

**Avaliação dos Teores de Lipídios e Proteínas e do Perfil Químico sob Diferentes Condições de Cultivo da Macroalga *Styopodium zonale* Papenfuss (Dictyotales, Phaeophyta)**

**SHALLINE HERMES SAMPAIO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO – 2011**

**Avaliação dos Teores de Lipídios e Proteínas e do Perfil  
Químico sob Diferentes Condições de Cultivo da Macroalga  
*Styopodium zonale* Papenfuss (Dictyotales, Phaeophyta)**

**SHALLINE HERMES SAMPAIO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira

Co-Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Angélica Ribeiro Soares

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO – 2011

**Avaliação dos Teores de Lipídios e Proteínas e do Perfil Químico sob Diferentes Condições de Cultivo da Macroalga *Styopodium zonale* Papenfuss (Dictyotales, Phaeophyta)**

**SHALLINE HERMES SAMPAIO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira  
Co-Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Angélica Ribeiro Soares

Aprovada em 13 de Maio de 2011

Comissão examinadora:

---

Profa. Alessandra Leda Valverde (D.S., Química de Produtos Naturais) UFF

---

Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF

---

Profa. Sílvia Menezes de Faria Pereira (D.S., Engenharia e Ciência dos Materiais) UENF

---

Profa. Angélica Ribeiro Soares (Co-Orientadora) (D.S., Química Orgânica) UFRJ

---

Profa. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF

“Não há nada como o sonho  
para criar o futuro.”

Leonardo da Vinci

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza, por guiar-me no caminho da luz, alimentando-me com força e coragem durante o percurso de aprendizado;

Agradeço a UENF, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho;

Aos professores Alessandra Leda Valverde, Rodrigo Rodrigues de Oliveira e Silvia Menezes de Faria Pereira por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Agradeço a Camila de Oliveira Mansur pelas análises realizadas no RMN, nos laboratórios do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN) e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Dept. de Bioquímica - UFRJ);

Agradeço à Professora Daniela Barros de Oliveira, por ter acreditado em mim, aceitando me orientar. Por todo ensinamento científico, paciência e carinho;

Agradeço à Professora Angélica Ribeiro Soares, que me mostrou como o mar é misterioso, e como as algas são fascinantes e promissoras. Foi muito importante sua presença e aprendizado em todo o decorrer deste trabalho;

Agradeço ao Prof. Heitor Monteiro Duarte, pela paciência e carinho de me ensinar e acompanhar nos dados fotossintéticos das algas;

Aos meus pais Antônio Carlos e Sara Rosana, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo, acreditando, entendendo a minha ausência. Essa vitória é de vocês;

Aos meus irmãos Isaac, Felipe e Sarah por acreditarem e torcerem sempre por mim. Obrigado mesmo !

Ao meu esposo Ronald, por todo carinho e compreensão. Sua ajuda foi essencial para eu continuar, quando eu não acreditava mais. Seu apoio é muito importante, em todos os momentos da minha vida. Te amo !!!!!!!!

Aos meus amigos da UENF, Natália (não tenho nem palavras para agradecer, você sempre acreditou e me incentivou), Raphael (que faz parte do LTA), Fernanda, Clara, Danielle, Lorena, Larissa, Rodrigo e Glauber. Obrigada pelo incentivo e pelos momentos de descontração. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês;

Agradeço à Porfa. Michelle M. Muzitano e aos meus amigos da parte biológica, Isabela, Marlon e Tati. Obrigada pela paciência e amizade, vocês me ajudaram muito;

Agradeço aos amigos do LTA, Silvia, sempre incentivando, Andréia, Geraldo, João, Simone (minha salvação na análise estatística), Valdinéia, Aninha, Juliana, Vânea, vocês são muito especiais;

Às meninas do NUPEM, Fernanda (pela paciência, hospedagem), Nathália (sempre disponível), Lorena, Max, Lilian, Marcão, Renan pela paciência, aprendizado e todo ensinamento. Vocês acrescentaram muito em meu caminho científico. Obrigada por cada momento que dividimos, vocês estarão sempre no meu coração;

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xiv
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	xvi
<b>RESUMO.....</b>	xviii
<b>ABSTRACT.....</b>	xx
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	3
<b>3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	4
3.1 – As macroalgas e sua importância econômica.....	4
3.2 - Ordem Dictyotales.....	6
3.3 – A espécie <i>Styopodium zonale</i> (Lamouroux) Papenfuss .....	9
3.4– Avaliação nutricional em algas marinhas .....	10
3.5 – Formação dos Radicais Livres X Antioxidantes .....	13
3.6 - Defesas Químicas.....	15
3.6.1 – Terpenos .....	16
3.7 – Alguns Meroditerpenos isolados a partir da espécie <i>Styopodium zonale</i> (Dictyotaceae) .....	18
3.8 – Cultivo de macroalgas .....	22
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	24
4.1. – Coleta de material vegetal.....	24

4.2 – Preparo do material vegetal .....	25
4.3 – Metodologia geral .....	25
4.4 - Parte Experimental I: Composição química nutricional .....	25
4.1 – Determinação de lipídios .....	25
4.2 – Determinação de proteínas.....	26
4.5 - Parte Experimental II - Cultivo da macroalga <i>Styopodium</i> .....	27
4.5.1 – Preparo da água do mar .....	27
4.5.2 – Meio de nutrientes.....	27
4.5.3 – Determinação de biomassa .....	28
4.5.4 – O cultivo .....	29
4.5.4.1 – Análise estatística .....	30
4.6 - Parte Experimental III: Análise da variação do perfil químico antes e pós – cultivo .....	31
4.6.1 – Preparo dos extratos .....	31
4.6.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	31
4.7 - Experimental IV: Atividade Antioxidante do extrato bruto e frações .....	32
4.8 - Parte Experimental V: isolamento e identificação da substância majoritária .....	33
4.8.1 - Cromatografia em Camada Delgada do extrato bruto .....	33
4.8.2 - Fracionamento ácido – básico do extrato .....	34
4.8.3 - Purificação da fração orgânica por técnicas cromatográficas ...	35
4.8.4 - Identificação e caracterização da substância majoritária .....	36
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1 – Parte Experimental I: Composição química nutricional .....	38
5.2 - Parte Experimental II: Cultivo da macroalga <i>Styopodium zonale</i> .....	40
5.2.1 – Determinação da variação de biomassa .....	40
5.3 - Parte experimental III: Análise da variação do perfil químico antes e pós – cultivo .....	45

5.4 – Experimental IV: Atividade antioxidante do extrato bruto e frações ....	65
5.5 - Parte Experimental V: Isolamento e identificação da substância majoritária .....	67
5.5.1 - Perfil Químico da Fração Orgânica Ácida .....	67
5.5.2 - Fracionamento da fração orgânica ácida .....	68
5.5.3 - Substância isolada Majoritária .....	70
5.5.4 – Ultravioleta Visível.....	71
5.5.5 – Infravermelho.....	74
5.5.6 - Elucidação estrutural da substância majoritária .....	74
5.5.6.1 – Técnica monodimensional .....	74
5.5.6.1.1 - RMN <sup>1</sup> H .....	74
5.5.7 – Técnicas bidimensionais.....	77
5.5.7.1 – Cosy <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H.....	77
5.5.7.2 – HMQC.....	80
5.5.7.3 – HMBC.....	82
5.5.8 – Proposta estrutural.....	84
5.6 – Ultravioleta visível.....	82
5.7 – Infravermelho.....	83
<b>6 – RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
6.1 - Avaliação do teor de proteínas e lipídios totais.....	87
6.2 – Variação de biomassa.....	87
6.3 – Variação do perfil químico após cultivo.....	87
6.4 – Avaliação da atividade antioxidante.....	88
6.5 – Avaliação do perfil químico.....	88
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>8 – APÊNDICE</b>	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupo da ordem Dictyotales e seus respectivos marcadores taxonômicos .....	08
Figura 2 – Foto de um espécime de <i>Styopodium zonale</i> (Lamouroux) Papenfus .....	09
Figura 3 – Estruturas químicas dos ácidos graxos poli-insaturados .....	12
Figura 4 – Biossíntese dos terpenos .....	17
Figura 5 – Alguns meroditerpenos isolados de <i>S. zonale</i> .....	19
Figura 6 – Sistema Millipore de filtração.....	27
Figura 7 – Esquema do resumo da estratégia utilizada para o cultivo.....	30
Figura 8 – Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante.....	33
Figura 9 – Esquema ilustrativo do fracionamento acidobásico.....	35
Figura 10 – Esquema da purificação e identificação da fração orgânica ácida.....	37
Figura 11 – Gráfico de variação de biomassa das algas do cultivo.....	42
Figura 12 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo I (400 µL) antes do cultivo.....	46
Figura 13 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo I (400 µL) pós - cultivo.....	46
Figura 14 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	49

Figura 15 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	50
Figura 16 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	51
Figura 17 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo II (800 µL) antes do cultivo.....	53
Figura 18 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo II (800 µL) pós – cultivo.....	53
Figura 19 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	56
Figura 20 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	57
Figura 21 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do controle antes do cultivo.....	59
Figura 22 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do controle pós – cultivo.....	59
Figura 23 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	62
Figura 24 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.....	63
Figura 25 - Cromatograma da fração orgânica ácida com diclorometano realizado por CCD. Fase móvel: diclorometano : acetato de etila (60:40) e revelador químico sulfato cérico.	68
Figura 26 - Cromatograma da primeira coluna da fração orgânica ácida realizado por CCD, mostrando as manchas características nos quatro grupos, que foram reunidas formando o AS. Fase móvel: hexano: diclorometano (60:40) e revelado com sulfato cérico.	69
Figura 27 – Picos recolhidos da coluna preparativa do conjunto SHS.....	70
Figura 28 - Espectro de ultravioleta de SH28 (MeOH).....	71
Figura 29 - Espectro de infravermelho de SH28 (CHCl <sub>3</sub> , filme).....	73
Figura 30 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH28 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	76
Figura 31 - Ampliação da região do espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH28 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	77

Figura 32 - Espectro de RMN 2D- COSY para SH28 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	78
Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN 2D- COSY para SH28 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	79
Figura 34 - Espectro de RMN-2D HMQC para SH28 ampliado (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)..	81
Figura 35 - Espectro de RMN-2D HMBC para SH28 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	82
Figura 36 - Espectro de RMN-2D HMBC para SH28 ampliado (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)...	83
Figura 37 - Estrutura do ácido atomárico.....	85

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Distribuição dos grupos de algas e suas principais características .....	5
Tabela 2: Principais produtos de algas e principais países produtores .....	06
Tabela 3: Principais nutrientes de algas marinhas .....	10
Tabela 4: Alguns dos principais metabólitos e alguns exemplos de atividades biológicas investigadas .....	22
Tabela 5: Componentes utilizados no preparo do meio de Provasoli.....	28
Tabela 6: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE .....	32
Tabela 7: Teores de lipídios totais e proteínas a partir da alga <i>Styopodium zonale</i> em relação à porcentagem do peso fresco com média e desvio padrão .....	39
Tabela 8: Picos assinalados do grupo I antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	47
Tabela 9: Picos assinalados do grupo I pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	48
Tabela 10: Picos assinalados do grupo II antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	54
Tabela 11: Picos assinalados do grupo II pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	55
Tabela 12: Picos assinalados do controle antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	60

Tabela 13: Picos assinalados do controle pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa .....	61
Tabela 14: Atividade antioxidante do extrato, das frações (ácida e neutra) e dos padrões fenólico Quercetina, Rutina e BHT .....	66
Tabela 15: Valores de Rfs das manchas na CCD dos conjuntos .....	69
Tabela 16: Comparação dos sinais de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400,00 MHz) da amostra SH28 e os sinais do ácido atomárico observados na literatura.....	75
Tabela 17: Comparação dos sinais de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do ácido atomárico.....	84
Tabela 18 - Taxas de Variação de Biomassa em % Relativo aos Experimentos antes e depois.....	104

### LISTA DE ABREVIÇÕES

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ACN	Acetonitrila
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RL	Radicais Livres
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
d	dubleto
AA	Atividade Antioxidante
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
MeOH	Metanol
s	singleto
δ	Deslocamento químico
RF	Fatores de Referência
TR	Tempo de Retenção

A.R	Área relativa
$\lambda$	Comprimento de onda
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas
I.V	Infravermelho
U.V	Ultravioleta
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
DHA	Ácido Docosaheptaenóico

## RESUMO

SAMPAIO, S.H. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2011. Estudo da Influência do cultivo da Macroalga *Styopodium zonale* Papenfuss (Dictyotales, Phaeophyta) na Composição Química. Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.. Co-Orientadora: Angélica Ribeiro Soares, D.Sc.. Banca Avaliadora: Alessandra Leda Valverde, D.Sc.; Rodrigo Rodrigues de Oliveira, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, em parceria com o Núcleo de Desenvolvimento Socioambiental de Macaé (NUPEM), na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, RJ. O objetivo deste trabalho foi determinar qualitativamente o perfil químico antes e após o cultivo da espécie *Styopodium zonale* Papenfuss (Dictyotales, Phaeophyta), quantificar o teor de lipídios e proteínas totais, o que impulsionaria seu uso popular como um possível alimento funcional, determinar o potencial antioxidante do extrato e

identificar a substância majoritária presente no extrato. As algas coletadas foram selecionadas para o cultivo, a outra parte para análise de proteína e lipídio e por último para a obtenção de uma substância purificada. As réplicas foram pesadas antes e após o cultivo, sob diferentes condições nutricionais (grupo I – 400 µL, II – 800 µL e III - controle), para obter informações à cerca do rendimento de biomassa, e submetidas à extração para obtenção do extrato com finalidade de estabelecer um perfil químico. O extrato bruto e as frações (ácida e neutra), foram submetidos ao teste antioxidante através do método de DPPH. Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter a substância majoritária purificada. Os teores protéico e lipídico ficaram de acordo com os da literatura. O extrato e a fração ácida mostraram-se eficientes quanto à capacidade sequestrante de radicais livres. 86% das réplicas apresentaram rendimento de biomassa negativo. A variação do perfil químico dos extratos dos grupos I, II e III, foi visualizada. A substância isolada (SH28) foi enviada ao RMN para elucidação estrutural, e se identificou o ácido atomárico como metabólito majoritário presente na população de *S. zonale* de Búzios – RJ. Sendo assim, este trabalho permitiu avaliar as condições do cultivo, conhecer qualitativamente o perfil químico da macroalga parda *Styopodium zonale* e avaliar sua atividade sequestradora de radicais livres, contribuindo assim para a compreensão científica.

### **Abstract**

Sampaio, S.H. MSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March 2011. The Influence of cultivation of the seaweed zone *Styopodium Papenfuss* (Dictyotales, Phaeophyta) on Chemical Composition. Professor Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.. co-Advisor: Angélica Ribeiro Soares, D.Sc.. Banking Appraiser: Alessandra Leda Valverde, D.Sc.; Rodrigo Rodrigues de Oliveira, D.Sc.; Silvia Menezes de Faria Pereira, D.Sc.

This work was carried out at the Laboratory of Food Technology of the Center for Agricultural Science and Technology at Universidade Estadual do Norte Fluminense, in association with the Center for social environment study of Macaé (NUPEM), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, RJ. The aim of this study was to determine qualitatively the chemical profile before and after cultivation, to quantify the content of lipids and proteins, which would promote their popular use as a functional food and can determine the antioxidant potential of the extract and identify the major substance. The algae collected were selected for cultivation, the other part for analysis of protein and lipid and

finally to obtain a purified substance. The replicas were weighed before and after culture under different nutritional conditions (Group I - 400  $\mu$ L, II - 800  $\mu$ L and III - control) for information about the biomass yield, and subjected to extraction to obtain the extract with order to establish a chemical profile. The crude extract and fractions (acidic and neutral), were tested by the antioxidant method of DPPH. The chromatographic fractionations were performed in order to obtain the purified major substance. The protein and lipid levels were in accordance with the literature. The extract and acidic fractions were efficient on the ability of scavenging free radicals. 86% of the replicates showed a negative biomass efficiency. The variation of the chemical profile of extracts from groups I, II and III, were visualized. The isolated substance (SH28) was sent to the NMR for structural elucidation, and identified the acid atomáric as major metabolite present in the population of *S. zonale* in Buzios - RJ. Thus, this work allowed the conditions of cultivation, to know qualitatively the chemical profile of the brown seaweed *Styopodium zonale* and evaluate its radical scavenging activity thus contributing to scientific understanding.

## 1. INTRODUÇÃO

As algas marinhas são organismos fotossintetizantes que visam fornecer energia para si própria, mantendo desta forma suas funções vitais, além de produzir mais oxigênio do que precisam na respiração, sendo o excesso liberado na atmosfera. São representadas pelas algas verdes, pardas e vermelhas (Almeida, et al. 2008).

As algas pardas participam de maneira bastante abrangente na vida cotidiana do homem, devido à sua importância econômica, como por exemplo pela produção de alginatos, agaranas e carragenanas, os quais são usados como matéria-prima em vários segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosméticos, têxtil e bebidas (Vidotti e Rollemberg, 2004).

Estudos relatam que várias espécies de algas vêm sendo empregadas como fonte de alimentos e fornecimento de nutrientes como proteínas e lipídios (Mchugh, 2003), importantes para o crescimento e manutenção do organismo.

As algas marinhas são grandes produtoras de metabólitos secundários derivados de unidades isoprênicas, hidrocarbonetos voláteis, fenóis e outros, e neste contexto, a macroalga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae), presente no litoral brasileiro, produz diterpenos, de origem biossintética mista ou meroditerpênicas (Vallim, 2005, Blunt et al., 2006).

As algas marinhas encontram-se expostas à grande quantidade de luz e às altas concentrações de oxigênio, originando os radicais livres. Desta forma, muitos metabólitos secundários isolados de algas possuem um forte potencial antioxidante (Chandini, Ganesan, e Bhaskar, 2008), que são substâncias que estabilizam os radicais livres por inibir a cadeia de iniciação ou interromper a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais.

Os antioxidantes têm elevado o interesse em pesquisas de biotecnologia em alimentos, que pode vir caracterizar as fontes marinhas, como alimentos funcionais, que são definidos como um grupo de substâncias que apresentam benefícios à saúde. Nesse sentido, técnicas de cultivo vêm sendo empregadas para produção de substâncias com emprego em alimentos e indústrias (Bernardes, 2010).

O cultivo em laboratório busca o estudo do comportamento da espécie selecionada, e tem contribuído ao longo dos anos para o conhecimento da biologia, fisiologia e ecologia desses organismos, apresenta vantagens como duplicação da biomassa em um curto período de tempo, possibilidade de controlar suas condições, de modo a aumentar a produção primária especificamente das proteínas, lipídios e dos metabólitos secundários (Marinho-Soriano et al., 2006, Costa, 2006).

Este estudo teve como enfoque principal submeter os espécimes de *Styopodium zonale* ao cultivo sob diferentes condições nutricionais, visando determinar qualitativamente o perfil químico antes e após o cultivo, quantificar o teor de lipídios e proteínas totais, determinar o potencial antioxidante do extrato e identificar a substância majoritária presente no extrato.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo estudo químico e nutricional da espécie da alga parda *Styopodium zonale* submetida ao cultivo sob diferentes condições nutricionais.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biomassa dos espécimes submetidos ao cultivo;
- Avaliar a influência do cultivo na variação do perfil químico dos espécimes de *S. zonale* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Isolar e indentificar o metabólito secundário majoritário presente no extrato através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *S. zonale* por método espectrofotométrico de DPPH;
- Avaliar o teor de lipídios totais da alga fresca pelo método de Bligh & Dyer;
- Avaliar o teor de proteínas totais da alga fresca pelo método de Kjeldhal.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1- As macroalgas e sua importância econômica

A vida, assim como é conhecida, começou nos oceanos, e as algas estão entre os organismos vivos mais antigos do mundo (Painter, 1983; Cassolato, 2008). Há 3,2 bilhões de anos surgiram as primeiras “algas”, devido à sua capacidade autotrófica de sobrevivência, transformou o planeta Terra, pela liberação de O<sub>2</sub> formando a atmosfera oxidante que nos envolve até hoje (Carvalho, 2004).

De maneira simplificada pode-se distinguir alguns dos grandes grupos de algas por características como organização celular, pigmentos fotossintetizantes, reservas nutritivas, composição da parede celular e habitat ([www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br), 2000), conforme apresentado resumidamente na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos grupos de algas e suas principais características.

