório de Botânica do Instituto de Oceanografia presentes nesse trajeto, pela companhia e auxílio.

Aos amigos, de Portugal e do Brasil, que de alguma maneira, contribuíram para a elaboração deste trabalho, pelos momentos de descontração, realmente especiais.

À minha mãe e meu pai, por sempre estar presente mesmo de longe, acreditar em mim e me apoiarem neste sonho.

À minha família que, mesmo distante, me amparou nesta jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram pra a realização deste trabalho.

Obrigada!

Resumo

O aumento do DIC (dissolved inorganic carbon) nos ambientes aquáticos é uma problemática ambiental mundial prevista para os próximos anos. Porém o conhecimento do efeito das interações do DIC com metais pesados nas macroalgas ainda é escasso. Neste estudo, foi investigada a acumulação de cádmio e cobre na alga castanha *Fucus vesiculosus* na presença de altas concentrações de DIC. As macroalgas foram recolhidas no estuário do Tejo, e submetidas a experiências em laboratório. A actividade fotossintética foi avaliada utilizando a razão Fv/Fm e os transientes da fluorescência da clorofila *a*. A acumulação de metais pesados e pigmentos foi estimada após cinco dias de tratamento. Os carotenóides apresentaram aumento significativo sob stress dos metais+DIC, sugerindo uma estratégia adaptativa a essas condições. No entanto, a análise estatística (ANOVA) mostrou que os níveis de clorofila *a* não foram significativamente diferentes entre os tratamentos. A acumulação dos dois metais, actividade fotossintética e o transporte de electrões apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com metais e o controlo. Da mesma forma, um aumento do DIC causou a diminuição da actividade fotossintética. As maiores acumulações de metais foram encontradas na estrutura reprodutiva e talo (ápice) para o cobre, na base e estruturas reprodutivas para o cádmio. O cádmio e cobre em *F.vesiculosus* apresentaram comportamento diferente quando adicionado DIC ao tratamento: a acumulação de cádmio diminuiu, enquanto que os valores de cobre foram superiores nos tratamentos com DIC. Estes resultados sugerem que o DIC é uma variável ambiental importante para a acumulação de metais em *F.vesiculosus*. Mecanismos potenciais para a relação significativa entre os resultados dos pigmentos, fotossíntese e da acumulação de metais em *F.vesiculosus* são sugeridos neste estudo. Os resultados e conclusões aqui obtidos podem ser utilizados como base para estudos futuros, visando esclarecer os mecanismos adoptados pelas algas de acordo com o stress a que são submetidas.

Palavras-chave: Fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos, estuário do Tejo, algas castanhas, poluição por metais, concentração de HCO_3^- .

Abstract

The increase of DIC (dissolved inorganic carbon) in aquatic environments is a global environmental problem expected for the next years. But the knowledge about the effect of interaction of heavy metals with DIC in macroalgae still is very scarce. In the present study, we investigated the accumulation of cadmium and copper in brown algae *Fucus vesiculosus* in the presence of high concentrations of DIC. Macroalgae were collected in the Tagus estuary, and subjected to laboratory experiments. The photosynthetic activity was evaluated using the ratio Fv/Fm and chlorophyll *a* fluorescence transients. The accumulation of heavy metals and pigments was estimated after five days of treatment. Carotenoids showed increased due to the stress of metals+DIC, suggesting an adaptive strategy for these conditions. However, statistical analysis (ANOVA) showed that the levels of chlorophyll were not significantly different between treatments. The accumulation of both metals, photosynthetic activity and electron transport detected in *F.vesiculosus* showed significant differences between control and metal treatment. Likewise, an increase in DIC caused a decrease in photosynthetic activity. The highest accumulations of metals were found in the reproductive structure and thallus (apex) for copper, at the holdfast and reproductive structures for cadmium. The cadmium and copper in *F.vesiculosus* showed different behavior when added DIC to treatment: the accumulation of cadmium decreased, while the amounts of copper were higher in treatments with DIC. These results suggest that the concentration of DIC is an important environmental variable for metal accumulation in *F.vesiculosus*. Potential mechanisms for the significant relationship and causal hypotheses between the results of pigments, photosynthesis and metals accumulation in *F.vesiculosus* are suggested in this study. The obtained results and conclusions can be used as a basis for future studies aiming to clarify the mechanisms adopted by algae under stress to which they are subject.

Keywords: Chlorophyll *a* fluorescence, Photosynthetic pigments, Tagus estuary, brown algae, metal pollution, HCO₃⁻ concentrations.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Macroalgas	1
1. 2. Fotossíntese	1
1.3. Carbono inorgânico dissolvido (DIC)	4
1.4. Pigmentos fotossintéticos	5
1.5. Metais pesados	7
2. Objectivos	13
3. Metodologia	14
3.1. Análise de metais pesados (Cd e Cu)	16
3.2. Análise de pigmentos	16
3.3. Análise da fluorescência da clorofila <i>a</i>	17
3.4. Análise do teste-JIP (indicadores de desempenho do processo fotoquímico)	17
3.5. Análise Estatística	18
4. Resultados	19
4.1. Experiência 1	19
4.1.1. Efeito sobre a fluorescência e os transientes de fluorescência da clorofila <i>a</i>	19
4.1.2. Concentrações de pigmentos fotossintéticos	25
4.1.3. Acumulação de metais em <i>F.vesiculosus</i>	26
4.2. Experiência 2	28
4.2.2. Efeito na fluorescência e nos transientes de fluorescência da clorofila <i>a</i> .	28
4.2.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos	28
4.2.3. Acumulação de Cd em <i>F.vesiculosus</i>	29
4.3. Experiência 3	31
4.3.1. Efeito na fluorescência e nos transientes de fluorescência da clorofila <i>a</i> .	31
4.3.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos	33
4.4. Experiência 4	34
4.4.1. Mudanças nas características da fluorescência e nos transientes da clorofila <i>a</i> induzidas por maiores concentrações de DIC e de metais (Cu e Cd)	34
4.4.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos	38
4.4.3. Acumulação de Cu e Cd em diferentes condições de DIC	41
5. Discussão	45
5.1. Fluorescência da clorofila <i>a</i> e transientes da clorofila <i>a</i>	45

5.2. Pigmentos fotossintéticos	52
5.3. Acumulação de metais pesados (Cu e Cd)	55
6. Conclusão	58
7. Referências	61
8. Anexo	75

1. Introdução

1.1. Macroalgas

As macroalgas são organismos de grande importância para os ecossistemas (tanto estuarino quanto marinho) localizados próximos à costa devido à sua alta produtividade primária e seu importante papel na dinâmica de nutrientes, na fixação de carbono, (Flindt et al., 1999), na incorporação de poluentes como metais pesados (Coelho et al., 2005) e na contribuição para a diversidade da fauna e sua manutenção.

As algas castanhas, ou Phaeophyta, compõem uma classe composta de algas marinhas maioritariamente. Estas algas apresentam cloroplastos com clorofila *a*, *c1* e *c2* e obtêm a sua cor característica a partir de grandes quantidades de carotenóides fucoxantina nos seus cloroplastos assim como a partir de qualquer tanino que esteja presente (Charrier et al., 2008). As maiorias das feófitas apresentam uma distribuição mundial e desenvolvem-se na faixa intertidal e em regiões superficiais, como também em zonas estuarinas. A presença de macroalgas castanhas do género *Fucus* é bastante comum em águas temperadas do hemisfério norte, apresentando um amplo gradiente latitudinal entre o Oceano Pacífico Norte, Oceano Atlântico Norte e Mar Báltico (Lüning, 1990). A espécie *Fucus vesiculosus* ocorre em zonas temperadas boreais e frias do Atlântico Norte (Rönnbäck et al. 2007). A característica peculiar de ser euribionte possibilita aos representantes dessa espécie a sobrevivência sobre diversas condições ambientais, como por exemplo, da salinidade e do hidrodinamismo (Malavenda & Voskoboinikov, 2009).

1. 2. Fotossíntese

Os pigmentos fotossintéticos do complexo antena são responsáveis pela absorção de energia luminosa (fótons) durante o processo fotossintético, e transferem essa energia para os centros de reacção dos fotossistemas I e II (P700 e P680, respectivamente). Estes são formas especiais da clorofila (Chl) que absorvem a luz num comprimento de onda de 680nm e 700nm, respectivamente (Young & Frank, 1996). A absorção da luz, no fotossistema II (FSII) pelo complexo antena excita a P680 e leva à reacção fotoquímica (liberação do electrão de alta energia). Os electrões são transferidos da água para oxidar P680 através de um complexo protéico-manganês localizado próximo ao espaço tilacóide. Para cada molécula de água, dois

electrões e dois íons H^+ são liberados neste espaço, contribuindo para ao gradiente de prótons no lúmen (Taiz & Zeiger, 2006).

O estado singlete de excitação da molécula de Chl *a* ($^1Chl^*$) forma-se após a absorção da luz pelos centros de reacção. Quando essa energia luminosa absorvida encontra-se em excesso, a $^1Chl^*$ pode retornar ao seu estado inicial através de uma das vias: pode ser utilizada para processos fotossintéticos (fotoquímica); ser dissipada sob forma de calor, radiação infravermelha (não-fotoquímica, NPQ); pode ser reemitida como radiação na região do visível do espectro (fluorescência); ou pode decair através do estado triplete da clorofila ($^3Chl^*$) (Müller, 2001). Propôs-se que a transferência de electrões dos centros de reacção da clorofila do FSII (P680) para o receptor quinona primário do FSII (Qa) dissipa a fluorescência, um processo denominado fotoquímica (Baker, 2008).

O monitorização da inibição ou diminuição na transferência de electrões entre os fotossistemas pode ser feito através da fluorescência da clorofila *a*. A fluorescência da clorofila permite obter informações sobre o estado do FSII, visto que, o fluxo de electrões através do FSII é um indicativo da taxa fotossintética total (Maxwell & Johnson, 2000). A medição da fluorescência da clorofila é um método sensível e não intrusivo, que fornece informações rápidas sobre os processos fotossintéticos, e sobre as reacções bioquímicas e da distribuição da energia entre os componentes fotossintéticos (Mouget & Trembin, 2002).

Para realizar a medição da fluorescência da clorofila *a* in vivo tem-se utilizado bastante os fluorímetros de modulação. Os receptores de electrões do FS II, quinona a (Qa), durante um forte impulso de luz branca, tornam-se totalmente reduzidos em menos de um segundo, de forma que a energia de excitação é dissipada somente pelo calor ou fluorescência (dissipação fotoquímica = 0) (Hanelt et al., 2003). O rendimento a partir da fluorescência do FSII é medido sob duas condições: após em período de escuro, quando todos os centros de reacção do FS II são ativos ou 'abertos' (Qa estão oxidadas), e em seguida quando todos os centros de reacção do FSII estão fechados (Qa estão totalmente reduzidas) (Franklin & Foster, 1997; Hanelt *et al.*, 2003).

Outros parâmetros derivados a partir dos transientes da fluorescência da clorofila *a* podem auxiliar na interpretação dos resultados, como é o caso do teste-JIP (Strasser & Strasser, 1995). O teste-JIP foi desenvolvido a partir da teoria do fluxo de energia na membrana do tilacóide e nos parâmetros que definem cada tipo de fluxo (Strasser et al., 2004, Romanowska-Duda et al., 2005; Kalaji & Loboda, 2007). Estes podem ser pensados como um fluxo absorvida (ABS), um fluxo de aprisionamento (TR), um fluxo de transporte de electrão

(ET) e um fluxo que define a dissipação de energia não-aprisionada na forma de calor e alguma fluorescência, ou transferidas para outros sistemas (DI).

Desta forma, o chamado teste-JIP pode ser usado para explicar o fluxo gradual de energia através de FS II no nível do centro de reacção (RC, do inglês, reaction center) (ABS/RC, TR/RC, ETo/RC e DI/RC) (Force et al., 2003), e de uma forma simples, pode-se avaliar o equilíbrio entre a entrada e saída do fluxo de energia dentro FSII, e oferecer informações relevantes sobre o destino provável da energia absorvida e sobre a estrutura e função do aparelho fotossintético (principalmente relacionado com FSII) (Kalaji et al., 2011).

Nos últimos anos, a fluorescência da clorofila *a* em algas tem sido amplamente utilizada em investigações sobre a fotossíntese com o objectivo de examinar o desempenho fotossintético e stress em estudos fisiológicos e ecofisiológicos. Um dos primeiros estudos com *Fucus vesiculosus*, foi realizado por Ramus et al (1977) onde estudou a adaptação dos pigmentos do complexo antena à diminuição da luz e a consequência na performance fotossintética. O trabalho de Huppertz et al (1990) investigou a fotoinibição da fotossíntese de *F. vesiculosus* submetidas à várias experiências, e observaram uma diminuição da razão Fv/Fm, durante a maré baixa, e um aumento durante a maré alta. Respostas ecofisiológicas de *F. vesiculosus* a fatores ambientais do Báltico e Atlântico foram estudadas, e evidenciou-se que houve uma aclimação a pouca luz através do aumento da clorofila *a* e uma menor capacidade fotossintética máxima (Nygård, 2005). Ekelund et al. (2008), ao estudar o transporte relativo de electrões em *F. vesiculosus* no Mar Báltico em diferentes profundidades, os resultados mostraram que algas de menores profundidades apresentam graus de fotoinibição maiores em comparação com aquelas provenientes de maiores profundidades. Nygård & Dring (2008) estudaram a influência da salinidade, temperatura, carbono inorgânico dissolvido e concentração de nutrientes no transporte de electrões (ETR) de *F. vesiculosus*, e observaram que o aumento do DIC elevou o ETR. O trabalho de Gylle (2011) utilizou os valores de Fv/Fm para comparar dois ecótipos (marinho e 'salobro') de *F. vesiculosus*, em diferentes temperaturas e dissecação, onde nenhuma diminuição foi registrada nestas condições, porém concluiu-se que o ecótipo 'salobro' tem menor eficiência, quando comparado ao marinho, na utilização da energia de excitação para a fotoquímica em situações de dissecação. Recentemente, Svahn et al (2012) investigou a actividade fotossintética de *F. vesiculosus* em diferentes condições luminosas, e demonstrou que o nível de saturação luminosa do transporte de electrões das algas variou de acordo com a qualidade da luz.

1.3. Carbono inorgânico dissolvido (DIC)

A maioria das algas possui um mecanismo de concentração de carbono (CCM, do inglês, carbon concentrating mechanism), o qual está associado com a capacidade de utilizar, direta ou indiretamente o bicarbonato (HCO_3^-) que se encontra mais abundante do que as outras espécies iônicas nos locais habitados pelas macroalgas marinhas (Axelsson et al., 2000; Zou, 2005). As formas iônicas do carbono inorgânico, não atravessam as membranas biológicas, necessitando de transportadores específicos. Este transporte é realizado através da sua desidratação extracelular, catalizada pela anidrase carbônica (AC) ligada à superfície, acessível a partir do exterior da membrana celular (Haglund et al, 1992; Mercado et al, 1997). Após, segue-se o transporte para o interior da célula, através da membrana, do CO_2 formado onde, na maioria dos casos, assume-se que ocorre a passagem através da membrana celular de forma passiva, em resposta ao gradiente de difusão (Axelsson et al., 2000). Existe outra forma de se utilizar a forma iônica do carbono inorgânico, a qual é realizada através da absorção de HCO_3^- directa através da membrana plasmática, facilitada por uma proteína de permuta aniônica (Drechsler et al, 1994;. Axelsson et al, 1995).

A partir da Revolução Industrial, foi registrado um aumento da concentração média do CO_2 de 315 ppm em 1960 para 380 ppm em 2007 (IPCC, 2007), e um aumento de 35% na emissão de CO_2 em todo o mundo desde 1990 (Kaladharan et al, 2009). É esperado que, com o aumento da concentração de CO_2 atmosférico, haja um aumento linear proporcional na concentração de CO_2 dissolvido na superfície do oceano, devido à troca de gás contínua que ocorre na interface ar-água (Stumm & Morgan, 1981; Takahashi et al, 1997). A fonte de carbono para as células fotoautotóficas durante o seu crescimento é o dióxido de carbono e, no caso de plantas que vivem em ambientes aquáticos (incluindo as macroalgas), essa fonte encontra-se no CO_2 dissolvido na água e nas formas iônicas de carbono inorgânico dissolvido (DIC, do inglês dissolved inorganic carbon) presente, ou seja, HCO_3^- e CO_2^{3-} (Axelsson et al., 2000).

Sabe-se que a produtividade marinha pode exibir respostas para o aumento do CO_2 atmosférico, e os níveis crescentes de CO_2 /DIC afectarão as algas de diversas maneiras, incluindo a fotossíntese (Sand-Jensen & Gordon, 1984; Iwasaki *et al.* 1996; Iwasaki *et al.* 1998; Axelsson *et al.*, 2000; Semesi *et al.* 2009), o crescimento (Gao *et al.* 1991, 1993; Andersen & Andersen, 2006; Palacios & Zimmerman, 2007) o metabolismo de nutrientes e componentes celulares (Mercado *et al.* 1999), a anidrase carbônica (Surif & Raven, 1989; Granbom & Pedersén, 1999; Snoeijs et al. 2002); pH (Sand-Jensen & Gordon, 1984;

Axelsson & Uusitalo, 1988). Após a análise de alguns estudos acredita-se que, em geral, a actual composição de carbono inorgânico dissolvido na água do mar ($\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$) pode saturar total ou quase totalmente a fotossíntese de muitas algas marinhas enquanto submersas, que tem sido muitas vezes explicada pela sua utilização eficiente de HCO_3^- presente na água do mar (Zou & Gao, 2001).

Alguns trabalhos envolvendo as respostas das macroalgas à presença do carbono na água têm sido realizados. Sand-Jensen & Gordon (1984), mostraram que existe diferenças na habilidade da utilização de HCO_3^- e CO_2 para a fotossíntese, entre as macrófitas (macroalgas e angiospermas) marinhas e de água doce. As espécies marinhas apresentaram maior afinidade ao HCO_3^- do que as de água doce, enquanto que para o CO_2 apresentaram variação similar. Axelsson & Uusitalo (1988), observaram que relação entre a capacidade de adaptação das diferentes classes de algas e as estratégias de aquisição de carbono, onde os membros da família *Fucaceae* apresentaram elevada eficiência na utilização do DIC, extraindo-o quase na totalidade. O estudo realizado por Surif & Raven (1989), com algas da ordem Laminariales e Fucales, mostraram que a fonte de carbono inorgânico resultou em alterações ecológicas e taxonômicas. As espécies da ordem Fucales apresentaram baixa concentração de compensação de CO_2 e saturação da fotossíntese, confirmando o papel dominante do mecanismo de concentração de CO_2 nessas algas. A espécie *Fucus serratus* foi referida como capaz de sobreviver em níveis de 5% de CO_2 durante três semanas, mas tendo a sua fisiologia fotossintética afectada (Johnston & Raven, 1990). Com relação à atividade da AC, alguns estudos afirmam que a utilização de HCO_3^- , em *F.serratus*, *Gracilaria tenuistipitata* e *Porphyra leucosticta*, por exemplo, pode ser suprimida em situações de níveis elevados de CO_2 (Johnston & Raven, 1990; Garcia-Sánchez et al, 1994; Mercado et al., 1997).

1.4. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos estão localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, e são responsáveis pela absorção da luz solar que será utilizada para a realização da fotossíntese. A faixa do espectro dos 400 aos 700 nm, a radiação fotossinteticamente ativa, abrange o perfil de absorção dos pigmentos, os quais irão diferir com relação à eficiência com que captam a luz ao longo desta faixa (Taiz & Zeiger, 2006). O sistema fotossintético das algas possui, do mesmo modo que o das plantas superiores, como pigmento principal a clorofila *a* (Junior, 1998), o qual é encontrado nos sistema fotossintético de todos os grupos

de algas, apesar destas apresentarem uma grande variação na composição dos seus pigmentos fotossintéticos. No gênero *Fucus*, por exemplo, além da clorofila *a*, apresentam como pigmentos que absorvem a luz a clorofila *c* e a fucoxantina (Dring, 1992).

A energia luminosa utilizada no processo fotossintético é absorvida como fótons pelos pigmentos fotossintéticos dos complexos antena (clorofilas e carotenóides), e convertida em energia química (moléculas de ATP e NADPH) na fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2006; Gylle, 2011). Ao absorver a luz, a clorofila, que se encontra em um estado de menor energia, absorve um fóton e sofre uma transição para um estado de maior energia ou excitado. A clorofila torna-se instável quando se encontra no estado excitado e logo libera parte da energia para o meio em forma de calor, entrando em um estado de menor excitação (Taiz & Zeiger, 2006).

Os carotenóides desempenham um papel importante na absorção de luz no complexo antena e na fotoproteção dos fotossistemas. Em situações onde a capacidade fotossintética é inferior à quantidade de energia absorvida, faz-se necessário uma dissipação da mesma, a fim de evitar danos aos pigmentos e proteínas. Os carotenóides auxiliam na fotoproteção do aparelho fotossintético, realizando interconversões entre as moléculas de xantofila, através do ciclo das xantofilas, e da dissipação sob forma de calor do excesso de energia (quenching) do estado 'triplet' da clorofila, impedindo a formação do oxigênio 'singlet' ($^1\text{O}_2$) (Ort, 2001). No ciclo da xantofila, através da sua de-epoxidação induzida por excesso de luz e pelo pH do lúmen (pH<6) que ativa a violaxantina depoxidase, a violaxantina dá origem a um pigmento intermediário, a anteraxantina; e esta, por fim, dá origem à zeaxantina (Havaux, 1988; Krause, 2003).

O gênero *Fucus* tem sido utilizado como objeto de estudo em alguns trabalhos científicos sobre pigmentos fotossintéticos em macroalgas. Ramus et al. (1977) foi um dos primeiros a abordar esta temática com *F.vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*, fazendo uma relação da adaptação dos pigmentos à diminuição da luz e à performance fotossintética. Os três pigmentos antena (Chl *a*, Chl *c* e fucoxantina) aumentaram com a profundidade e a sombra. O estudo de Nielsen & Nielsen (2005) utilizou a composição dos pigmentos fotossintéticos (clorofila e pigmentos acessórios) para avaliar a resposta fotossintética de *F.serratus* em resposta ao cobre em diferentes intensidades luminosas, e observou que este metal não apresentou um efeito no conteúdo dos pigmentos avaliados, tanto em condições de alta e baixa energia luminosa. O trabalho de Voskoboinikov et al. (2006), estudou o efeito da ação prolongada de ausência de luz na presença dos pigmentos fotossintéticos e na estrutura celular de *F. vesiculosus* e *F. serratus*, no Mar de Barents, em condições de verão e de

inverno. Com a diminuição da irradiação, ocorreu a acumulação de pigmentos fotossintéticos, nomeadamente a violaxatina. Nygård & Ekelund (2006) utilizaram a composição dos pigmentos em *F.vesiculosus* como um dos parâmetros (além da fotossíntese e tolerância a UV-B) para avaliar os efeitos de diferentes salinidades na água do mar. O conteúdo dos pigmentos (Chl *a*, violaxantina, diadinoxantina e zeaxantina) diminuiu em nas algas que foram transferidas para salinidades menores (5psu). Gylle (2011), ao estudar a importância da salinidade e da luz na concentração de clorofila *a* e *c* em *F.vesiculosus* e *F.radicans*, demonstraram que em salinidades mais baixas há uma maior concentração de Chl *c*. Este facto foi relacionado com a menor irradiância nos locais na época da recolha do material. Os resultados também mostraram que *F.vesiculosus* é capaz de produzir Chl *a* mesmo em condições de completa escuridão. Svahn et al. (2012), ao utilizar tratamentos com luz branca e luz azul em algas (*F. vesiculosus* e *F.radicans*) provenientes do Mar da Noruega, descreveram que os resultados da concentração da clorofila indicaram uma diminuição significativa da Chl *a* e *c* em *F.vesiculosus*. Porém, as espécies provenientes do Mar Bothiniano mostraram um aumento da Chl *a* após os tratamentos.

1.5. Metais pesados

Os metais pesados são elementos químicos que estão presentes naturalmente no ambiente, porém o aumento das actividades poluidoras tem acelerado a liberação destes elementos nos ecossistemas. A contaminação de águas por iões metálicos tóxicos representa um problema ambiental mundial devido ao seu reflexo e acúmulo na cadeia alimentar (Figueira et al., 2000). Por isso, o uso de organismos marinhos como bioindicadores de poluição por metais pesados, com o objectivo de dar informações sobre a concentração e disponibilidade dos metais no ambiente, é muito comum actualmente (Topcuoğlu et al., 2003; Conti & Cecchettib, 2003). Neste contexto, a capacidade das algas de remover metais pesados em solução aquosa já é conhecida e bastante estudada actualmente, sendo considerada uma melhor opção, quando comparadas aos sedimentos e a água, para estudos toxicológicos que avaliam concentrações de metais pesados, tanto em águas estuarinas quanto em águas costeiras, em todo o mundo. As algas respondem prontamente a vários poluentes provenientes de actividades humanas e muitas espécies podem sobreviver em condições de poluição (elevadas concentrações de metais) (Hu et al., 1996). Além disso, as algas satisfazem muitos dos requisitos básicos dos bioindicadores: são sedentárias, suas dimensões são adequadas, são fáceis de identificar e recolher, são amplamente distribuídas, acumulam metais de forma

satisfatória, são altamente tolerantes a variações físico-químicas do habitat, e são também tolerantes ao stress produzido pelo processamento e manuseamento tanto no laboratório, como no campo (Rainbow & Phillips, 1993; Rainbow 2006). Alguns gêneros de macroalgas, como *Fucus*, são geralmente utilizados como bioindicadores de poluição por metais pesados, oferecendo informações sobre a concentração e a disponibilidade dos metais em águas estuarinas e costeiras em todo o mundo (Topcuoğlu et al., 2003; Conti & Cecchetti, 2003).

A acumulação de metais pelas algas a partir da coluna de água apresenta geralmente duas etapas: uma acumulação passiva inicial com base na absorção rápida nas superfícies exteriores dos talos, seguida de uma acumulação mais lenta dependente de processos metabólicos e, conseqüentemente, dos factores ambientais que os influenciam (Levine, 1984). As algas não possuem raízes, assim apenas acumulam metais a partir da solução da coluna de água, desde que as suas frondes não estejam em contacto com o sedimento onde pode acontecer a acumulação via difusão (Levine, 1984; Sfezer et al., 1998).