Divisão	Organização celular	Pigmentos	Principais constituintes da parede celular	Habitat	Produto de Reserva
Chlorophyta (verde)	Eucariota	clorofila <i>a</i> e <i>b</i> ; xantofilas e carotenos	Celulose	Água doce; marinha, terrestre, saprófita ou associadas com outros organismos.	Amido
Phaeophyta (parda)	Eucariota	Clorofila <i>a</i> e <i>c</i> , fucoxantina e carotenos	Celulose e ácido alginico	Maioria marinha; 4 gêneros de água doce.	Laminarina e manitol
Rhodophyta (vermelha)	Eucariota	clorofila <i>a</i> e <i>d</i> , ficobilinas, xantofilas e carotenos	celulose, ágar e carragenana	Marinha; água doce.	Amido das florídeas

As algas são organismos capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes, sendo assim, são encontradas em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve e ocupam uma posição única como produtoras primárias na cadeia alimentar marinha dentre outros. Por estarem expostas a ambientes e situações adversas, as algas produzem moléculas químicas diferentes das estruturas produzidas por plantas terrestres (Silva, 2004, Kavalco, 2010).

A utilização de algas é conhecida desde o século IV, no Japão e século VI na China. Atualmente estes países, são os maiores consumidores de algas e esta exigência é a base de uma indústria que recolhe e produz anualmente cerca de 12,5 milhões de toneladas (peso fresco), que valem 6,2 bilhões de dólares americanos (FAO, 2007). A crescente corrida pela busca de matéria-prima natural na indústria fez com que países europeus se destaquem na produção de algas. Na Tabela 2, encontram-se esquematizados os principais países produtores e alguns exemplos de suas utilizações.

Tabela 2 – Principais produtos de algas e principais países produtores.

	Principais gêneros	Principais países produtores
<b>Ágar</b> (indústria cosmética)	<i>Gelidium, Gracilaria, Gelidiella</i>	Coreia, Marrocos, Chile Espanha e Portugal
<b>Carregenatos</b> (indústria Alimentícia)	<i>Gigartina, Chondrus, Hypnae</i>	Filipinas, Canadá, Chile, Dinamarca, Espanha
<b>Alginatos</b> (indústria farmacêutica)	<i>Sargassum, Laminaria, Undaria</i> <i>Macrocystis, Ecklonia</i>	USA, Noruega, Mexico, China, Irlanda
<b>Consumo humano direto</b>	<i>Porphyra, Laminaria, Undaria</i> <i>Hizikia</i>	Japão, Coreia, China
<b>Rações Animais</b>	<i>Ascophyllum, Sargassum</i>	Noruega, Irlanda
<b>Fertilizantes</b>	<i>Macrocystis, Ascophyllum</i>	França

( Patarra, 2008)

### 3.2.- Ordem Dictyotales

As algas pertencentes à ordem Dictyotales, constituem o grupo de maior biomassa da costa brasileira (Freitas, 2006). São grandes produtoras de substâncias fenólicas e terpenoídicas, e têm sido muito investigadas devido à produção de defesas químicas e de terem se revelado como uma fonte excepcional de compostos biologicamente ativos (Vallim, 2005).

A ordem Dictyotales (Phaeophyta) é formada por 18 gêneros e 100 espécies de algas pardas, distribuindo-se em águas tropicais e subtropicais (Verlaque, et al., 2009). Porém, a partir dos metabólitos isolados, Vallim e colaboradores (2005) sugeriram uma nova denominação taxonômica para os três grupos que formam a família Dictyotaceae. Segundo os autores, o antigo grupo “*Taonia*” que inclui espécies que produzem diterpenos de origem biossintética mista, meroditerpenos, deve ser substituído por “*Stypopodium*”, identificação correta para a espécie *Taonia atomaria* que originou o nome do antigo grupo.

O grupo “*Dictyopteris*”, constituído inicialmente somente por espécies do gênero *Dictyopteris*, passaria a fazer parte do gênero *Taonia* J. Agardh, uma vez que ambos produzem sesquiterpenos simples, ou de origem biossintética mista.

O grupo denominado de “*Dictyota*” compreenderia as espécies dos gêneros *Dictyota*, *Glossophora*, *Pachydictyon*, *Spatoglossum*, *Stoechospermum*, todas produtoras de diterpenos cíclicos. Muitos desses metabólitos são exclusivamente marinhos.

A caracterização das espécies a partir do isolamento, elucidação estrutural de suas moléculas, análise da similaridade química entre as populações, tem sido de extrema importância para a taxonomia, pois expressa a eficiência dos metabólitos como marcadores taxonômicos, biogeográficos e filogenéticos das algas pardas da ordem Dictyotales (Freitas, 2006). Os marcadores taxonômicos desta ordem, bem como os esqueletos básicos estão apresentados na Figura 1.

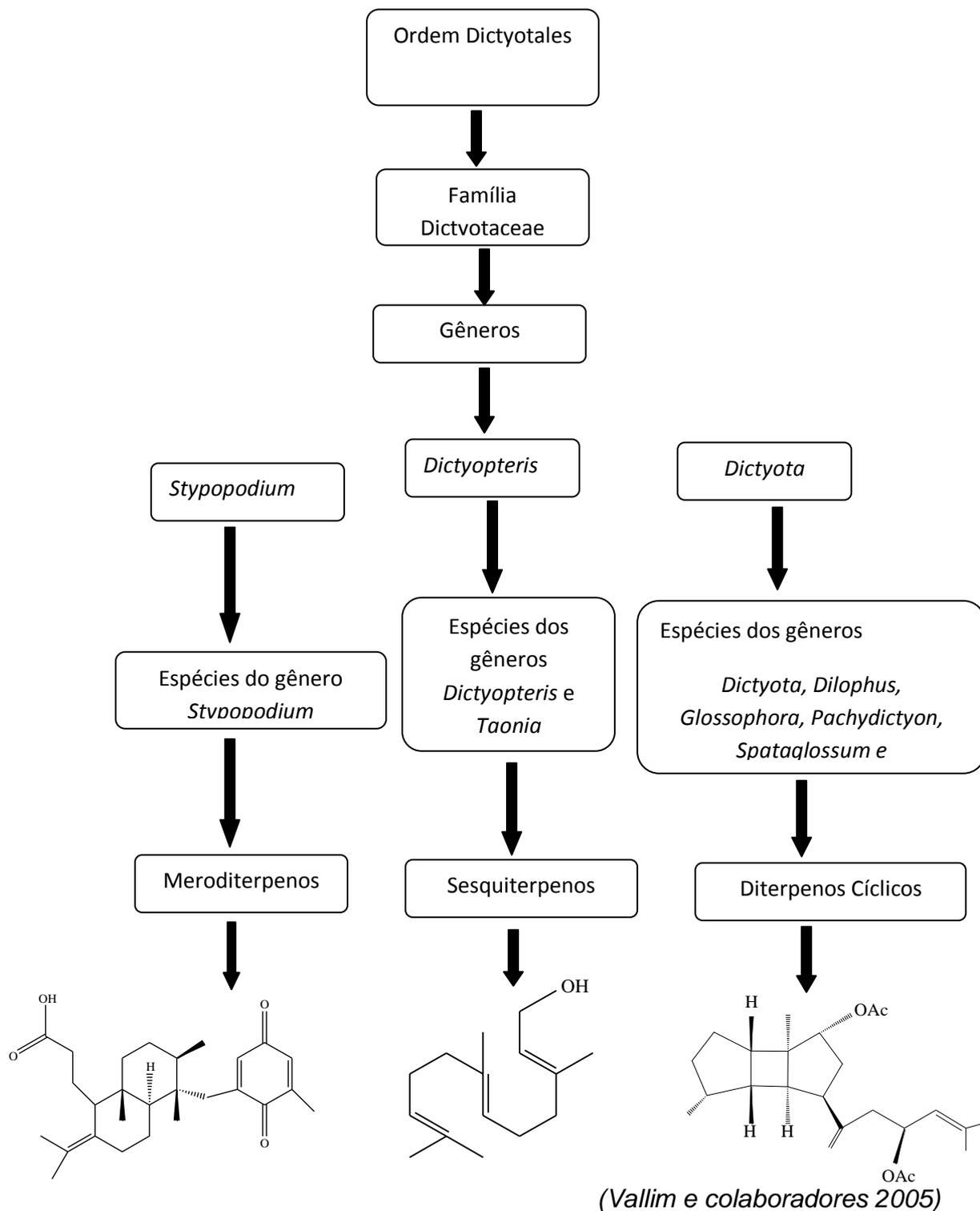


Figura 1 – Grupo da ordem Dictyotales e seus respectivos marcadores taxonômicos.

### 3.3 - A espécie *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss

A espécie *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss, é uma alga parda da família Dictyotaceae, de hábito arbustivo e apresenta predominância de pigmentos fotossintéticos, como a clorofila a e c ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org), 2010).

Apresenta talo foliáceo, consistência maleável, não ramificado ([www.smithsonian tropical research institute](http://www.smithsonian tropical research institute), 2010), com lâminas em forma de leque de até 45 cm de altura. Predominantemente marinhas, apresentam-se fixas a um substrato em zonas de até 30 metros de profundidade. Dentro da água apresentam-se amarelas e fora da água marrom-escuro ([www.smithsonian tropical research institute](http://www.smithsonian tropical research institute), 2010).

O gênero *Styopodium* (Figura 2) é encontrado no Oceano Índico, Pacífico, Mar Mediterrâneo e nas águas quentes do Oceano Atlântico, sendo que a macroalga *S. zonale* é a única espécie do gênero encontrada no litoral brasileiro. Além de fazer parte das cadeias alimentares de vários organismos, fornecem *habitat*, refúgio e ambiente para reprodução de diversos organismos da biota marinha (Araújo, 2005).



(algaebase, 2010)

Figura 2 – Foto de um espécime de *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss.

### 3.4 - Avaliação nutricional em algas marinhas

As algas marinhas são fontes de uma grande variedade de compostos benéficos para o homem, apresentando diversas aplicações na indústria de alimentos (Mamatha et al., 2007), fertilização do solo (Blunden, 1991) e em outras áreas biotecnológicas, como a produção de biodiesel (Farias et al., 2001; Lima et al., 2004).

A utilização das algas para consumo humano em países orientais, fez com que o recente aumento da demanda por produtos a partir de algas vem impulsionasse as pesquisas sobre a composição nutricional de espécies comestíveis pertencentes às três classes de macroalgas (Phaeophyta, Rhodophyta e Chlorophyta) (Sánchez-Machado et al. 2004, Matanjun et al. 2008). Na Tabela 3 estão os principais nutrientes detectados e relatados na literatura para algas marinhas.

Tabela 3 – Principais nutrientes de algas marinhas.

Nutrientes	Descrição
Polissacarídeo	Alginato de algas pardas, carraginatós e ágar de algas vermelhas, Laminarina nas algas pardas e amidos florídeos nas algas vermelhas. Os polissacarídeos não são digeridos pela flora bacteriana intestinal dos humanos e assim podem ser considerados como fibras dietéticas.
Minerais	Corresponde a 36% do peso seco total, As algas pardas são conhecidas como fonte rica em iodo e importante fonte de cálcio, que pode chegar a 7% do peso seco total nas macroalgas.
Proteínas/aminoácidos	O conteúdo de proteína em algas pardas geralmente é baixo (5-15% do peso seco), enquanto que em algas verdes e vermelhas os valores são mais elevados (10-30% do peso seco). Os ácidos aspártico e glutâmico são os principais aminoácidos na maior parte das algas marinhas.
Lipídios	Representam entre 1-5% do peso seco das algas, mas oferecem uma composição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). Contêm carotenóides e terpenóides.
Micronutrientes	Fonte de vitaminas do grupo B, C e E. Os polifenóis podem variar entre 5-15% do peso seco e presença de carotenóides como $\beta$ -caroteno, fucoxantina, luteína, violaxantina dentre outros.

(Patarra, 2008)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, as algas comestíveis contêm concentrações significativas de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (Norziah e Ching, 2000; Wong e Cheung, 2000, Sanchez-

Machado, Lopez -Hernandez' e Paseiro-Losada, 2002) que são elementos básicos e necessários para a dieta humana.

As proteínas, por exemplo, representam importante papel nutricional nos alimentos. São componentes essenciais porque são fontes de aminoácidos necessários para o crescimento e manutenção do organismo, são importantes no processamento de alimentos e no desenvolvimento de produtos alimentícios (Sze-Tao e Sathe, 2000).

O teor de proteína presente nas algas difere entre as espécies. Geralmente a fração de proteína encontrada nas algas pardas é mais baixa (3-15% do peso seco) do que a das algas verdes ou vermelhas (10-47% do peso seco). A espécie de feofíceia *Undaria pinnatifida* ("wakame"), por exemplo, apresenta teor de proteína entre 11-24% de seu peso seco, enquanto outras algas pardas também exploradas industrialmente (*Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* e *Himanthalia elongata*) possuem concentração de proteína inferior a 15% do peso seco. Em várias algas verdes pertencentes ao gênero *Ulva*, o teor de proteína oscila entre 10-26% de seu peso seco. O teor de proteína na *Ulva pertusa*, bastante consumida no Japão, varia de 20-26% de seu peso seco (Fleurence, 1999; Sousa, 2005). A macroalga vermelha *Palmaria palmata* consiste em uma boa fonte de proteína (10-26% do peso seco), além de conter aminoácidos essenciais que representam de 26 a 50% do total de aminoácidos, quantidade semelhante à encontrada em clara de ovo (Galland-irmouli et al., 1999; Sousa, 2005).

Os lipídios, por sua vez, são fundamentais para a saúde. As funções destas moléculas estão bem definidas como energéticas, estruturais, hormonais e bioquímicas, entre outras (Haliloglu et al., 2003). Dentro dos lipídios, os ácidos graxos poli-insaturados (**PUFA's**) são requeridos para um crescimento, desenvolvimento e principalmente através da manutenção da integridade estrutural e funcional das membranas (Sargent et al., 1999, Souza, 2007).

Os ácidos graxos, importantes constituintes da dieta humana, apresentam efeitos terapêuticos e desempenham importante papel tecnológico na indústria de alimentos. As características dos ácidos graxos é determinante nas propriedades físicas, químicas e sensoriais dos alimentos (Souza, 2007).

Alguns Trabalhos têm demonstrado que o maior benefício das algas marinhas está na composição química dos ácidos graxos essenciais poli-insaturados (Tonon et al., 2003; Robin e Vicent, 2003). Bell e Sargent (2002) descrevem que o ácido araquidônico (20:4n-6), presente no fitoplâncton alimentar, é essencial para a formação do ácido eicosapentaenóico (**EPA**) e ácido docosahexaenóico (**DHA**).

Os ácidos **EPA** e **DHA** podem atuar na prevenção e tratamento de várias doenças, como cardiovasculares, hipertensão, inflamações em geral, asma, artrite, psoríase e vários tipos de câncer (Sander, 2000).

Os principais **PUFA's** para a dieta humana são o ácido linoléico, ácido linolênico, araquidônico, **EPA** e **DHA** (Figura 3) (Alonso, 2000).

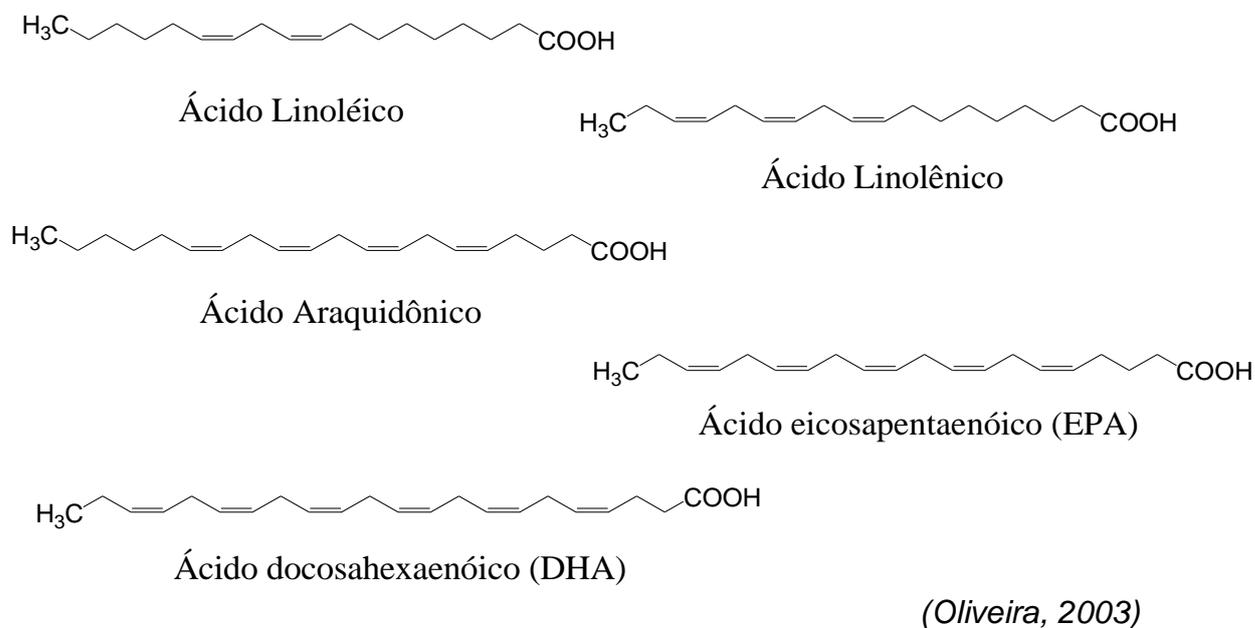


Figura 3: Estruturas químicas dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's).

Em pacientes com alterações das respostas metabólicas, o equilíbrio entre os lipídeos da dieta, tem como propósito controlar a resposta inflamatória, por meio da relação entre os tipos de PUFA's ingeridos (Calder, 2003).

Por outro lado, os PUFA's por possuírem em sua estrutura química, duplas ligações, são alvos preferenciais à peroxidação lipídica, resultando em formação de radicais livres lesivos aos tecidos (Waitzberg, 2002).

Neste contexto, o interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel que essas substâncias exercem na patogênese de diversas doenças (Tiwari, 2001).

### **3.5 - Formação dos Radicais Livres X Antioxidantes**

Os Radicais Livres (RL) são moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos com um ou mais elétrons desemparelhados (Young e Woodside, 2001; Schneider e Oliveira, 2004). Essa configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis com meia-vida curta e quimicamente reativos.

O processo respiratório e diversas reações oxidativas, que ocorrem nas células aeróbicas, levam à formação de radicais livres, que causam danos ao organismo e contribuem para o aparecimento de muitas doenças, tais como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, bem como aceleram o processo de envelhecimento (Sikora et al., 2008). Por isso, as células humanas dependem de certa capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbica. Para alcançar uma proteção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste de um arranjo de diversos componentes lipossolúveis (por exemplo, vitamina E e carotenóides), hidrossolúveis (ácido ascórbico; glutatona) e enzimáticos (glutatona peroxidase; superóxido dismutase; catalase) (McClean et al., 2005).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROS, espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio) formadas *in vivo*, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, produzidos pelo corpo humano e por fatores ambientais, exercem funções essenciais como custo energético, desintoxicação, sinalização química, e função imunológica (Schneider e Oliveira, 2004; Ali, et al., 2008). O excesso destas espécies reativas, induzido pela exposição a substâncias oxidantes externas ou uma falha nos mecanismos de defesa, pode

causar dano na molécula de DNA, lipídios e proteínas aumentando o risco de diferentes doenças (Ali, et al., 2008).

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é gerado pela reação entre moléculas de substâncias que participam da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático com o oxigênio, em decorrência do metabolismo aeróbico. As células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológica para eliminar micro-organismos patogênicos; nas doenças inflamatórias crônicas esta produção torna-se excessiva, provocando lesões nos tecidos (Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004; Mariod, 2009).

Se o  $O_2$  é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Reação 1); se receber apenas um elétron, o produto será o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Reação 2).



O  $H_2O_2$  é extremamente tóxico e sua toxicidade se deve, em grande parte, à conversão em radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Radicais livres causam quebra e modificações nas bases de DNA levando a alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004, Halliwell, 2009).

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicam que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante (Podsdek, 2007).

Esses mecanismos pelos quais essas patologias se desenvolvem, geralmente envolvem alterações oxidativas de moléculas consideradas críticas, o que inclui proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos, além das substâncias

envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (Villeneuve, 2007).

Em algas marinhas são observadas numerosas substâncias com atividade antioxidante. Nestes organismos as variações nas condições ambientais afetam significativamente o metabolismo, podendo resultar em estresse oxidativo com produção de radicais livres e peroxidação lipídica (Nimptsch e Pflugmacher 2007).

### **3.6 - Defesas Químicas**

O oceano é resultado de uma gigantesca reação ácido – base, onde os ácidos que continuamente afloram do interior da terra são misturados com bases que estão sendo liberadas constantemente das rochas, pela ação do tempo (Shibata, 1998; Carvalho, 2000).

Diferentes grupos de algas adaptaram-se ao ambiente marinho através de diferentes vias evolucionárias, determinadas pelas informações genéticas existentes, resultando em diferentes estratégias de sobrevivência, as quais influenciaram enormemente na morfologia, fisiologia e bioquímica das macroalgas marinhas ao longo de sua vida (Naldi, 1999; Carvalho, 2000).

Essa interação com o meio causou diferenças significativas em determinadas características desses organismos, como nas pigmentações. Os pigmentos, além de serem fotossintetizantes (clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas), conferem às algas, grande poder de adaptação à luz incidente (Jensen, Faulkner e Fenical, 1977; Carvalho, 2000)

As características morfológicas, como a forma, o tamanho e a dureza do talo, e as funções bioquímicas, como a produção de substâncias químicas (Padilha, 1985; Carvalho 2000).

Nesse imenso laboratório, os organismos aquáticos e o ambiente abiótico estão inter-relacionados e interagem entre si, desenvolvendo estratégias de defesa que resultam na produção de um elevado número de substâncias químicas, a partir de diferentes rotas metabólicas (Barros et al., 2005).

Como defesas químicas, as macroalgas marinhas produzem terpenos, acetogeninas, derivados de aminoácidos, fenóis simples e polifenóis, substâncias que diferem dos produtos de plantas terrestres (Pohnert, 2004).

A biossíntese de terpenos, por exemplo, representa uma interface química entre as algas e o ambiente circundante. Sua produção é frequentemente afetada por condições ambientais, que podem ser entendidos também como fatores de estresse, como irradiação solar, concentração de nutrientes, índice pluviométrico, temperatura, salinidade, pH (Gobbo-Neto e Lopes 2007), radiação UV, seca e hipóxia (Zhang e Klesig 2001, Preisser et al. 2007, Reifenrath e Muller 2007, Menone et al. 2008).

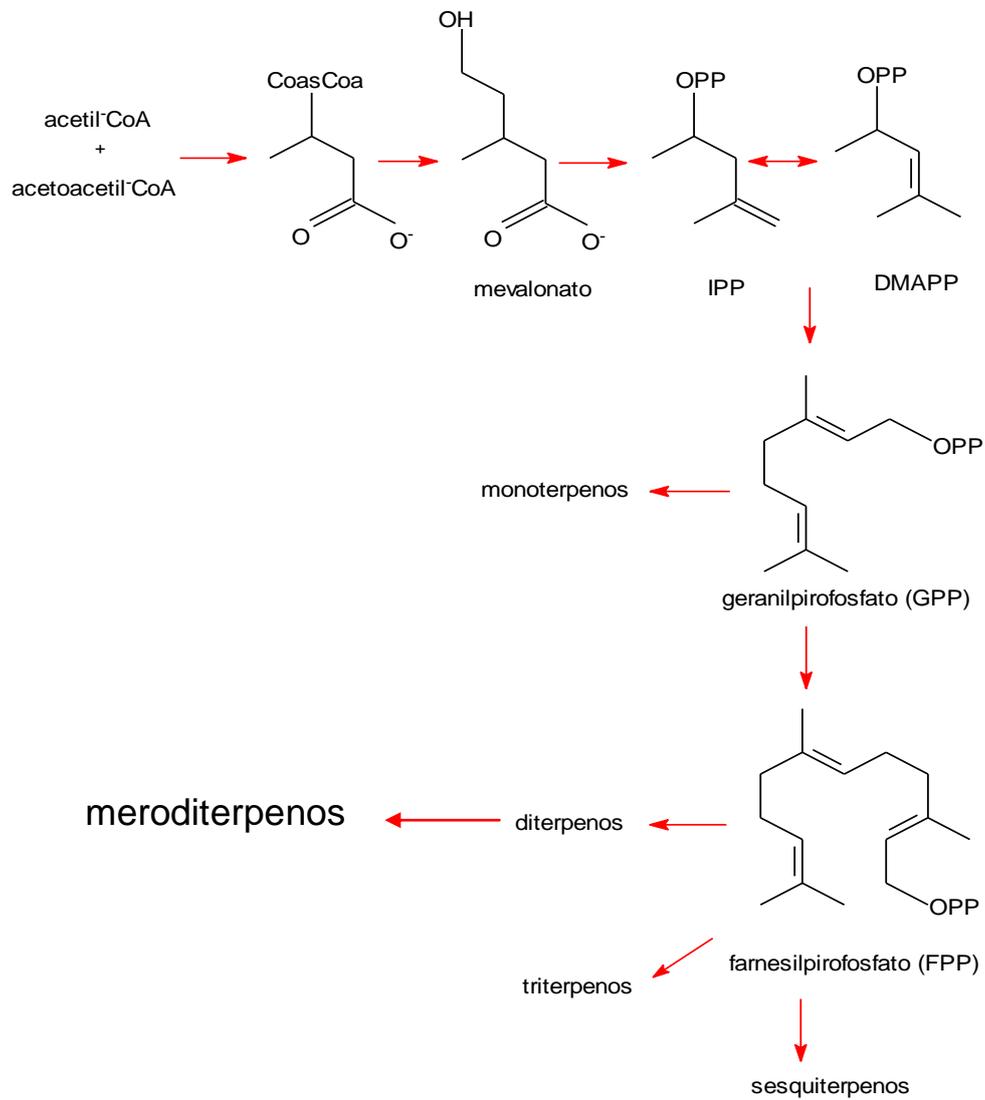
### 3.6.1. Terpenos

Os terpenos são definidos como moléculas formadas pelo encadeamento de unidades isoprênicas, podendo conter oxigênio como alcoóis, aldeídos e cetonas. Organismos marinhos são grandes produtores de metabólitos secundários derivados de unidades isoprênicas, incluindo os monoterpenos (C10), os sesquiterpenos (C15), os diterpenos (C20), os triterpenos (C30) e os tetraterpenos (C40). Dentre esses organismos, as algas marinhas estão entre os principais produtores destas substâncias (Blunt et al., 2006).

Esqueletos terpenoídicos são produzidos por representantes de todas as divisões de macroalgas marinhas, dentre eles, derivados halogenados e terpenos de origem biossintética mista (meroterpenóides), como os metabólitos isolados de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) e de algas pardas do gênero *Styopodium* (Dictyotaceae) (Soares, 2003).

As algas pardas surgiram como uma excepcional fonte de compostos terpênicos, derivados da via do mevalonato, cuja biossíntese está representada na Figura 4 e que fazem parte de uma estratégia defensiva contra herbívoros no meio marinho (Paul et al., 2001). Além disso, essas substâncias parecem reforçar a proteção das algas contra bactérias, fungos ou organismos incrustantes como esporos de algas e larvas de invertebrados, podendo assim,

aumentar as vantagens das algas na competição interespecífica por espaço (Teixeira et al., 2001).



(Simões, 2006)

Figura 4 – Esquema biossintético geral para os terpenos.

### 3.7 – Alguns Meroditerpenos isolados da espécie *Stypopodium zonale* (Dictyotaceae)

O gênero *Stypopodium* é quimicamente caracterizado pela produção de diterpenos de origem biossintética mista ou meroditerpenos. Há cerca de 30 anos atrás foi isolado o primeiro composto a partir deste gênero, a partir daí, outros estudos levaram ao isolamento de diversas substâncias oriundas da mesma via biossintética (Figura 5).

O taondiol (**5a**), produzido por *Taonia atomaria* (*Stypopodium zonale*), coletado nas Ilhas Canárias e seus produtos de transformação, taondiol, 14-ceto-taondiol (**5b**) e 14-ceto-isotaondiol (**5c**) (González et al., 1973, Soares et al. 2003, Vallim et al., 2005), foram identificados.

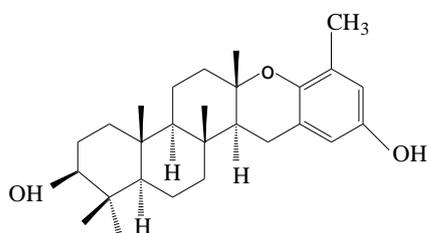
O ácido atomárico (**5d**) foi isolado na mesma época, porém em outra localidade, Puerto Santiago (González et al., 1974, Dorta, 2002) juntamente com o taondiol (**5a**), o isotaondiol (**5e**) e dois meroditerpenos considerados precursores do ácido atomárico. No litoral brasileiro, este mesmo ácido foi isolado de outras populações de *S. zonale* (Soares, 2003; Pereira, 2004).

Em 1981, Gerwick e Fenical identificaram cinco meroditerpenóides de *S. zonale* (**5f**, **5g**, **5h**, **5i**, **5j**), além do taondiol (**5a**), do ácido atomárico (**5d**), do estipotriol (**5k**) e estipoldiona (**5l**). Em 1985 Gerwick e colaboradores, isolaram um novo meroditerpeno derivado do ácido atomárico, o ácido 5 a-desmetil, 5-acetil, atomárico (**5m**) (Soares, 2005).

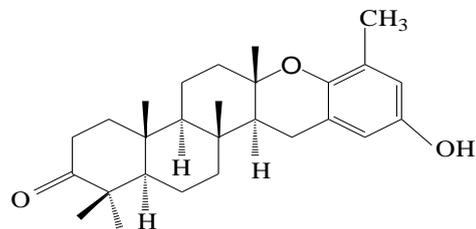
Em 1999, Wessels e colaboradores (Wessels et al., 1999, Soares, 2005), isolaram o ácido estipoquinônico (**5n**), possível derivado do ácido estipoidroquinônico (**5o**), na costa da Ilha de Lanzarote (região da Ilhas Canárias).

Dorta e colaboradores (2002a) isolaram três novos meroditerpenóides, o ácido estipoidroquinônico (**5o**) e os ácidos 10-desisopropenila, 10-ceto atomárico (**5p**) e o 10-desisopropenila-10-ceto-estipoidroquinônico (**5q**). Em 2003, Dorta isolou o 5'a-desmetil-5'-acetil-atomárico-1-ceto-5'a-desmetil atomárico (**5r**) e a estipolactona (**5s**) (Dorta et al., 2003).

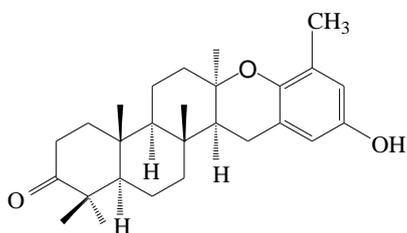
Segundo Vallim e colaboradores (2005), a peroxilactona, derivado acetilado do hemilactal, parece ser formada a partir da oxidação das peroxilactonas, quando expostas ao ar.



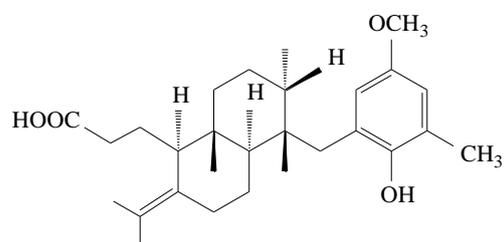
taondiol (5a)



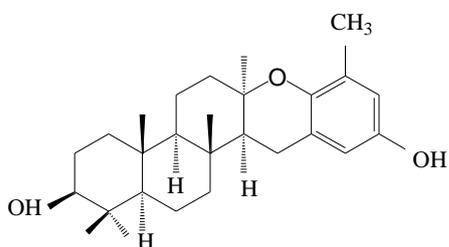
14-ceto-taondiol(5b)



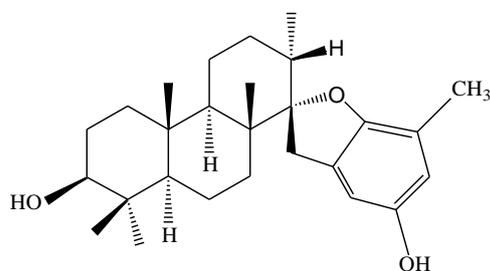
14-ceto-isotaondiol (5c)



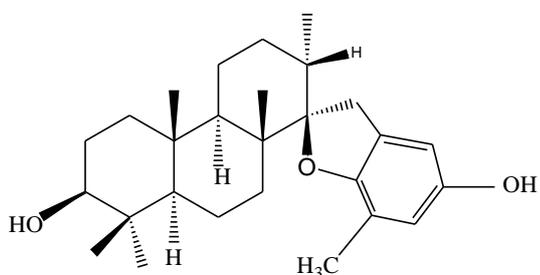
ácido atomárico (5d)



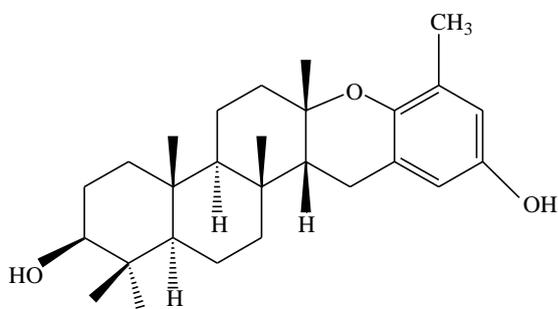
isotaondiol (5e)



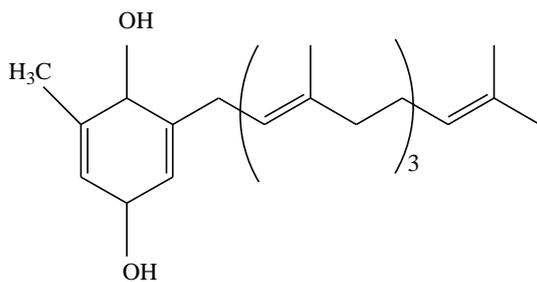
estipoldiol (5f)



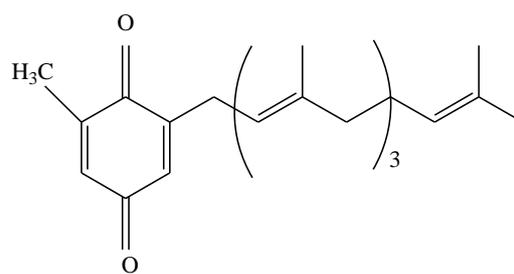
epistipodiol (5g)



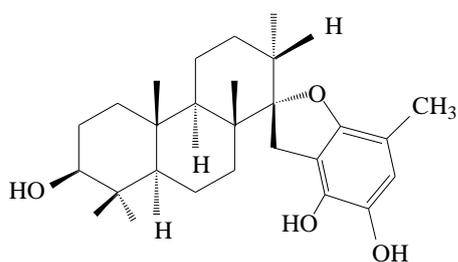
epitaondiol (5h)



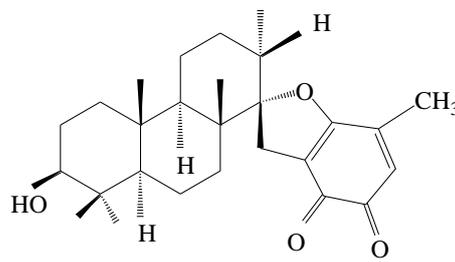
2-(geranyl-geranyl)-6-metil-1,4-benzoidroquinona(5i)



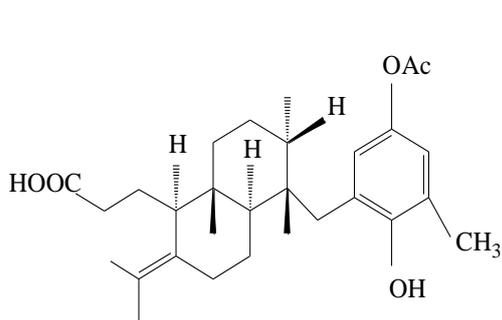
2-(geranyl-geranyl)-6-metil-1,4-benzoquinona (5j)



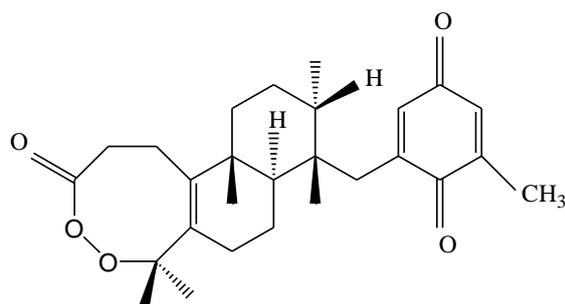
estipotriol (5k)



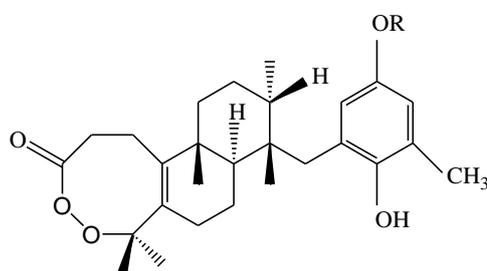
estipoldiona (5l)



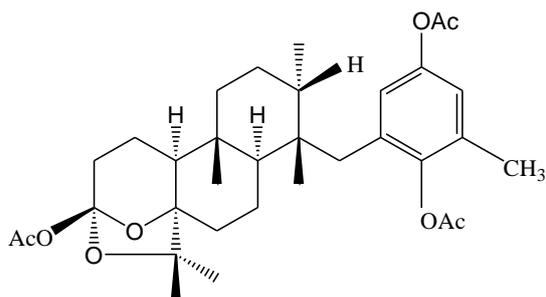
ácido 5'a-desmetil,  
5'-acetil, atomárico (5m)



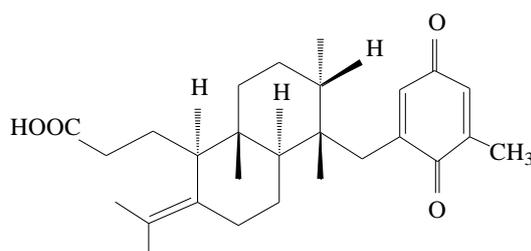
peroxilactona do ácido  
estipoquinônico (5n)



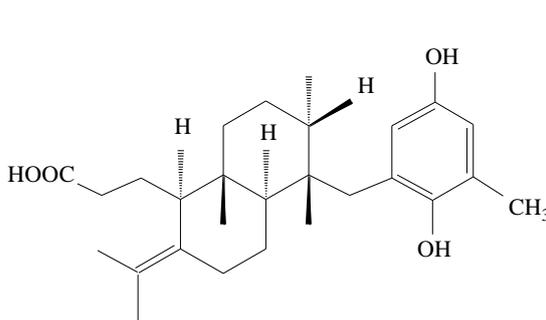
peroxilactona do ácido 5'a-desmetil, 5'-acetil, atomárico (5m)  
R=Ac, peroxilactona do ácido atomárico R=CH<sub>3</sub>



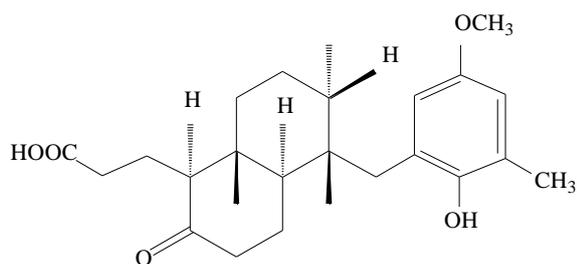
hemilactal do ácido 5'a-desmetil,  
5'-acetil, atomárico (5m)



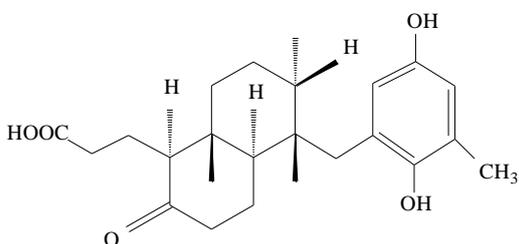
ácido estipoquinônico (5n)



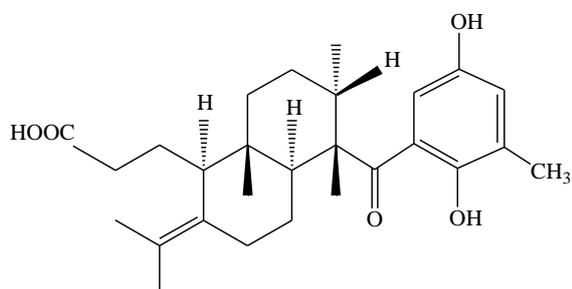
ácido estipidroquinônico (5o)



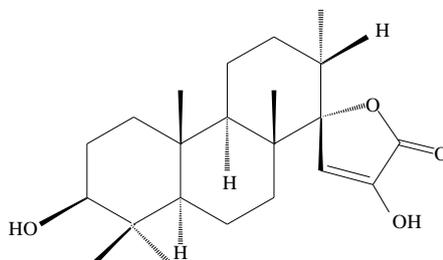
ácido 10-desisopropenila,  
10-ceto atomárico (5p)



ácido 10-desisopropenila,  
10-ceto estipidroquinônico (5q)



ácido  
1-ceto-5'a-desmetil atomárico (5r)



estipolactona (5s)

Figura 5 – Alguns meroditerpenos isolados de *S. zonale*

Alguns desses metabólitos meroditerpênicos isolados e identificados de *Styopodium zonale* de várias regiões tropicais e subtropicais foram testados em ensaios biológicos e apresentaram atividades biológicas para diferentes doenças descritas na literatura conforme observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Alguns dos principais metabólitos e alguns exemplos de atividades biológicas investigadas.