Ao utilizar macroalgas marinhas, alguns problemas podem surgir devido a diferenças nas taxas de acumulação de metal por partes de diferentes idades talo e sob diferentes condições ambientais (Phillips, 1977). Porém, apenas poucos estudos examinaram a variação intra-talo das concentrações de metais. Flutuações nas taxas de crescimento e actividade metabólica entre as algas coletadas em diferentes épocas do ano e de ambientes diferentes podem levar à variações nas concentrações de metal no tecido, que por sua vez são controladas por outros factores além da concentração biodisponível na água do mar. A acumulação de metais pode ocorrer durante o crescimento lento e/ou durante a absorção passiva/adsorção (Markham et al, 1980); por outro lado, a diluição dos metais acumulados podem ocorrer devido a altas taxas de crescimento e expansão rápida do tecido, resultando em baixas concentrações de metais no tecido (Bryan, 1969; Fuge & James, 1973; Villares et al., 2002).

A absorção/retenção de metais pesados pelas algas pode também ser atribuída às propriedades da parede celular, a qual apresenta uma variedade de polissacarídeos e proteínas, algumas delas contendo sulfato aniónico, carboxila ou grupos fosfato (Farías et al., 2002). Neste contexto, a alga castanha, *F. vesiculosus*, tem sido frequentemente utilizada como um bioindicador para poluição por metais pesados na água do mar, devido à sua alta capacidade de acumulação de elementos (Fuge & James, 1973).

O aparato fotossintético das algas pode ser afectado pelos metais pesados, influenciando a fixação de CO₂ a vários níveis (Clijsters & Van Assche, 1985). No FS II, a fotofosforilação e/ou a actividade enzimática pode ser inibida por metais pesados. Além disso,

as concentrações de pigmentos podem ser reduzidas pelo cádmio (Cd) e cobre (Cu), possivelmente porque estes elementos interferem na biossíntese de pigmentos (Clijsters & Van Assche, 1985; Prasad & Strzalka, 1999). A maioria das macroalgas acumulam metais em baixas concentrações como micronutrientes para cumprir funções metabólicas essenciais, como a activação de enzimas, que requer a presença do Cu, e também para facilitar reacções de transferência de electrões (Falkowski & Raven, 1997; Ash & Stone, 2003). Outros metais, como o Cd, também podem interferir na função de enzimas e cofactores associados. Elevadas concentrações desses metais podem ser tóxicas, apresentando efeitos como a inibição da fotossíntese (Overnell, 1976) e restrição do crescimento de algas (Stemann Nielsen & Wium-Andersen, 1970; Coelho et al, 2000).

Não é atribuída nenhuma função biológica evidente em organismos vivos para o Cd, porém sabe-se que é um dos mais tóxicos metais pesados (Latowsky et al., 2005). Em plantas, o Cd pode interferir no crescimento, reduzir a taxa fotossintética, provocar alterações nas atividades enzimáticas e metabólicas (Cobbet, 2000). Em meio aquático, este elemento somente está presente no estágio de oxidação +2, e por isso não sofre grande influência pelo potencial de oxi-redução da água (Callahan et al., 1979). A forma mais tóxica do Cd é a forma iónica, e esta constitui na forma prevalente em ambientes aquáticos de baixa salinidade (Sprague, 1986). O Cd pode causar a inibição da fase clara da fotossíntese, interferir na cadeia transportadora de electrões, principalmente por influência do lado doador e receptor do FSII (Maksymiec & Baszyński, 1988). Pigmentos, como a clorofila e carotenóides, também podem sofrer uma diminuição na presença do Cd. A foto-degradação do aparato fotossintético pode estar relacionada com a sobreexcitação da fotossíntese, devido à produção de espécies reativas de oxigénio. Além disso, este metal pode causar um aumento na taxa de dissipação do excesso de energia, conhecida como não-fotoquímica, resultando em dissipação de energia térmica. O ciclo da xantofila também pode ser afetado resultando na interconversão de violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (Janik et al., 2008).

O Cu é um micronutriente essencial e bastante tóxico quando encontrado em concentrações elevadas, apresentando o único estado de oxidação +2 quando encontrado na água (Gledhill et al, 1997). O Cu é um elemento essencial para processos metabólicos em algas marinhas, sendo necessário para o transporte de electrões na fotossíntese (plastocianina, para aquelas que não usam a alternativa, citocromo livre de Cu) e também participa na desintoxicação de radicais de oxigénio geradas pelo metabolismo (Himelblau & Amansino, 2000). No entanto, alguns processos metabólicos podem ser afectados na presença de concentrações elevadas de Cu (Küpper et al., 2002), pelo que, tem-se mostrado que este metal

diminui a concentração de pigmentos, (Rijstenbil et al. 1994) além de inibir a fotossíntese (Fernandes & Henriques, 1991). Esse é considerado um dos metais mais tóxicos para as algas marinhas e, em geral, a toxicidade do Cu é maior do que a do Cd. Proteínas de algas e plantas foram identificadas como responsáveis pela captação de cobre na superfície da célula, sua distribuição no interior da célula e sua divisão dentre as organelas intracelulares (Himmelblau & Amasino 2000; Grotz & Guerinot 2006).

A actividade fotossintética também pode ser afectada devido à substituição da clorofila por metais pesados, sob condições de stress, por vários motivos. A clorofila substituída por metais (Hms-Chl) forma-se quando o ião central da clorofila (Mg^{2+}) é substituído por um metal pesado. O rendimento quântico da fluorescência da Hms-Chl é muito mais baixo do que a Mg-Chl (Watanabe & Kobayashi, 1988), indicando um estado de excitação inicial mais instável. A energia de ressonância transferida dos complexos de pigmento antena para os centros de reacção nos tilacóides, que depende do mesmo estado de excitação que causam à fluorescência da Chl *a* (Karukstis, 1991), ou é ineficiente ou não se realiza. Outro motivo para a diminuição é que a capacidade de libertar electrões a partir do estado 'singlet' da Chl *a* é maior na Mg-Chl do que todos Hms-Chls (Watanabe et al., 1985).

Há muitos anos que as macroalgas vêm sendo utilizadas em estudos com metais pesados. E neste contexto, *Fucus* spp. são reconhecidas geralmente como sendo altamente resistente à poluição por metais pesados (Pawlik-Skowrońska et al., 2007). Riget et al. (1995), estudou a variação sazonal de cádmio, cobre, zinco e chumbo em *F. vesiculosus*, no oeste da Groenlândia, onde concluíram que havia uma melhor relação entre a variação sazonal com o Cd do que com o Cu. Andersson & Kautsky (1996) obtiveram resultados do efeito de diferentes concentrações cobre em estágios reprodutivos de *F. vesiculosus* no Mar Báltico, que mostraram a maior sensibilidade dos estágios germinativos em diferentes salinidades e idades dos zigotos. Além disso, sugeriram que o aumento da concentração de cobre afetará a frequência de germinação de *F. vesiculosus*. A influência de variações no ecossistema na acumulação de Cd e Cu, e outros metais pesados, por *F. vesiculosus* foi estudado por Struck et al (1997) e verificaram que a variação na salinidade influencia na tomada de macronutrientes e metais pesados. Mais recentemente, contaminações metais pesados, incluindo Cd e Cu, têm sido estudadas com o auxílio de algas castanhas (*F. vesiculosus*) e dos sedimentos a fim de verificar as mudanças ambientais (Giusti, 2001). O resultados encontrados por Nielsen et al. (2003), nas diferenças da tolerância ao cobre herdada na adaptação fotossintética e mecanismos de exclusão em *F. serratus*, revelaram que as algas naturalmente expostas ao Cu foram mais resistentes e que a tolerância a este metal é em parte

herdada e em parte devido à exclusão do metal. Além disso, observaram que há efeitos inibitórios do Cu na taxa de câmbio de oxigênio em algas tolerantes e não tolerantes. Stengel et al (2005), ao estudar concentrações de Cu em regiões do talo de *F.vesiculosus* com diferentes idades, concluíram que as regiões mais antigas do talo apresentavam os maiores valores de concentração deste metal em locais ‘limpos’ (não industrializados), sendo que não foi registrada de forma clara esta mesma tendência em locais industrializados. O trabalho de Barreiro et al. (2002) realizou o biomonitoramento de metais pesados em estuários e comparando *F.vesiculosus* e *F.ceranoioides*, e observaram que não houve diferença significativa para Cu, manganês e zinco entre as espécies, apoiando a viabilidade da utilização dessas algas para monitorar esses metais ao longo dos estuários. Nielsen & Nielsen (2005), estudaram os efeitos na fotossíntese da exposição ao Cu, onde concluíram que não havia relação desta resposta com a aclimação à luz e com a taxa de crescimento de *F. vesiculosus*. Além disso, medições de parâmetros da fluorescência da clorofila mostraram que a presença do Cu aumentou o transporte de electrões. O trabalho desenvolvido por Lee (2009) estudou as respostas fisiológicas e bioquímicas de *F.serratus* expostos ao cádmio, e demonstraram que mais de 50% de cádmio foi acumulado intracelularmente sem demonstrar sinais de stress, tanto em populações de ambientes contaminados quanto em populações de ambientes limpos. Além disso, a exposição ao Cd inibiu o crescimento da alga e aumentou a concentração de alguns pigmentos (Chl *a*, Chl *c* e fucoxantina) e a concentração de enzimas antioxidantes.

Em Portugal, foram realizados alguns estudos que abordaram a utilização das macroalgas como organismos úteis para o biomonitoramento de metais pesados. Leal et al. (1997), realizou para a linha de costa do Porto, um estudo de biomonitoramento com duas espécies de macroalgas bentônicas (*Enteromorpha* spp. e *Porphyra* spp), e a sua relação com alguns metais pesados (Cd, Cu, Hg e Pb). Verificou-se que *Enteromorpha* spp. pode ser utilizada para estimar a concentração de Cd, Cu e Hg, enquanto que *Porphyra* spp de Cd, Cu e Pb (Leal et al., 1997).

Estudos sobre metais pesados presentes no estuário do Tejo têm recebido considerável atenção nos últimos anos (Vale et al. 1990; Caçador et al. 1993, Caçador, 1994; Caçador et al. 1996a;Caçador et al. 1996b; Pereira et al. 2007; Reboreda & Caçador, 2007; Válega et al. 2008; Caçador et al. 2009; Duarte et al. 2009; Duarte et al. 2010).O primeiro trabalho sobre macroalgas do estuário do rio Tejo, foi realizado por Alvera-Azcárate et al. (2003) o qual apresentou um modelagem de produtividade algal, destacando o papel das algas intertidais. Os resultados mostraram que a fixação de carbono pelas algas intertidais excedem 13,500 tC por ano e corresponde a 21% do total de carbono fixado por todos os produtores primários.

Posteriormente, Sousa-Dias & Melo (2008), estudaram o padrão de abundância (sazonal e inter-anual) à longo prazo das macroalgas em relação à diferentes condições ambientais no estuário do Tejo. Observou-se diferenças na porcentagem de cobertura de acordo com o período do ano, sendo *Ulva* sp. menos abundante em períodos mais frios; e além de uma correlação negativa entre *Gracilaria gracilis* e o grupo de algas filamentosas o que foi interpretado como uma possível competição entre as duas categorias.

2. Objectivos

Identificar a relação entre o padrão de acumulação de cádmio e cobre em *F. vesiculosus* com o aumento da concentração de DIC;

Avaliar a resposta da fluorescência da clorofila *a* e dos transientes da fluorescência da clorofila *a* em *F. vesiculosus*, quando submetidas à tratamentos com cádmio e cobre em altas concentrações de DIC;

Analisar os níveis de pigmentos fotossintéticos em condições de exposição ao cádmio e cobre em altas concentrações de DIC.

Verificar se existe alguma especificidade entre o metal acumulado e o seu local de acumulação no talo.

3. Metodologia

O material para o presente estudo foi obtido através de recolhas realizadas na região entremarés, durante as baixa-marés diurnas, no estuário da Tejo em Lisboa (N:38.78122, E: -9.091212) durante o período de Novembro de 2011 a Abril de 2012. As amostras de *F. vesiculosus* foram recolhidas e acondicionadas em sacos plásticos transparentes “zip-lock” e transportadas para o laboratório de botânica do Instituto de Oceanografia da Universidade de Lisboa, onde foram lavadas com água do próprio estuário previamente filtrada, a fim de remover os sedimentos e epífitas das macroalgas. Cinco talos foram mantidos na estufa em recipientes aerados contendo água do mar artificial (salinidade de aproximadamente 24) e meio de cultura Provasoli (PES, Provasoll's Enriched Seawater, 250 ml.L⁻¹, em anexo), num volume total de 500ml. Foram retirados todos os compostos no meio de cultura que continham EDTA para evitar interferências nos resultados. As soluções de Cu e de Cd utilizadas foram preparadas a partir da dissolução em água destilada do sal sulfato de cobre pentahidratado e sulfato de cádmio heptahidratado, respectivamente. As experiências foram realizadas durante cinco dias, e o meio de cultura não foi trocado durante as experiências. As condições experimentais de temperatura, salinidade e pH foram monitoradas durante todas as experiências. A nomenclatura utilizada foi a base de dados atualizada de Guiry & Guiry (2012). As concentrações de metais utilizadas para as experiências foram baseadas nos dados do SNIRH (www.snirh.pt).

Experiência 1:

Avaliação dos efeitos dos metais pesados, Cu e Cd, na fotossíntese e concentração dos pigmentos em *F. vesiculosus*.

Utilizou-se para esta experiência concentrações de Cu de 0,5µM/L (Cu1), 1µM/L (Cu2) e 2µM/L (Cu3); e para o Cd concentrações de 0,002µM/L (Cd1), 0,004µM/L (Cd2) e 0,008µM/L (Cd3). Foram também mantidos recipientes sem adição de metais para o controlo.

Experiência 2:

Avaliação dos efeitos do Cd, na fotossíntese e concentração dos pigmentos em *F. vesiculosus*.

Esta experiência foi realizada utilizando-se três concentrações diferentes de Cd: 1µM/L (Cd1), 2 µM/L (Cd2) e 4 µM/L (Cd3), além do controlo (sem adição de Cd). Foram avaliados os efeitos desse metal na fotossíntese e nos pigmentos das macroalgas e também a concentração do metal nas algas.

Experiência 3:

Respostas das macroalgas à diferentes concentrações de carbono inorgânico dissolvido.

Foram utilizadas a concentração atual (controle), intermediária e máxima prevista para 2100 de acordo com o IPCC (Gatuso et al. 2010). Para esta experiência utilizou-se água do estuário previamente filtrada (filtros Whatman 42, tamanho de poro 2,5 μ m). A partir de cálculos realizados foram obtidas as quantidades de NaCO₃ e NaHCO₃ a serem adicionados: para o cenário intermédio adicionou-se: 0,0023mg/500ml (0,138 μ mol/L) de NaCO₃ e 0,0017mg/500ml (0,01 μ mol/L) de NaHCO₃; para o cenário de 2100 foram adicionados 0,0174 mg/500ml (0,1048 μ mol/L) de NaCO₃ e 0,0131mg/500ml (0,0779 μ mol/L) de NaHCO₃.

Experiência 4:

Avaliação dos efeitos do aumento do DIC sobre a acumulação de Cu e Cd, fotossíntese e concentração dos pigmentos em *F. vesiculosus*.

Para a realização desta experiência foram selecionadas uma concentração dos metais e uma concentração de DIC, de acordo com as respostas obtidas nas experiências anteriores. Desta forma, foram as macroalgas foram mantidas em seis recipientes contendo: 1) Controle (água do mar artificial enriquecida); 2) Cobre, concentração de 0,5 μ M/L, 3) Cádmio, concentração de 2 μ M/L; 4) DIC, concentração prevista para o cenário 2100; 5) Cobre + DIC e 6) Cádmio + DIC. Nesta experiência as algas foram mantidas em uma sala com temperatura de 20°C, sob um regime fotoperiódico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, fluxo luminoso de 200 μ mol m⁻² s⁻¹.



Figura 1. Algas durante experiência em estufa.

3.1. Análise de metais pesados (Cd e Cu)

A análise dos metais pesados foi realizada a partir das regiões apicais, basal, vesículas e estruturas reprodutivas das macroalgas. As amostras retiradas foram colocadas rapidamente em azoto líquido, e retiradas para passar pelo processo de liofilização, e posteriormente trituradas e homogeneizadas manualmente com o auxílio de um almofariz e pilão. Aproximadamente 100 mg de amostras secas de macroalgas foi utilizada e colocados em bombas de Teflon contendo 2ml de HNO₃/HClO₄ (7:1 v/v) para a digestão. Posteriormente, as bombas foram colocadas na estufa a 110°C, durante 3h (Vinagre *et al.*, 2008). Os extractos contidos nas bombas, depois de terem arrefecido, foram filtrados através de filtros Whatman 42 para tubos de ensaio e diluídos com água ultrapura até perfazerem 10ml, e armazenados a 4°C até análise. As concentrações dos metais pesados foram determinadas através de espectrofotometria de absorção atômica (AAS) na chama (Spectra AA 50, VARIAN). Todo o material utilizado nas análises dos metais foram descontaminados em banhos de 24 horas em ácido clorídrico 10%.

3.2. Análise de pigmentos

Para a determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) aproximadamente 0,1g de material da alga foi retirado, colocado em um recipiente com azoto líquido por alguns minutos, logo após foram liofilizados e triturados em almofariz foram colocadas em tubos de ensaio. A extração foi realizada através da adição de 6mL de acetona pura, e para assegurar a desagregação completa do material as amostras foram submetidas à um banho frio de ultrassom durante 2 minutos. A extração dos pigmentos ocorreu à -20°C durante 24h, no escuro para prevenir degradação dos pigmentos. Após a extração as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a análise no espectrofótopmetro pelo método de 'Gauss-Peak Spectra' (GPS) [18]. A leitura das amostras foi realizada pelo espectrofótopmetro de feixe duplo a partir dos 350 nm aos 750 nm. O espectro de absorvância foi posteriormente analisado através do programa Sigma Plot 11.0, onde foi quantificados e identificados a MgChl *a*, MgChl *c1*, anteraxantina, betacaroteno, violaxantina, fucoxantina, feofitina *a*, auroxantina, zeaxantina e a MgChl *a* substituída por Cd (CdChl) e Cu (CuChl).

3.3. Análise da fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *in vivo* foi medida com o fluorômetro de pulso de amplitude modulada (Fluoropen FP100 PAM, Photo System Instruments, Czech Republic). Os dados registrados foram: F_v , F_m , F_0 e F_v/F_m ; sendo: F_v = fluorescência variável; F_m = fluorescência máxima; F_0 = fluorescência inicial; e F_v/F_m (Φ_{FSII}) = máxima eficiência fotoquímica. As leituras que foram realizadas após a adaptação das algas ao escuro durante 30 minutos, para a oxidação dos componentes do sistema de transporte de electrões. Para a adaptação das algas ao escuro utilizou-se papel laminado, para cobrir a região mediana superior do talo da alga. A leitura da fluorescência inicial das plantas adaptadas ao escuro foi realizada através de um pulso de luz modulado com baixa intensidade ($<0.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a fim de não provocar variação na fluorescência. A fluorescência máxima, em algas adaptadas ao escuro, foi induzida por um curto pulso de luz saturante ($8000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), o qual provoca a redução da Q_a . A mudança da eficiência da fluorescência durante os pulsos de luz actínica seguintes induz o efeito de Kausty. Os mesmos parâmetros foram obtidos em algas adaptadas à luz sendo, neste caso, o F_v'/F_m' a eficiência fotoquímica operacional. Os coeficientes dos “quenching” fotoquímico (q_P) e não fotoquímico (q_N e NPQ) também foram calculados, a partir dos dados das leituras das algas adaptadas ao escuro e à luz.

3.4. Análise do teste-JIP (indicadores de desempenho do processo fotoquímico)

Os transientes da fluorescência da Chl *a*, foram analisados utilizando o teste-JIP. Após a adaptação da alga ao escuro durante aproximadamente 30 minutos, as amostras foram submetidas à luz, utilizando o fluorômetro de pulso de amplitude modulada (PAM), em 5 níveis de fluorescência: F_0 ($t=20-50\mu\text{s}$), F_j ($t=2\text{ms}$), F_i ($t=30\text{ms}$), F_p ($t=300\text{ms}$) (Strasser & Strasser 1995; Strasser et al. 2000).

Baseado nestes dados, os seguintes parâmetros dos transientes da fluorescência foram avaliados: rendimento quântico efetivo do FSII (F_m-F_0/F_m); TR/RC - energia absorvida acumulada; DI - energia dissipada em forma de calor, fluorescência ou pela transferência de energia para outro sistema; S_m - directamente proporcional ao número de electrões que saem da quinona a (Q_a^-) para a cadeia transportadora de electrões; ABS ($TR+DI$) - fotões absorvidos pela molécula de clorofila no complexo antena; TR/ABS - máxima eficiência quântica do FSII; ψ_0 (ET_0/TR_0) - probabilidade da energia de excitação mover um elétron após a Q_a ; ρE_0 (ET/ABS) - probabilidade de um fotão absorvido mover um electrão dentro da cadeia transportadora de electrões; N - número de ‘turnovers’ da Q_a para Q_a^- ; ABS/RC

número total de fotões absorvidos por moléculas de Chl por todos os centros de reacção, dividido pelo número total de RC activos; ρ Po - rendimento máximo da fotoquímica primária; e PI – índice de desempenho

3.5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste estatístico paramétrico ANOVA One-way (análise de variância), seguido do teste de comparação múltipla à posteriori (post-hoc) de Fisher, e para os não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas, com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o programa STATISTICA 10. Para verificar as diferenças dos resultados da acumulação de metais, fotossíntese e concentração de pigmentos dos tratamentos, foi primeiramente utilizado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias e para testar a distribuição das amostras realizou-se o teste de teste de Kolmogorov-Smirnov.

4. Resultados

4.1. Experiência 1

4.1.1. Efeito sobre a fluorescência e os transientes de fluorescência da clorofila *a*

As concentrações de Cu e de Cd provocaram mudanças nos sinais da fluorescência da clorofila *a* (Figura 2). Nos tratamentos com Cu, tanto no Cu1(0,5 μ M/L) e no Cu2 (1 μ M/L), observou-se que os valores de eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) apresentaram uma tendência a diminuir, em geral, quando comparados aqueles registrados para o controle. A concentração letal do Cu para *F. vesiculosus* observada foi de 2 μ M/L (Cu3). Já para o Cd, não houve uma tendência à diminuição e nem uma diferença evidente em relação aos valores apresentados pelo controle. Resultados da análise de variância (one-way ANOVA) mostraram que a eficiência fotossintética do FSII apresenta diferenças significativas dentre os sete tratamentos ($P < 0,0001$). A análise dos testes de Fisher indicou haver diferenças entre os tratamentos com Cu1 e Cu2 e o controle, assim como pelo grupo formado pelos tratamentos com Cu2 e Cd1, Cd2 e Cd3 (Tabela1).

A análise de variância também revelou diferenças significativas nos resultados de alguns parâmetros do teste-JIP. Maiores valores de TR ($P = 0,0074$) foram observadas no controle quando comparados com os tratamentos com metais pesados, tanto Cd quanto no Cu (Figura 3, Tabela 2). A Figura 3 retrata os resultados do parâmetro TR/ABS ($P = 0,0139$) entre os diferentes tratamentos em função dos dias de experiência, onde, no geral, o tratamento com o Cu2 apresentou menores valores comparativamente com o controle, e o contrário foi observado para os tratamentos com o Cd. O teste de Fisher confirmou que os tratamentos: Cu1, Cu2 e Cd3 apresentaram diferenças significativas com relação ao controle (Tabela 3). Para algas submetidas ao tratamento Cu1 os valores apresentados, tanto no ρ_{E_0} e no ρ_{E_0} , no geral, foram maiores do que os registrados para o controle, enquanto que para o Cu2 verificaram-se valores inferiores aos do controle durante toda a experiência (Figura 5). As análises do teste de Fisher indicaram haver diferenças entre os tratamentos Cu2 e o controle para o ρ_{E_0} , e para o ρ_{P_0} , no entanto, só foram registradas diferenças significativas entre o controle e o tratamento Cu1 (Tabela 4). Valores registrados de ρ_{E_0} ($P=0,000041$) e ρ_{P_0} ($P<0,000001$) para os tratamentos com Cd foram maiores que aqueles verificados para o controle. Segundo o teste de Fisher, para o ρ_{E_0} todos os tratamentos com Cd apresentaram

resultados significativamente diferentes do controle, já para o ρ_{Po} somente os tratamentos Cd1 e Cd2 mostraram-se significativamente diferentes em relação ao controle (Figura 6, Tabela 5). Os demais parâmetros (NPQ, DI, ABS, Sm, Psi_O, N, ABS/RC e PI) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com o teste ANOVA.