Metabólitos	Atividade Biológica	Referência
Estipodiol (5f)	Antitumoral	Mayer e Lehmann, 2000
Estipoldiona (5l)	Inibidor in vitro de polimerização de microtúbulos	Mayer e Lehmann, 2000
Taondiol (5a)	Antifúngica	Roussis, 2007
Isoepitaondiol	Inseticida e Antimicrobiana	Roussis, 2007
Ácido atomárico (5d)	Inibem a atividade do receptor de enzima tirosina quinase	Wessels <i>et al.</i> , 1999
Ácido estipoquinônico (5n)	Inibem a atividade do receptor de enzima tirosina quinase	Wessels <i>et al.</i> , 1999

### 3.8 - Cultivo de macroalgas

Modificações do ambiente natural para um ambiente com condições controladas fazem com que haja variação da fisiologia e bioquímica das algas (Murakami *et al.*, 2009).

O objetivo de um sistema de cultivo, fora do ambiente natural, é obter produção de biomassa algal através da captação da energia luminosa pelas estruturas vegetativas, transformando-a em energia química, que posteriormente será utilizada diretamente nos processos vitais das espécies (Wong e Chang, 2000).

Durante o cultivo, o controle dos parâmetros abióticos, como temperatura (devido aos seus efeitos nas atividades e propriedades moleculares, e, portanto em todos os aspectos metabólicos), salinidade, pH,

radiação (que é um pré-requisito para uma existência fototrófica e importante para a manutenção das taxas fotossintéticas) e nutrientes, são fundamentais e podem influenciar no desenvolvimento do cultivo em si e principalmente na composição nutricional, através do estímulo ou inibição da biossíntese de metabólitos secundários (Murakami et al, 2009).

Em relação aos nutrientes estes são uma importante variável no cultivo de algas marinhas. Combinações adequadas de nitrogênio e fósforo são fundamentais para o enriquecimento dos meios de cultura (Nishihara et al. 2005).

Em geral os íons nitrato e amônio, importantes na biossíntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, são as maiores fontes de nitrogênio natural das algas marinhas. Portanto, estão presentes como componentes do meio de nutrientes nos sistemas de cultivos devido à incapacidade das algas de fixar nitrogênio atmosférico (Nishihara et al. 2005).

O movimento da água é um fator essencial no fluxo de nutrientes disponíveis na água para as algas. Em espécies da macroalga vermelha *Gelidium* a difusão dos nutrientes no cultivo, resultantes do movimento da água, aumenta a captação efetiva dos níveis de radiação que devem ser mantidos constantes, oferecendo oportunidades de desenvolvimento das algas (Pfetzing et al., 2000).

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados à parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) sob a orientação da Profa. Daniela Barros de Oliveira, com a colaboração do Laboratório Grupo de Produtos Naturais de Organismos Marinhos, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento Ecológico de Macaé (NUPEM) para toda a parte do cultivo, testes biológicos e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Macaé, RJ, sob a orientação da profa. Angélica Ribeiro Soares.

### 4.1 - Coleta do material vegetal

Os espécimes de *Styopodium zonale* foram coletados a 10 metros de profundidade no distrito de Armação dos Búzios - RJ, na praia do Forno (22°44'31.70"S, 41°52'35.97" O) no mês de junho de 2010, através de mergulho em apnéia. Durante a coleta, a temperatura da água foi medida em torno de 21°C. Os espécimes foram acondicionados em caixas térmicas e encaminhados ao laboratório.

O exemplar do material foi depositado no herbário RFA da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, sob o número 35956.

## **4.2 - Preparo do material vegetal**

No laboratório, os espécimes coletados foram selecionados para o cultivo, de acordo com a biomassa. Os espécimes restantes, uma parte foram lavados em água destilada, para retirada da fauna e flora acompanhante, e secos com papel absorvente. Posteriormente, parte desse material foi congelado a fim de que seja utilizado na análise de lipídios e proteínas e a outra parte foi seca à temperatura ambiente para o preparo do extrato bruto.

## **4.3 - Metodologia geral**

Para facilitar o entendimento deste trabalho de dissertação de mestrado, este item foi dividido em cinco subitens: Experimental I - Composição química nutricional, Experimental II – Cultivo da macroalga *Styopodium zonale*, Experimental III - Análise da variação do perfil químico antes e pós – cultivo, Experimental IV – Atividade antioxidante do extrato e Frações e Experimental V – Isolamento e identificação da substância Majoritária.

## **4.4 - Parte Experimental I: Composição química nutricional**

### **4.4.1- Determinação de Lipídios**

Para a extração dos lipídios totais, as algas foram descongeladas, pesadas, sua umidade previamente determinada (85%) (ref.) e extraídas de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios foram extraídos, usando uma mistura de solventes polares e de média polaridade (metanol e clorofórmio). Neste método pesou-se 3,0g de material vegetal, adicionou-se 20 mL de metanol, 20 mL clorofórmio e 4 mL de água destilada, para manter a proporção metanol/clorofórmio/água. Após agitação foi acrescentado 10 mL de sulfato de sódio 1,5%. A amostra foi deixada em

repouso para formar duas fases, uma hidrofílica e outra hidrofóbica. Foram retirados 15 mL da fase inferior (clorofórmio), que foi transferida para um tubo de 30 mL. Acrescentou-se 1g de sulfato de sódio anidro para a retirada de água e o material filtrado, transferiu-se 5 mL para uma placa de petri que foi colocada para evaporar em estufa a 105°C. Após secagem e resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas. O percentual de lipídios totais foi estimado a partir do peso dos lipídios em um volume de 5 mL, corrigido para o peso da amostra utilizado (AOAC, 1985).

#### 4.4.2 – Determinação de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldhal (AOAC,1985). Utilizaram-se três réplicas de 2,0g que foram transferidas para um balão de Kjeldahl de 50 mL. Ao balão foram adicionados os catalisadores (0,5g de sulfato de cobre e 1,0g de sulfato de potássio) e finalmente 5 mL de ácido sulfúrico 1N. O balão foi conduzido ao digestor por vinte e quatro horas, até adquirir uma coloração verde transparente. Após a digestão, o material foi transferido para o destilador de Kjeldahl ao qual foi adicionado hidróxido de sódio na concentração 1:1. O produto da destilação foi coletado em um erlenmeyer contendo 25 ml da solução de ácido bórico 4% e gotas do indicador vermelho de metila e verde de bromocresol. A destilação foi levada até que o material do erlenmeyer atingisse um volume de 75 mL. Procedeu-se então à titulação com ácido clorídrico a 0,1N concentrado, aplicando-se o valor do volume titulado na seguinte fórmula:

$$\text{Nitrogênio total} = V \times \text{normalidade} \times \text{fator do ácido} \times 14.01 \times 100$$

---

peso da amostra em gramas

$$\text{sendo o teor de proteínas das amostras} = 6,25 \times \text{nitrogênio total}$$

## 4.5 – Parte Experimental II - Cultivo da macroalga *Styopodium*

### 4.5.1 – Preparo da água do mar

A água do mar foi coletada na Praia dos Cavalheiros, em Macaé, Rio de Janeiro, em caixas isotérmicas com capacidade para 20 L, que foram transportadas para o Biotério do NUPEM/UFRJ, e onde foram filtradas em sistema Millipore com filtro 0,45  $\mu$  (Figura 6), reservadas em erlenmeyer de 1000 mL e esterilizadas em micro-ondas por 10 min até fervura, sendo que a cada 2 min, o recipiente contendo 800 mL de água, era retirado e agitado com movimentos circulares. Após este procedimento, os recipientes contendo a água devidamente filtrada e esterilizada foram armazenados em geladeira.



Figura 6 – Sistema Millipore de filtração.

### 4.5.2 – Meio de Nutrientes

O meio de nutrientes Provasoli (PES) (Provasoli 1968, Bravin, 2002) foi preparado e utilizado no cultivo das algas. Este meio consiste em uma mistura de substâncias importantes no desenvolvimento e manutenção dos espécimes conforme Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Componentes utilizados no preparo do meio de Provasoli (PES).

REATIVOS	SOLUÇÕES EM ÁGUA DESTILADA (I)	VOLUMES PARCIAIS UTILIZADOS
Na-glicerofosfato . 5H <sub>2</sub> O (I)	5,0000 g / 100 mL	16,0 mL
NaNO <sub>3</sub> (I)	5,6000 g / 150 mL	150,0 mL
Cianocobalamina (Vit. B <sub>12</sub> ) (I)	0,0100 g / 100 mL	1,6 mL
Tiamina (I)	0,1000 g / 100 mL	8,0 mL
Biotina (I)	0,0100 g / 100 mL	0,8 mL
Tampão – Tris (II)	6,5440 g / 150 mL	150,0 mL
Fe EDTA: Na <sub>2</sub> EDTA (III) + Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2640 g / 500 mL 0,2808 g	500 mL
P II – mistura dos metais (IV)	–	500 mL
Volume final em água destilada (V)	–	2,000 mL

(I) - Os volumes excedentes podem ser armazenados no congelador; (II) – Tris-aminometano. Levar a pH 7.8 com HCl 5N; (III) – Etilenodiaminotetracetato de sódio; (IV) – P II - mistura dos metais. Na<sub>2</sub> EDTA – 0,4000g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,4480g; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0,0192g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – 0,0480g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,0088g; CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,0019g; Água destilada – 500,0ml

O meio de nutrientes foi preparado em duas partes: Parte I (PI) – contendo uma mistura de Na-glicerofosfato. 5H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, cianocobalamina (vit. B<sub>12</sub>), tiamina, biotina, tampão e etilenodiaminotetracetato de sódio e Parte II (PII) – contendo uma mistura de metais. Cada componente foi pesado e diluído em água destilada conforme Tabela 5.

#### 4.5.3 – Determinação de biomassa

As algas foram pesadas antes e após o cultivo (7 dias), através de rápida secagem do excesso de água com papel absorvente, para evitar discrepância de biomassa das algas entre as réplicas. Para pesagem foi empregada balança digital.

#### **4.5.4 – O cultivo de *Styopodium zonale***

As algas foram aclimatadas em aquário e quinze espécimes foram selecionados de acordo com o tamanho e biomassa. Pequenos fragmentos de cada espécime foram retirados para preparo do extrato bruto e posterior a este procedimento as algas foram colocadas nos erlenmeyers contendo água do mar previamente filtrada e esterilizada. Após a acomodação das algas em erlenmeyers devidamente rotulados, o alimento artificial (PES) foi acrescentado após 24 hs de aclimação em biotério e as algas foram divididas em três grupos. Os espécimes pertencentes ao primeiro grupo receberam 400 µL de meio de nutriente PES, os espécimes do segundo grupo, receberam 800 µL de meio de nutriente PES e os espécimes do terceiro grupo (controle), não receberam meio PES. As algas foram encaminhadas para as câmaras incubadoras refrigeradas (B.O.D.), equipadas com controle de temperatura (21°C), sistema de fotoperíodo (12/12h) e três lâmpadas Osram presas em sua porta. Estes parâmetros permaneceram constantes durante todo o período de duração do cultivo. As bombas de aquário foram ajustadas dentro das câmaras para que todos os recipientes tivessem aeração. No total foram utilizadas três câmaras de B.O.D., uma para cada grupo. O bioensaio foi monitorado e durou uma semana, conforme esquema da Figura 7.

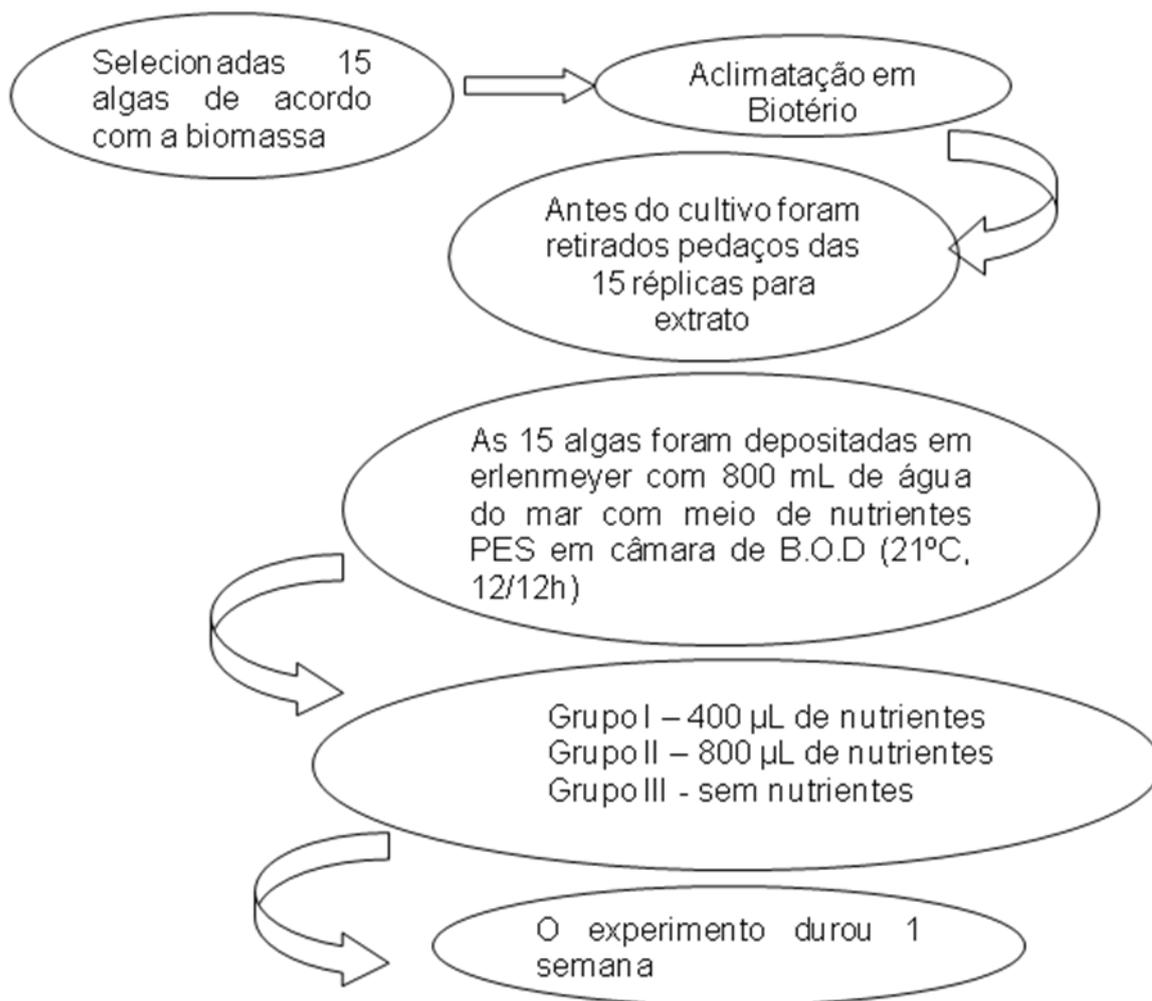


Figura 7 - Esquema do resumo da estratégia utilizada para o cultivo.

#### 4.5.4.1 – Análise Estatística

Os dados obtidos durante o cultivo experimental foram avaliados por análise variância (Anova). Para a análise estatística, foi estabelecida a forma de um delineamento inteiramente casualizado, constituído por dois tratamentos e um controle, com cinco repetições para cada um. Os dados foram comparados aplicando-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância utilizando-se para isto um programa de Sistema para Análises Estatísticas (V.9,0) – SAS.

## **4.6 – Parte Experimental III: Análise da variação do perfil químico antes e pós - cultivo**

### **4.6.1 – Preparo dos extratos**

Pedaços dos espécimes retirados antes do cultivo e as algas após o cultivo foram secos à temperatura ambiente para evitar fotólise, termodegradação dos metabólitos e cortados manualmente para obtenção do extrato bruto antes e pós - cultivo. A extração foi realizada com o solvente de polaridade intermediária diclorometano (HPLC, Tedia), sob maceração por 3 dias. O extrato foi filtrado com filtro de papel e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

### **4.6.2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As amostras do extrato bruto antes e pós - cultivo foram dissolvidas em metanol (HPLC, Tedia) na concentração de 10 mg / mL (p/v) e injetadas por gradiente de concentração (Tabela 6), através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que é uma técnica que apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do detector utilizado, independente da fase móvel, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004). Esta técnica foi empregada a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico dos extratos. As análises por CLAE neste estudo foram realizadas no aparelho:

1. Shimadzu, Modelo LC-20, com duas bombas LC20AT, a detecção feita no comprimento de onda fixo de 254 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M20A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20  $\mu$ L.

A coluna utilizada foi C-18 da Shim-Pack (5 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm) e o sistema de solvente, água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e Metanol. Foi utilizado um sistema de eluição com gradiente (com fluxo de 1mL / min.).

Tabela 6: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.

Tempo (min)	Concentração de Água Acidificada (pH 3,2)	Metanol
0	30	70
5	20	80
20	10	90
35	0	100
45	0	100

#### 4.7 - Experimental IV: Atividade Antioxidante do extrato bruto e frações

O extrato bruto e as frações (neutra e ácida) provenientes do fracionamento ácido-base foram submetidos à avaliação quanto à atividade antioxidante pelo método fotolorimétrico do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH – 0,1mM), juntamente com os padrões fenólicos (rutina, quercetina e BHT (butil-hidroxi-tolueno)) (Figura 8) (ref.).

Este método consiste na adição de 1 mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 100 µg / mL, em 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), sendo a reação processada em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (marca).

A capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH, que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina.

As amostras foram analisadas em triplicata, protegidas da luz com papel alumínio e a atividade sequestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de

substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT), Rutina e Quercetina.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculada conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorbância da solução de DPPH e  $A_{\text{Extr}}$  é a absorbância da amostra em solução de DPPH (Roesler *et al.*, 2007).

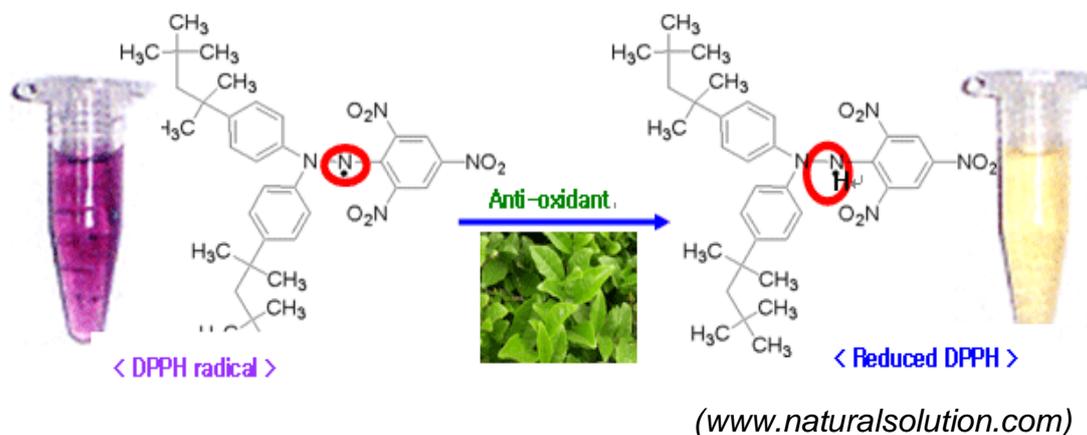


Figura 8 - Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante.

## 4.8 – Parte Experimental V: isolamento e identificação da substância majoritária

### 4.8.1 – Cromatografia em Camada Delgada do extrato bruto

Após o preparo do extrato bruto diclorometânico, foi realizada Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> em alumínio, com espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm), cortadas na medida de 4 cm de comprimento. As aplicações das amostras foram feitas a aproximadamente 0,5 cm acima da borda inferior e 0,5 cm de distância das

bordas laterais, o sistema de solvente utilizado foi diclorometano, acetato e metanol em várias proporções.

Após o desenvolvimento da cromatografia, foi utilizado um revelador físico (Sabudak et al., 2005) com leitura da placa em lâmpada de UV nos comprimentos de onda de 254 e 332 nm, devido à sílica estar pré-impregnada com material fluorescente. Como revelador químico utilizou-se a solução ácida de sulfato cérico, que é borrifado sob a placa cromatográfica, que depois de aquecida apresentou manchas coloridas.

#### **4.8.2 – Fracionamento ácido – base do extrato**

Após a avaliação por CCD, uma parte do extrato bruto (3,2g) foi submetida a fracionamento ácido-base. Este fracionamento foi realizado, para promover a separação dos ácidos orgânicos presentes no extrato. A amostra foi colocada em funil de separação e foi adicionado hidróxido de sódio 10% (NaOH) para a retirada de moléculas com características ácidas. Duas fases bem distintas foram formadas, mas a fase orgânica foi recolhida para lavagem com água destilada e a fase aquosa foi lavada com diclorometano e depois com ácido clorídrico (HCl) 50% até atingir pH entre 2 – 3. Após acidificação, a fase orgânica foi recolhida novamente para secagem à temperatura ambiente para obtenção de extrato orgânico ácido conforme Figura 9.

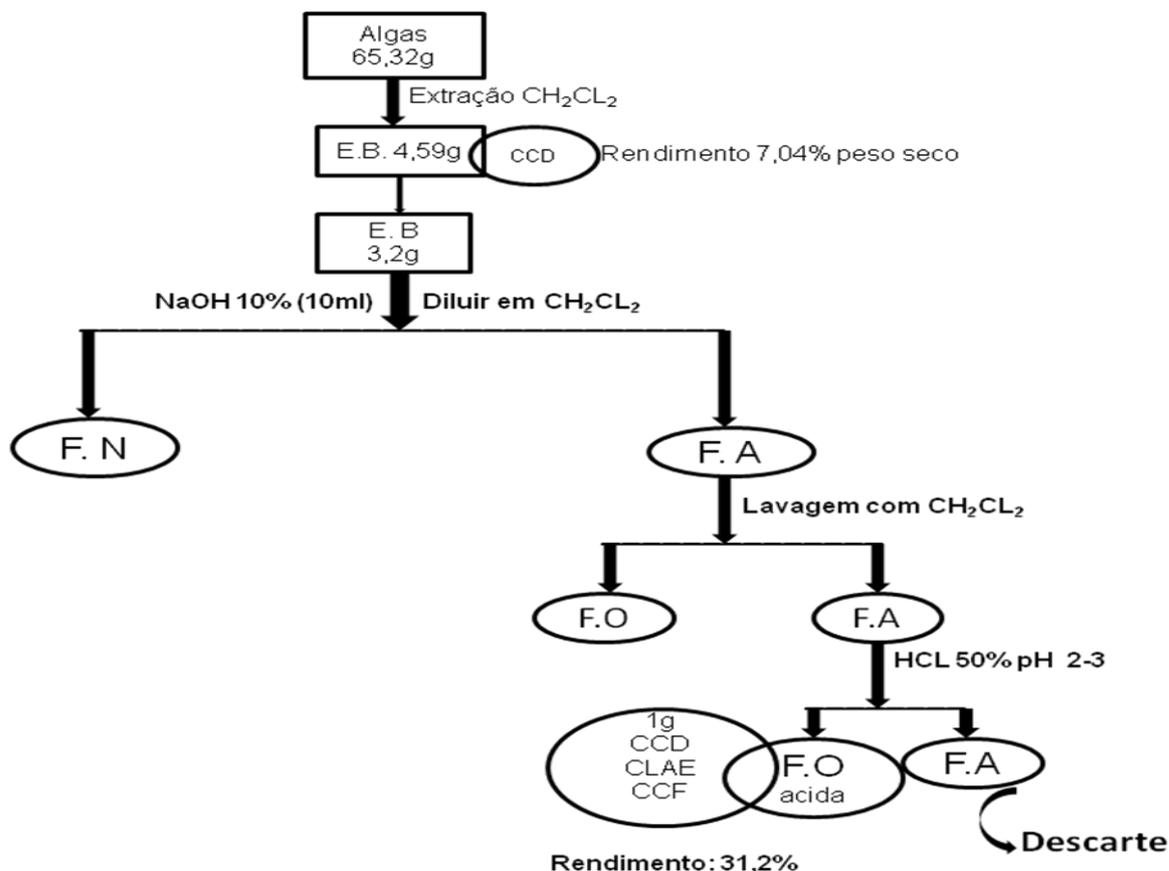


Figura 9 - Esquema ilustrativo do fracionamento acidobásico.

#### 4.8.3 – Purificação da fração orgânica por técnicas cromatográficas

A fração orgânica ácida (1,0 g) foi submetida à purificação em cromatografia de coluna aberta, cujas frações resultantes desta coluna foram analisadas por CCD. A sílica para preenchimento da coluna utilizada neste trabalho foi sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck), a eluição foi realizada em sistema de solvente em diferentes polaridades (hexano – 100% a 50%, acetato de etila – 100% a 50%, diclorometano – 100% a 50% e metanol – 100%).

O processo de fracionamento foi guiado pelas placas em CCD, onde as 150 frações eluídas da cromatografia em coluna aberta foram agrupadas em conjuntos de acordo com as cores e dos valores de retenção ( $R_f$ ) das manchas.

As frações F2, F3, F4, F5 foram reunidas para purificação por Cromatografia Preparativa (Cromatografia Líquida Preparativa, equipamento

Shimadzu, modelo LC-6AD SPD-20AV, CBM-20A, com detector UV/VIS) utilizando coluna (PREP – ODS kit preparativa 250x20mm, 5 mm, 100A). As frações reunidas foram injetadas em preparativa, com fluxo de 20 ml / min e sistema de solvente acetonitrila (ACN- HPLC, Tedia) 75% e água millique acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) (HPLC, Tedia pH 3,00). Os picos de majoritários foram recolhidos em frascos previamente pesados, as frações foram secas à temperatura ambiente e pesadas para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Ultravioleta (U.V), Infravermelho (I.V) conforme esquema representado pela Figura 10 (página 38).

#### **4.8.4 – Identificação e caracterização da substância majoritária**

Para a identificação e caracterização dos metabólitos isolados foi necessária a utilização de métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , que são técnicas espectroscópicas importantes para a elucidação estrutural da molécula. O RMN fornece o esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. A análise foi realizada em colaboração com a Profa. Luzineide Tinoco. A amostra foi solubilizada em clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) deuterado.

Os equipamentos utilizados foram:

- Varian 400 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN);
- Bruker 400 MHz do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Departamento de Bioquímica - UFRJ).

A espectroscopia de infravermelho também foi empregada, para tal, foi feita uma pastilha de brometo de potássio (KBr) seco, a qual foi prensada com 8 toneladas por 10 minutos. Esta pastilha foi usada como branco (background). Após, a pastilha foi impregnada com substância isolada e feita a leitura. O equipamento usado foi:

- Modelo Nicolet 6700 de Transformada de Fourier (Shimadzu) UFRJ com software IR solution.

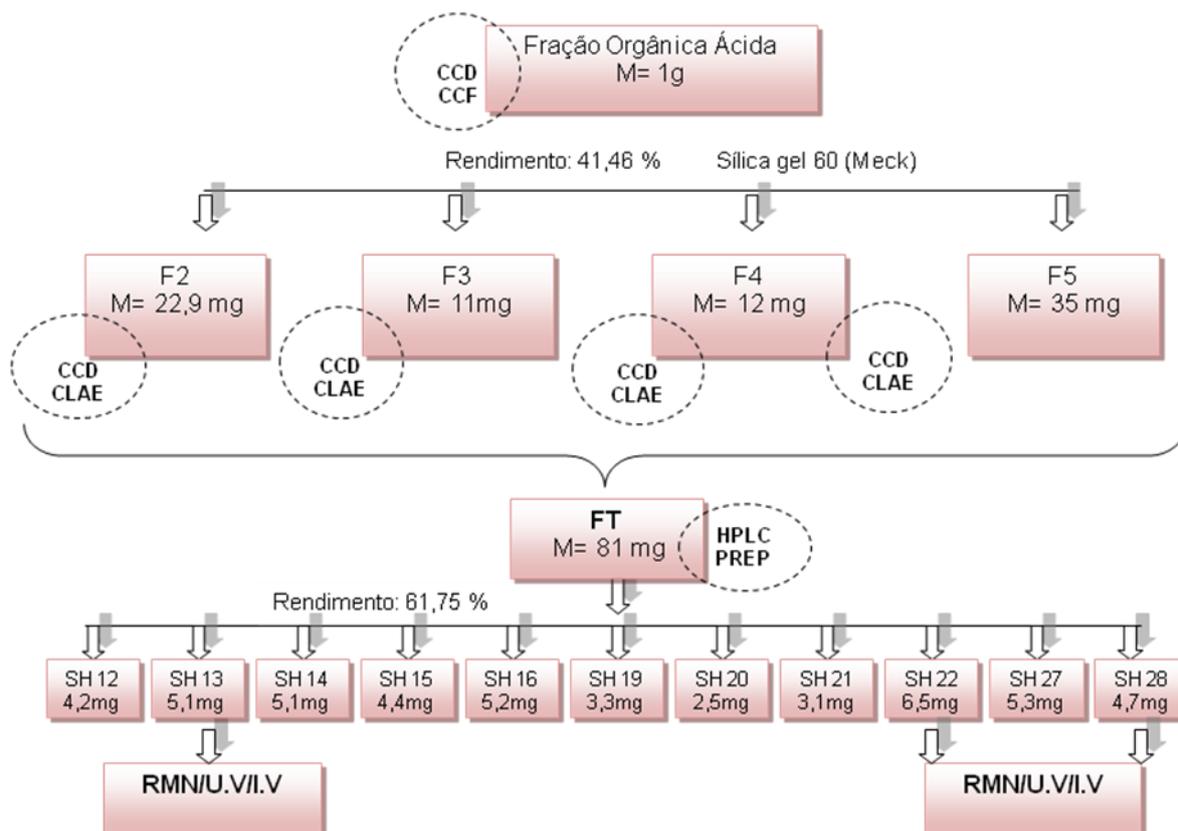


Figura 10 - Esquema da purificação e identificação da fração orgânica ácida.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Parte Experimental I: Composição química nutricional

As propriedades nutricionais das algas marinhas têm sido pouco estudadas quando comparadas às plantas terrestres (Li et al., 2006). Estudos relatam que as algas marinhas, em particular as comestíveis contêm quantidades significativas de proteínas e lipídios (Norziah e Ching, 2000).

Lipídios é um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Fornecem maiores taxas de energia, quando transformados pelas enzimas, transportam vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e possuem ácidos graxos poli-insaturados em sua composição (Monteiro et al., 2003).

É importante ressaltar que atualmente a qualidade nutricional de um alimento para o consumo humano está baseada na concentração de ácidos graxos da série n-3, principalmente o eicosapentaenóico (20:5n-3, **EPA**) e o docosahexaenóico (22:6n-3, **DHA**), que atuam na prevenção de uma série de doenças como as cardiovasculares, a arterioesclerose, o reumatismo, o câncer e a artrite. Em crianças na idade pré-escolar, estes ácidos graxos desempenham um importante papel tanto na formação dos tecidos neurais como da retina e no desenvolvimento da inteligência (Khotimchenko et al., 2002).

Atualmente há uma tendência em produzir alimentos nutricionalmente mais saudáveis para o consumo humano (Matanjun et al.,2009). Desta forma dentre as pesquisas desenvolvidas neste trabalho, o estudo quanto à quantificação dos lipídios e proteínas foi realizado. A Tabela 7 mostra o teor de proteína e lipídio encontrado na alga parda *Styopodium zonale*.

Tabela 7: Teores de lipídios totais e proteínas a partir da alga *Styopodium zonale* em relação à porcentagem do peso fresco com média e desvio padrão.

Amostra	*Lipídios Totais (%)	*Proteínas Totais (%)
<i>Styopodium zonale</i>	1,7±1,23	25,22±1,54
Referência	1-5	10-17

\* triplicata

Estes resultados mostram que o teor de lipídios totais em torno de 1,7% em relação ao peso fresco em *Styopodium zonale* encontra-se dentro dos valores relatados na literatura para algas marinhas pardas (1 – 5%). De um modo geral, as algas verdes apresentam níveis maiores de lipídios, daí sua maior utilização na produção de biocombustíveis, do que as algas vermelhas e pardas (Burtin, 2003, Renaud e Luong – Van, 2006).

Assim como os lipídios, as proteínas são um dos componentes bioquímicos mais importantes na biomassa de algas, apresentam funções importantes em todos os processos biológicos. Dentre suas atividades estão a catálise enzimática, transporte e armazenamento, sustentação, crescimento e controle da diferenciação celular (Sukran, 2003).

Em alguns estudos, foi possível observar o teor de proteína em espécies de algas, por exemplo, as algas vermelhas (Rhodophyta) apresentam valores máximos de proteína bruta em relação ao peso fresco de 35,3% em *Soliera robusta*, 32,10% em *Acanthophora delilei* Lamour e 28,40% em *Porphyra spp*, enquanto que o menor valor registrado foi de 10,1% na alga parda *Dictyota bartayresiana* (Ortiz, 2006).

O teor de proteína em algas pardas (Phaeophyta) é geralmente uma média de 10-17% do peso fresco, em relação aos teores de proteínas registrados para algas vermelhas (Rhodophyta) e verdes (Chlorophyta), que é em torno de 21-35% do peso fresco (Ortiz, 2006). A análise de proteínas totais em *Styopodium zonale* revelou uma concentração de 25,22%, teor superior aos valores registrados para outras espécies da mesma classe (Phaeophyta), o que torna esta alga importante fonte protéica para futuras aplicações em indústria e tecnologia de alimentos.

Estes primeiros relatos sobre a composição de lipídios e proteínas da macroalga *S. zonale* vêm sugerir e impulsionar as pesquisas da utilização de fontes marinhas como alimento funcional.

## **5.2 – Parte Experimental II: Cultivo da macroalga *Styopodium zonale***

### **5.2.1 – Determinação da variação de biomassa**

As algas marinhas utilizam a fotossíntese como processo fisiológico para a produção de matéria-prima orgânica, desta forma, determinar a biomassa é o primeiro procedimento quando se deseja conhecer o papel, a importância e a dinâmica das algas marinhas em seu ecossistema bem como, avaliar o fluxo de energia e estimar o estoque de nutrientes que são produzidos para o ambiente marinho (Pompeu, 1999, Reis, 2003).

A variação de biomassa de qualquer espécie de alga submetida à técnica de cultivo representa uma medida de adaptação às condições nutricionais, ou seja, de que forma os espécimes utilizam os componentes do alimento artificial, para a produção de matéria orgânica.

O cultivo de algas é abordado na maioria dos estudos, com o objetivo de produção sustentável para a extração de matéria-prima como o ágar, pois sua demanda está crescendo e como consequência das exigências do mercado vem se observando a exploração dos estoques naturais. Nesse sentido, o cultivo é uma alternativa para diminuir a pressão dos estoques naturais e promover o desenvolvimento de regiões costeiras (Neto, 2009).

Até o momento não foram registrados estudos da alga *S. zonale* quando submetida ao cultivo sob diferentes condições nutricionais, sendo este o primeiro relato. Neste cultivo os espécimes foram submetidos a diferentes concentrações de meio de nutrientes, o grupo I recebeu 400  $\mu\text{L}$ , o grupo II recebeu 800  $\mu\text{L}$ , e o grupo III (controle) não recebeu nutriente. A variação de biomassa é representada pelas letras, massa inicial (A) e massa final (D).

Os resultados de biomassa obtidos durante o cultivo podem ser visualizados na Figura 11.

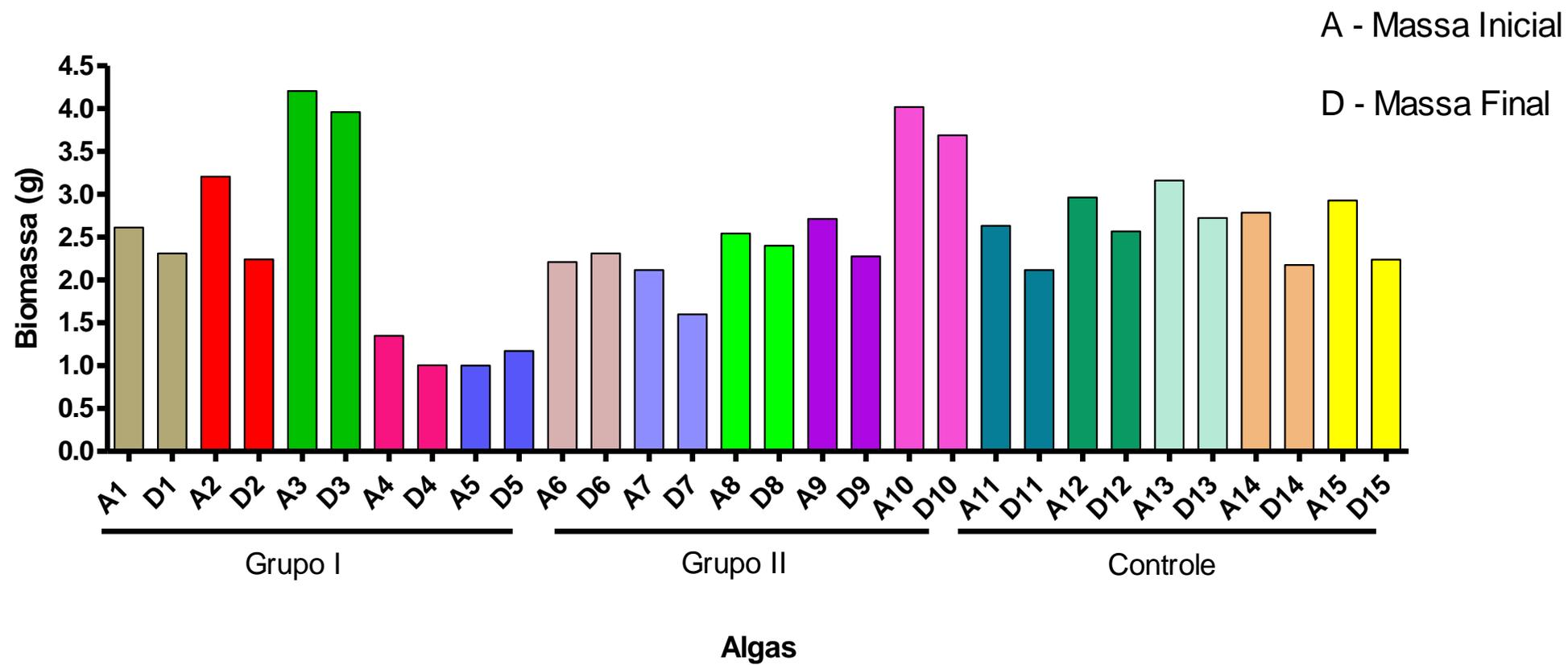


Figura 11 – Gráfico de variação de biomassa das algas do cultivo.

Os valores registrados de biomassa das algas variaram consideravelmente, tanto para as algas do grupo I (400  $\mu$ L), quanto para as algas do grupo II (800  $\mu$ L), e o grupo III (controle). Das 15 réplicas, 13 (86,66%) apresentaram redução de biomassa.

Na redução de biomassa visualizada, foi possível observar que a alga 2 (grupo I), foi o espécime que mais apresentou porcentagem de variação negativa, em torno de 30 %, ao passo que os espécimes 4 (25,42% - grupo I), seguido das réplicas 7 (24,18% - grupo II), 15 (23,67% - grupo III) e 14 (21,96% - grupo III), a diminuição da biomassa permaneceu em torno de 21% a 26%.

Para as réplicas 11 (19,63% - grupo III), 9 (16,24% - grupo II), 13 (13,88% - grupo III), assim como a réplica 12 (13,41% - grupo III) e 1 (11,58% - grupo I), após o cultivo, a redução da biomassa foi considerada intermediária, visto que, variou negativamente de 11% a 19%.