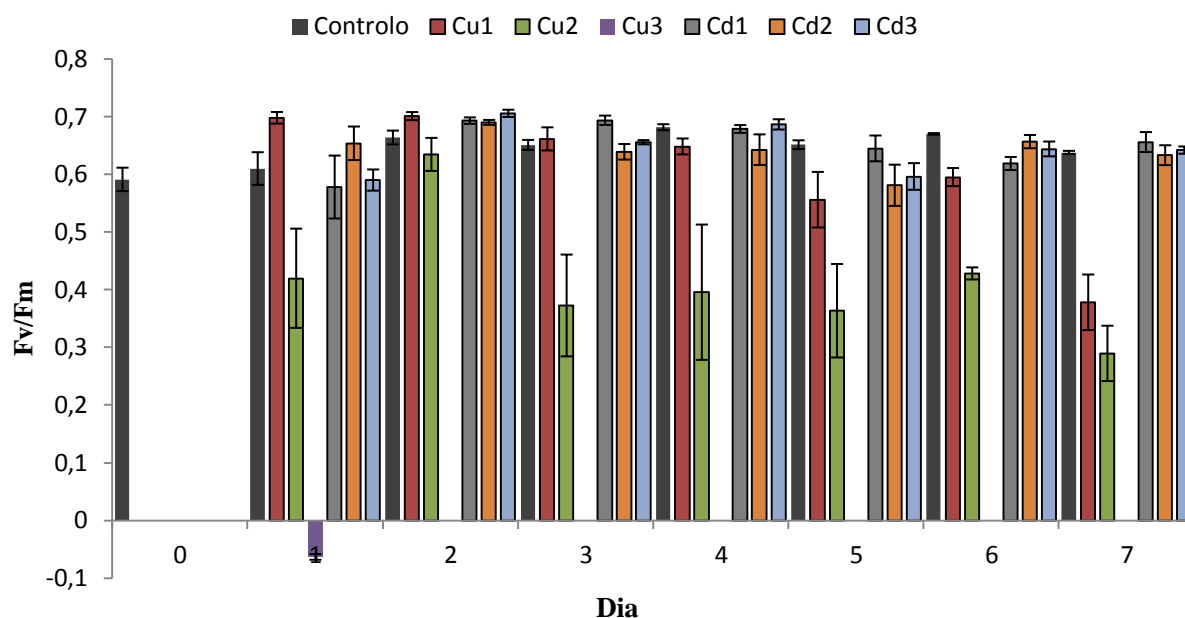


Figura 2. Eficiência fotoquímica do FSII em algas submetidas à presença de Cu1 (0,5 μ M/L), Cu2 (1 μ M/L), Cu3 (2 μ M/L), 0,002 μ M/L (Cd1), 0,004 μ M/L (Cd2) e 0,008 μ M/L (Cd3) durante 7 dias. As algas do tratamento Cu3 morreram após o primeiro dia de experiência (barras de erro representam o erro padrão).

Treatmento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,147799	0,000000	0,950494	0,804109	0,890836
Cu1	0,147799		0,000000	0,187266	0,293731	0,251756
Cu2	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
Cd1	0,950494	0,187266	0,000000		0,786554	0,861823
Cd2	0,804109	0,293731	0,000000	0,786554		0,922918
Cd3	0,890836	0,251756	0,000000	0,861823	0,922918	

Tabela 1. Resultados do teste de Fisher (Anova one-way) para a eficiência fotoquímica do FSII. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

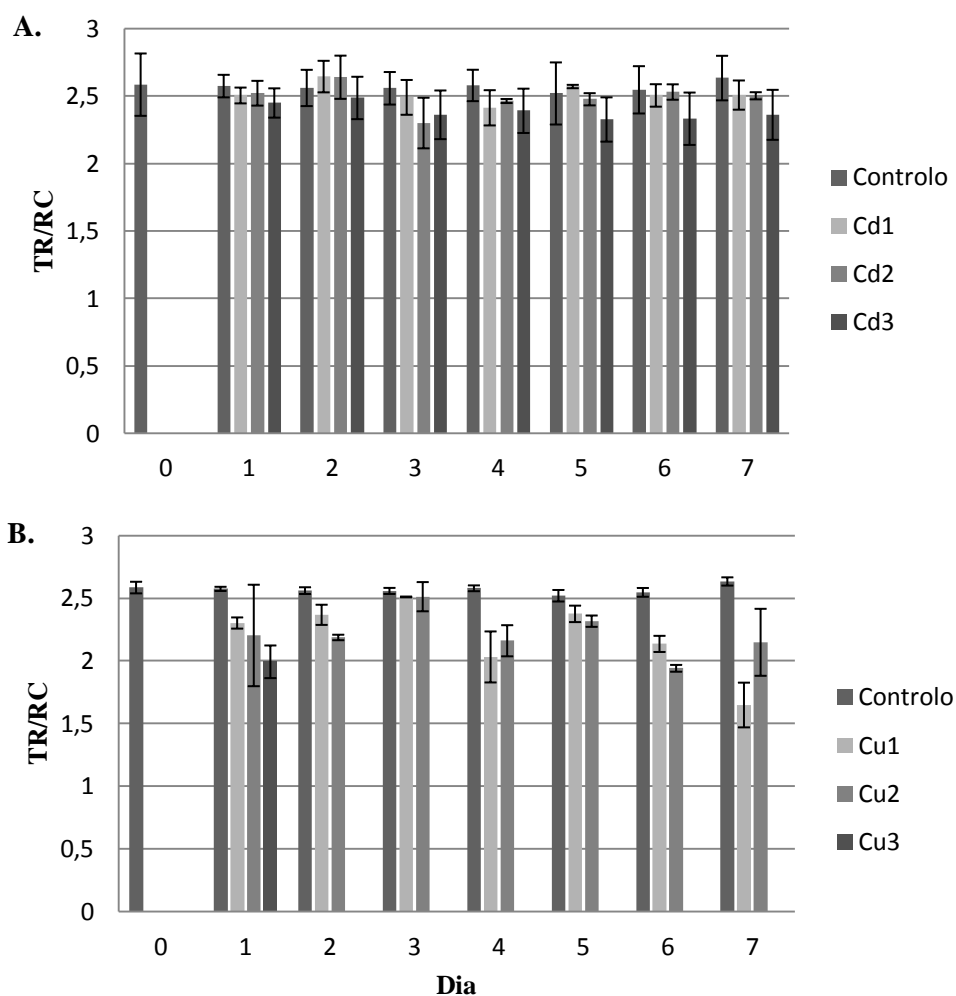


Figura 3. Efeito do Cd (A) e do Cu (B) na energia absorvida acumulada (TR/RC) durante 7 dias de tratamento. As algas do tratamento Cu3 morreram após o primeiro dia de experiência (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,000000	0,000008	0,625176	0,301466	0,022415
Cu1	0,000000		0,674583	0,000049	0,000294	0,010206
Cu2	0,000008	0,674583		0,000350	0,001703	0,035971
Cd1	0,625176	0,000049	0,000350		0,633306	0,114349
Cd2	0,301466	0,000294	0,001703	0,633306		0,268547
Cd3	0,022415	0,010206	0,035971	0,114349	0,268547	

Tabela 2. Resultados do teste de Fisher (Anova one-way) para o TR/RC. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

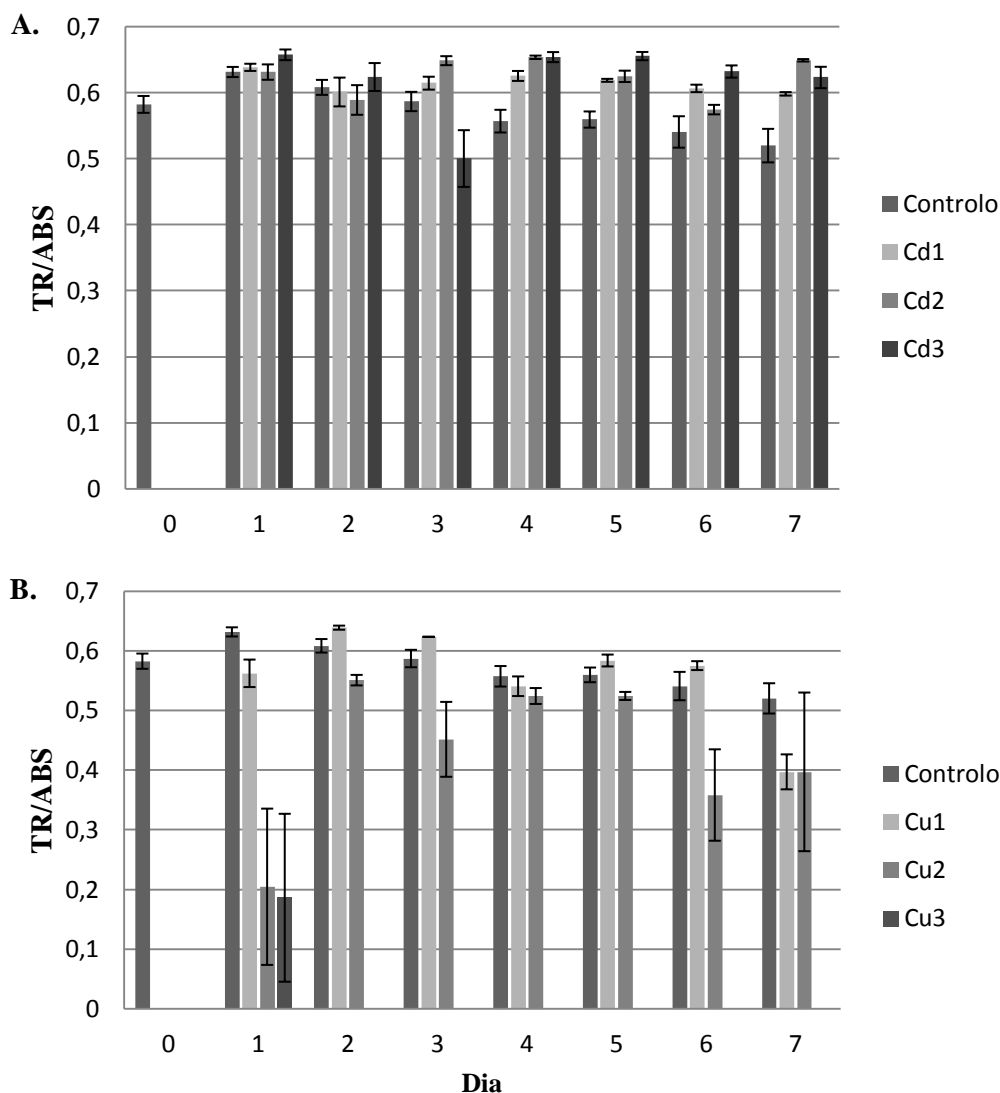


Figura 4. Efeito do Cd (A) e do Cu (B) na máxima eficiência quântica do FSII (TR/ABS) durante 7 dias de tratamento. As algas do tratamento Cu3 morreram após o primeiro dia de experiência (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,588947	0,000000	0,182250	0,114635	0,121251
Cu1	0,588947		0,000008	0,102542	0,065107	0,068750
Cu2	0,000000	0,000008		0,000000	0,000000	0,000000
Cd1	0,182250	0,102542	0,000000		0,829455	0,848926
Cd2	0,114635	0,065107	0,000000	0,829455		0,980120
Cd3	0,121251	0,068750	0,000000	0,848926	0,980120	

Tabela 3. Resultados do teste de Fisher (Anova one-way) para o TR/ABS. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

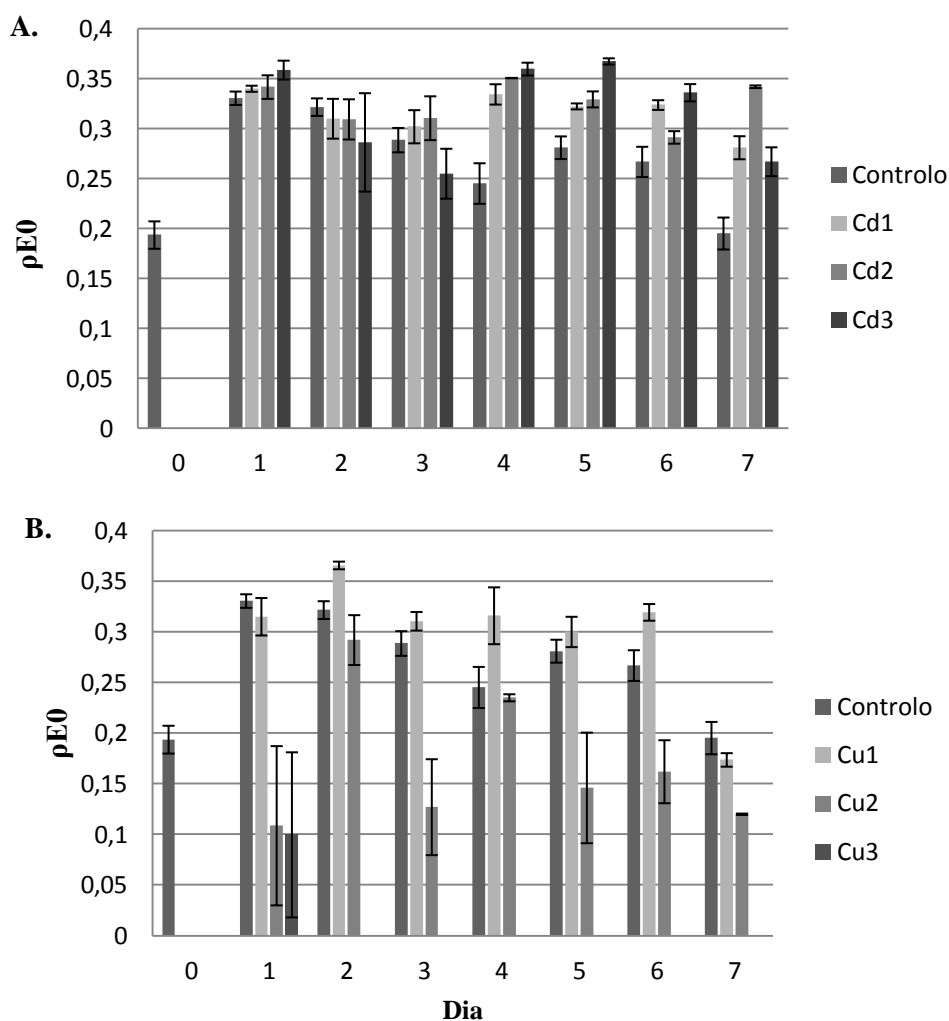


Figura 5. Efeito do Cd (A) e do Cu (B) no ρ_{E0} (probabilidade que um fóton absorvido tem de mover um electrão na cadeia transportadora de electrões) durante 7 dias de tratamento. As algas do tratamento Cu3 morreram após o primeiro dia de experiência (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,162309	0,006606	0,033343	0,015497	0,036852
Cu1	0,162309		0,000409	0,516607	0,362508	0,540272
Cu2	0,006606	0,000409		0,000038	0,000014	0,000044
Cd1	0,033343	0,516607	0,000038		0,792656	0,971074
Cd2	0,015497	0,362508	0,000014	0,792656		0,764856
Cd3	0,036852	0,540272	0,000044	0,971074	0,764856	

Tabela 4. Resultados do teste de Fisher (Anova one-way) para o ρ_{E0} . Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

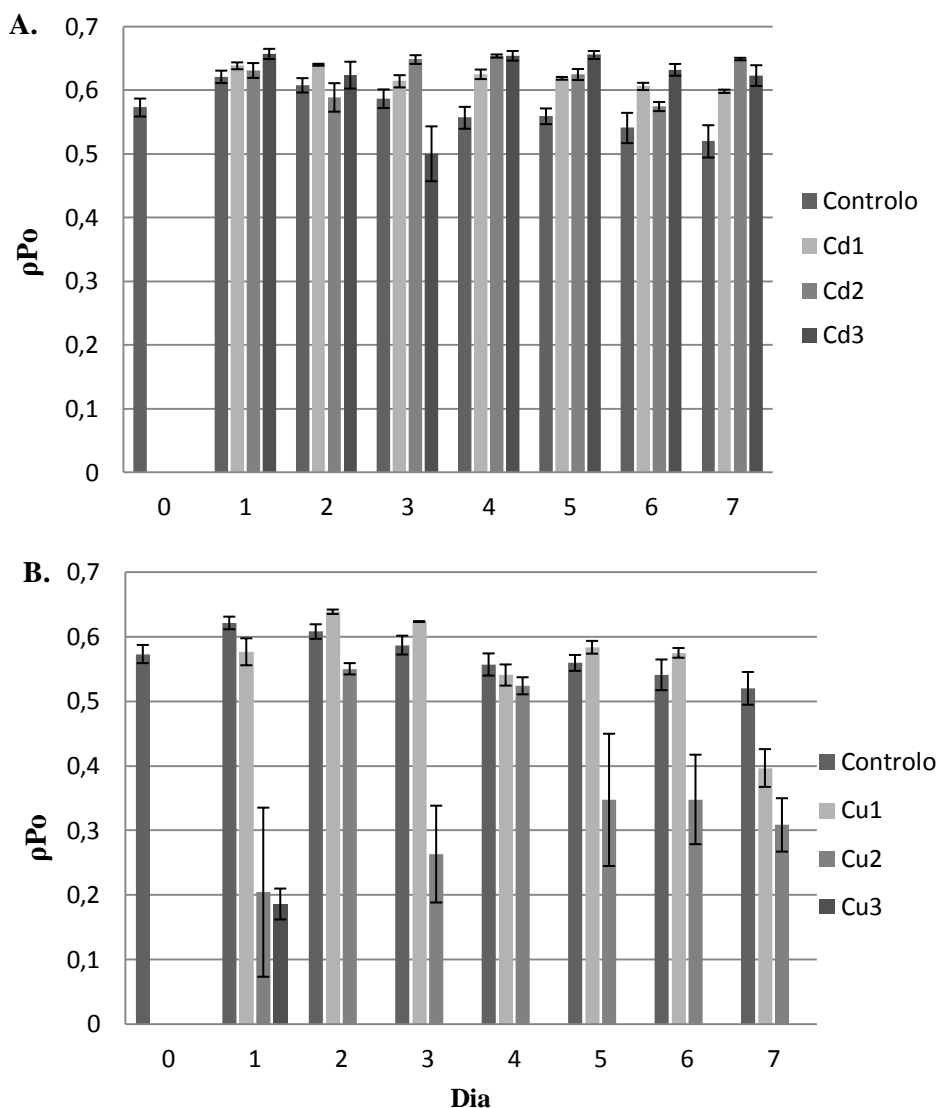


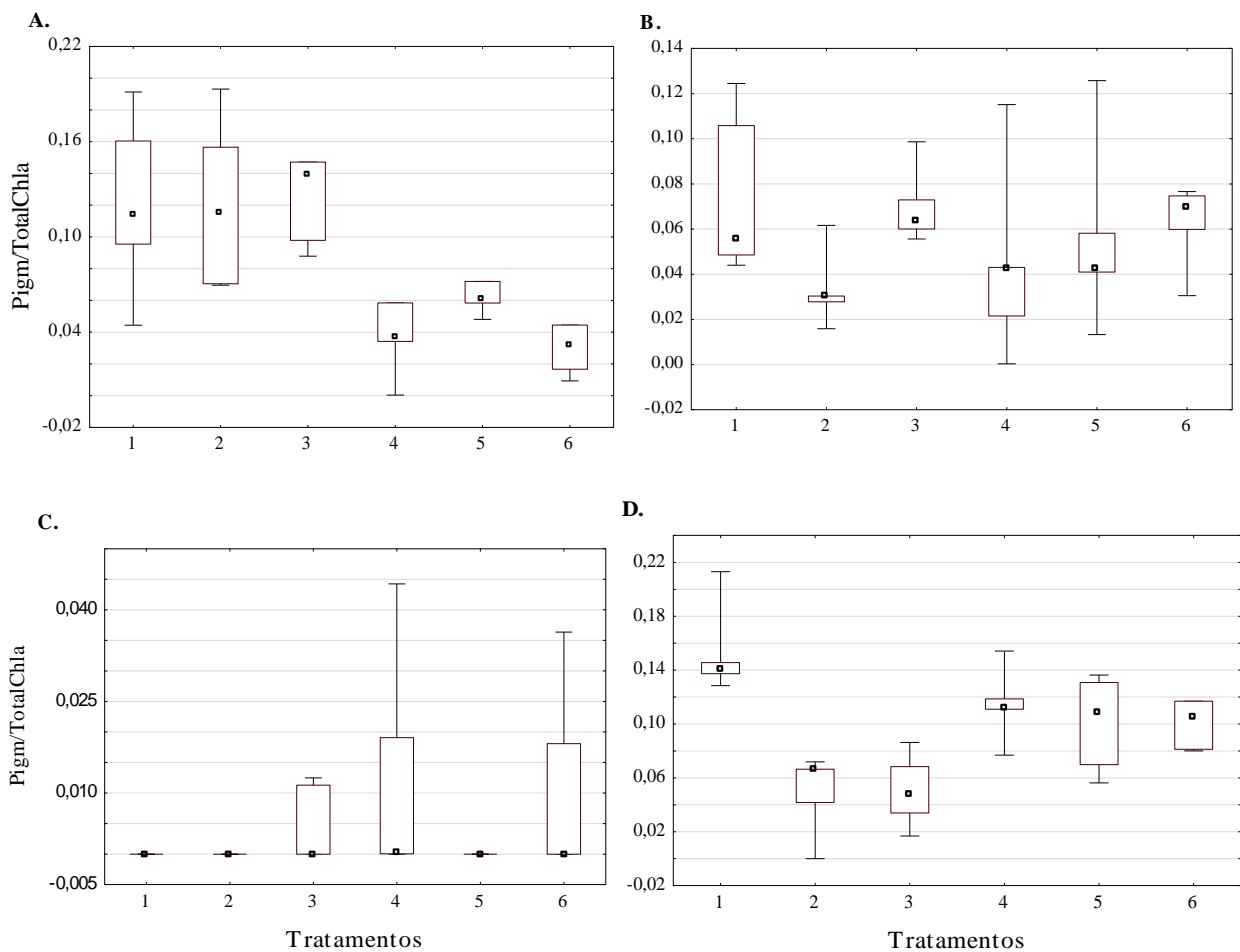
Figura 6. Efeito do Cd (A) e do Cu (B) no ρPo (rendimento máximo da fotoquímica primária) durante 7 dias de tratamento. As algas do tratamento Cu3 morreram após o primeiro dia de experiência (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,017566	0,897223	0,002537	0,000013	0,752445
Cu1	0,017566		0,049780	0,548297	0,059268	0,016284
Cu2	0,897223	0,049780		0,011384	0,000194	0,695672
Cd1	0,002537	0,548297	0,011384		0,195607	0,002893
Cd2	0,000013	0,059268	0,000194	0,195607		0,000029
Cd3	0,752445	0,016284	0,695672	0,002893	0,000029	

Tabela 5. Resultados do teste de Fisher (Anova one-way) para o ρPo . Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.1.2. Concentrações de pigmentos fotossintéticos

Dados das concentrações dos pigmentos em resposta aos diferentes tratamentos são mostrados na Figura 7. As concentrações dos pigmentos observadas em *F. vesiculosus*, apesar de mostrarem diferenças nas médias entre os tratamentos, estas só foram significativas, segundo o teste Kruskal-Wallis, na razão (pigmento/total Chla) dos níveis de violaxantina ($P = 0,0001$), feofitina *a* ($P = 0,0001$), zeaxantina ($P = 0,0032$) anteraxantina ($P = 0,0002$) e auroxantina ($P = 0,0001$). No caso dos quatro últimos citados, a exposição ao Cd e Cu resultou em uma redução nos valores médios das concentrações desses pigmentos nas algas, quando comparados ao controlo. No entanto, para a violaxantina observou-se que os tratamentos com Cu foram aqueles que registraram uma maior concentração desse pigmento. Quanto aos demais pigmentos (MgChla, MgChlc1, fucoxantina e betacaroteno) verificou-se que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as médias dos tratamentos submetidos aos metais pesados.



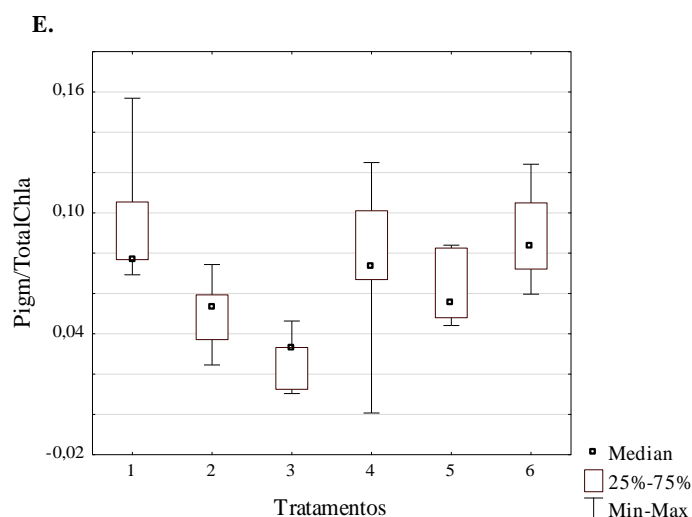


Figura 7. Efeitos dos tratamentos Controlo (1), Cobre 0,5μM/L (2), Cobre 1μM/L (3), Cádmio 0,002μM/L (4), Cádmio 0,004μM/L (5) e Cádmio 0,008μM/L (6) nos pigmentos fotossintéticos Auroxantina (A), feofitina *a* (B), anteraxantina (C), violaxantina (D) e zeaxantina (E). Foram utilizadas escalas diferentes nos gráficos para facilitar a visualização dos resultados.

4.1.3. Acumulação de metais em *F. vesiculosus*

Foi comparada a variação na acumulação dos metais pesados em relação ao local do talo da alga em todos os tratamentos. Os resultados revelaram que as diferenças entre as concentrações de metais nos tratamentos e as regiões do talo (talo, vesícula, reprodutiva e base), de acordo com a análise de variância (Kruskal-Wallis), apresentaram diferenças significativas. No geral, com o aumento da concentração de metal utilizada, tanto para Cu quanto para o Cd, houve também um aumento da quantidade de metal observada nas algas (Figura 8). Para o Cu, a vesícula ($P = 0,0166$) foi a região com maior aumento percentual deste metal, seguido das estruturas reprodutivas ($P = 0,0029$), do talo ($P = 0,0227$) e da base ($P = 0,0009$). A análise do teste de comparações múltiplas indicou haver diferenças significativas entre o tratamento Cu2 e o controlo, em todas as regiões do talo. Para o Cd, maiores valores foram observados na base ($P = 0,0047$), seguido pelo talo ($P = 0,003$), estruturas reprodutivas ($P = 0,0113$) e vesícula ($P = 0,0151$). Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos com Cd3 e o controlo para todas as regiões do talo.