Dentre as algas que perderam biomassa após o experimento, as réplicas 8 (5,6% - grupo II), seguidas de 3 (5,88% - grupo I) e 10 (8,23% - grupo II), foram o grupo que apresentou menor variação negativa.

Em relação às réplicas que obtiveram ganho de biomassa, a alga 5 (17% - grupo I), maior variação positiva, seguida da alga 6 (5% - grupo II) se destacaram, durante o período de cultivo, este crescimento pode estar atrelado ao seu estado físico, bem como ao aproveitamento do requerimento de luz, através da fotossíntese, com transformação em energia química para a produção de matéria orgânica.

Ao analisar a variação de biomassa entre os grupos, observa-se que os espécimes do grupo II (800  $\mu$ L) apresentaram menor variação negativa de biomassa, em torno de 13,56%, seguido do grupo I (400  $\mu$ L), com variação de 18,22% e, posteriormente do grupo III (controle), com 18,51% de variação.

Embora, a maioria dos espécimes, apresente redução de biomassa, cada réplica reagiu à modificação nutricional de maneira intrínseca. Variação entre indivíduo é observada na literatura para a macroalga vermelha *Asparagopsis armata*. Neste trabalho, fica evidente a variação da susceptibilidade da alga entre distintas etapas de seu ciclo de vida e entre os

gêneros da espécie, havendo um maior consumo por parte do herbívoro sobre o gametófito masculino. A fase mais consumida foi a de maior conteúdo de nitrogênio e menores níveis de metabolitos secundários de defesa (Vergés *et al.*, 2008).

Estudos relatam que o cultivo das algas dos gêneros *Gracilaria*, *Eucheuma* e *Kappaphycus*, feito em um sistema extensivo, sem adição de nutrientes e tratamento com produtos químicos, tem a taxa de crescimento bem como, a produção de biomassa, como parâmetros utilizados para avaliar o desempenho das algas para fins de maricultura, considerando que as taxas de crescimento são intrínsecas a uma dada espécie em resposta aos fatores ambientais (Pinto *et. al.*, 2009).

Vale ressaltar que fatores abióticos como: a intensidade luminosa constante durante a exposição dos espécimes ao cultivo, a aeração do meio, que é um fator de promoção da dissolução de oxigênio e de outras substâncias, favorece o aproveitamento algal, bem como, a fonte ou concentração de nitrogênio podem afetar o crescimento e composição bioquímica em cultivo, atingindo diretamente a produtividade e a composição bioquímica da biomassa obtida (Hardy *et al.*, 2000).

O estado físico de cada indivíduo, as condições de cultivo e o período de cultivo são determinantes na resposta de aumento ou diminuição de biomassa algal devido às alterações ambientais para as diferentes espécies (Santeiro, 2006).

A variação negativa de biomassa das algas foi estatisticamente significativa nas diferentes concentrações de nutrientes e controle (Anova, Tukey  $P < 0,05$ ). Estes resultados expressam que a variação negativa da biomassa pode estar relacionada, ao estado fisiológico das réplicas e também aos fatores ambientais relacionados ao experimento.

É importante ressaltar que o litoral de Búzios, lugar onde as algas foram coletadas, passou por ressacas na mesma época, e este fato pode ter influenciado nas condições físicas dos espécimes.

De maneira geral o cultivo mostrou-se viável tecnicamente, podendo ser expandido para outras espécies de algas ou para execução de outros bioensaios.

### **5.3 – Parte experimental III: Análise da variação do perfil químico antes e pós – cultivo**

Espécies de algas apresentam variações na produção de metabólitos secundários qualitativamente e/ou quantitativamente. Essas variações podem ser genética e ambientalmente controladas, ou até mesmo resultantes de pressões ecológicas locais (Edwards et al., 2006).

Variações na produção de metabólitos intra-específicas ou intra-populacionais, podem ser observadas entre diferentes fases do ciclo de vida de uma espécie (Lopanik et al., 2006), bem como variações internas ao corpo do organismo como tamanho, idade e tipo de tecido (Ward, 2007).

Sendo assim, as pesquisas realizadas no âmbito da variabilidade qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários de macroalgas marinhas sugerem que o nível de variação intra-específica pode ser induzida por características genéticas ou condicionadas por fatores ambientais (Salgado et al., 2008; Sudatti et al., 2008; Pereira e Da Gama, 2008) e, dependendo do tempo de exposição, estes fatores podem gerar mudanças fenotípicas intra-específicas em populações naturais de algas marinhas (Pavia e Brock, 2000).

O cultivo do gênero *Styopodium*, a partir de diferentes condições nutricionais reflete a importância das respostas químicas, para o conhecimento desta espécie e podem ser visualizadas nas Figuras 12, 13, 17, 18, 21, 22 e Tabelas 8, 9, 10, 11, 12, 13.

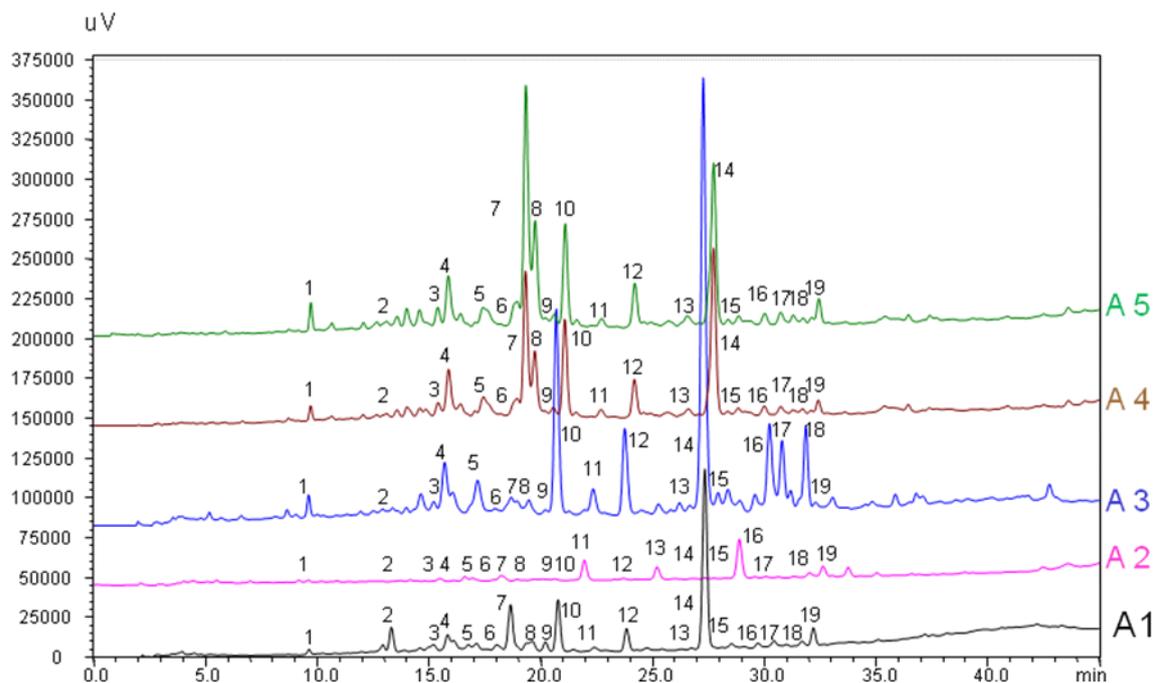


Figura 12 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo I (400 µL) antes do cultivo.

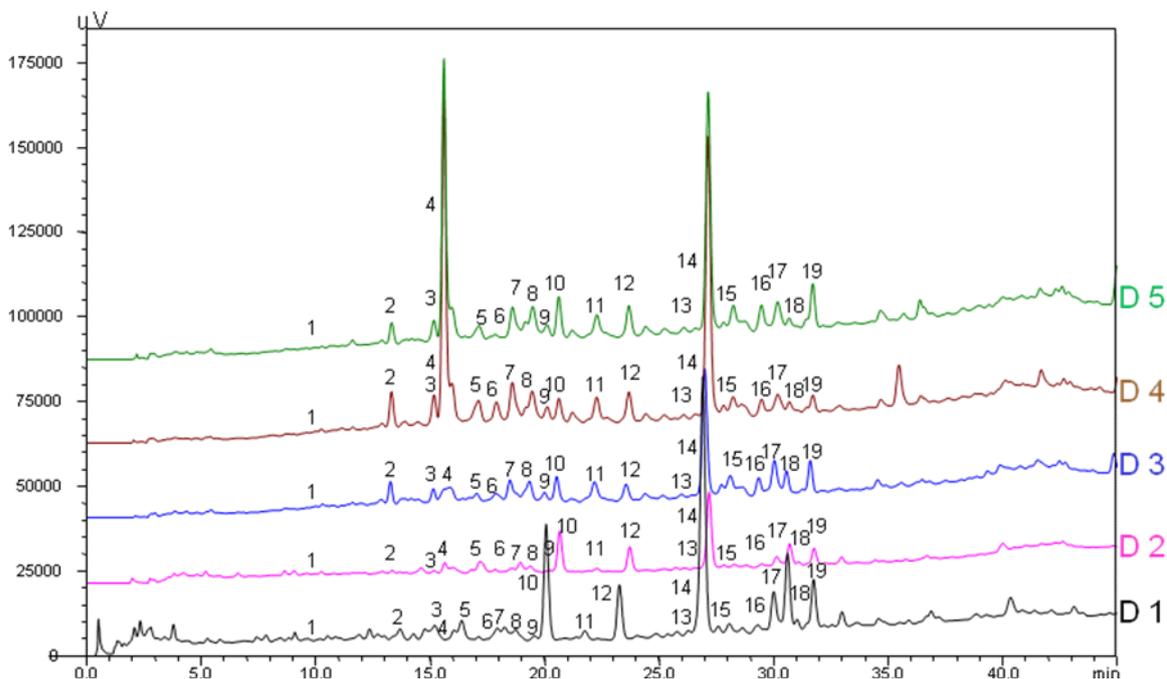


Figura 13 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo I (400 µL) pós - cultivo.

Tabela 8 – Picos assinalados do grupo I antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa . T. R (Tempo de Retenção)  $\lambda$  (comprimento de onda (nm)) e % A. R. (% Área Relativa) \_ (picos comentados) \_ (picos majoritários)

Pico	A1			A2			A3			A4			A5		
	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.
1	9.649	199	0.8255	9.047	197	1.3844	9.627	199	1.3476	9.720	199	1.4530	9.726	197	1.8596
2	13.323	199	5.1397	-	-	-	13.383	197	0.5121	13.578	199	0.8749	13.113	199	0.8870
3	15.202	200	0.3788	-	-	-	15.219	200	0.9283	15.414	200	1.6824	15.397	199	1.7810
4	15.901	200	3.1265	-	-	-	15.707	200	3.3405	15.883	200	6.6191	15.870	200	5.1112
5	16.765	200	0.9131	16.946	200	0.1256	17.177	200	4.3147	17.439	200	4.1806	17.422	199	3.5590
6	17.133	199	1.3690	-	-	-	17.984	200	0.6776	18.946	200	3.2385	18.945	200	3.3704
7	18.651	201	11.6595	18.006	200	1.0234	18.677	201	1.6258	19.318	200	19.7515	19.337	200	25.6473
8	19.624	201	2.4394	-	-	-	19.467	201	1.3089	19.733	201	8.6219	19.751	200	10.9757
9	20.212	201	1.9330	-	-	-	20.214	200	0.3003	20.213	201	0.5660	20.217	200	0.7467
10	20.774	202	11.5932	-	-	-	20.692	201	12.5564	21.073	201	10.4513	21.095	201	11.1979
11	22.395	201	0.9871	21.956	201	4.4326	22.339	201	1.7020	22.693	201	1.2735	22.722	201	0.6865
12	23.836	201	5.2592	-	-	-	23.752	201	5.6132	24.186	201	5.4360	24.201	201	4.8476
13	-	-	-	27.154	201	33.5031	26.659	201	0.5440	26.598	201	1.0859	26.551	201	1.3019
14	27.332	202	41.9904	-	-	-	27.264	201	27.9164	27.719	200	29.4424	27.726	202	22.8292
15	28.530	201	1.0484	-	-	-	27.923	201	1.3811	28.826	201	0.4382	28.845	201	0.6401
16	29.710	201	0.8673	30.673	201	7.5985	30.221	201	6.4287	29.994	201	1.4750	30.011	201	1.4138
17	30.430	201	1.0892	-	-	-	30.765	201	4.3642	30.725	201	1.2990	30.726	204	1.4598
18	31.678	203	0.9632	31.728	201	6.2400	31.846	201	4.9502	31.572	201	6.4047	31.283	201	0.6633
19	32.185	201	3.5391	32.932	201	2.0794	33.045	201	0.6420	32.406	201	1.5728	32.432	201	2.1257

Tabela 9 – Picos assinalados do grupo I pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa. T. R. (Tempo de Retenção)  $\lambda$  (comprimento de onda nm) e % A.R. (% Área Relativa) (picos comentados)(picos majoritários

Pico	D1			D2			D3			D4			D5		
	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx.(nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.
1	9.073	197	0.5611	9.056	197	1.4306	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	13.396	199	0.9081	-	-	-	13.254	199	4.3123	13.303	199	2.7948	13.309	199	2.3228
3	15.239	199	0.4831	15.246	200	1.4789	15.127	200	2.3568	15.154	200	2.1537	15.151	200	1.7614
4	-	-	-	15.628	200	2.5565	15.864	200	6.1410	15.588	200	26.2453	15.588	200	23.0264
5	17.252	201	2.1583	17.162	201	6.7034	17.018	199	0.9706	17.097	199	2.2882	17.118	201	2.0644
6	18.742	200	1.4077	-	-	-	17.856	200	1.4837	17.882	200	1.6256	-	-	-
7	19.052	200	1.5287	18.927	199	2.8707	18.475	200	5.1776	18.577	200	3.9858	18.585	201	3.8281
8	19.510	200	1.6303	19.336	200	2.0142	19.319	200	5.1744	19.441	200	3.1989	19.467	201	3.9676
9	20.297	201	0.4398	-	-	-	19.982	201	1.2583	20.097	201	1.3260	20.092	201	1.4374
10	20.787	201	15.3942	20.644	201	15.9806	20.511	201	4.7744	20.608	201	1.9630	20.602	201	3.8199
11	22.409	201	1.0502	22.230	201	3.8756	23.167	201	4.9299	22.258	201	2.8376	22.267	201	2.6774
12	23.852	200	5.4949	23.701	201	9.8813	23.544	201	3.5977	23.666	200	2.7452	23.665	201	3.1767
13	26.260	201	0.5308	26.854	201	1.3789	25.974	201	0.5660	26.549	201	0.4081	26.549	201	0.2920
14	27.342	200	27.8655	27.169	201	34.6932	26.977	201	26.0572	27.123	201	24.0457	27.126	201	22.8561
15	28.452	200	1.1240	27.736	201	1.2509	28.095	201	3.0820	28.220	201	2.1723	28.228	201	1.6601
16	30.312	201	4.2135	30.121	201	3.9158	29.333	200	2.8391	29.461	200	1.3871	29.457	201	2.7894
17	30.889	201	9.6400	30.687	201	8.5735	30.020	201	6.7588	30.165	201	2.2813	30.164	201	3.3563
18	31.283	201	0.7813	-	-	-	30.546	201	3.8786	30.671	201	0.6674	30.660	201	0.6965
19	31.977	201	4.8733	32.955	201	2.2126	31.585	201	5.6813	31.698	201	1.2342	31.693	201	3.7678

Para analisar os cromatogramas e as Tabelas dos grupos I, II e III (controle) antes e pós – cultivo foi utilizado como critério, picos que possuem percentual de área relativa igual ou superior a 5%. O alinhamento dos cromatogramas possibilitou a observação do aumento/diminuição dos perfis entre as réplicas. Após a seleção destes picos, foi possível visualizar os semelhantes, entre as réplicas e depois observou se estes mesmos picos estavam presentes no grupo I, II e III antes e após o cultivo conforme Figuras 14, Figura 15 e Figura 16.

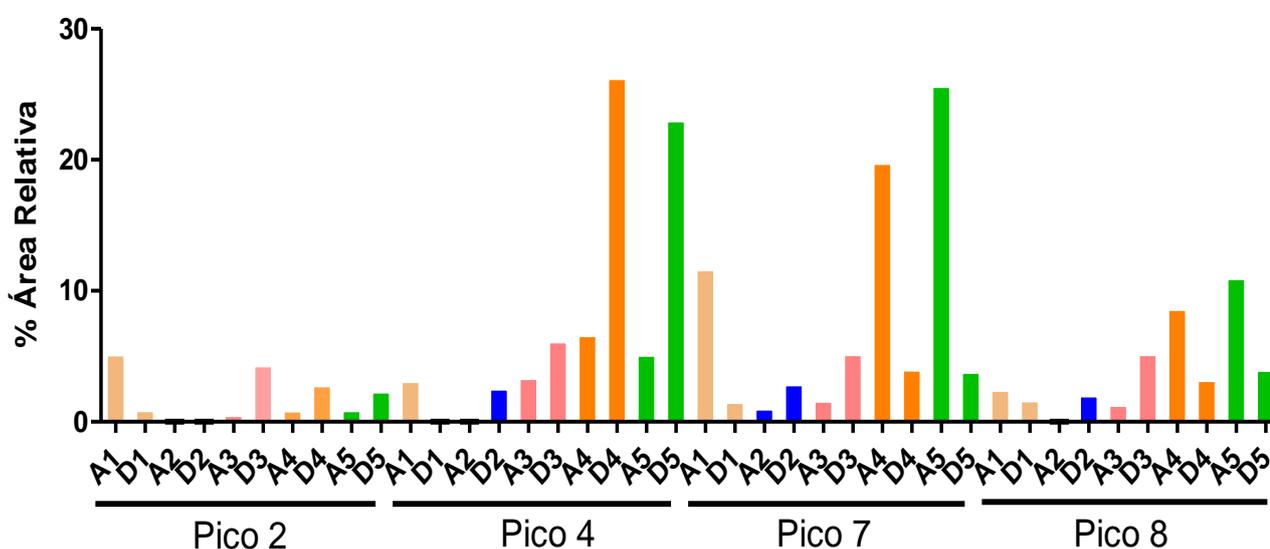


Figura 14 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

Desta forma, se pode verificar que o pico 2, apresenta área de 5, 13% na réplica 1 antes do cultivo, tem sua área diminuída consideravelmente após o cultivo da mesma (D1 com 0,9081%). Nas demais réplicas (antes e após o cultivo) a área deste pico não apresenta porcentagem em torno de 5%.

Já o pico 4, dobra sua área para a réplica 3 (A3 - 3,34% / D3 - 6,14%), sendo este aumento significativo. Para as réplicas 4 e 5 após o cultivo se pode observar um aumento muito intenso (D4 - 26,24%) e (D5 - 23,02%) Na réplica 1 este pico permaneceu abaixo de 5% e para a réplica 2 este pico não foi listado.

Para a área do pico 7 se nota uma diminuição intensa após o cultivo das réplicas 1 (A1 - 11,65% / D1 - 1,52%), 4 (A4 - 19,75% / D4 - 3,98%) e em 5 (A5 - 25,64%, este pico é o majoritário, e D5 - 3,82%). Entretanto, se observa um efeito contrário, ou seja, um aumento do percentual de área após o cultivo para as réplicas 2 (A2 - 1,02% / D2 - 2,87%) e 3 (A3 - 1,62% / D3 - 5,17%).

Ao observar o pico 8, se pode verificar que o percentual de área diminuiu pouco na réplica 1 (A1 - 2,43% / D1 - 1,63%), enquanto que para as réplicas 4 (A4 - 8,62% / D4 - 3,96%) e 5 (A5 - 10,97% / D5 - 3,96%) esta redução foi significativa. Na réplica 2 antes do cultivo, este pico não foi detectado, porém após o experimento apresentou-se visivelmente com 2,01% de área, enquanto um aumento na concentração deste pico para a réplica 3 (A3 - 1,30% / D3 - 5,17%) foi verificado.