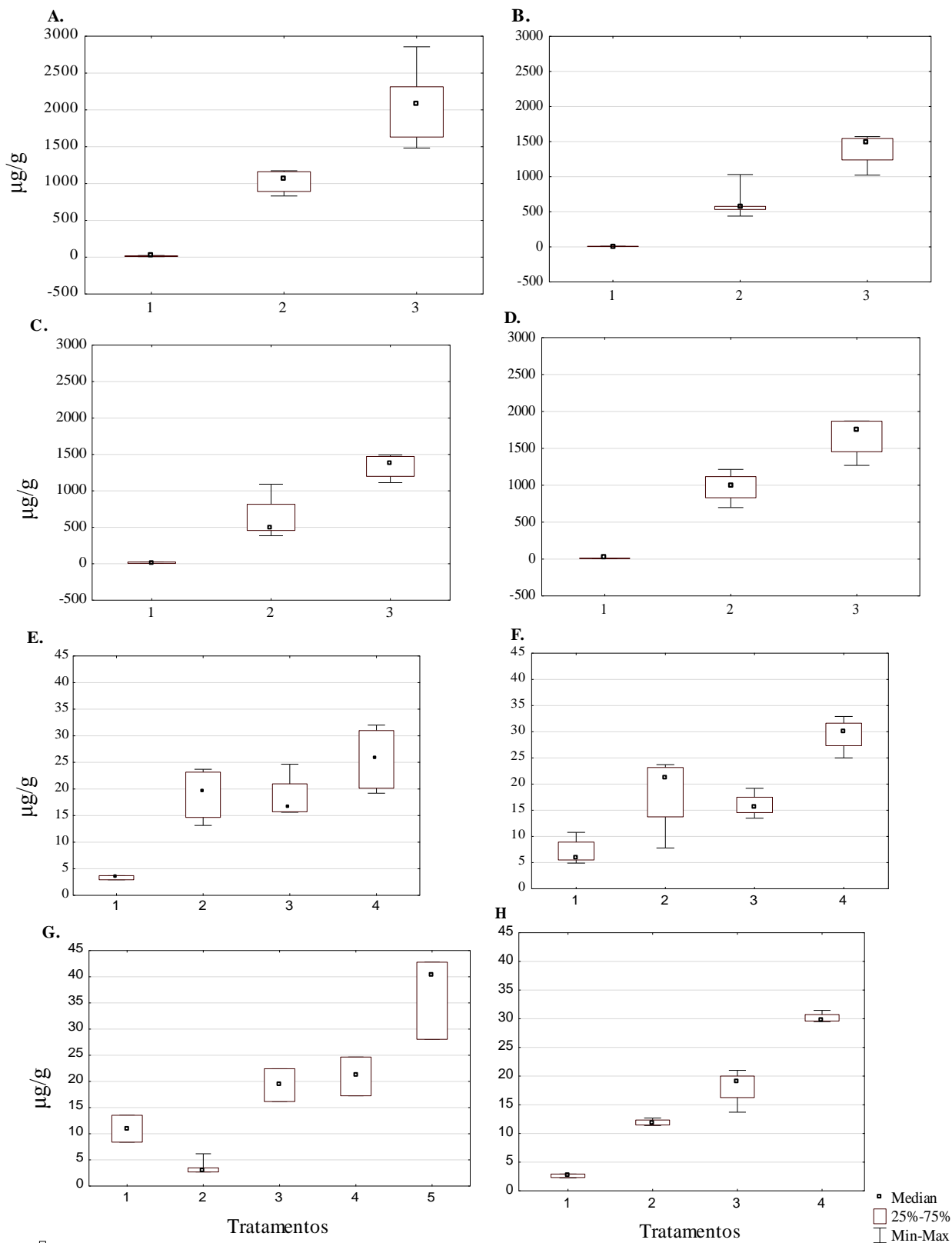


Figura 8. Concentrações de Cu no talo (A), vesícula (B), estruturas reprodutivas (C) e base (D) das algas nos tratamentos controlo (1), Cobre 0,5µM (2), Cobre 1µM (3); e concentrações de Cd no talo (E), vesícula (F), estruturas reprodutivas (G) e base (H) das algas nos

tratamentos controlo (1), cádmio 0,002 μ M (2), Cádmio 0,004 μ M (3) e Cádmio 0,008 μ M (4) (μ g/g peso seco).

4.2. Experiência 2

4.2.2. Efeito na fluorescência e nos transientes de fluorescência da clorofila *a*.

Os valores da eficiência fotoquímica do FSII das algas analisadas durante 4 dias de experiência não mostraram ser afetados pela exposição ao Cd, nas três concentrações utilizadas. Diferenças na eficiência fotossintética e no teste-JIP entre os tratamentos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados indicaram que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas para estes parâmetros ($P > 0,05$).

4.2.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos

De acordo com o teste Kruskal-Wallis, o stress causado pelas diferentes concentrações de Cd resultou, ao final da experiência, em diferenças significativas entre os tratamentos para os seguintes pigmentos (mg/g peso seco): MgChl*c1* ($P = 0,0339$), anteraxantina ($P = 0,0117$), betacaroteno ($P = 0,0077$) e total de carotenóides ($P = 0,0159$) (Figura 9). Para a MgChl*c1*, observaram-se maior percentual de redução entre o controlo (com média de 1,06) e o tratamento com a maior concentração de Cd (Cd3, 4 μ M/L), o qual apresentou valores mais baixos na concentração média desse pigmento (com a média mais baixa de 0,000035). O contrário foi observado para os teores de anteraxantina, betacaroteno e total de carotenóides, onde os tratamentos com Cd apresentaram maiores valores nas concentrações desses pigmentos quando comparado com o controlo. A concentração dos demais pigmentos (MgChl*a*, fucoxantina, violaxantina, CdChl*a*) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparada com os tratamentos. No entanto, algas sob stress de Cd apresentaram maiores valores de MgChl*a*, fucoxantina e violaxantina, além de aumentarem a CdChl*a* em tratamentos com maiores concentrações de Cd.

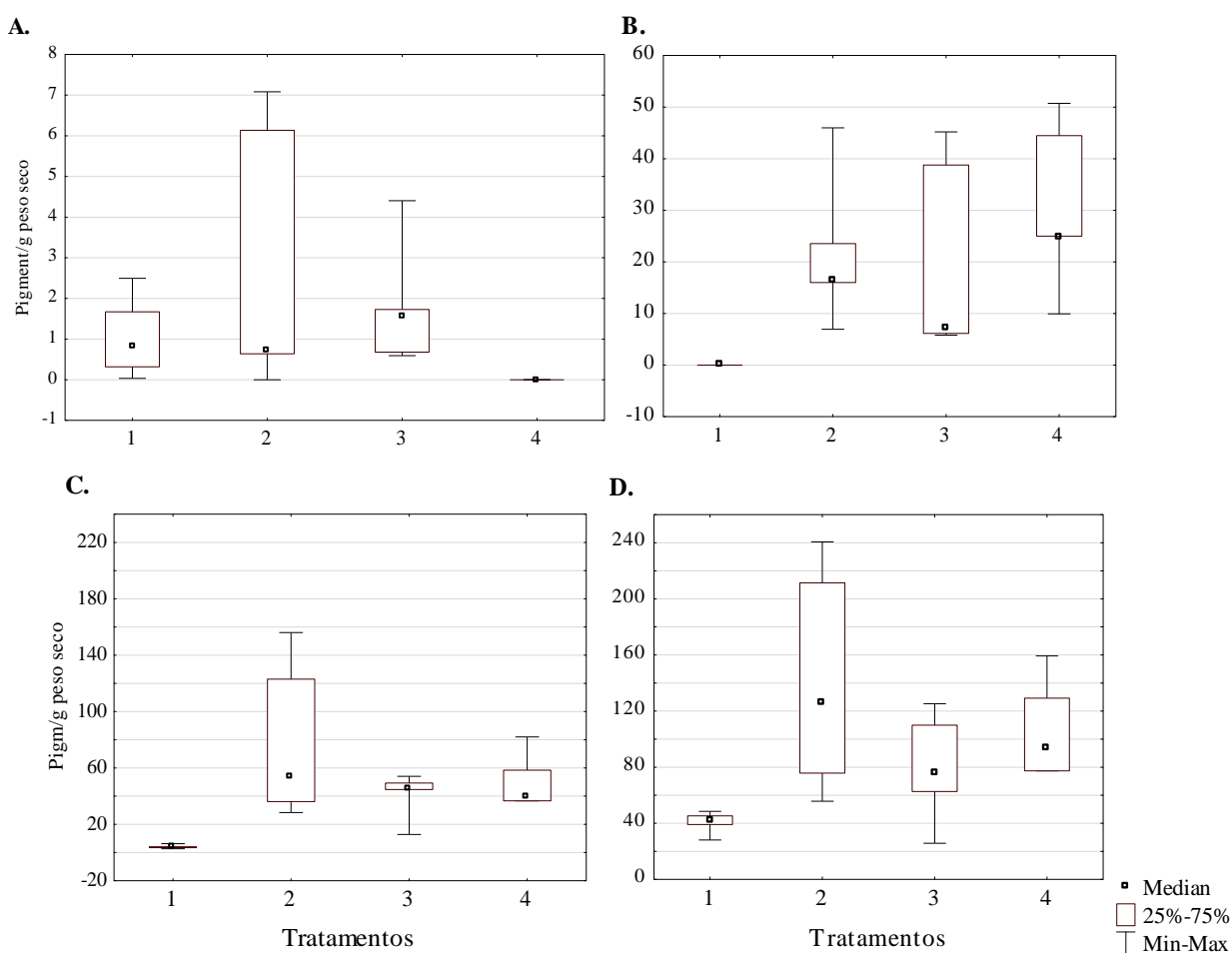


Figura 9. Concentrações dos pigmentos fotossintéticos (mg/g peso seco): MgChlcl (A), betacaroteno (B), anteraxantina (C) e Total Carotenóides (D) para algas submetidas aos tratamentos: controlo (1), Cd 1 μ M/L (2), Cd 2 μ M/L (3) e Cd 4 μ M/L (4). Foram utilizadas escalas diferentes nos gráficos para facilitar a visualização dos resultados.

4.2.3. Acumulação de Cd em *F.vesiculosus*

A acumulação de Cd pelas diferentes regiões do talo macroalgas expostas aos 4 tratamentos (controlo, 1 μ M/L, 2 μ M/L e 4 μ M/L) foram determinadas após os 4 dias de experiência (Figura 10). As diferenças entre as concentrações de metais nas regiões do talo das algas foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual mostrou que a concentração de Cd nas diferentes regiões: vesícula ($P = 0,0434$), estrutura reprodutiva ($P = 0,0049$) e base ($P = 0,0198$) de *F.vesiculosus* manifestaram diferenças estatisticamente significativas, exceto para o talo.

A análise dos resultados mostra que, no geral, as concentrações de Cd nas macroalgas foram maiores com o aumento da concentração de Cd nos tratamentos. A base foi a região do talo com maior percentual de aumento na concentração de Cd, seguido das estruturas reprodutivas, talo e vesícula. Os resultados das análises dos testes de comparações múltiplas mostraram que existem diferenças significativas entre os tratamentos com os metais e o controle, no entanto não apresentam o mesmo resultado entre os tratamentos com diferentes concentrações de metais.

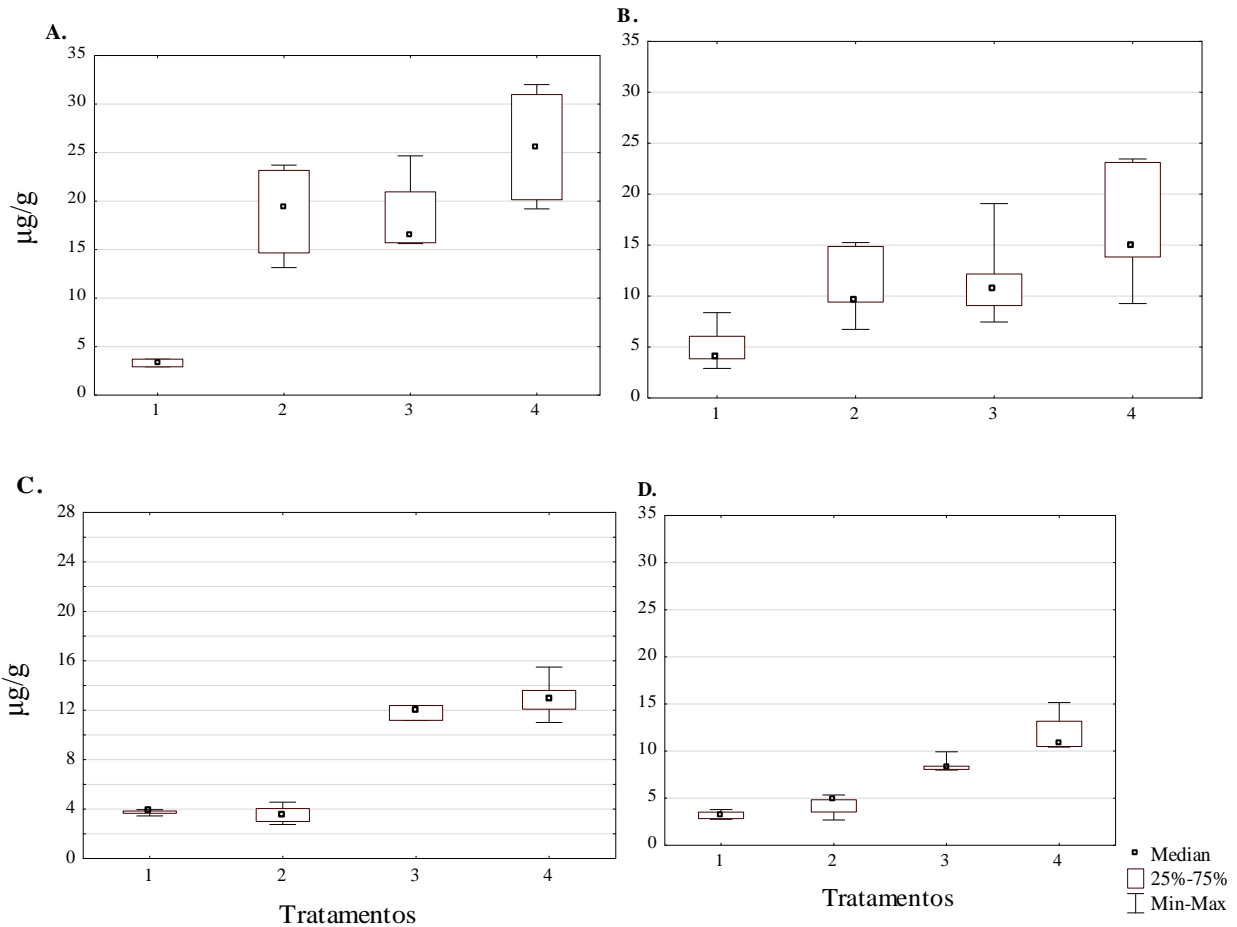


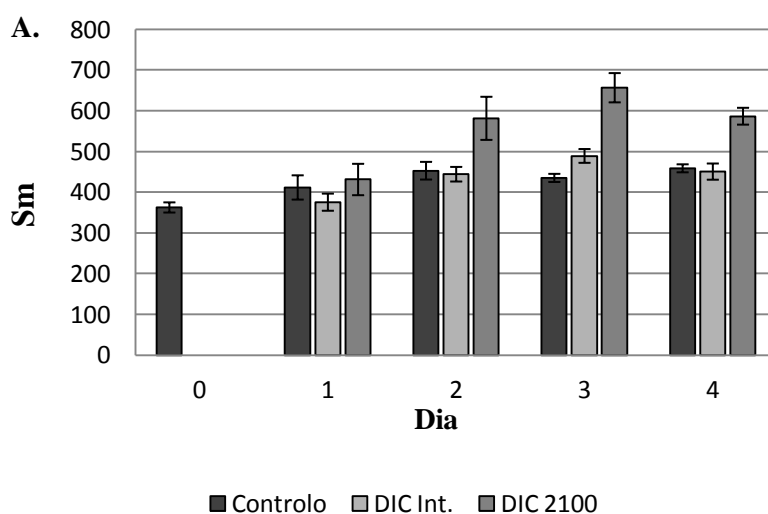
Figura 10. Concentração de cádmio ($\mu\text{g/g}$ peso seco) no talo (A), vesícula (B) estruturas reprodutivas (C) e base (D) das algas nos tratamentos controle (1) cádmio $1\mu\text{M/L}$ (2), cádmio $2\mu\text{M/L}$ (3) e cádmio $4\mu\text{M/L}$ (4) ($\mu\text{g/g}$ peso seco).

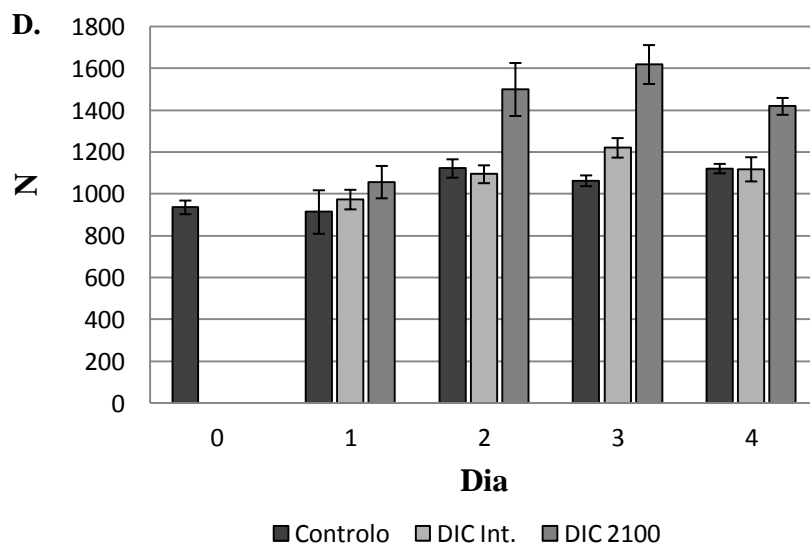
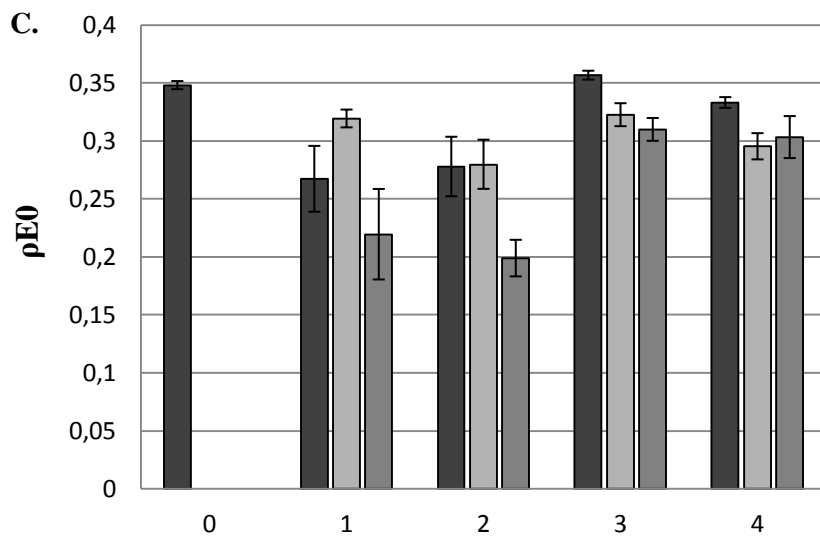
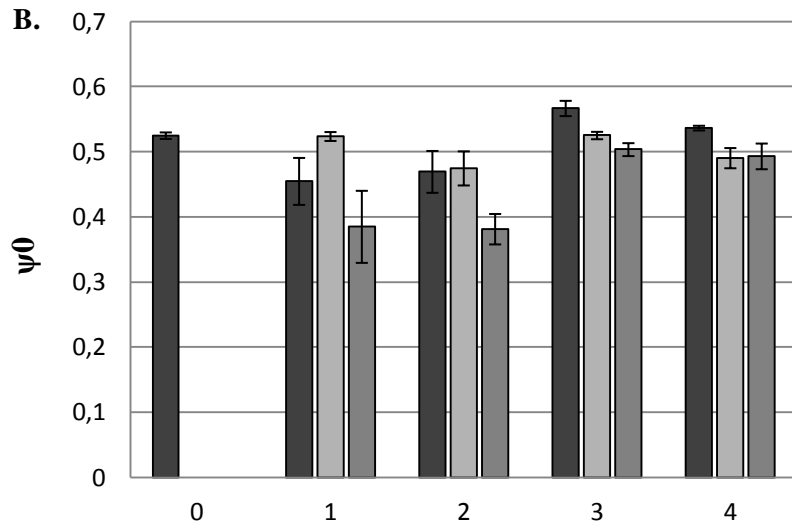
4.3. Experiência 3

4.3.1. Efeito na fluorescência e nos transientes de fluorescência da clorofila *a*.

Os resultados a partir dos dados de fluorescência nas algas estudadas demonstram que não há um comportamento distinto influenciado pelas concentrações DIC, e nem relações estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos e a eficiência fotoquímica do fotossistema II, analisado pelo teste de análise de variância Kruskal-Wallis.

Considerando os resultados da análise de Kruskal-Wallis para os parâmetros do teste-JIP, foram observadas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: S_m ($P = 0,017$), ψ_0 ($P = 0,0316$), ρ_{E0} ($P = 0,0339$), N ($P = 0,0098$), ρ_{Po} ($P = 0,0414$) (Figura 10). Para os parâmetros S_m e N os valores apresentados pelos tratamentos com $2191.10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$ de DIC foram mais elevados do que aqueles apresentados pelo controlo. O contrário foi observado nos parâmetros ψ_0 , ρ_{E0} e ρ_{Po} , onde o controlo atingiu valores mais altos do que aqueles observados nos outros tratamentos (Figura 11). Os resultados das análises do teste de comparações múltiplas apresentaram diferenças significativas entre o tratamento DIC 2100 e o controlo para todos os parâmetros anteriormente citados. Os tratamentos não provocaram diferenças significativas nos valores encontrados nos demais parâmetros do teste-JIP (TR, DI, ABS, ABS/RC) quando comparados ao controlo.





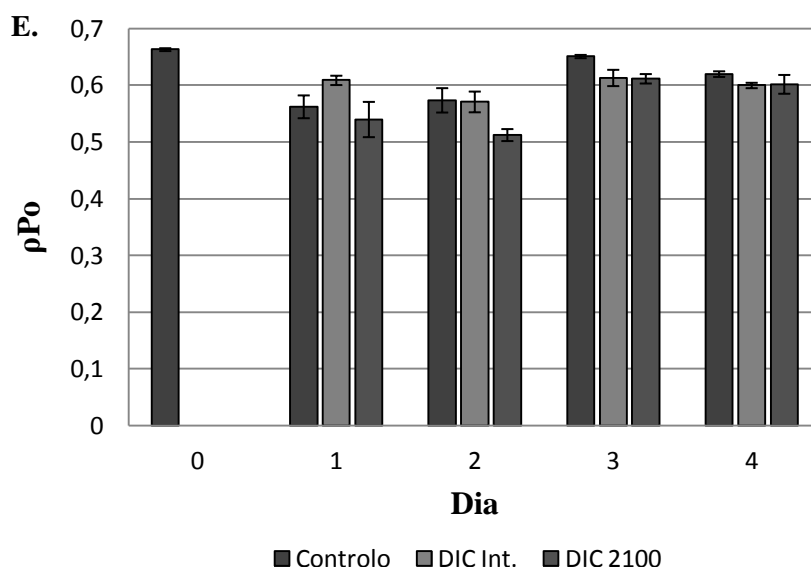


Figura 11. Influência das diferentes concentrações de DIC no ρP_0 , (directamente proporcional ao número de electrões que saem da Q_a^- para a cadeia transportadora); ψ_0 (ET/TR: probabilidade da energia de excitação mover um electrão após a Q_a); ρE_0 (probabilidade que um fóton absorvido tem de mover um electrão na cadeia transportadora de electrões); N (número de ‘turnovers’ da Q_a para a Q_a^-); ρP_0 (rendimento máximo da fotoquímica primária). DIC Int.: $1095 \cdot 10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$ de DIC; DIC 2100 = $2191 \cdot 10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$ (barras de erro representam o erro padrão).

4.3.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos

Os dados obtidos nas algas submetidas a esta experiência sugerem que não existem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as concentrações dos pigmentos (clorofilas, xantofilas e carotenóides) das algas nos três tratamentos (controlo, DIC intermediário e DIC 2100). Apesar disso alguns pigmentos apresentaram, nos tratamentos com DIC, maiores concentrações de: feofitina *a* ($P = 0,3791$), MgChl*a* ($P = 0,765$) e total de carotenóides ($P = 0,2753$) (Tabela 5).

Pigmento	Controlo	DIC Int.	DIC 2100
Feofitina <i>a</i>	9,664 ± 1,905	9,601 ± 1,747	14,17 ± 1,69
MgChla	129,155 ± 5,505	140,386 ± 4,369	154,207 ± 3,815
Total Carotenóides	93,222 ± 3,977	93,376 ± 2,665	107,2 ± 1,423

Dados dos valores médios de cinco indivíduos. ± erro padrão

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos com DIC Int. = 1095.10^{-6} mol.kg⁻¹ e com DIC 2100 = 2191.10^{-6} mol.kg⁻¹ nos pigmentos fotossintéticos (mg/g peso seco): feofitina *a*, MgChla e total de carotenóides.

4.4. Experiência 4

4.4.1. Mudanças nas características da fluorescência e nos transientes da clorofila *a* induzidas por maiores concentrações de DIC e de metais (Cu e Cd)

A eficiência fotoquímica do FSII nos tratamentos variou com a adição de metais e de DIC (Figura 12), apresentando valores inferiores aqueles observados no controlo, especialmente no tratamento com DIC (sem adição de metal). Resultados do teste de Kruskal-Wallis mostraram que existe diferença significativa entre os tratamentos nos valores da eficiência do FSII ($P < 0,00001$). A análise do teste de comparações múltiplas indicou haver diferenças significativas entre o tratamento Cu+DIC e o controlo (Tabela 6). No teste-JIP foram verificadas diferenças significativas, pelo teste de comparações múltiplas ($P = 0,0366$), no TR entre os tratamentos submetidos ao DIC e os tratamentos com Cu+DIC. O cobre apresentou valores mais inferiores de TR enquanto que valores mais elevados foram observados no tratamento com o DIC (Figura 13).