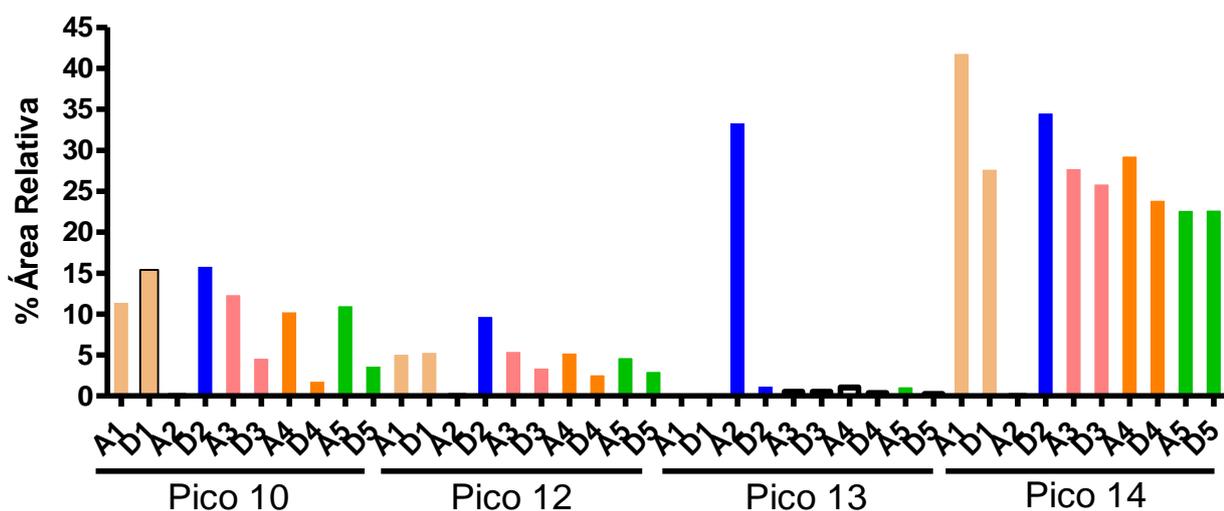


Figura 15 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

De acordo com a análise do pico 10 se pode observar que o mesmo, tem sua área levemente aumentada na réplica 1 após o cultivo (A1 - 11,59% / D1 - 15,39%), tornando-se este aumento significativo na réplica 2 com área em torno de 15,98%, porém nas réplicas 3, 4 e 5 ocorre uma inversão da intensidade da área, através da diminuição acentuada deste pico após o cultivo (A3 - 12,55% / D3 - 4,77%), (A4 - 10,45% / D4 - 1,96%) e (A5 - 11,19% / D5 - 3,81%).

A área correspondente ao pico 12 permanece com percentual acima de 5% após o cultivo na réplica 1 (A1 - 5,25% / D1 - 5,49%) , tornando - se este visível e acentuado para a réplica 2 (D2 - 9,88%), com uma leve diminuição após o cultivo para as réplicas 3 (A3 - 5,61% / D3 - 3,59%), 4 (A4 - 5,43% / D4 - 2,74%) e 5 (A5 - 4,84% / D5 - 3,17%).

Foi possível visualizar que o pico 13, apresenta área percentual significativa e majoritária apenas para a réplica 2 antes do cultivo (A2 - 33,50%), após o experimento se observa uma diminuição acentuada deste pico (D2 - 1,37%), enquanto que nas demais réplicas antes e após o cultivo a concentração desta área foi inferior a 5%.

Para a área referente ao pico 14, se pode verificar que em todas as réplicas antes e após o bioensaio, este pico permanece majoritário e acentuado, entretanto uma diminuição significativa da área é visível na alga 1 (A1 - 41,99% / D1 - 27,86%), em relação às algas 3 (A3 - 27,91% / D3 - 26,05%) e 4 (A4 - 29,44% / D4 - 24,04%), que se pode observar em uma redução pequena da área relativa. Ao mesmo tempo, um aumento inexpressivo de área na alga 5 pode ser visualizado (A5 - 22,82% / D5 - 22,85%), enquanto que na réplica 2 após o cultivo (D2 - 34,69%), este pico se torna detectável com área majoritária em relação às demais réplicas.

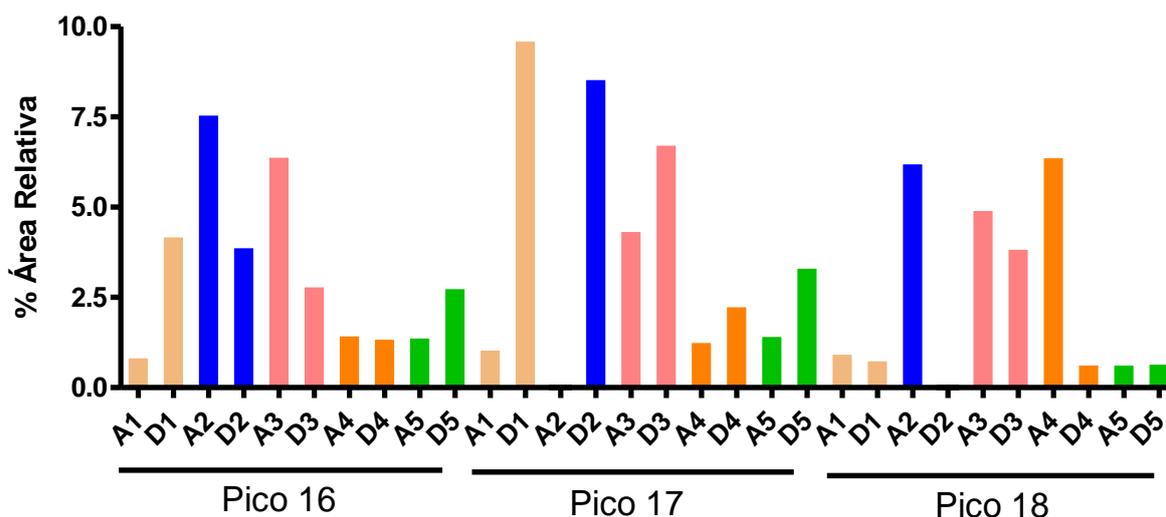


Figura 16 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

Já pico 16 apresenta área superior a 5% antes do cultivo, somente nas réplicas 2 (A2 - 7,59%) e 3 (A3 - 6,42%) em relação às demais, que se observa pico inferior a 5%. Desta forma após o cultivo a área correspondente a este pico diminuiu a metade do percentual na alga 2 (D2 - 3,91%) e 3 (D3 - 2,83%) e se pode verificar que nas outras algas permaneceu abaixo de 5%.

Ao analisar o pico 17, se pode visualizar, que todas as algas antes do cultivo, se apresentam inferior a 5%, porém após a realização do experimento, esta área relativa aumentou consideravelmente nas réplicas 1 (D1 - 9,64%), 2 (D2 - 8,57%) e 3 (D3 - 6,75%), enquanto que nas algas 4 (D4 - 2,28%) e 5 (D5 - 3,35%) este pico permanece abaixo de 5% de percentual de área.

Ao visualizar o pico 18, se pode observar que na réplica 2 (A2 - 6,24%) após o cultivo este pico não foi detectado, enquanto que a alga 4 (A4 - 6,40%) apresenta redução acentuada do percentual de área (D4 - 0,66%), nas demais réplicas foi verificado área relativa inferior a 5%.

Vale ressaltar que cada espécime da macroalga *S. zonale* do grupo I (400 µL), apresentou uma extensa variação no perfil químico das réplicas representadas pelos picos coincidentes com percentual de área igual ou superior a 5%. A variação seja ela, positiva e/ou negativa pode ser provocada por mudanças nutricionais, que atingem uma série de fatores extrínsecos bióticos e abióticos (Pavia & Brock, 2000, Soares, 2005). É importante ressaltar que cada réplica deste grupo apresentou alterações químicas às condições nutricionais.

As algas correspondentes ao grupo II, numeradas de 6 a 10, receberam 800 µL de meio de nutrientes PES e foram expostas às mesmas condições ambientais.

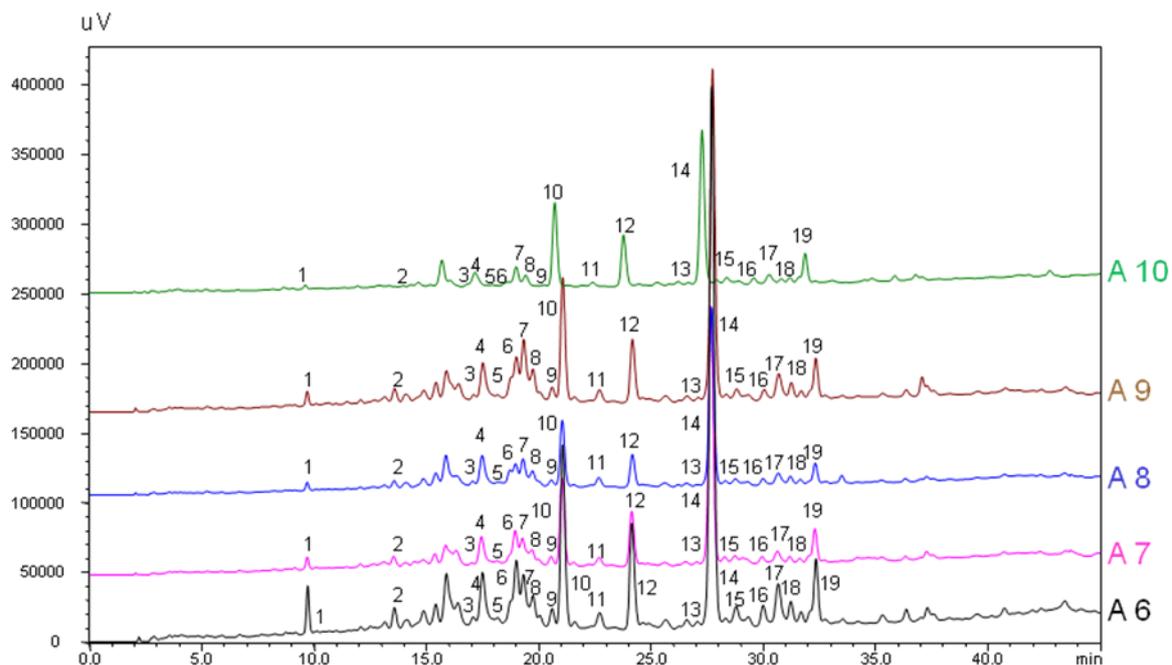


Figura 17 – Cromatograma de Variação do perfil químico das réplicas do grupo II (800  $\mu$ L) antes do cultivo.

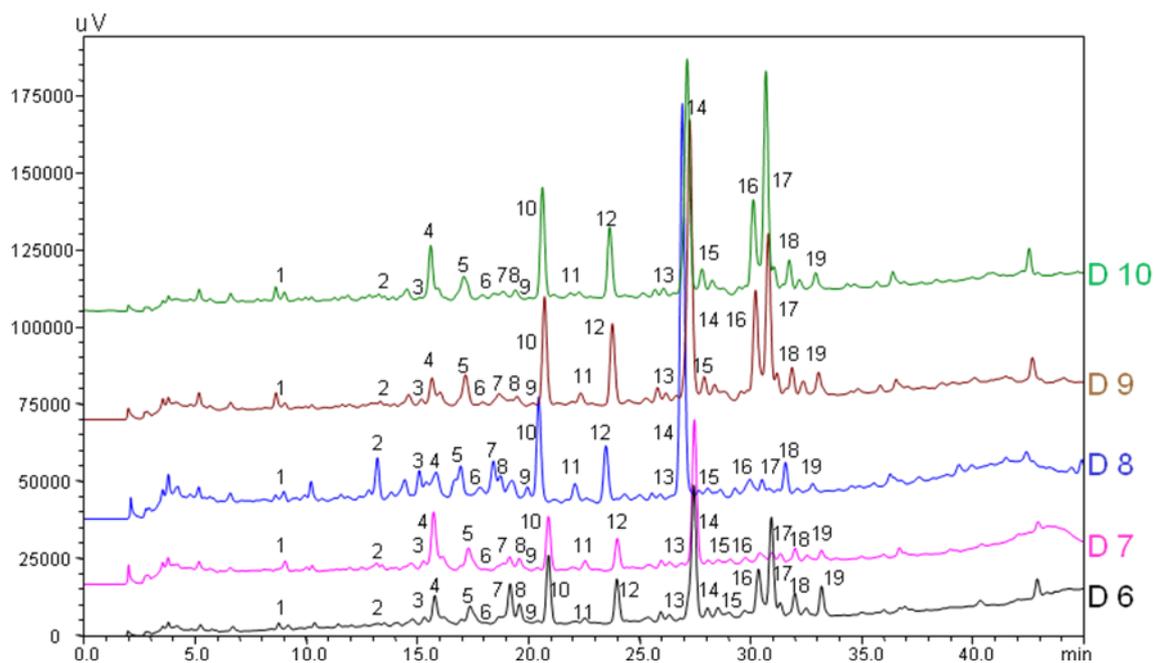


Figura 18 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do grupo II (800  $\mu$ L) pós - cultivo.

Tabela 10 – Picos assinalados do grupo II antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa. T. R (Tempo de Retenção) λ (comprimento de onda (nm)) e % A.R. (% Área Relativa) \_ (picos comentados) \_ (picos majoritários)

Pico	A6			A7			A8			A9			A10		
	T. R.	λ máx. (nm)	% Á. R.	T.R.	λ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	λ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	λ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	λ máx. (nm)	% Á. R.
1	9.725	199	2.5882	9.707	196	0.9355	9.704	197	0.8341	9.704	198	0.7862	9.620	199	0.5222
2	13.585	199	1.1407	13.553	198	1.0815	13.572	199	0.9474	13.592	199	1.0726	-	-	-
3	17.089	197	0.7618	-	-	-	17.064	199	0.4921	17.113	197	0.6239	-	-	-
4	17.504	200	4.3137	17.456	200	4.7531	17.490	199	5.3744	17.523	199	4.7025	17.173	199	3.8621
5	18.185	200	0.7652	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	19.009	202	5.4314	18.961	200	5.8262	18.977	200	3.2087	19.011	200	5.9529	-	-	-
7	19.327	201	3.2786	19.281	201	4.0648	19.306	200	4.5168	19.338	200	6.0556	19.000	200	3.9828
8	19.751	201	1.9817	19.704	200	2.0756	19.725	200	2.9377	19.750	200	2.9055	19.425	200	2.2921
9	20.606	201	1.0567	20.558	201	1.1673	20.567	201	0.9171	20.606	200	1.2519	-	-	-
10	21.070	201	9.5034	21.044	201	9.9418	21.054	201	10.5573	21.075	201	10.2255	20.717	200	16.0132
11	22.720	201	0.9106	22.695	201	1.0408	22.681	201	1.3521	22.708	200	0.9893	22.408	201	0.8436
12	24.148	201	5.9386	24.143	201	6.1520	24.175	201	5.2594	24.176	201	5.3082	23.777	201	10.4122
13	26.597	201	0.5756	26.542	202	0.5528	26.581	201	0.5437	26.607	201	0.4980	26.662	201	0.2541
14	27.711	201	29.6444	27.664	200	30.8657	27.697	201	29.8505	27.741	201	28.7250	27.274	201	30.9538
15	28.788	201	1.5326	28.740	201	1.2991	28.766	201	0.6693	28.817	201	0.6225	28.374	201	0.8668
16	30.663	201	2.9367	29.947	201	0.9766	29.992	201	1.2005	30.042	201	1.0553	29.576	201	1.3191
17	31.224	201	1.3001	30.631	201	2.0606	30.665	201	2.5974	30.684	201	2.8690	30.260	201	2.3954
18	31.682	201	0.7060	31.178	201	0.7473	31.205	201	1.3154	31.246	201	1.4278	31.180	201	1.0532
19	32.349	201	3.8535	32.298	201	4.3217	32.312	201	3.4295	32.339	201	3.7071	31.863	201	5.4276

Tabela 11 – Picos assinalados do grupo II pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa. T. R (Tempo de Retenção)  $\lambda$  (comprimento de onda (nm)) e % A.R. (% Área Relativa) \_ (picos comentados) \_ (picos majoritários)

Pico	D6			D7			D8			D9			D10		
	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.
1	9.204	199	0.5226	9.062	196	1.4236	9.573	199	0.3398	9.050	199	0.3966	9.030	199	0.6080
2	-	-	-	-	-	-	13.213	199	2.9588	-	-	-	-	-	-
3	15.334	199	0.9753	14.400	199	0.6127	15.100	199	1.6892	15.196	199	0.5770	-	-	-
4	15.798	200	4.6454	15.745	200	11.8389	15.857	199	3.0094	15.671	199	2.5913	15.612	199	4.4121
5	17.384	200	3.5344	17.311	200	5.5179	16.960	199	2.2595	17.177	199	3.3098	17.104	199	3.4076
6	-	-	-	-	-	-	17.835	200	0.7970	-	-	-	-	-	-
7	19.188	201	5.7362	19.166	201	2.6172	18.436	200	2.9839	18.690	200	1.1313	18.421	200	0.8074
8	19.609	201	2.8194	19.603	200	2.6112	18.749	200	1.5930	19.495	200	0.4491	18.870	200	0.8452
9	-	-	-	-	-	-	19.272	201	1.9896	-	-	-	-	-	-
10	20.913	201	9.0684	20.911	201	8.8685	20.477	201	7.8471	20.736	201	8.6845	20.640	200	8.8515
11	22.550	201	0.5771	22.560	201	1.4546	22.112	201	1.4531	22.365	200	0.8198	22.297	201	0.4835
12	23.993	201	5.8867	24.013	201	5.1373	23.497	201	4.4823	23.789	201	6.8863	23.670	201	6.0257
13	26.352	201	0.9277	26.365	202	0.8993	26.485	201	0.2335	26.201	201	0.5895	26.093	201	0.6130
14	27.454	201	20.8993	27.482	200	25.8019	26.940	201	30.7558	27.272	201	25.4484	27.156	201	22.1999
15	28.543	201	0.9762	29.096	201	0.4735	28.088	201	0.3944	28.388	201	0.6115	27.824	201	1.8732
16	30.366	201	7.0523	30.434	201	2.8200	29.988	201	2.4271	30.234	201	10.5125	30.134	201	9.2531
17	30.947	201	13.7768	30.969	201	1.7532	30.526	201	1.2550	30.808	201	14.4192	30.700	201	19.5332
18	31.346	201	1.4044	31.361	201	1.3374	31.583	201	2.1883	31.877	201	2.3275	31.752	201	2.3638
19	32.003	201	2.9201	32.015	201	1.8206	32.806	201	0.5269	32.385	201	1.3808	32.941	201	1.2485

Os picos iguais ou acima de 5% de área foram visualizados nos cromatogramas, nas tabelas do grupo II (800  $\mu$ L) antes e pós-cultivo e nas Figuras 19 e 20,

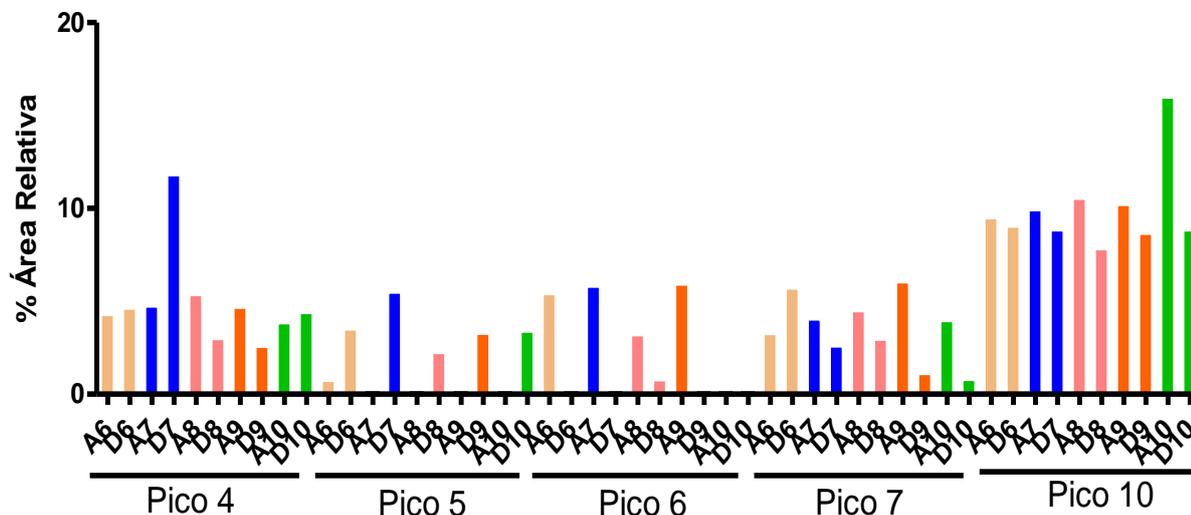


Figura 19 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

Pode-se ressaltar que o pico 4 está presente superior a 5% somente na réplica 8 antes do cultivo (A8 - 5,37%), com diminuição do percentual de área para 3,00% após o cultivo. Ao finalizar o experimento, este pico se apresenta acima de 5% na réplica 7, com 11,83% de percentual de área, sendo este pico o majoritário em relação às demais réplicas.