O efeito da adição de DIC e dos metais também foi evidente, apresentando diferenças significativas ($P < 0,0001$), nos valores de Sm (Figura 13), sendo os tratamento com o Cu o que apresentou maiores diferenças entre os demais (Tabela 7). Os valores de TR/ABS ($P = 0,0018$) apresentaram uma tendência à diminuição quando adicionado o DIC e metais (Figura 13), e de acordo com o teste de comparações múltiplas houveram diferenças significativas entre o controlo e o tratamento com Cu, e entre os tratamentos com Cu e Cd+DIC. A adição de Cd levou a uma redução no ψ_0 ($P = 0,0002$), enquanto que para o tratamento com Cd+DIC notou-se o efeito contrário (Figura 13). Os resultados do teste de comparações múltiplas apresentaram diferenças entre os tratamentos expostos ao Cádmio e o Cobre, Cobre+DIC e o

controle. Os valores de N ($P = 0,0009$) mostraram-se maiores, no geral, em algas submetidas os maiores concentrações de metais pesados, tanto para o Cu quanto para o Cd, porém sem diferentes significativas com relação os tratamentos com DIC. Algas submetidas a tratamentos com DIC mostraram comportamento semelhante entre si (diminuição) no parâmetro $\rho P0$ ($P = 0,0014$), e também, de acordo com o teste de comparações múltiplas, estatisticamente diferente ao comportamento do controle.

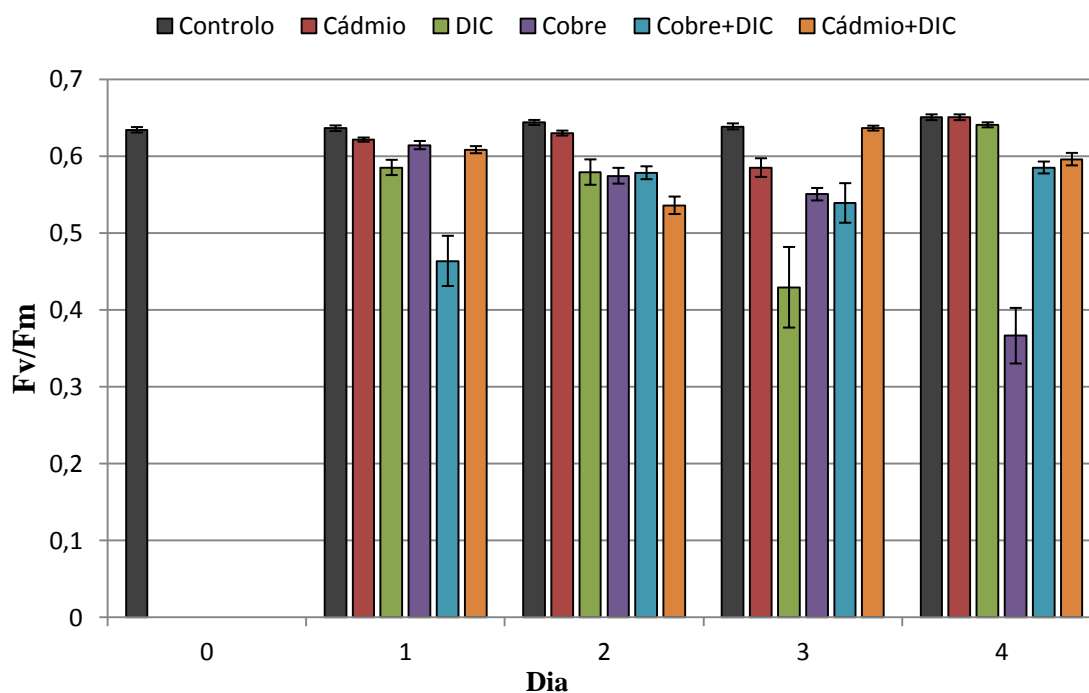
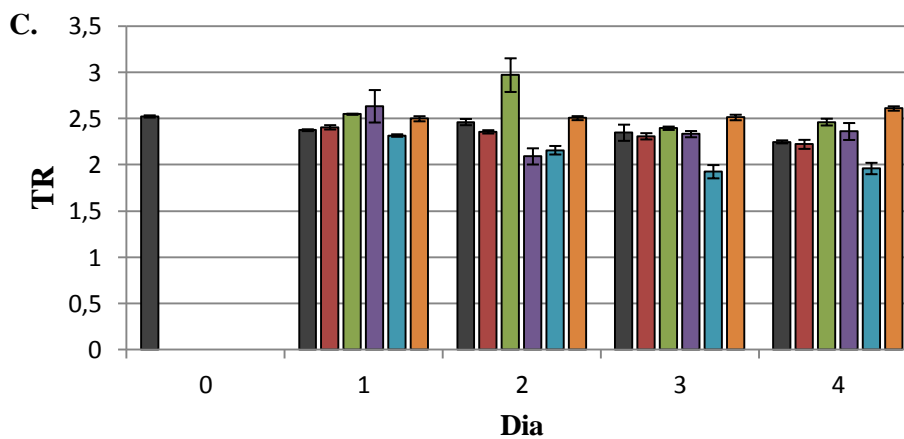
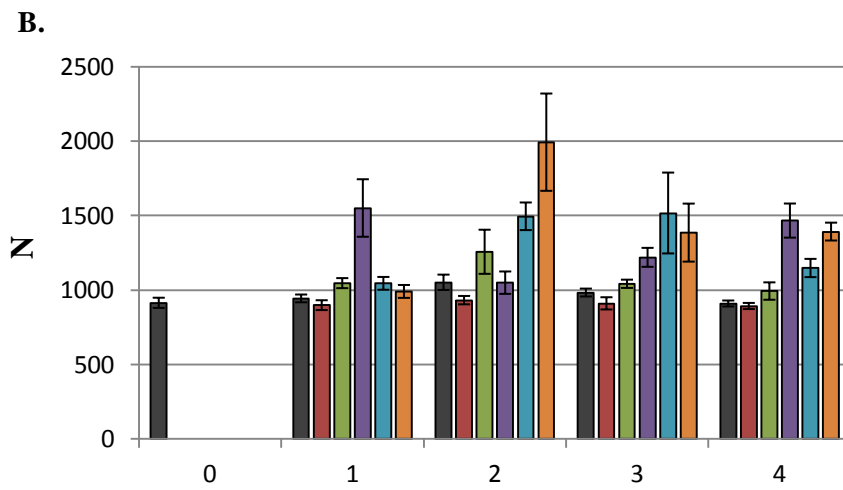
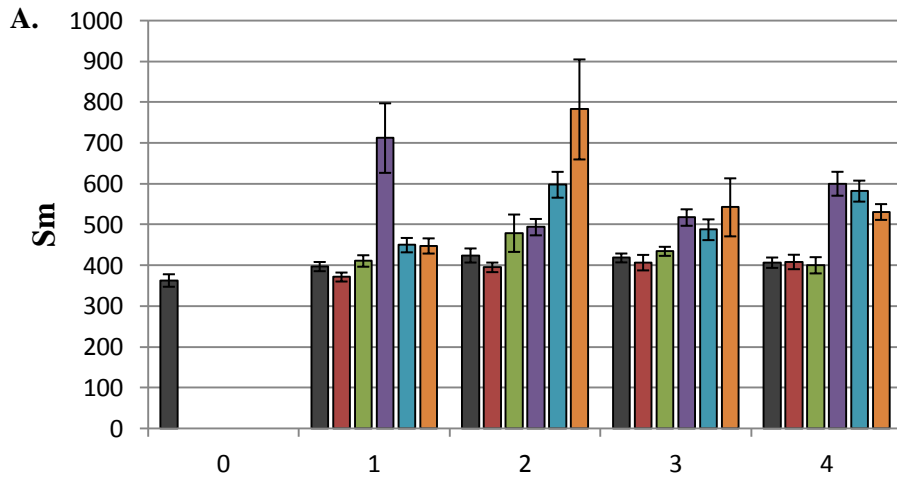


Figura 11. Eficiência fotoquímica do FSII em algas submetidas à presença de Cádmio ($4\mu\text{M/L}$), DIC ($2191.10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$), Cobre ($1\mu\text{M/L}$), Cobre ($1\mu\text{M/L}$) + DIC ($2191.10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$), Cádmio ($4\mu\text{M/L}$) + DIC ($2191.10^{-6} \text{ mol.kg}^{-1}$) durante quatro dias (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controle		1,000000	0,029029	0,000002	0,000001	0,577247
Cádmio	1,000000		1,000000	0,004266	0,002700	1,000000
DIC	0,029029	1,000000		0,618898	0,548574	1,000000
Cobre	0,000002	0,004266	0,618898		1,000000	0,302015
Cobre+DIC	0,000001	0,002700	0,548574	1,000000		0,270589
Cádmio+DIC	0,577247	1,000000	1,000000	0,302015	0,270589	

Tabela 6. Resultados do teste de comparações múltiplas para a eficiência fotoquímica do FSII. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).



■ Controlo ■ Cádmio ■ DIC ■ Cobre ■ Cobre+DIC ■ Cádmio+DIC

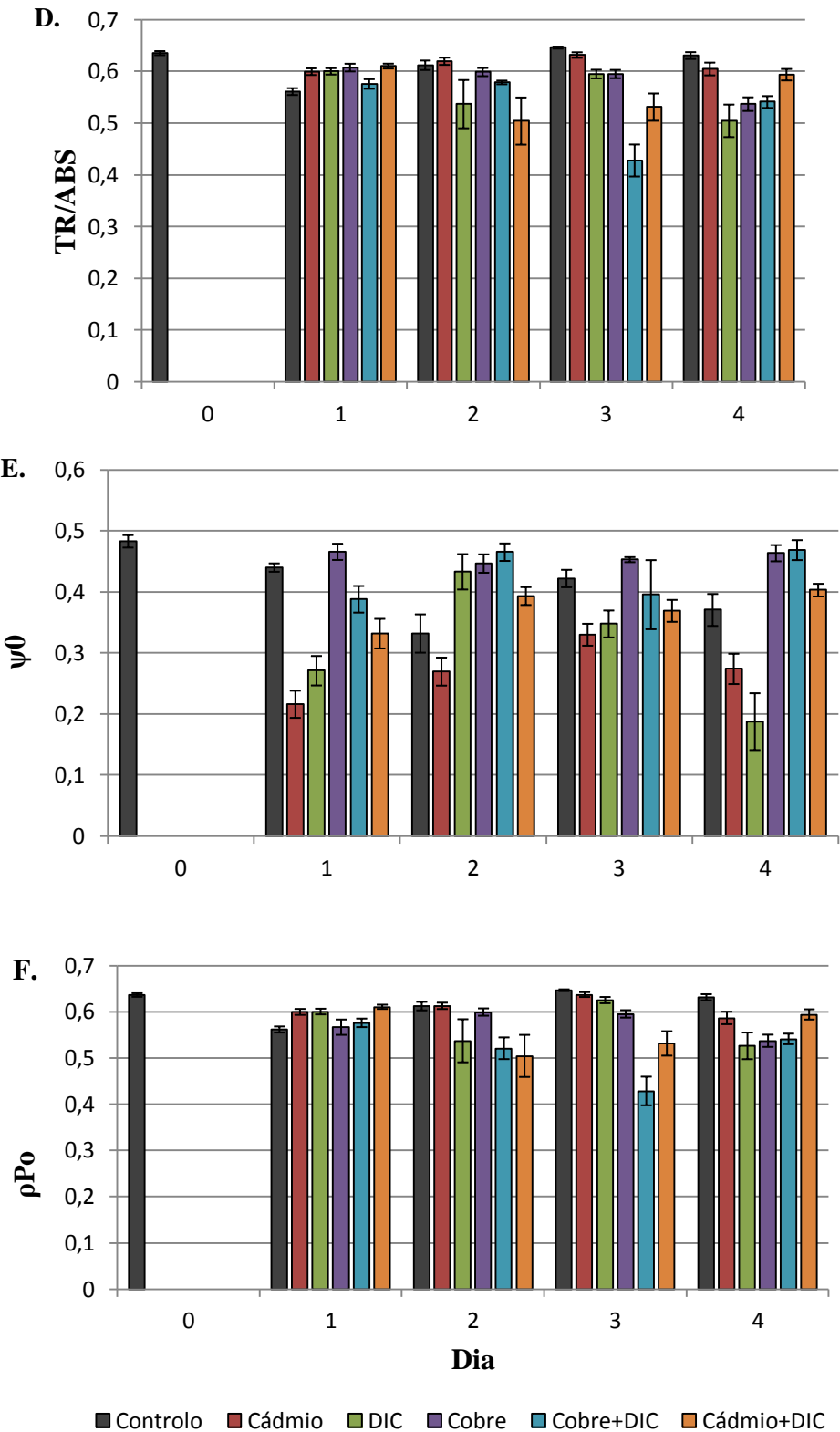


Figura 13. Influência das diferentes concentrações dos tratamentos: Cádmio ($4\mu\text{M/L}$), DIC ($2191.10^{-6}\text{mol.kg}^{-1}$), Cobre ($1\mu\text{M/L}$), Cobre ($1\mu\text{M/L}$) + DIC ($2191.10^{-6}\text{mol.kg}^{-1}$), Cádmio ($4\mu\text{M/L}$) + DIC ($2191.10^{-6}\text{mol.kg}^{-1}$) nos parâmetros: Sm, N, TR TR/ABS, ψ_0 , ρP_0 (barras de erro representam o erro padrão).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		1,000000	1,000000	0,000005	0,036478	1,000000
Cádmio	1,000000		1,000000	0,000019	0,061877	1,000000
DIC	1,000000	1,000000		0,022156	1,000000	1,000000
Cobre	0,000005	0,000019	0,022156		0,402766	0,501555
Cobre+DIC	0,036478	0,061877	1,000000	0,402766		1,000000
Cádmio+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	0,501555	1,000000	

Tabela 7. Resultados do teste de comparações múltiplas para o parâmetro S_m do teste-JIP. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tratamentos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
Controlo		0,024084	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Cádmio	0,024084		1,000000	0,004146	0,000435	1,000000
DIC	1,000000	1,000000		0,293781	0,069594	1,000000
Cobre	1,000000	0,004146	0,293781		1,000000	1,000000
Cobre+DIC	1,000000	0,000435	0,069594	1,000000		1,000000
Cádmio+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Tabela 8. Resultados do teste de comparações múltiplas para o parâmetro ψ_0 do teste-JIP. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

4.4.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos

A concentração de DIC, de Cd e de Cu afectou o conteúdo dos pigmentos das algas. O teor dos pigmentos observados nas algas nos tratamentos foi significativamente diferente nos pigmentos mencionados a seguir (Figura 14). As concentrações de feofitina *a* ($P = 0,0087$) e auroxantina ($P = 0,0068$) foi maior nas algas submetidas aos tratamentos com DIC e metais (Cu e Cd) comparativamente com os tratamentos sem a adição de DIC. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas para esses pigmentos ($P > 0,05$) (Tabela 6). O teor de betacaroteno ($P = 0,0136$), zeaxantina ($P = 0,0172$) e CdChla ($P = 0,0163$) foram afectados pelos tratamentos com a adição de DIC. A quantidade desses pigmentos diminuiu em condições de altas concentrações de DIC, sendo essas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 9).

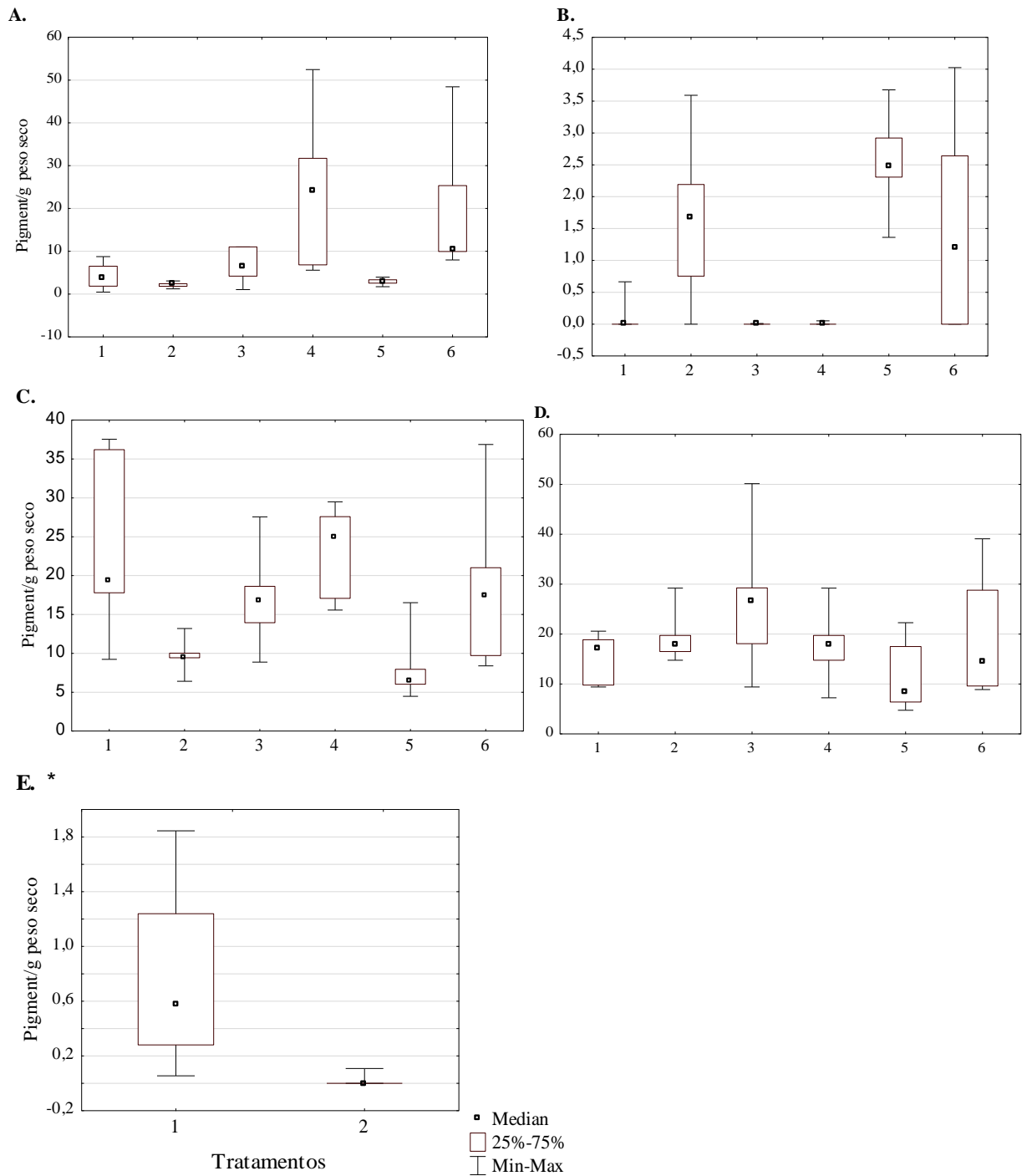


Figura 14. Concentração dos pigmentos fotossintéticos (mg/g peso seco): Feofitina *a* (A), auroxantina (B), betacaroteno (C), zeaxantina (D) e CdChla (E) em algas submetidas aos tratamentos controlo (1), Cádmio (2), DIC (3), Cobre (4), Cobre+DIC (5), Cádmio+DIC (6). * Cádmio (1), Cádmio+DIC (2).

A.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6
Controlo		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Cd	1,000000		1,000000	0,043033	1,000000	0,033952
DIC	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Cu	1,000000	0,043033	1,000000		0,218709	1,000000
Cu+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	0,218709		0,178815
Cd+DIC	1,000000	0,033952	1,000000	1,000000	0,178815	

B.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6
Controlo		0,609135	1,000000	1,000000	0,085143	1,000000
Cd	0,609135		0,322618	0,663964	1,000000	1,000000
DIC	1,000000	0,322618		1,000000	0,038247	1,000000
Cu	1,000000	0,663964	1,000000		0,095001	1,000000
Cu+DIC	0,085143	1,000000	0,038247	0,095001		1,000000
Cd+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

C.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6
Controlo		0,467118	1,000000	1,000000	0,054283	1,000000
Cd	0,467118		1,000000	0,389103	1,000000	1,000000
DIC	1,000000	1,000000		1,000000	0,609135	1,000000
Cu	1,000000	0,389103	1,000000		0,043033	1,000000
Cu+DIC	0,054283	1,000000	0,609135	0,043033		0,426576
Cd+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,426576	

D.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6
Controlo		1,000000	1,000000	1,000000	0,197875	1,000000
Cd	1,000000		1,000000	0,218709	1,000000	1,000000
DIC	1,000000	1,000000		1,000000	0,558192	1,000000
Cu	1,000000	0,218709	1,000000		0,030103	1,000000
Cu+DIC	0,197875	1,000000	0,558192	0,030103		0,467118
Cd+DIC	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,467118	

E.

Tratamentos	1	2
Cd		0,016294
Cd+DIC	0,016294	

Tabela 9. Resultados do teste de Fisher para os pigmentos: Feofitina *a* (A), auroxantina (B), betacaroteno (C), zeaxantina (D) e CdChl*a* (E).

4.4.3. Acumulação de Cu e Cd em diferentes condições de DIC

A acumulação de Cu e Cd nas diferentes regiões do talo das algas mostraram-se influenciada pelos tratamentos. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis houve diferenças significativas entre os tratamentos e a concentração de metais nas algas. Os resultados evidenciam que o conteúdo de Cd nas algas foi reduzido em altas concentrações de DIC dissolvido, apresentando concentrações semelhantes aquelas encontradas em tratamentos não expostos ao Cd. Em contrapartida, a acumulação de Cu apresentou uma tendência a aumentar, comparativamente com os demais tratamentos, em condições onde foi submetido ao o metal (Cu) + DIC (Figura 15).

Com relação às regiões do talo que apresentaram maior percentual de aumento na acumulação dos metais temos, para o Cd: estruturas reprodutivas ($P = 0,0097$) com os maiores valores, seguidas pela base ($P = 0,0085$), vesículas ($P = 0,0089$) e por fim o talo ($P = 0,0082$). Para o Cu a estrutura reprodutiva foi a região com maior aumento percentual de Cu, seguida pelas vesículas, base e talo (Figura 14). A análise dos testes de Fisher está representada na Tabela 10. Os resultados indicam que a adição do DIC aos tratamentos com os metais, no caso do cádmio, somente apresentou diferenças significativas com o controlo. Já para o cobre, a adição do DIC ao tratamento, levou a diferenças significativas na acumulação de metais pesados nas diferentes regiões do talo das algas.

A.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		0,006734	0,303675	1,000000
Cd	0,006734		1,000000	0,171688
DIC	0,303675	1,000000		1,000000
Cd+DIC	1,000000	0,171688	1,000000	

B.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		0,009900	0,328714	0,041934
Cd	0,009900		1,000000	1,000000
DIC	0,328714	1,000000		1,000000
Cd+DIC	0,041934	1,000000	1,000000	

C.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		0,008283	0,087318	0,303745
Cd	0,008283		1,000000	1,000000
DIC	0,087318	1,000000		1,000000
Cd+DIC	0,303745	1,000000	1,000000	

D.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		0,004407	0,905383	0,197816
Cd	0,004407		0,821030	1,000000
DIC	0,905383	0,821030		1,000000
Cd+DIC	0,197816	1,000000	1,000000	

E.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		1,000000	0,032664	0,027671
Cu	1,000000		0,071977	0,061779
DIC	0,032664	0,071977		1,000000
Cu+DIC	0,027671	0,061779	1,000000	

F.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		1,000000	0,083641	0,006671
Cu	1,000000		0,222613	0,023379
DIC	0,083641	0,222613		1,000000
Cu+DIC	0,006671	0,023379	1,000000	

G.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		1,000000	0,083641	0,003072
Cu	1,000000		0,368213	0,023379
DIC	0,083641	0,368213		1,000000
Cu+DIC	0,003072	0,023379	1,000000	

H.				
Tratamentos	1	2	3	4
Controlo		1,000000	0,085622	0,002963
Cu	1,000000		0,586738	0,049572
DIC	0,085622	0,586738		1,000000
Cu+DIC	0,002963	0,049572	1,000000	

Tabela 10. Resultados do teste de comparações múltiplas para as concentrações metais nas diferentes regiões do Talo. 1: Talo; 2: Vesícula; 3: Estruturas reprodutivas; 4: Base . (A; E) Talo; (B; F) Vesícula; (C; G) Estruturas reprodutivas; (D; H) Base. Em negrito estão indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$).

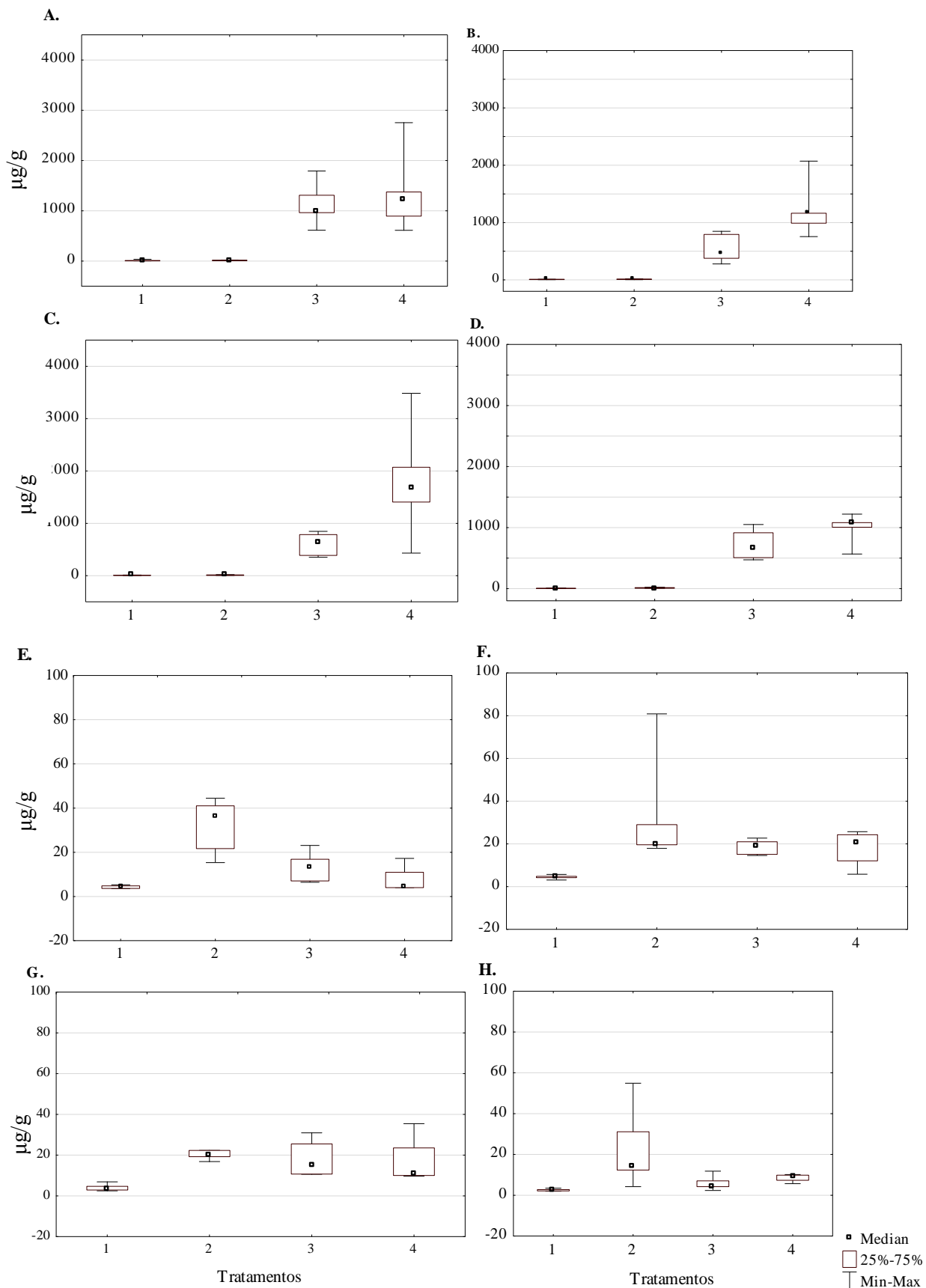


Figura 15. Concentração de Cu ($\mu\text{g/g}$ peso seco) no Talo (A), vesícula (B), estruturas reprodutivas (C) e base (D) das algas nos tratamentos controlo (1), Cobre (2), DIC (3),

Cobre+DIC (4). Concentração de Cd ($\mu\text{g/g}$ peso seco) no Talo (E), vesícula (F), estruturas reprodutivas (G) e base (H) das algas nos tratamentos controlo (1), Cádmio (2), DIC (3), Cádmio+DIC (4).

5. Discussão

5.1. Fluorescência da clorofila *a* e transientes da clorofila *a*

A eficiência fotoquímica máxima do FSII (Fv/Fm) funciona como um indicador bastante útil e rápido em estudos de stress ambiental, avaliando a relação dos factores de stress com os efeitos fotoinibitórios, a fixação de CO₂ e rendimento da reacção fotoquímica (Bjoerkman & Demmig, 1987). Em termos gerais, as condições de altas concentrações de DIC (carbono inorgânico dissolvido) e de Cu resultaram em danos fotoinibitórios do FSII, redução do Fv/Fm, isto é, houve a diminuição da proporção do total de energia que foi absorvida pela clorofila do FSII que foi utilizada para o processo fotoquímico nos centros de reacção. A concentração de DIC no meio apresentou um importante papel na regulação da actividade da fotossíntese de *F.vesiculosus*. Os resultados da fluorescência da clorofila *a* demonstram que *F.vesiculosus* não foi beneficiada pelo aumento da concentração de DIC na água, visto que houve uma saturação da fotossíntese (diminuição de Fv/Fm) nessas condições, indicando menor eficiência fotoquímica do FSII. Portanto, a quantidade de DIC fornecida foi maior do que a utilizada pelas algas, limitando a fotossíntese.

A fotossíntese de algumas espécies de macroalgas marinhas apresenta saturação pela presença de concentrações elevadas de carbono inorgânico. Resultados similares em macroalgas com relação à diminuição da actividade do FSII em altas concentrações de CO₂/DIC no meio, foram obtidos em *Gracilaria tenuistipitata* (Garcia-Sanchez et al., 1994), *Ulva rigida* (Gordillo et al., 2001), *Hizikia fusiforme* (Zou et al, 2003) *Ulva rotundata* (Levavasseur et al., 1991). Dados da literatura concluíram que as Fucales, incluindo *F.vesiculosus*, são capazes de utilizar o HCO₃⁻ como fonte majoritária de carbono orgânico para a fotossíntese, e que a sua absorção activa pode consistir em um mecanismo efectivo de acumulação do CO₂ dentro da célula, aumentando no sítio da Rubisco, a concentração de carbono inorgânico (Sand-Jensen & Gordon 1984; Surif & Raven 1989; Beer et al. 1990). Isto se dá, provavelmente, através de um mecanismo que envolve o transporte de CO₂ e HCO₃⁻ para o interior da célula (Johnston & Raven 1986; Raven 1991; Surif & Raven, 1989; Mercado et al.,1998). Portanto, é provável que a fotossíntese tenha sido dependente da fonte de CO₂ no meio.

Os resultados sugerem que *F.vesiculosus* apresentou um metabolismo tipo C4 e desta forma a concentração de carbono inorgânico utilizado no presente trabalho foi suficiente para saturar a actividade fotossintética. Para Surif & Raven (1989) as Fucaceae são semelhantes às plantas C4, apresentando saturação quando expostas a elevados níveis de CO₂, elevada

capacidade de utilizar HCO_3^- , além de acumular CO_2 . Kawamitsu & Boyer (1999) detectaram como fonte orgânica para a fotossíntese de *F. vesiculosus*, o malato e aspartato, assemelhando-as às plantas C_4 , onde a única diferença apresentada foi o facto de que a fonte de carbono acumulada pelas algas foi utilizada somente para a fotossíntese.

Iwasaki et al. (1996) atribui duas possibilidades aos danos no FSII em situação de excesso de CO_2 : a acidificação do citoplasma da alga e a inativação directa do FSII. A primeira, diminuiria a quantidade de FSII abertos em consequência do não funcionamento do ciclo de Calvin-Benson devido ao baixo pH no estroma, além de inativar algumas enzimas responsáveis pela assimilação do CO_2 . A segunda também seria motivada pelo baixo pH no citoplasma (Ono & Inoue, 1989).

Outra provável razão para a sensibilidade da eficiência fotoquímica em resposta a elevadas concentrações de HCO_3^- é o mecanismo de concentração de CO_2 (MCC) encontrado em macroalgas marinhas, que se baseia no transporte CO_2 e/ou HCO_3^- pela plasmalema (Beer, 1994; Giordano et al., 2005). A transferência de CO_2 para a Rubisco, em organismos aquáticos, aumenta com o MCC. Nas macroalgas marinhas, este é baseado na utilização de HCO_3^- , através da produção de CO_2 a partir da desidratação do HCO_3^- , catalizada pela enzima anidrase carbónica (AC) na plasmalema, podendo também ocorrer menos frequentemente, através da tomada directa através da plasmalema (Axelsson et al., 1995). Desta forma, a diminuição da actividade da fotossíntese verificada no presente estudo pode ser atribuída a uma supressão da actividade do MCC em resposta às altas concentrações externas de DIC, (Israel & Hophy, 2002) e/ou também como resultado de uma redução da Rubisco, situação já verificada em outros estudos, como por exemplo em *Ulva rigida* (Gordillo et al., 2001) e *Gracilaria tenuistipitata* (García-Sánchez et al., 1994).

Uma vez que a AC cataliza a inter-conversão de HCO_3^- e CO_2 , a supressão da sua síntese influenciada pela alta concentração de CO_2 resulta em uma menor capacidade de utilizar o HCO_3^- (Gao et al., 1993), podendo este facto ter influenciado na eficiência fotossintética das algas em estudo. Johnston & Raven (1990), em um estudo com *F. serratus*, mostraram uma diminuição na capacidade de utilizar HCO_3^- e uma concomitante redução na actividade da AC. Por outro lado, estas conclusões não estão de acordo com os dados relatados em outros estudos, que verificaram uma maior eficiência fotossintética causada pelo aumento de CO_2 em *Gracilaria* sp. e *G. chilensis* (Gao et al., 1993) *Porphyra leucosticte* (Mercado et al., 1999); *Cladophora vagabunda* e *Gracilaria tikvahiae* (Rivers & Peckol, 1995). Essas discordâncias com os resultados dos estudos citados podem estar relacionadas à utilização de

compostos como NaOH e HCl para controlar o pH, diferenças na habilidade da utilização das formas de DIC das espécies e diferentes condições utilizadas durante os estudos.

Os efeitos negativos de metais pesados na fotossíntese das algas têm sido estudados por vários autores (Gross et al., 1970; Wu & Lorenzen, 1984; Clijsters & Assche, 1985; Atal et al., 1991; El-Sheekh, 1993). Para Küpper et al. (2002) a presença de metais pesados leva a inibição na separação de cargas no FSII entre o complexo antena e os centros de reacção, além de danificar o aparato fotossintético. A espécie *F. vesiculosus*, em um estudo realizado por Nygård & Ekelund (1999), apresentou um aumento da respiração como consequência à exposição aos metais pesados.

As concentrações utilizadas de Cu e Cd foram capazes de interferir na atividade fotossintética de *F. vesiculosus* no presente estudo. Os resultados obtidos pela fluorescência da clorofila *a*, durante as experiências, evidenciam que o Cd é um metal com menor toxicidade com relação ao Cu. A razão Fv/Fm indicou que a fotossíntese foi interrompida somente nos tratamentos com as mais elevadas concentrações de Cd (2µM/L e 4µM/L), ao contrário do Cu que afectou a eficiência fotoquímica, mesmo em concentrações mais baixas. Os valores de Fv/Fm para as algas expostas ao Cd (experiência 1) é similar aos registrados nas algas do controlo, indicando que a fração dos RC do FSII, responsáveis por converter a luz absorvida em energia para os processos fotoquímicos, não foi afectado nos diferentes tratamentos (Svahn et al. 2012). Maior sensibilidade ao Cu foi observada em vários estudos (Munda & Hudnik, 1986; Fernandes & Henriques, 1991; Lobban & Harrison, 1994; Ralph & Burchett, 1998; Macinnis-Ng & Ralph 2002; Xia et al., 2004). Küpper et al. (1996) observou que as doses letais de Cu, para algumas espécies, foi inferior a encontrada no presente estudo, como para *Stratwtes abides* com 0,5 µM/L e *Elodea canadensis* com 0,8 µM/L.

Alterações nos níveis enzimáticos podem ser causadas pelo Cu (Gupta & Mukherji, 1977), com interferência nos processos metabólicos celulares devido à inibição causada por este metal. De acordo com Baker (2008), mudanças na estrutura e na organização das membranas do tilacóide podem afectar a fração da luz que é absorvida e recebida pelo FSII. Em alguns casos, como resposta ao stress causado pelo Cu, ocorre a indução de alterações na ultraestrutura da membrana, especificamente nos grupos sulfidril, onde a ligação desse metal aos grupos-SH levam à inibição fotossintética, visto que estes grupos são importantes para a actividade enzimática, além de causar uma perda de iões K⁺ e Cu⁺ no cloroplasto (Ouzounidou, 1993; Ralph & Burchett, 1998; Brown & Newman, 2003; Küpper et al., 2002). A maior afinidade do Cu pelos grupos-SH pode explicar algumas diferenças da resposta por esse metal comparativamente ao Cd (Clijsters & Assche, 1985).

Elementos como o Cu, são constantemente retirados do meio por serem necessários em processos importantes, inclusive na fotossíntese. O maior efeito tóxico desse metal pode ser atribuído ao facto de que, em condições de elevadas concentrações de Cu, ocorre a saturação dos processos metabólicos resultando em impactos tóxicos (Ralph & Burchett, 1998). Efeitos inibitórios na eficiência fotossintética em macroalgas em resposta a altas concentrações de Cu foram relatados também por (Ralph & Burchett, 1998; Küpper et al., 2002; Nielsen & Nielsen, 2005). De acordo com Pätsikkä et al. (2001), o excesso de Cu pode causar danos às proteínas do complexo de evolução do oxigênio no lado doador do FSII, levando a uma perda da actividade em condições de luz.

Algumas reacções que levam à peroxidação lipídica têm a participação de iões de Cu, levando a formação de $^1\text{O}_2$ (oxigênio 'singlet'), que são precursores de radicais hidroxilas altamente reactivos, através da competição com a catalase no consumo de H_2O_2 e da inibição do transporte de electrões que formará um estado excitado da Chl, aumentando os níveis de $\cdot\text{OH}$ (Sandmann & Boger, 1980).

O Cd não apresentou o mesmo efeito inibitório que o Cu, visto que não é igualmente essencial ao desenvolvimento dos organismos, e por isso a menor toxicidade do Cd pode estar relacionada com este facto e, desta forma, é possível que haja uma diminuição da sua acumulação pelas algas, reduzindo o seu impacto tóxico. Assim, este metal apresenta uma resposta mais limitada da fluorescência da clorofila *a* do que o Cu (Ralph & Burchett, 1998). De forma geral, têm se constatado por outros estudos que o stress provocado pelo Cd em algas tem pouca interferência nos parâmetros da fluorescência (Krupa et al., 1993; Di Cagno et al., 1999). Lee (2009), ao estudar o efeito do Cd em *F.serratus*, verificou que concentrações de (0 ~ 10 mg/L) não afectaram os valores de Fv e dos transientes da clorofila *a* nas populações, expostas ao Cd durante 7 e 14 dias. Para Krupa (1988), no caso do Cd, os danos ao aparato fotossintético estão relacionados particularmente com o complexo de captura de luz do FSII.

A partir dos resultados, é possível estabelecer uma relação na eficiência fotoquímica, entre o DIC e os metais pesados, visto que a adição do DIC aos tratamentos modificou os valores de Fv/Fm. No tratamento com Cu+DIC, o mecanismo de obtenção de HCO_3^- pelas algas diminuiu a super-excitação e a fotoinibição, permitindo maiores valores de Fv/Fm, o que demonstrou maior tolerância das macroalgas ao stress causado pelo excesso de Cu (Axelsson et al., 2000). Desta forma, a interpretação dos dados de fotossíntese em tratamentos com Cu+DIC pode ser feita pelo efeito inibitório do Cu na fotossíntese, o qual pode ser compensado pelo HCO_3^- . O maior desempenho fotossintético poderá estar de alguma forma

relacionada com a maior necessidade de carbono pelas células. Assim, em situações de altas concentrações de DIC, o CCM apresentará uma função importante, podendo resultar em uma melhor eficiência na utilização da energia em situações onde os complexos de captação de energia tem sua capacidade comprometida (Giordano et al., 2005).

Para o Cd, no entanto, a adição de DIC aos tratamentos resultou em uma diminuição de F_v/F_m . Lee et al. (1976), demonstraram que a actividade da anidrase carbónica diminuiu em tratamentos com Cd, e relaciona este facto com a actividade zinco-dependente dessa enzima (Atkins et al. 1972), levando a uma interação antagonista do Cd com o zinco, e reduzindo a actividade enzimática. Desta forma, a soma dos efeitos do DIC e do Cd na anidrase carbónica é uma hipótese para a interpretação da diminuição de F_v/F_m no presente estudo.

Além dos resultados mencionados acima, também foram analisados os efeitos dos metais e do DIC na captura e na utilização da energia pelas algas a partir da análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a*. Estudos anteriores estudaram as alterações no transporte de electrões do FSII em algas e plantas aquáticas (Iwasaki et al, 1996; Macinnis & Ralph, 2002). De acordo com os resultados do teste-JIP, o aumento na concentração de metais pesados levou a um maior stress relacionado com a estrutura e a função do FSII. Com a diminuição na eficiência fotossintética do FSII, segue-se uma série de eventos relacionados com a inativação do transporte de electrões nos tratamentos com metais e/ou DIC e com a redução no aproveitamento da energia fornecida ao complexo-antena. O aumento do stress, ou seja, maiores concentrações (tanto de DIC como de metais pesados) refletiram em uma maior inibição do transporte de electrões através do FSII. O fluxo de electrões no FSII foi reduzido em alguns níveis, como em pE_0 , TR, TR/ABS, ψ_0 e pP_0 , aumentando a dissipação de energia em forma de fluorescência e diminuindo processos como a fixação do CO_2 . A inibição do transporte de electrões foi mais severa, no geral, nos tratamentos com DIC e com Cu. Esses resultados mostram que existem mecanismos para manter o funcionamento do FSII quando a alga encontra-se em altas concentrações de DIC e/ou metais pesados.

A partir dos dados do teste-JIP e de F_v/F_m , em tratamentos com Cu e DIC, observa-se uma maior interferência na redução do acceptor de electrões (Q_a) e na inibição do transporte de electrões. Visto que os tratamentos expostos ao Cd e não alterou significativamente a razão F_v/F_m (experiência 1), os centros de reacção do FSII provavelmente não foram afectados pela exposição ao Cd no presente estudo. Nas condições de stress por Cd e DIC (experiência 4), a eficiência na transferência de electrões após a Q_a (ψ_0) pode ter sido afectada pela diminuição e/ou parcial bloqueio do transporte de electrões do FSII. Quando isto acontece, a transferência

de electrões da Qa para o NADP e para o CO₂ fica comprometida. Assim, a diminuição do pool de plastoquinona pode ter levado a uma redução do rendimento fotossintético observado, além da alcalinização do estroma (Mallick & Mohn, 2003). De acordo com Prasad & Strzalka (1999), o Cd não interage com as reacções fotossintéticas nas membranas do tilacóide, somente nas reacções do ciclo de Calvin e na fixação de CO₂, inibindo-as. Desta forma, a taxa de transporte de electrões pode ser influenciada indirectamente pelo Cd + DIC, limitando o consumo de ATP e NADPH através da inibição do ciclo de Calvin (Krupa et al., 1993).

Ao analisar os valores de ρE_o das experiências, observou-se que o DIC e o Cu (1 μ M/L) apresentaram menores valores deste parâmetro quando comparado com o controlo. Neste caso, a probabilidade da energia de excitação entrar no transporte de electrões foi menor nesses tratamentos, implicando também em uma menor eficiência na produção do potencial de redução (NADPH). Para o Cd os valores de ρE_o apresentou-se elevado durante a experiência 1. A explicação para este facto é a hipótese de que o Cd, quando em baixas concentrações, teria um efeito optimizador na transferência de electrões permitindo uma maior conversão da energia absorvida pelo FSII, contrariamente ao Cu, que sofreu uma parcial inibição do transporte de electrões para a reacção fotoquímica primária.

A diminuição do TR/ABS em tratamentos com Cu (experiência 1), sugere um aumento na absorção de fotões por molécula de clorofila (ABS). O mesmo não foi observado nos tratamentos expostos ao Cd, onde o TR/ABS manteve-se estável durante toda a experiência. Esses resultados indicam que, para o Cu existe um maior dano fotoquímico do FSII, onde é possível haver um mecanismo menos eficiente na dissipação da energia acumulada e uma inactivação de alguns centros de reacção devido ao aumento da absorção (Strasser et al., 2000).

O TR, fluxo de energia conservada em componentes químicos, é a fração do fluxo de luz absorvida utilizado para separação primária de cargas e estabilização do centro de reacção do FSII como P680+Qa⁻, fechando os centros de reacção do FSII. Desta forma, valores inferiores de TR registrados, pode significar que, nos tratamentos com Cu e Cd (experiência 1) e Cu+DIC, houve um suprimento incompleto de energia para os centros de reacção do FSII e uma dissipação do fluxo de energia como calor, fluorescência ou transferência para outros sistemas. Além disso, danos estruturais no aparato fotossintético podem estar relacionados com a inibição desses processos.

Danos causados nos centros de reacção ativos, resultaram em um comprometimento da eficiência fotoquímica no FSII (ρP_o), principalmente na experiência 4 pelo Cu+DIC. Os

valores de ρPo encontrados pode ter sido resultado da inactividade dos centros de reacção ativos, os quais quando se encontram com baixa densidade, podem sobrecarregar o funcionamento dos centros de reacção, verificado em valores mais elevados de TR, como nos tratamentos submetidos ao DIC.

No caso dos os processos relacionados com a saída de electrões da Qa para a cadeia transportadora (Sm), demonstrou-se que este não foi um factor limitante na eficiência da conversão da energia luminosa em energia química, principalmente nos tratamentos com Cd+DIC e Cd (experiência 4) e DIC (experiência 3). Contrariamente, esses tratamentos mostraram limitações com relação a outro parâmetro como ψ_0 , para o Cd, e o ψ_0 e ρE_0 para o DIC.

Nas experiências em que foram registrados um aumento de N no tratamento com DIC e Cu (experiência 3 e 4), é possível relacionar este facto ao aumento concomitante de Sm, visto que: $N = [(TR_0/RC) \cdot Sm]$. Segundo Force et al. (2003), a contribuição do FSII pode ser menor quando comparada ao FSI, em caso de aumento do N, pois este pode ocorrer através do transporte cíclico de electrões do FSI.

Visto que em algas tratadas com Cd e Cd+DIC o transporte de electrões não mostrou grandes alterações como o Cu e Cu+DIC, não é provável que tenha ocorrido danos nas membranas dos tilacóides devido à presença de Cu nos tratamentos. Uma possível explicação para a diminuição no transporte de electrões em algas expostas a elevadas concentrações de Cu, origina-se num desvio na utilização da energia capturada. A relação do Cu com a inibição dos centros de reacções já foi relatada por outros autores (Barón et al., 1995; Brown & Newman, 2003). De acordo com Linger et al., (2005), a causa para as alterações observadas nos resultados podem estar relacionadas com danos estruturais nos centros de reacção do FSII e/ou nos complexos antena, levando à mudanças na dissipação da energia. Além disso, um aumento no ΔpH na membrana do tilacóide, além da diminuição no transporte de electrões, foi observado como resultado do impacto de metais pesados por Ralph & Burchett (1998).

A partir dos dados do teste-JIP para o Cd, pode-se afirmar que as algas submetidas a tratamentos com este metal foram mais eficientes na manutenção do fluxo de transporte de electrões, quando comparado com o Cu. Assim como no presente estudo, efeitos inibitórios do Cu foram normalmente associados por alguns autores (Sandmann & Böger, 1980; Yruela et al., 1991, 1993, 1996; Jegerschöld et al., 1995). Nielsen et al., (2003) associou os efeitos do Cu com a redução da Qa e com a doação de electrões para reacções fotoquímicas no FSII após a Qa. De acordo com esses autores a H⁺ATPase pode ser o alvo do Cu, diminuindo a quantidade de H⁺ para o transporte de electrões e consequentemente a energia capturada no

FSII. Além disso, o Cu pode inibir o transporte de electrões para o NADP^+ , quando transportado para o cloroplasto, e também pode substituir o mercúrio presente na plastocianina, causando perturbações do transporte de electrões do FSII para o FSI (Coelho et al., 2000; Radmer & Kok, 1974)

5.2. Pigmentos fotossintéticos

O conteúdo do complexo pigmento-proteína presente na membrana e a sua organização em geral, influencia nos processos fotoquímicos. Na experiência 1, as concentrações de alguns pigmentos em tratamentos com metais apresentaram uma diminuição significativa. O excesso de Cd afectou negativamente o cloroplasto, como pode ser verificado pela clorose das algas. O surgimento de uma zona com pouca pigmentação foi registrada em tratamentos com Cd e com Cd+DIC. Efeito semelhante também foi encontrado por Markham et al. (1980) em talos de Laminaria. A peroxidação das membranas dos cloroplastos, causada pela clorofila com carga tríplice pode explicar o aparecimento de clorose nas folhas das plantas, o qual é um efeito tóxico comum do Cd (Durrant et al., 1990; Chugh & Sawhney, 1999; Hess & Weller, 2000).

O aumento dos valores de total de carotenóides, como observado na experiência 2, podem estar relacionados com a capacidade desses pigmentos de realizar a supressão do oxigênio 'singlet', além de reagirem com os radicais livres, como superóxido e radical hidroxila, diminuindo os danos oxidativos, potencialmente deletérios. Com base nesses resultados, pode-se dizer que os carotenóides desempenham um papel antioxidante no controlo dos distúrbios oxidativos causados pelos metais. De acordo com Franklin & Foster (1997) os carotenóides, particularmente o betacaroteno, é um 'quencher' para o estado excitado 'triplet' da clorofila e o estado 'singlet' do O_2 , e são essenciais para a protecção dos centros de reacção a danos causados pela fotoinibição.

Tratamentos com o Cu foram os que apresentaram menores concentrações de betacaroteno (experiência 4). Um aumento desse pigmento era esperado, depois da adição de Cu, visto que elevaria a atuação antioxidante nos tratamentos. Os baixos níveis celulares de carotenóides sugerem, então, maior efeito oxidativo no Cu do que no Cd. Além disso, a eficiência fotossintética pode ter sofrido uma diminuição, em partes, devido a essa destruição dos pigmentos antena.

O aumento de pigmentos carotenóides, nos tratamentos metais+DIC, evidencia que é provável que o efeito da adição de DIC aos metais nos pigmentos tenha aumentado a

susceptibilidade das algas. Esse tipo de comportamento após a exposição a metais pesados foi relatado por Ralph & Burchett (1998) e pode ser atribuído como uma estratégia de protecção ao aumento dos radicais livres formados. O stress causado pela exposição das macroalgas aos metais e às elevadas concentrações de DIC poderá ter causado um aumento das espécies reactivas de oxigénio, como O^{2-} , 1O_2 , $\cdot OH$, H_2O_2 , os quais podem ser removidos por compostos como os pigmentos carotenóides (Franklin & Foster, 1997).

Os níveis de MgChl *a* não apresentaram variações significativas nos tratamentos, apesar de sofrer uma diminuição nos tratamentos com metais, sugerindo que a diminuição da eficiência fotossintética pode ser causada por danos diretos no FSII, e não por mudanças nos níveis desse pigmento. A MgChl *c1*, na experiência 2, apresentou menores concentrações comparativamente ao controlo, após a exposição ao Cd3, provavelmente causada pela menor necessidade de pigmentos do complexo antena pelas algas. Além disso, este facto, também pode explicar uma menor estimulação da capacidade fotossintética quando as algas foram submetidas a tratamentos com Cd.

Revelou-se que, na experiência 1, os diferentes metais provocaram efeitos semelhantes no ciclo da violaxantina. Em algas tratadas com Cd e Cu, as concentrações de violaxantina e zeaxantina foram significativamente menores do que no controlo. Pode-se notar os efeitos no ciclo da violaxantina, onde a presença do metal causou mudanças na dissipação de energia originada nos pigmentos antena e nos centros de reacção (Heber et al. 2001). Após o tratamento com Cd e Cu, as algas apresentaram também uma acumulação do pigmento anteraxantina, sugerindo, que a segunda fase de de-epoxidação e a formação de zeaxantina foi inibida pelos metais (Janik et al. 2008). Apesar desse factor não ser indispensável para a dissipação de energia, a inibição da síntese de zeaxantina, pode causar alterações nas propriedades dissipativas (Schreiber & Neubauer 1990).

Na experiência 4, a adição de DIC aos tratamentos com Cu resultou também em uma diminuição da concentração de zeaxantina. A dispersão do excesso de energia em resposta a inibição do transporte de electrões, nas algas nos tratamentos com Cu+DIC, de acordo com os resultados, não reflectiu-se nas concentrações de pigmentos zeaxantina. Visto que alguns trabalhos têm relacionado a actividade da ATP-ase na acidificação do espaço intratilacóide, necessária pra ocorrer a depoxidação da violaxantina, o mal funcionamento dessa enzima causado pela presença dos metais pesados, principalmente o Cu, poderá ter levado à uma diminuição na produção da zeaxantina (Gilmore et al., 1998).

A partir dos resultados, assume-se que a de-epoxidação ocorreu preferencialmente em situações de excesso de Cu, do que em tratamentos com DIC juntamente com o Cu. A

conversão da violaxantina- anteraxantina à zeaxantina pode esta relacionada com a fotoinibição, já encontrada em outras espécies de Phaeophyta como *Lobophora variegata* (Franklin et al., 1996) e *Laminaria* (Vershinin & Kamnev, 1996). Desta forma, pode-se afirmar que as algas expostas ao tratamento Cu+DIC apresentaram menor fotoinibição comparativamente àquelas aos tratamentos com Cu.

As diferentes respostas dos pigmentos podem estar relacionadas com os mecanismos de ação dos metais e/ou aos danos estruturais na membrana. Collen & Davison (1999) sugeriram que o Cu interage com as membranas dos tilacóides, enquanto que o Cd interfere em outros processos metabólicos em plantas. Como já citado anteriormente, mudanças no pH (Δ pH) no lúmen podem ser geradas pelo transporte de electrões no cloroplasto. Visto que para a formação da zeaxantina a partir da violaxantina é preciso um baixo pH no lúmen, as menores concentrações desse pigmento, quando comparados com o controlo, na experiência 1 e 4 sugere um valor de pH elevado no lúmen dos tilacóides (Gilmore & Yamamoto, 1992). A menor eficiência do FSII pode estar relacionada também com o menor transporte de electrões no complexo citocromo b6/f e/ou da inibição da doação de electrões ao FSII, devido à elevada energização da membrana do tilacóide (Δ pH).

Ruban et al (1998), mostrou que a auroxantina pode ser uma via utilizada para a dissipação de energia no ciclo da xantofila. Assim, maiores concentrações de auroxantina nos tratamentos expostos ao Cu, Cu+DIC e Cd+DIC, pode estar relacionada com a característica de esse pigmento funcionar como um ‘quenching’ da fluorescência da clorofila, semelhante à zeaxantina.

Metais pesados divalentes, como o Cu e o Cd, podem substituir o Mg^{2+} presente na molécula de Chl de plantas aquáticas. Tal substituição torna a Chl instável, impede a captação da luz fotossintética pelos pigmentos antena danificados (Küpper et al., 1996; Küpper et al., 2007). Além disso, a capacidade de liberar electrões a partir de um estado excitado é menor na [Hms]-Chl (Watanabe et al., 1985; Watanabe & Kobayashi, 1988). No presente estudo, somente o Cd teve um efeito significativo sob a *MgChla*. A redução do ψ_0 , N e TR nas algas submetidas ao tratamento com Cd quando comparadas aquelas submetidas ao Cd+DIC, pode estar relacionada com a maior fração de Mg^{2+} substituída por iões de Cd na molécula de clorofila do complexo antena neste último tratamento.

A formação de [Hms]-Chl tem um papel importante nos danos causados por metais pesados, como já demonstrado em estudos anteriores (Gross et al., 1970; Puckett, 1976; Samuelsson & Öquist, 1980; Kowalewska & Hoffmann, 1989; Küpper et al., 1998; Prasad &

Strzalka, 1999; Patra & Sharma, 2000; Prasad et al., 2001; Küpper et al., 2002; Küpper & Küpper, 2006).

Küpper et al. (2002) propuseram que o Cu pode ser inserido na molécula de feofitina *a*, no RC do FSII, interferindo na separação de cargas entre a Pheo⁺ e Qa⁻. No presente estudo foi possível notar os efeitos do Cu na conversão da Mg-Chl em feofitina *a*, revelando uma relação de inibição induzida pelo Cu provocada pela inserção desse metal na molécula de feofitina *a* nos centros de reacção. Além disso, os níveis desse pigmento aumentaram nos tratamentos com metais+DIC em comparação aos tratamentos somente com metais, indicando que houve um comprometimento da Chl do complexo antena, o qual interferiu nos resultados da fluorescência da clorofila *a*. No entanto, Küpper et al. (2002) afirma que a causa do declínio da feofitina *a* pode ser confundida também com a diminuição total de pigmentos ou com a feofitina formada pela degradação de pigmentos-proteínas de células mortas.

5.3. Acumulação de metais pesados (Cu e Cd)

A acumulação de metais pesados em *F. vesiculosus* foi afectada por alterações físico-químicas na água, isto é, a adição de DIC aos tratamentos expostos ao Cd e Cu, e também no metabolismo das algas. A acumulação de Cu e Cd, sob em tratamentos com DIC, sugere mecanismos distintos na acumulação desses metais nas algas. Uma gama de alterações celulares podem contribuir directamente e/ou indirectamente para a capacidade de tolerância aos metais pesados em algas. Hipotetizamos que, a presença de metais pesados+DIC afeta a atividade metabólica das células e por consequência o transporte ativo dos iões de metais através da membrana para o interior da célula.

A utilidade das macroalgas em investigações sobre contaminações com metais pesados tem sido relatada por vários autores (Haug et al. 1974; Pedersen, 1984; Stengel et al. 2005). No entanto, a literatura ainda mostra-se bastante escassa de informações que valide os resultados do presente estudo. Os resultados foram comparados com a literatura existente que estudaram separadamente a aquisição de carbono inorgânico e a acumulação de metais pesados em macroalgas.

A diferença do comportamento da acumulação dos dois metais perante o aumento de DIC pode estar relacionado com o facto de que o Cu é um metal reconhecido como essencial, em oposição ao Cd. Acredita-se que existe um mecanismo ativo de acumulação de Cu, o qual ocorreria através da ligação deste metal a um carregador específico, provavelmente um polipeptídeo (Fernandes & Henriques, 1991). Assim, o impacto tóxico do Cu pode estar

relacionado com facto de que a quantidade de metal acumulada foi maior do que a quantidade necessária para os processos metabólicos (Macfalane & Burch, 2001).

O aumento na acumulação de Cu pela alga quando acompanhado de maiores concentrações de DIC, pode ser explicada indirectamente por um distúrbio no metabolismo das algas, visto que estas retiram activamente o Cu (Baker & Walker, 1990; Macfalane & Burch, 2001). Além disso, é provável a existência de algum mecanismo inibitório provocado pelo excesso de DIC, na acumulação de metais, além de vias distintas de entrada na célula entre o Cd e o Cu.

O enriquecimento do DIC contribuiu, nos tratamentos com Cd, para a diminuição da acumulação desse metal por *F.vesiculosus*. Nessas condições, a eficiência fotossintética também diminuiu. O DIC poderá ter afectado a biodisponibilidade dos metais pesados na água, diminuindo, no caso do Cd, a capacidade de acumulação desses metais pelas algas. A diminuição da acumulação de Cd em condições de enriquecimento de DIC sugere uma competição entre concentrações elevadas desse metal e a aquisição de DIC pelas algas. Outra explicação estaria no facto de que a menor actividade fotossintética no tratamento Cd+DIC, levou a uma redução no fornecimento de energia necessária para os processos que envolvem a acumulação dos metais. Em plantas, a diminuição da actividade fotossintética pode resultar em uma diminuição do pH intracelular, e por consequência diminuir a absorção não metabólica dos metais (Gutknecht, 1963; Bryan, 1969). Todos estes resultados citados revelam uma elevada diversidade na aclimação fotossintética, com relação aos altos níveis de DIC juntamente com metais pesados, na acumulação de metais pelas algas.

A capacidade das algas de acumular metais depende de uma série de fatores. Dois processos podem oferecer explicações para a influência do DIC na acumulação de metais. A síntese de proteínas ligantes, assim como de outros como carboxila e amino, é conhecida como um fator que interfere na acumulação de metais, diminuindo a quantidade de metais dissolvidos em água (Rainbow, 1997, Greene & Darnall, 1990). Os grupos carboxila fornecem cargas negativas e desta forma atraem catiões de metais divalentes (Mata et al., 2009). Mudanças fisiológicas dos organismos (por exemplo, a permeabilidade da membrana) e/ou ambientais (por exemplo, mais iões livres) também poderão explicar os efeitos observados na acumulação dos metais.

Algas marinhas podem produzir compostos orgânicos, como polissacarídeos, polifenóis e polipeptídeos, e liberar para o meio como um mecanismo de defesa contra a toxicidade dos metais pesados, controlando a sua acumulação (Romeo & Gnassia-Barelli, 1993; Vasconcelos & Leal, 2001; Brown & Newman, 2003). Muitos desses exsudados

orgânicos, assim como alginatos presentes na parede celular das algas, apresentam elevada afinidade por metais, complexando-os e, conseqüentemente, influenciando na sua toxicidade, como já foi demonstrado por alguns estudos (Haug et al., 1974; Schramm, 1993; Gledhill et al., 1997; Gledhill et al. 1999; Vasconcelos et al., 2001). Stengel et al. (2005), mostrou que a espécie *F.vesiculosus* é capaz de liberar ligantes quando submetidas à concentração elevada de Cu dissolvido. Outras macroalgas como *Porphyra* e *Enteromorpha*, demonstraram que os ligantes exsudatos produzidos são capazes de competir com os sítios de ligação dos metais nessas algas (Vasconcelos & Leal, 2001). Algas castanhas apresentam uma relação entre a complexação interna e externa de ligantes e polifenóis e a tolerância aos metais (Smith *et al.*, 1986; Gledhill *et al.*, 1999). Porém o mecanismo de protecção contra a toxicidade dos metais pesados ainda não está claro, visto que a liberação desses exsudatos é considerado um evento normal (Romeo & Gnassia-Barelli, 1993).

As concentrações dos metais Cu e Cd em *F.vesiculosus* também variaram de acordo com a região do talo. Para o Cd a base foi uma das regiões que apresentou maiores concentrações desse metal. Isto pode ser justificado pelo facto de que estas regiões do talo, isto é, regiões que apresentam em crescimento lento, acumulam mais rapidamente o Cd (Markham et al., 1980). O aumento percentual mais elevado de Cd no talo e de Cu nas estruturas reprodutivas e vesículas provavelmente estão relacionados com variações nas características de acumulação e retenção de metais nessas regiões (Stengel et al., 2005). Myklestad & Eide (1978) relacionaram, para *Ascophyllum nodosum*, as concentrações de metais acumuladas com a idade do talo, onde ‘tecidos’ com maiores taxas de crescimento apresentaram maior acumulação de Cu. As concentração de metais pesados das algas que não foram submetidas aos tratamentos (T0), foram similares às encontradas por Stengel et al. (2005), que encontrou valores maiores de Cu na região basal (holdfast) de *F.vesiculosus*, contudo as diferentes partes do talo não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Outras características, como gradientes de fenol, também podem estar relacionadas com alterações nos resultados da acumulação de metais pelas diferentes partes do talo (Haug et al., 1974; Craigie et al., 1984; Saraswathi et al., 2003). De acordo com Stengel et al. (2005) a relação entre a acumulação e a taxa de crescimento pode ser metal específica. Isso explicaria o diferente comportamento aqui registrado do Cu com relação ao Cd. O primeiro, por ser um metal essencial, a acumulação aumentaria directamente proporcional à taxa de crescimento. Já para o Cd, que é um metal não essencial, esta relação não está presente. Resultados semelhantes foram encontrados por (Markham et al., 1980; Rice & Lapointe, 1981).

6. Conclusão

Os resultados aqui apresentados enfatizam a influência das complexas interações entre metais pesados e o DIC sobre a acumulação dos metais, fotossíntese e pigmentos fotossintéticos em *F.vesiculosus*. Esses dois factores de impacto ainda não tinham sido estudados em conjunto, desta forma as informações presentes nesta dissertação são pioneiras.

Os metais pesados estudados apresentaram uma distribuição irregular no talo da alga, onde regiões distais do talo (reprodutivas e talo) apresentaram um maior aumento percentual nas concentrações de cobre, enquanto que para o cádmio, a base e as estruturas reprodutivas foram as regiões com maior aumento percentual após os tratamentos. Em estudos com metais pesados a escolha da região do talo utilizada para análise é fundamental, visto que é possível haver uma distribuição não uniforme no conteúdo do metal no talo, como mostrado pelos nossos resultados para *F.vesiculosus*.

O DIC pode ser considerado uma variável importante a ser levada em consideração em estudos com macroalgas, visto que a acumulação de metais por *F.vesiculosus* foi aparentemente controlada pelos processos metabólicos provocados por mudanças ambientais (aumento de DIC). As diferenças observadas na acumulação de cádmio e cobre em tratamentos com e sem DIC, podem indicar que essa interferência é específica para cada metal. Sugere-se que, sob condições de elevadas concentrações de DIC, as mudanças na acumulação de metais pesados gerada pode ser determinante para a actividade fotossintética em *F.vesiculosus* interferindo na acumulação de metais pesados. Assim, pode-se concluir que a variação do DIC é um factor importante a considerar nos estudos de monitorização, ou na avaliação de concentrações de metais em *Fucus*.

Os níveis de pigmentos fotossintéticos demonstraram que podem ser utilizados como indicadores biológicos de metais (individualmente), como também de stress combinado (metais+DIC). Quando as algas foram submetidas a uma mistura de metais e DIC, é provável que os carotenóides tenham sido utilizados para combater o stress oxidativo, através do aumento da sua produção. Os níveis de carotenóides confirmaram as mudanças significativas na fisiologia da alga devido ao stress dos metais pesados e DIC. Pode-se concluir que os mecanismos de protecção contra o stress oxidativo promovido pelos metais pesados em tratamentos com DIC são diferentes. As menores concentrações de zeaxantina, devido à presença do Cobre+DIC, sugerem que as macroalgas podem ter perdido a capacidade de sintetizar esse pigmento (reação de epoxidação). Este facto sugere que a dissipação de energia não esteve relacionada à produção de zeaxantina, mas sim a de outros pigmentos

como a auroxantina. Já em tratamentos com Cobre o aumento da zeaxantina sugere que houve uma maior fotoinibição comparativamente aos tratamentos com Cobre+DIC.

O nosso estudo também permitiu caracterizar o desempenho da fotossíntese de *F. vesiculosus* sob condições de stress de metais pesados e DIC com base na resposta da fluorescência da clorofila *a*, o que ofereceu informações sobre os mecanismos ecofisiológicos que ocorrem em um período curto de tempo. Os metais pesados investigados nas experiências demonstraram algumas diferenças nos efeitos na actividade fotossintética em *F. vesiculosus*. A exposição ao cobre apresentou maiores efeitos na fotossíntese do que o cádmio, apresentando maior redução na eficiência fotoquímica do FSII (Fv/Fm), provavelmente, como resultado da diminuição dos centros de reacção, e na transferência da energia absorvida para o processo fotossintético. A partir dos resultados, é evidente que nos tratamentos com cádmio as algas apresentaram mecanismos mais eficientes para a utilização e captura de energia, quando comparadas com o cobre. Apesar das concentrações elevadas de cádmio induzirem a diminuição de ψ_0 , o transporte de electrões do FSII manteve a eficiência, como foi observado nos parâmetros TR, TR/ABS, ρE_0 e ρP_0 .

Além disso, a resposta da fotossíntese de *F. vesiculosus* foi limitada pelos níveis de DIC na água. A adição de DIC em tratamentos com cádmio resultou em uma diminuição de Fv/Fm, enquanto que o resultado contrário foi observado em tratamentos com cobre. O transporte de electrões diminuiu em água enriquecida com DIC, apesar do aumento de alguns parâmetros como Sm e N. Isso sugere o efeito directo dos outros parâmetros na fotossíntese. As alterações de Sm e N, nos tratamentos Cobre+DIC e Cádmio+DIC, podem reflectir uma aclimação do complexo antena em forma de compensar a menor capacidade de transferir os electrões após a Qa (ψ_0), o que contribuiu para um maior controle da transferência de energia em resposta ao stress por metais e DIC. Portanto, as concentrações de DIC na água pode ser um importante factor de controlo da actividade fotossintética nas macroalgas.

Para se explicar o comportamento fotossintético das macroalgas às altas concentrações de DIC, não só a fluorescência da clorofila *a* precisa ser estudada, como também o conteúdo de componentes, como anidrase carbônica e Rubisco, visto que estes podem influenciar significativamente a resposta das algas. Esses resultados representam uma contribuição para o melhor entendimento da resposta fotossintética de *F. vesiculosus*, importante em situações das alterações ambientais em curso actualmente.

Os resultados obtidos podem ser um indicativo de que existe um efeito fisiológico na fotossíntese quando combinados os dois factores de stress: metais+DIC. Contudo, informações e estudos adicionais são necessários a fim de esclarecer os padrões de

acumulação de metais pela interação com DIC, os processos de aclimação às elevadas concentrações de DIC, as concentrações de metabólitos secundários, e outras questões não satisfatoriamente respondidas no presente trabalho. Para além disso, é importante também ter em conta a possível presença de um mecanismo de acumulação dos metais nas células, quando em situações de excesso de DIC na água, o qual só poderá ser confirmado através da caracterização do comportamento das taxas vitais, dos mecanismos de ligação dos metais pesados e constituição bioquímica que regulam os processos quando sujeitos a mudanças dos factores bióticos e abióticos. É preciso ressaltar também que o conhecimento derivado a partir desse estudo, é relevante para investigações de monitorização, assim como para a utilização em políticas futuras de protecção ambiental.

7. Referências

- Andersen, T. & Andersen, F. Ø. 2006. Effects of CO₂ concentration on growth of filamentous algae and *Littorella uniflora* in a Danish softwater lake. *Aquatic Botany*, 84, 267–271.
- Andersson, S. & Kautsky, L. 1996. Copper effects on reproductive stages of Baltic Sea *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*, 125, 171–176.
- Ash, C. & Stone, R., 2003. A question of dose. *Science*, 300, 925.
- Atal, N., Saradhl, P. P. & Mohanty, P. 1991. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant and Cell Physiology*, 32, (7) 943-51.
- Atkins, C. A., Patterson, B. D. & Graham, D. 1972. Plant carbonic anhydrases. 11. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218- 223.
- Axelsson, L. & Uusitalo, J. 1988. Carbon acquisition strategies for marinemacroalgae. I. Utilization of proton exchanges visualized during photosynthesis in a closed system. *Marine Biology*, 97, 295–300.
- Axelsson, L., Ryberg, H. & Beer, S. 1995. Two modes of bicarbonate utilization in the marine green macroalga *Ulva lactuca*. *Plant, Cell and Environment*. 18, 439–445.
- Axelsson, L., Mercado, J. & Figueroa, F. 2000. Utilization of HCO₃⁻ at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. *European Journal of Phycology*, 35, 53–59.
- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biolog.*, 59, 89–113.
- Baker, A. J. M. & Walker, P. L. 1990. *Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants*. IN Shaw, A. J. (Ed.) Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press.
- Barón, M., Arellano, J. B. & Gorge, J. L. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiologia Plantarum*, 94, 174–80.
- Barreiro, R., Picado, L. & Real, C. 2002. Biomonitoring heavy metals in estuaries: a field comparison of two brown algae species inhabiting upper esturine reaches. *Environmental Monitoring and Assessment*, 75, 121–134.
- Beer, S., Israel, A., Drechsler, Z. & Cohen, Y., 1990. Photosynthesis in *Ulva fasciata* V. Evidence for an inorganic carbon concentrating system, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase CO₂ kinetics. *Plant Physiology*, 94, 1542-1546.
- Bjoerkman, O. & Demmig, B. 1987. Proton yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489–504.
- Brown, M. T. & Newman, J. E. 2003. Physiological responses of *Gracilariopsis longissima* (S. G. Gmelin) Steentoft, L. M. Irvine and Farnham (Rhodophyceae) to sub-lethal copper concentrations. *Aquatic Toxicology*, 64, 201–213.

- Bryan, G. W. 1969. The absorption of zinc and other metals by the brown seaweed *Laminaria digitata*. *Journal of Marine Biology*, 49, 225-243.
- Caçador I., C., Vale & E. Catarino. 1993. Effects of plants on the accumulation of Zn, Pb, Cu and Cd in sediments of the Tagus estuary salt marshes, Portugal. In: J.-R. Vetoer (ed.), *Environmental Contamination*, 355-364.
- Caçador, I. 1994. *Acumulação e retenção de metais pesados nos sapais do Estuário do Tejo*. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Lisboa, 142 p.
- Caçador, I., Vale, C. & Catarino, F. 1996a. Accumulation of Zn, Pb, Cu, Cr and Ni in Sediments Between Roots of the Tagus Estuary Salt Marshes, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42, 393-403.
- Caçador, I., Vale, C. & Catarino, F. 1996b. The influence of plants on concentration and fractionation of Zn, Pb, and Cu in salt marsh sediments (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5, 193-198.
- Caçador, I., Caetano, M., Duarte, B. & Vale, C. 2009. Stock and losses of trace metals from salt marsh plants. *Marine Environmental Research*, 67, 75-82.
- Callahan, M. A., et al. 1979. *Water related environmental face of 129 priority pollutants*. National Technical Information Service, Springfield, Virginia, vol.I.
- Charrier, B., Coelho, S.M, Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A. F & Cock, J. M. 2008. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: Two centuries of research. *New Phytologist*, 177, 319–332.
- Chugh, L. K. & Sawhney, S. K. 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiology et Biochemistry*, 37(4), 297–303.
- Clijsters, H. & Van Assche, F. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7, 31-40.
- Cobbet, C. S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123, 825- 832.
- Coelho, S., Rjistenbil, J. W. & Brown, M. T. 2000. Impacts of anthropogenic stresses on the early development stages of seaweeds. *Journal of Aquatic Ecosystem Stresses and Recovery*, 7, 317- 333.
- Coelho, J.P., Pereira, M.E., Duarte, A. & Pardal, M.A. 2005. Macroalgae response to a mercury contamination gradient in a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, 492- 500.
- Collen, J. & Davison, I.R. 1999. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 35, 62–69.
- Conti, M. E. & Cecchetti, G. 2003. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, 93, 99-112.

- Craigie, J.S., Morris, E.R., Rees, D.A. & Thom, D. 1984. Alginate block structure in Phaeophyceae from Nova Scotia: variation with species, environment and tissue type. *Carbohydrate Polymers*, 4, 237 - 252.
- Di Cagno, R., Guidi, L., Stefani, A. & Soldatini, G. F. 1999. Effects of cadmium on growth of *Helianthiis annuiis* seedlings: physiological aspects. *New Phytologist*, 144, 65-71.
- Dixon, P.S. & Irvine, L.M. 1977. Seaweeds of the British Isles. Volume 1 Rhodophyta
- Drechsler, Z., Sharkia, R., Cabantchik, Z.I. & Beer, S. 1994. The relationship of arginine groups to photosynthetic HCO_3^- uptake in *Ulva* sp. mediated by a putative anion exchanger. *Planta*, 194, 250–255.
- Dring, M. J. 1992. *The biology of marine plants*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 48-66 p.
- Duarte, B., Almeida, P. R. & Caçador, I. 2009. *Spartina maritima* (cordgrass) rhizosediment extracellular enzymatic activity and its role in organic matter decomposition processes and metal speciation. *Marine Ecology*, 30, 65-73.
- Duarte, B., Caetano, M., Almeida, P. R., Vale, C. & Caçador, I. 2010. Accumulation and biological cycling of heavy metal in four salt marsh species, from Tagus estuary (Portugal). *Environmental Pollution*, 158, 1661-1668.
- Durrant, J. R. et al. 1990. Characterisation of tripler states in isolated photosystem II reaction centers: oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1017, (1) 167-175.
- Ekelund, N. G. A., Nygård, C. A., Nordström, R. & Gylle, A. M. 2008. In situ study of relative electron transport rates in the marine macroalga *Fucus vesiculosus* in the Baltic Sea at different depths and times of year. *Journal of Applied Phycology*, 20, 751–756.
- El-Sheekh, M. M. 1993. Inhibition of photosystem II in the green alga *Scenedesmus obliquus* by nickel. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 188, 363-72.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 2007. *Aquatic Photosynthesis*, 2nd ed., Princeton University Press, Princeton, NJ, 484 p.
- Farías, S., Arisnabarretab, S. P., Vodopivec, C. & Smichowski P. 2002. Levels of essential and potentially toxic trace metals in Antarctic macro algae. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57, 2133–2140.
- Fernandes, J. C. & Henriques, F. S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57, (3) 246–273.
- Figueira, M. M., Volesky, B., Ciminelli, V. S. T. & Roddick, A. 2000. Biosorption of metals in brown seaweed biomass. *Water Research*, 34, (1) 196–204.
- Flindt, M.R., Pardal, M.A., Lillebø, A.I., Martins, I. & Marques, J.C. 1999. Nutrient cycling and plant dynamics in estuaries: a brief review. *Acta Oecologica*, 20, 237-248.
- Force, L., Critchley, C., & Rensen, J. J. S. V. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. *Photosynthesis Research*, 78, 17–33.

- Franklin, L.A. & Forster, R.M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *European Journal of Phycology*, 32, 207–232.
- Franklin, L. A., Seaton, G. G. R., Lovelock, C. E. & Larkum, A. W. D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis on a tropical reef. *Plant, Cell and Environment*, 19, 825–836.
- Fuge, R. & James, K. H. 1973. Trace metal concentrations in brown seaweeds in Cardigan Bay, Wales. *Marine Chemistry*, 1, 281–293.
- Gao, K., Aruga, Y., Asada, K., Ishihara, T., Akano, T. & Kiyohara, M. 1991. Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda in high CO₂ concentrations. *Journal of Applied Phycology*, 3, 355–362.
- Gao, K., Aruga, Y., Asada, K. & Kiyohara, M., 1993. Influence of enhanced CO₂ on growth and photosynthesis of the red algae *Gracilaria* sp. and *G. chilensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5, 563–571.
- García-Sánchez, M. J., Fernández, J. A. & Niell, F. X. 1994. Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta*, 194, 55–61.
- Gattuso, J., Gao, K., Lee, K., Rost, B. & Schulz, K. G. 2010. Part 1: Seawater carbonate chemistry. Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry. In U. Riebesell, V. J. Fabry, L. Hansson, & J.-P. Gattuso (Eds.), *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting* (Luxembourg., 41–52 p.).
- Gilmore, A. M. & Yamamoto, H. Y. 1992. Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1899–1903.
- Gilmore, A. M., Shinkarev, V. P., Hazlett, T. L. & Govindjee. 1998. Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids. *Biochemistry*, 37, 13582–13593.
- Giordano, M., Beardall, J. & Raven, J. A. 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 99–131.
- Giusti, L. 2001. Heavy metal contamination of brown seaweed and sediments from the UK coastline between the Wear river and the Tees river. *Environment International*, 26, 275–286.
- Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S. J. & Brown, M. T. 1997. The toxicity of copper (II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. *Journal of Phycology*, 33, 2–11.
- Gledhill, M., Nimmo, M., Hill, S.J. & Brown, M.T. 1999. The release of copper-complexing ligands by the brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) in response to increasing total copper levels. *Journal of Phycology*, 35, 501 - 509.
- Gordillo, F. J. L., Niell, F. X., & Figueroa, F. L. 2001. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta*, 213, 64–70.
- Govindjee, Amesz, J. & Fork, D.C. (Eds.). 1986. *Light emission by plants and bacteria*. Academic Press, Orlando.

- Granbom, M. & Pedersén, M. 1999. Carbon acquisition strategies of the red alga *Eucheuma denticulatum*. *Hydrobiologia*, 398/399, 349–354.
- Greene, B. & Darnall, D. W. 1990. *Microbial oxygenic photoautotrophs cyanobacteria and algae for metal-ion binding*. In: Ehrlich HL, Brierley CL, editors. Microbial mineral recovery, Mc-Graw, New York, 277- 302
- Gross, R. E., Pugno, P. & Dngger, W. M. 1970. Observations on the mechanism of copper damage in *Chlorella*. *Plant Physiology*, 46, 183-5.
- Grotz, N. & Guerinot, M. L. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, (7) 595–608
- Guiry, M.D & Guiry, G. M. 2012. AlgaeBase world-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. www.algaebase.org
- Gupta, B. & S. Mukherji. 1977. Effects of toxic concentrations of copper on growth and metabolism of rice seedlings. *Z. Pflanzenphysiol*, 82, 95-106.
- Gutknecht, J. 1963. Zinc 65 uptake by benthic marine algae. *Limnology and Oceanography*, 8, 31±38.
- Gylle, A. M. 2011. *Physiological adaptations in two ecotypes of Fucus vesiculosus and in Fucus radicans with focus on salinity*. Thesis. Mid Sweden University.
- Haglund, K., Ramazanov, Z., Mtolera, M. & Pederson, M. 1992. Role of external carbonic anhydrase in light-dependent alkalization by *Fucus serratus* L., and *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Phaeophyta). *Planta*, 188, 1–6.
- Hanelt, D., Wiencke, C. & Bischof, K. 2003. *Photosynthesis in Marine Macroalgae, Photosynthesis in Algae.* Larkum W.A., Douglas E., Raven J.A (eds): 413-435. Kluwer Academic Publisher.
- Haug, A., Melson, S. & Omang, S. 1974. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Environental Pollution*, 7, 179-92.
- Havaux, M., Ernez, M. & Lannoye, R. 1988. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *Journal of Plant Physiology*, 133, 555–560.
- Heber, U., Bukhov, N.G., Shuvalov, V.A., Kobayashi, Y. & Lange, O.L. 2001. Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1999-2006.
- Hess, F. D. & Weller, S. C. 2000. *Mode of action in photosystem II: photosynthesis inhibitors (triazines, ureas, substituted phenols)*. In: Herbicide Action Course. West Lafayette: Purdue University, 168- 186 p.
- Himelblau, E. & Amasino, R. M. 2000. Delivering copper within plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3) 205–210

- Hu, S., Tang, C. H., & Wu, M. 1996. Cadmium accumulation by several seaweeds. *The Science of the Total Environment*, 187, 65–71.
- Huppertz, K., Hanelt, D. & Nultsch, W. 1990. Photoinhibition of photosynthesis in the marine brown alga *Fucus serratus* as studied in field experiments. *Marine Ecology Progress Series*, 66, 175–182.
- IPCC. 2007. Synthesis Report. *Contribution of Working Groups of the Fourth Assessment Report of the Inter governmental Panel on Climate Change*, WMD and UNEP, 397 p.
- Israel, A. & Hophy, M. 2002. Growth, photosynthetic properties and Rubisco activities and amounts of marine macroalgae grown under current and elevated seawater CO₂ concentrations. *Global Change Biology*, 8, 831–840.
- Iwasaki, I., Kurano, N. & Miyachi, S. 1996. Effects of high-CO₂ stress on photosystem II in a green alga, *Chlorococcum littorale*, which has a tolerance to high CO₂. *Journal of Photochemistry and Phoyobiology B: Biology*, 36, 327–332.
- Iwasaki, I., Hu, Q., Kurano, N. & Miyachi, S. 1998. Effect of extremely high-CO₂ stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO₂' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *Journal of Photochemistry and Phoyobiology B: Biology*, 44, 184–190.
- Janik, E., Grudzinski, W., Gruszecki, W. I. & Krupa, Z. 2008. The xanthophyll cycle pigments in *Secale cereale* leaves under combined Cd and high light stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 90, 47–52.
- Jegerschöld, C., Arellano, J. B., Schröder, W. P., van Kan, P. J. M., Barón, M. & Styring, S. 1995. Copper (II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 34, 12747–54.
- Johnston, A. M. & Raven, J. A. 1986. The utilization of bicarbonate ions by the macroalga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis. *Plant, Cell and Environment*, 9, 175-184.
- Johnston, A. M. & Raven, J. A. 1990. Effects of culture in high CO₂ on the photosynthetic physiology of *Fucus serratus*. *British Phycological Journal*, 25, 75–82.
- Kaladharan, P., Veena, S. & Vivekanandan, E. 2009. Carbon sequestration by a few marine algae: observation and projection. *Journal of Marine Biological Association of India*, 51, (1) 107–110.
- Kalaji, H. M., Bosa, K., Ko, J. & Zuk-gołaszewska, K. 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 64–72.
- Kalaji, H. M. & Lobota, T. 2007. Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant, Soil and Environment*, 53, 511 -516.
- Karukstis, K. K. 1991. *Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus*. In: Scheer H (ed) *Chlorophylls*, 770–797p. CRC Press, Boca Raton/Ann Ar-bor/Boston/London

Kawamitsu, Y. & Boyer, J. S. 1999. Photosynthesis and carbon storage between tides in a brown alga, *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*, 133, 361–369.

Kowalewska, G. & Hoffmann, S. K. 1989. Identification of the copper porphyrin complex formed in cultures of blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 11, 39-50.

Krause, G.H. & Jahns, P. 2003. *Pulse amplitude modulated fluorometry and its application in plant science*. In Light Harvesting Antennas in Photosynthesis, eds., Green B.R. and Parson W. (Series: Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 13. Series ed., Govindjee), 373-399, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Krupa, Z. 1988. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 73, 518–524.

Krupa, Z., Öquist, G. & Huner, N. P. A. 1993. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88, 626–630

Küpper, H. & Küpper, F. C. 2006. [Heavy metal]-Chlorophylls formed in vivo during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material. In B. Grimm, R. J. Porra, W. Rudiger, & H. Scheer (Eds.), (Springer., 67–77 p.). Netherlands.

Küpper, H., Küpper, F. & Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47, (295) 259–266.

Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F. C. & Prasil, O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology*, 38, (3) 429–441

Küpper, H., Seibert, S. & Aravind, P. 2007. A fast, sensitive and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss-Peak-Spectra. *Analytical Chemistry*, 79, 7611-7627.

Latowski, D., Kruk J. & Strzałka K. 2005. Inhibition of zeaxanthin epoxidase activity by cadmium ions in higher plants, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 2081–2087.

Leal, M. C. F., Vasconcelos, M. T., Sousa-pintot, I. & Cabral, O. P. S. 1997. Biomonitoring with Benthic Macroalgae and Direct Assay of Heavy Metals in Seawater of the Oporto Coast (Northwest Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 34 (12) 1006-1015.

Lee, S. J. 2009. *Physiological and biochemical responses to cadmium exposure in Fucus serratus (Phaeophyceae)*. Thesis. School of Biological Sciences. Faculty of Sciences. University of Plymouth. 263 p.

Lee, K. C. 1976. Cunningham, B. A., Paulsen, G. M., Liang, G. H. & Moore, R. B. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiologia Plantarum*, 36, 4–6.

- Levavasseur, G., Edwards, E., Osmond C. & Ramus, J. 1991. Inorganic carbon limitation of photosynthesis in *Ulva rotundata* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 27, 667-672
- Levine, H.G. 1984. *The use of seaweeds for monitoring coastal waters*. In: Schubert, L.E. (Ed.), *Algae as Ecological Indicators*. Academic Press, London.
- Linger, P., Ostwald, A. & Haensler, J. 2005. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum*, 49, (4) 567–576.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, New York.
- Lüning, K. 1990. *Seaweeds: their environment, biogeography, and ecophysiology*. John Wiley & Sons, New York, 527 p.
- Macfarlane, G. R. & Burchett, M. D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 233-240.
- Macinnis-Ng, C. M. O. & Ralph, P. J. 2002. Towards a more ecologically relevant assessment of the impact of heavy metals on the photosynthesis of the seagrass, *Zostera capricorni*. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 100- 106.
- Maksymiec, W. & Baszyński, T. 1988. The effect of Cd²⁺ on the release of proteins from thylakoid membranes of tomato leaves. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 57, 465 – 474.
- Malavenda, S. V. & Voskoboinikov, G. M. 2009. Influence of abiotic factors on the structure of the population of the brown alga *Fucus vesiculosus* in east Murman (Barents Sea). *Algology*, 35(2), 132–137.
- Mallick, N. & Mohn, F. H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 64–69.
- Markham, J. W., Kremer, B. P. & Sperling, K. R. 1980. Effects of cadmium on *Laminaria saccharina* in culture. *Marine Ecology Progress Series*, 3, 31-39.
- Mata, Y. N., Blázquez, M. L., Ballester, A., González, F. & Mu, J. A. 2009. Biosorption of cadmium, lead and copper with calcium alginate xerogels and immobilized *Fucus vesiculosus*. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 555–562.
- Maxwell, K. & Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659–668.
- Mercado, J. M., Figueroa, F. L., Niell, F. X. & Axelsson, L. 1997. A new method for estimating external carbonic anhydrase activity in macroalgae. *Journal of Phycology*, 33, 999-1006.
- Mercado, J. M., Gordillo, F. J. L., Figueroa, F. L. & Niell, F. X. 1998. External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221, 209–220.

- Mercado, M., Javier, F., Gordillo, L., Niell, F. X. & Figueroa, L. 1999. Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*. *Journal of Applied Phycology*, 11, 455–461.
- Mouget, J. & Tremblin, G. 2002. Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS , Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Botany*, 74, 219–231.
- Müller, P., Li, X.-P. & Niyogi, K. K. 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy¹. *Update on Photosynthesis*, 125, 1558–1566.
- Munda, I. M. & V. Hudnik. 1986. Growth response of *Fucus vesiculosus* to heavy metals, singly and in dual combinations, as related to accumulation. *Botanica Marina*, 29, 401-412.
- Myklestad, S. & Eide, I. 1978. Exchange of heavy metals in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. in situ by means of transplanting experiments. *Environmental Pollution*, 16, 277 - 284.
- Nielsen, H. D. & Nielsen, S. L. 2005. Photosynthetic responses to Cu²⁺ exposure are independent of light acclimation and uncoupled from growth inhibition in *Fucus serratus* (Phaeophyceae). *Marine Pollution Bulletin*, 51, 715–721.
- Nielsen, H. D., Brownlee, C., Coelho, S. M. & Brown, M. T. 2003. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist*, 160, 157–165.
- Nygård, C.A. 2005. *Ecophysiological responses of Baltic and Atlantic Fucus vesiculosus to environmental factors*. Thesis, Mid Sweden University.
- Nygård, C. A. & Dring, M. J. 2008. Influence of salinity, temperature, dissolved inorganic carbon and nutrient concentration on the photosynthesis and growth of *Fucus vesiculosus* from the Baltic and Irish Seas Influence of salinity, temperature, dissolved inorganic carbon and nutrient. *European Journal of Phycology*, 43 (3), 253–262.
- Nygård, C. & Ekelund, N. G. A. 1999. Effects of lead on photosynthesis and respiration of the bladder wrack *Fucus vesiculosus* in relation to different salinities. *Water, Air and Soil Pollution*, 116, 549–65.
- Nygård, C A & Ekelund, N. G. A. 2006. Photosynthesis and UV-B tolerance of the marine alga *Fucus vesiculosus* at different sea water salinities. *Journal of Applied Phycology*, 18, 461–467.
- Ono, T. & Inoue, Y. 1989. Removal of Ca by pH 3.0 treatment inhibits S2 to S3 transition in photosynthetic oxygen evolution system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 973, 443- 449.
- Ort, D. 2001. When there is too much light. *Plant Physiology*, 125, 29–32.
- Ouzounidou, G. 1993. Changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment dose response relations in *Silene* and *Thlaspi*. *Photosynthetica*, 29, 455-462.
- Overnell, J. 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Marine Biology*, 38, 335–342.
- Palacios, S. L. & Zimmerman, R. C. 2007. Response of eelgrass *Zostera marina* to CO₂ enrichment: possible impacts of climate change and potential for remediation of coastal habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 344, 1–13.

- Papageorgiou, G.C. & Govindjee (Eds.). 2004. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol. 19 (Series Editor: Govindjee), Springer, Dordrecht (reimpresso 2010).
- Patra, M. & Sharma, A. 2000. Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review*, 66, 379–422.
- Pätsikkä E., Aro, E-M. & Tyystjärvi, E. 2001. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in tylakoid membranes. *Physiology of Plants*, 113, 142-150.
- Pawlik-Skowronska B., Pirszel, J. & Brown, M. T. 2007. Concentrations of phytochelatin and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat. *Aquatic Toxicology*, 83, (3) 190–199.
- Pedersen, A. 1984. Studies on phenol content and heavy metal uptake in fucoids. *Hydrobiologia*, 116/117, 498–504.
- Pereira, P., Caçador, I., Vale, C., Caetano, M. & Luísa, A. 2007. Decomposition of belowground litter and metal dynamics in salt marshes (Tagus Estuary, Portugal). *Science of the Total Environment*, 380, 93 - 101.
- Phillips, D. J. H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review. *Environmental Pollution*, 13, 281–317.
- Prasad, M.N.V. & Strzalka, K. 1999. *Impact of heavy metals on photosynthesis*. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, Berlin, 117–138.
- Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M. & Strzalka, K. 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science*, 881– 889.
- Puckett, K. J. 1976. The effects of heavy metals on some aspects of lichen physiology. *Canadian Journal of Botany*, 54, 695-703.
- Rainbow, P. S. 1997. Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry? *Journal of the Marine Biological Association*.UK, 195- 210.
- Rainbow, P.S. 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australian Journal of Ecotoxicology*, 12, 107-122.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 26, 593–601.
- Ralph, P. J. & Burchett, M. D. 1998. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 103, 91 -101.
- Ramus, J., Lemons, F. & Zimmerman, C. 1977. Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*, 42, 293–303.
- Radmer, R. & Kok, B. 1974. Kinetic observation of the system II electron receptor pool isolated by mercuric ion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 357, 177- 180.

- Raven, J. A. 1991. Physiology of inorganic C acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: relation to increased CO₂ and temperature. *Plant, Cell and Environment*, 14, 779–794.
- Reboreda, R. & Caçador, I. 2007. Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environmental Pollution*, 146, 147-154.
- Rice, D.L. & Lapointe, B.F. 1981. Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. II. Trace metal chemistry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54, 1 - 11.
- Riget, F., Johansen, P. & Asmund, G., 1995. Natural seasonal variation of cadmium, lead and zinc in brown seaweed (*Fucus vesiculosus*). *Marine Pollution Bulletin*, 30, 409-413.
- Rivers, J. & Peckol, P. 1995. Summer decline of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in a eutrophic embayment: interactive effects of temperature and nitrogen availability? *Journal of Phycology*, 31, 223–228.
- Rijstenbil, J. W., Derksen, J. W. M., Gerringa, L. J. A., Poortvliet, T. C. W., Sandee, A., Van den Berg, M., Van Drie, J. & Wijholds, J. A. 1994. Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Marine Biology*, 119, 583-590.
- Romanowska-Duda, B., Kalaji, M. H. & Strasser, R. J. 2005. *The use of PSII activity of Spirodela oligorrhiza plants as an indicator for water toxicity*. IN Van Der Est A., B. (Ed.) Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives. Lawrence, Allen Press.
- Romeo, M. & Gnassia-Barelli, M. 1993. *Organic ligands and their role in complexation and transfer of trace metals (micronutrients) in marine algae*. In: Rijstenbil, J.W., Haritonidis, S. (Eds.), Macroalgae, Eutrophication and Trace Metal Cycling in Estuaries and Lagoons: Proceedings of the Coast-48 Symposium of Sub Group III, Thessaloniki, 121- 135 p.
- Rönnbäck P, Kautsky N, Pihl L, Troell M, Söderqvist T. & Wennhage H. 2007. Ecosystem goods and services from Swedish coastal habitats: identification, valuation, and implications of ecosystem shifts. *Ambio* 36, 534–544.
- Samuelsson, G. & Oquist, G. 1980. Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacia oleracea*. *Plant and Cell Physiology*, 21, (3) 445-54.
- Sandmann, G. & Böger, P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiology*, 66, 797–800
- Sand-Jensen, K. & Gordon, D. M. 1984. Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO₃ and CO₂. *Marine Biology*, 80, 247-253.
- Saraswathi, S.J., Babu, B. & Rengasamy, R. 2003. Seasonal studies on the alginate and its biochemical composition I: *Sargassum polycystum* (Fucales, Phaeophyceae). *Phycological Research*, 51, 240- 243.
- Schramm, W., 1993. *Investigations on the influence of organic substances produced by seaweeds on the toxicity of copper*. In: Rijstenbil, J.W., Haritonidis, S. (Eds), Macroalgae, Eutrophication and Trace Metal Cycling in Estuaries and Lagoons: Proceedings of the Coast-48 Symposium of Sub Group III, Thessaloniki, 106 – 120 p.

- Schreiber, U. & Neubauer, C. 1990. O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanisms of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*, 25, 279-293.
- Semesi, I. S., Kangwe, J. & Bjork, M. 2009. Alterations in seawater pH and CO₂ affect calcification and photosynthesis in the tropical coralline alga, *Hydrolithon* sp. (Rhodophyta). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84, 337–341.
- Sfezer, P., Geldon, J., Ali, A., Paez Osuna, F., Ruiz-Fernandes, A.C. & Guerrero Galvan, S.R. 1998. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthic organisms from Mazatlan Harbour, mangrove lagoon of the northwest coast of Mexico. *Environment International*, 24, 359–74.
- Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH), Instituto Nacional da Água (INAG, I.P.)
- Smith, K. L., Hann, A. C. & Harwood, J. L. 1986. The subcellular localisation of absorbed copper in *Fucus*. *Physiologia Plantarum*, 66, (4) 692–698
- Snoeijs, P., Klenell, M., Choo, K. S., Comhaire, I., Ray, S. & Pedersen, M. 2002. Strategies for carbon acquisition in the red marine macroalgae *Coccolithus truncatus* from the Baltic Sea. *Marine Biology*, 140, 435–44.
- Sousa-Dias, A. & Melo, R. A. 2008. Long-term abundance patterns of macroalgae in relation to environmental variables in the Tagus Estuary (Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76, 21-28.
- Sprague, J. B. 1986, *Toxicity and tissue concentrations of lead, zinc, and cadmium for marine bivalve molluscs and crustaceans*. Report prepared for the International Lead Zinc Research Organization, Inc., North Carolina, USA, 215 p.
- Steemann Nielsen, E. & Wium-Andersen, S. 1970. Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Marine Biology*, 6, 93- 97.
- Stengel, D. B., Mcgrath, H. & Morrison, L. J. 2005. Tissue Cu, Fe and Mn concentrations in different-aged and different functional thallus regions of three brown algae from western Ireland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, 687–696.
- Strasser, B. J. & Strasser, R. J., 1995. *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test*. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: from light to biosphere*. Kluwer Academic, Dordrecht, 977–980.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. & Tsimilli-Michael, M. 2000. *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples*, in: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, Taylor and Francis, London, UK, 443–480 p.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. & Srivastava, A. 2004. *Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient*. IN Govindjee (Ed.) *Chlorophyll a Fluorescence*. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Struck, B. D., Pelzer, R., Ostapczuk, P., Emons, H. & Mohl, C., 1997. Statistical evaluation of ecosystem properties influencing the uptake of As , Cd , Co , Cu , Hg , Mn , Ni , Pb and Zn in

- seaweed (*Fucus vesiculosus*) and common mussel (*Mytilus edulis*). *The Science of the Total Environment*, 207, 29–42.
- Stumm, W. & Morgan, J.J. 1981. *Aquatic Chemistry; an Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. Wiley, New York, 780 p.
- Surif, M. B. & Raven, J. A. 1989. Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia*, 78, 97–105.
- Svahn, C., Gylle, A. M. & Ekelund, N. G. A. 2012. Photosynthetic activity in marine and brackish water strains of *Fucus vesiculosus* and *Fucus radicans* (Phaeophyceae) at different light qualities. *Photochemistry and Photobiology*.
- Taiz, L. & Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, MA, USA. 702 p.
- Takahashi, T., Feely, R.A., Weiss, R.F., Wanninkhof, R.H., Chipman, D.W., Sutherland, S.C. & Timothy, T.T. 1997. Global air–sea flux of CO₂ difference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 8292–8299.
- Topcuoğlu, S., Güven, K.C., Balkıs, N. & Kirbaşoğlu, C. 2003. Heavy metal monitoring of marine algae from the Turkish Coast of the Black Sea, 1998–2000. *Chemosphere*, 52, 1683–1688.
- Vale, C., Catarino, F., Cortesao, C. & Caçador, M. 1990. Presence of metal-rich rhizoconcretions on the roots of *Spartina maritima* from the salt marshes of the Tagus Estuary, Portugal. *Science of the Total Environment*, 97–98.
- Válega, M., Lillebo, A., Pereira, M., Caçador, I., Duarte, A. & Pardal, M. 2008. Mercury mobility in a salt marsh colonized by *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 72, 1607–1613.
- Vasconcelos, M. T. S. D. & Leal, M. F. C. 2001. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry*, 74, 65–85.
- Vershinin, A. O. & Kamnev, A. N. 1996. Xanthophyll cycle in marine macroalgae. *Botanica Marina*, 39, 421–425.
- Villares R., Puentea, X. & Carballeira, A. 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environmental Pollution*, 119, 79–90.
- Vinagre, C., Cabral, H.N. & Caçador, I. 2008. Influence of halophytes and metal contamination on salt marsh macro-benthic communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76, 715–722.
- Voskoboinikov, G. M., Makarov, M. V. & Ryzhik, I. V. 2006. Changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular structure of the brown algae *Fucus vesiculosus* L. and *F. serratus* L. from the Barents Sea during a prolonged period of darkness. *Algology*, 32 (1), 20–27.

- Watanabe, T. & Kobayashi, M. 1988. Chlorophylls as functional molecules in photosynthesis. Molecular composition in vivo and physical chemistry in vitro. *Special Articles on Coordination Chemistry of Biologically Important Substances*, 4, 383–395.
- Watanabe, T., Machida, K., Suzuki, H., Kobayashi, M. & Honda, K. 1985. Photoelectrochemistry of metallochlorophylls. *Coordination Chemistry Reviews*, 64, 207–224.
- Wu, J. T. & Lorenzen, H. 1984. Effect of copper on photosynthesis in synchronous *Chlorella* cells. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 25, 125–32.
- Xia, J. R., Li, Y. J., Lu, J. & Chen, B. 2004. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 979–986.
- Young, A. J. & Frank, H. A. 1996. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, 3–15.
- Yruela, I., Montoya, G., Alonso, P. J. & Picorel, R. 1991. Identification of the pheophytin-QA-Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22847–22850.
- Yruela, I., Montoya, G. & Picorel, R. 1992. The inhibitory mechanism of Cu(II) on the photosystem II electron transport from higher plants. *Photosynthesis Research*, 33, 227–233.
- Yruela, I., Alfonso, M., de Zarate, I. O., Montoya, G. & Picorel, R. 1993. Precise location of the Cu(II)-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorbance changes. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1684–1689.
- Yruela, I., Gatzen, G., Picorel, R. & Holzwarth, A. R. 1996. Cu(II)-inhibitory effect on photosystem II from higher plants. A picosecond time-resolved fluorescence study. *Biochemistry*, 35, 9469–9474.
- Zou, D. 2005. Effects of elevated atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). *Aquaculture*, 250, 726–735.
- Zou, D.H. & Gao, K.S. 2001. Effects of elevated CO₂ concentration on the photosynthesis and related physiological processes in marine macroalgae. *Acta Ecologica Sinica*. 22, 1750–1757 (em Chinês com Resumo em Inglês).
- Zou, D.H., Gao, K.S. & Xia, J.R. 2003. Photosynthetic utilization of inorganic carbon in the economic brown alga, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae) from the South China Sea. *Journal of Phycology*, 36, 1095–1100.

8. Anexo

Componentes	Concentração para um litro
NaNO ₃	56,00 mg
Na ₂ -glicerofosfato. 5H ₂ O	8,00 mg
H ₃ BO ₃	4,48 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,19 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	0,48 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	88,00 ug
CoSO ₄ .7H ₂ O	19,00 ug
FeCl ₃	2,64 mg
+ Fe(NH ₄) ₂ .6H ₂ O	2,80 mg
Tiamina. HCl	80,00 ug
Biotina	0,80 ug
Cianocobalamina	1,60 ug