Ao observar o pico 5 se pode visualizar que o mesmo não é detectado na réplica 7 antes do cultivo, enquanto que nas demais réplicas, este pico se apresenta com área abaixo de 5%. Porém, após o cultivo a área deste pico se torna visível na réplica 7 com 5,51% de percentual de área e nas demais réplicas, permanece inferior a 5% de área relativa.

Já o pico 6 presente nas réplicas 6 (A6 - 5,43%), 7 (A7 - 5,82%) e 9 (A9 - 5,95%) com valores de área acima de 5%, não foi detectado nestas mesmas réplicas após o bioensaio. Após o cultivo, este pico permanece indetectável na réplica 10, e se pode verificar uma diminuição considerável para a réplica 8 (A8 - 3,20% / D8 - 0,79%).

Ao analisar a área do pico 7 percebe-se que este se torna inexpressivo após o cultivo para a réplica 9 (A9 - 6,05%), com um aumento pouco

expressivo na réplica 6 (A6 - 3,27% / D6 - 5,73%) e uma redução do percentual de área para as réplicas 7 (A7 - 4,06% / D7 - 2,61%), 8 (A8 - 4,51% / D8 - 2,98%) e 10 (A10 - 3,98% / D10 - 0,80%).

Para o pico 10 pode-se verificar uma diminuição pouco acentuada após o cultivo para as réplicas 6 (A6 - 9,50% / D6 - 9,06%), 7 (A7 - 9,94% / D7 - 8,86%), 8 (A8 - 10,55% / D8 - 7,84%), e 9 (A9 - 10,22% / D9 - 8,68%) enquanto que uma diminuição de quase o dobro do percentual de área foi verificada para a réplica 10 (A10 - 16,01% / D10 - 8,85%).

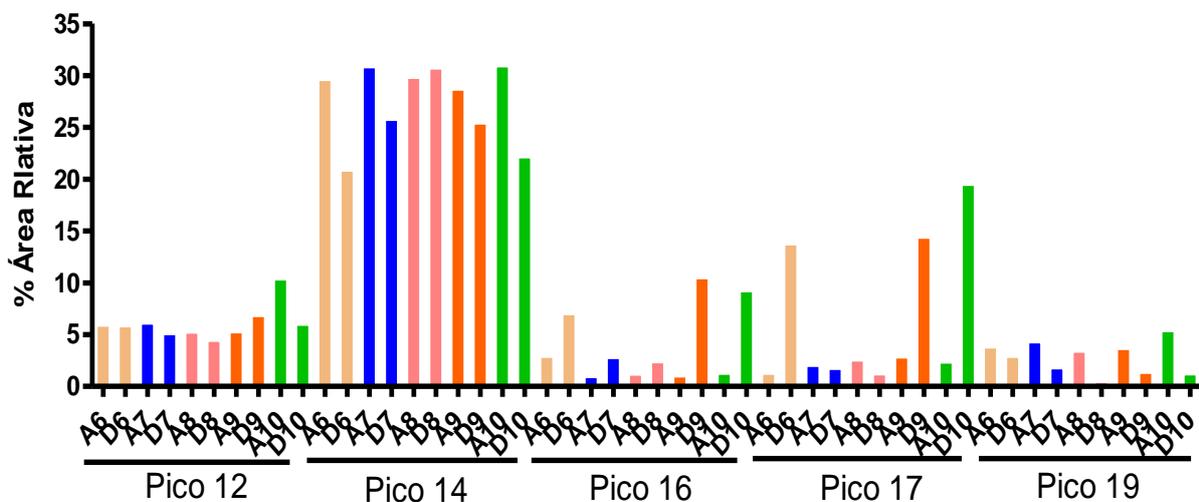


Figura 20 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

Pode-se ressaltar que no pico 12, houve uma diminuição após o cultivo para as réplicas 6 (A6 - 5,93% / D6 - 5,88%), assim como para as réplicas 7 (A7 - 6,15% / D7 - 5,13%) e 8 (A8 - 5,25% / D8 - 4,48%). Porém, um aumento foi observado para a réplica 9 (A9 - 5,30% / D9 - 6,88%) e para a réplica 10, foi visualizado uma redução de quase 40% do seu valor (A10 - 10,41% / D10 - 6,02%).

Ao visualizar o pico 14 percebe-se que está presente como majoritário em todas as réplicas antes e após experimento, porém durante o cultivo, houve diminuição das áreas para as réplicas 6 (A6 - 29,64% / D6 - 20,89%), 7 (A7 - 30,86% / D7 - 25,80%), assim como para as réplicas 9 (A9 - 28,72% / D9 - 25,44%) e 10 (A10 - 30,95% / D10 - 22,19%). Vale ressaltar também, que

apenas para a réplica 8 houve aumento do percentual de área (A8 - 29,85% / D8 - 30,75%).

A área correspondente ao pico 16 aparece em todas as réplicas com percentual inferior a 5% antes do cultivo, porém após o cultivo pode-se observar um aumento significativo deste pico em todas as réplicas pertencentes ao grupo II como, por exemplo (A6 - 2,93% / D6 7,05%), (A7 - 0,97% / D7 - 2,82%), (A8 - 1,20% / D8 - 2,42%), (A9 - 1,05% / D9 - 10,51%) e (A10 - 1,31% / D10 - 9,25%).

Para o pico 17 houve um aumento intenso, após o cultivo para as réplicas 6 (A6 - 1,30% / D6 - 13,77%), seguido da réplica 9 (A9 - 2,89% / D9 - 14,41%) e 10 (A10 - 2,39% / D10 - 19,53%), sendo este o majoritário entre as demais. Ao mesmo tempo se pode visualizar uma redução deste pico para as réplicas 7 e 8 de (A7 - 2,06% / D7 - 1,75%) e (A8 - 2,59% / D8 - 1,25%) respectivamente.

Porém, para o pico 19 apenas a réplica 10 apresenta área acima de 5% antes do bioensaio (A10 - 5,42%), enquanto que nas demais réplicas este pico permanece abaixo de 5%. Foi verificado que as réplicas, após o cultivo, permaneceram com pico inferior a 5% do percentual.

De maneira geral, o grupo II (800 µL) respondeu à variação no perfil química. Apesar da réplica 10 ter correspondido quimicamente à variação dos picos comentados para o grupo II, (alguns com áreas bastante representativas), esta réplica apresentou todo seu aparato fisiológico comprometido após o cultivo, e desta forma não resistiu às modificações nutricionais.

A variação percebida principalmente com o aumento ou com a redução da concentração de metabólitos durante o cultivo faz com que esta espécie apresente evidências químicas frente às condições nutricionais. As algas correspondentes ao grupo III, pertencentes ao controle, foram numeradas de 11 a 15, desta forma não receberam meio de nutrientes PES, porém foram expostas às mesmas condições ambientais.

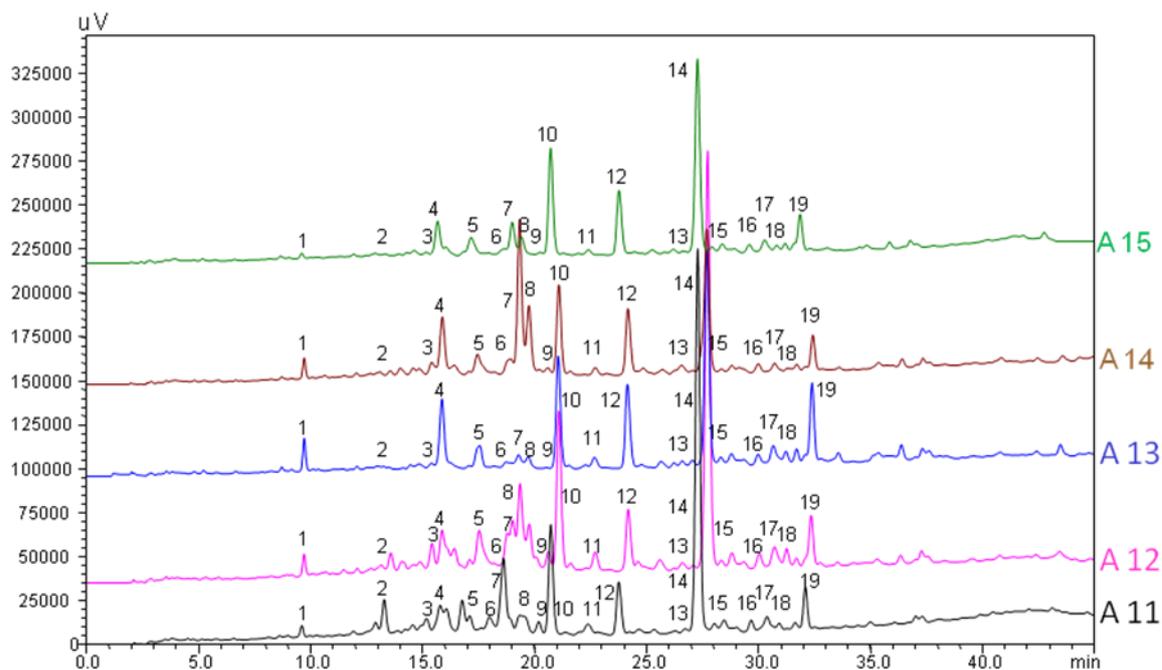


Figura 21 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do controle antes cultivo.

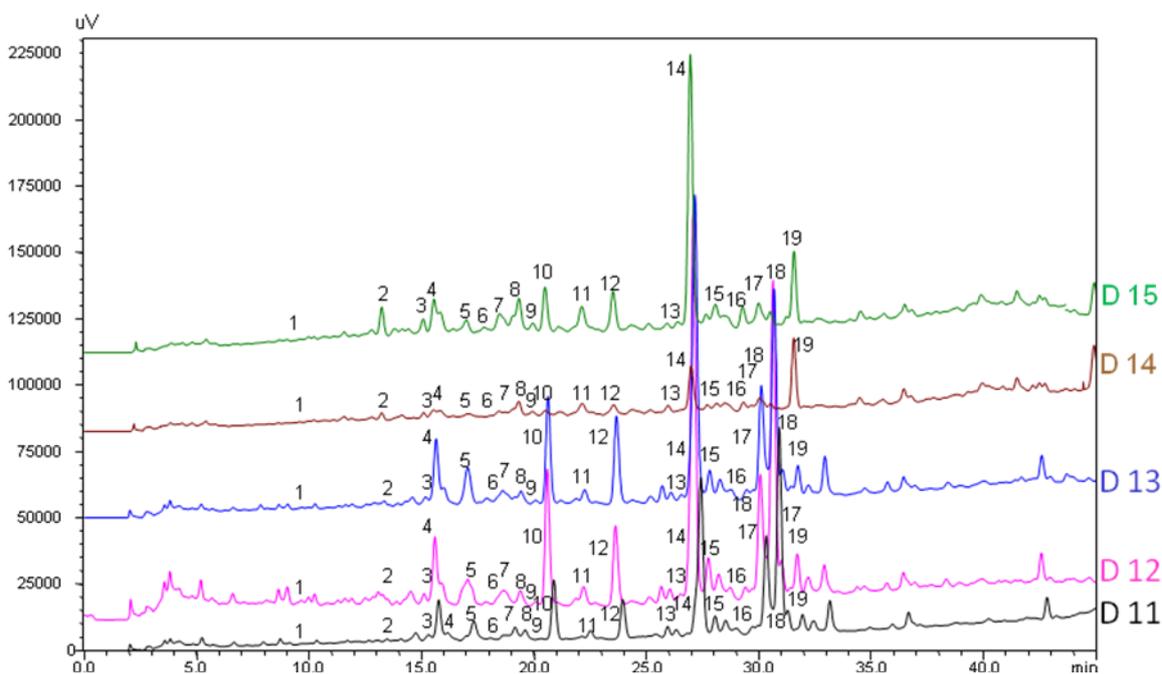


Figura 22 – Cromatograma de variação do perfil químico das réplicas do controle pós – cultivo.

Tabela 12 – Picos assinalados do controle antes do cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa. T. R. (Tempo de Retenção)  $\lambda$  (comprimento de onda (nm)) e % A. R. (% Área Relativa) \_ (picos comentados) \_ (picos majoritários)

Pico	A11			A12			A13			A14			A15		
	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.
1	9.616	199	0.8001	9.715	199	0.8718	9.721	199	2.4305	9.719	199	1.3530	9.614	199	0.5218
2	13.292	199	3.1446	13.585	199	1.2422	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	15.181	199	0.3057	15.426	199	1.9322	14.852	199	0.7394	15.414	199	1.5667	-	-	-
4	15.874	200	2.1067	15.876	200	4.1374	15.867	199	8.9163	15.885	199	6.6765	15.676	199	5.9291
5	16.771	200	3.2264	17.530	200	4.4725	17.550	199	3.3140	17.454	199	2.9749	17.170	199	3.8928
6	17.600	200	0.3602	-	-	-	-	-	-	18.932	200	2.4293	-	-	-
7	18.613	201	10.1651	18.785	201	2.4783	19.292	200	1.1636	19.330	200	18.5765	19.003	200	5.1234
8	19.339	201	3.6824	19.353	200	6.5261	19.716	200	1.1686	19.747	200	7.6800	19.423	200	2.6804
9	20.185	201	0.9896	20.618	201	1.2387	-	-	-	20.213	200	0.4735	-	-	-
10	20.725	201	10.8522	21.083	201	10.0639	21.055	201	12.5872	21.082	201	9.3060	20.717	200	15.8450
11	22.384	201	1.2246	22.707	201	1.2078	22.676	201	1.4303	22.588	200	0.3313	22.403	201	0.7425
12	23.757	201	5.5837	24.179	201	4.1558	24.145	201	9.9610	24.167	201	7.4541	23.768	201	9.9473
13	26.718	201	0.3674	26.599	202	0.6211	26.589	201	0.5889	26.559	201	1.3153	26.194	201	0.5994
14	27.281	201	39.5020	27.722	200	28.2442	27.689	201	25.2281	27.689	201	18.2591	27.269	201	30.4861
15	28.460	201	0.9637	28.806	201	1.3546	28.785	201	0.7790	28.799	201	0.9649	28.376	201	0.8472
16	29.666	201	1.1335	30.032	201	1.0827	29.979	201	1.3273	29.985	201	0.9592	29.584	201	1.3440
17	30.375	201	2.1162	30.709	201	1.9653	30.654	201	3.1668	30.714	201	1.0961	30.270	201	2.4244
18	30.915	201	0.5763	31.246	201	1.2311	31.691	201	1.6158	31.702	201	0.5814	31.181	201	1.0930
19	32.082	201	3.7394	32.339	201	3.4959	32.383	201	8.7086	32.416	201	3.2313	31.849	201	5.9730

Tabela 13 – Picos assinalados do controle pós - cultivo com seus respectivos tempo de retenção, comprimento de onda e % de área relativa. T. R. (Tempo de Retenção),  $\lambda$  (comprimento de onda (nm)) e % A.R. (% Área Relativa) \_ (picos comentados) \_ (picos majoritários)

Pico	D11			D12			D13			D14			D15		
	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% Á. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T.R.	$\lambda$ máx. (nm)	% A. R.	T. R.	$\lambda$ máx. (nm)	% Á. R.
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	13.256	199	0.4113	-	-	-	13.321	199	1.7010	13.221	199	2.4730
3	15.309	199	0.6217	15.105	199	0.5519	-	-	-	15.089	199	1.1246	15.054	199	1.6247
4	15.756	200	4.5190	15.588	200	3.5676	15.641	199	5.0998	15.528	199	0.9007	15.543	199	3.7849
5	17.317	200	2.5477	17.049	200	2.6496	17.045	199	3.4161	-	-	-	16.985	199	1.8176
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	19.157	201	0.7350	18.644	201	1.6031	18.600	200	1.8385	-	-	-	18.464	200	3.0323
8	19.602	201	0.6687	19.386	200	0.9395	19.419	200	0.9910	19.313	200	3.6127	19.323	200	3.6533
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.945	201	0.8658
10	20.882	201	6.1464	20.587	201	6.9172	20.621	201	7.3524	-	-	-	20.487	200	4.3578
11	22.511	201	0.7168	22.203	201	1.0100	22.249	201	0.9853	22.143	200	3.0961	22.127	201	3.8268
12	23.952	201	4.2187	23.623	201	4.2113	23.666	201	6.4872	23.543	201	3.6540	23.516	201	4.2930
13	26.330	201	0.7391	26.044	202	0.7107	26.093	201	0.9874	25.967	201	1.7418	26.386	201	0.7753
14	27.420	201	20.5530	27.088	200	22.4600	27.161	201	32.0057	26.994	201	13.5710	26.954	201	27.9675
15	28.059	201	2.2456	28.220	201	1.9389	28.270	201	1.7854	28.128	201	2.5344	28.070	201	3.1287
16	30.335	201	12.0361	30.072	201	7.6020	30.117	201	10.1950	29.322	201	2.6463	29.290	201	2.0886
71	30.916	201	22.7672	30.636	201	17.1165	30.685	201	17.1477	30.038	201	5.2117	30.001	201	3.4625
18	31.292	201	1.7508	31.714	201	2.0079	31.745	201	2.5623	30.531	201	1.4213	-	-	-
19	32.441	201	0.9641	32.921	201	1.6582	32.947	201	3.3116	31.564	201	18.5129	31.572	201	6.4047

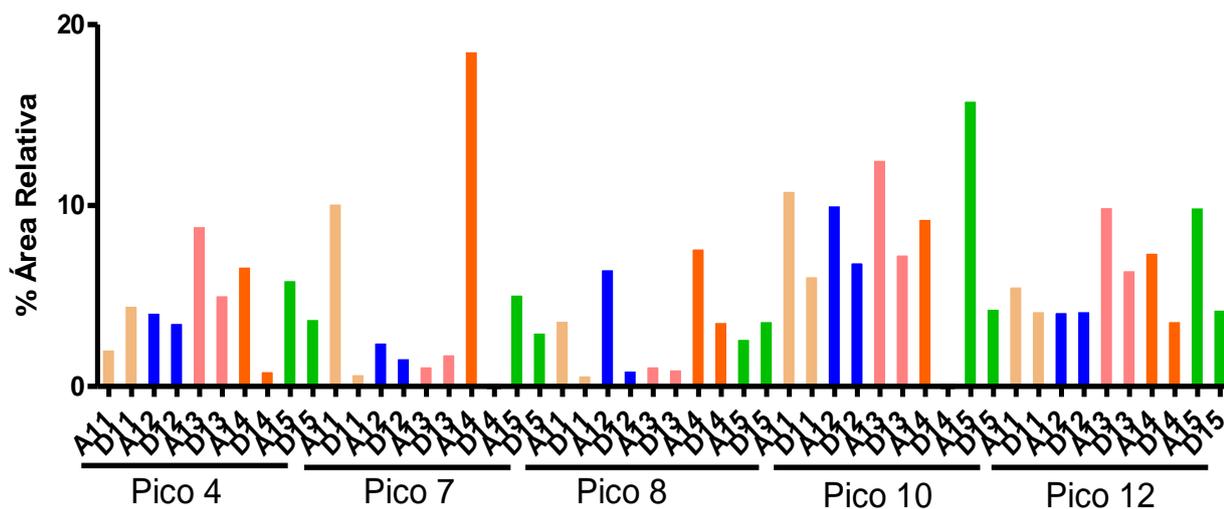


Figura 23 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

De acordo com a visualização dos cromatogramas do grupo III (controle) antes e pós – cultivo e da Figura 23, pode-se ressaltar que o pico 4 se apresenta com área abaixo de 5% antes e após o experimento tanto na réplica 11 como em 12, entretanto nas demais réplicas antes do cultivo a concentração deste pico se apresenta com área superior a 5%. Após o experimento pode-se verificar uma redução deste percentual na alga 13 (A13 - 8,9% / D13 - 5,09%), para a alga 15 (A15 - 5,92% / D15 - 3,78%), porém na alga 14 (A14 - 6,67% / D14 - 0,90%) uma diminuição acentuada foi verificada.

Em relação ao pico 7 pode-se observar que se apresenta bem representativo antes do cultivo nas réplicas 11 ( A11 - 10,1%), sendo que para a réplica 14 (A14 - 18,57%) este pico é majoritário, porém na réplica 15 (A15 - 5,12%) está em torno de 5% e nas demais algas 12 (A12 - 2,47%) e 13 (A13 - 1,16%) se encontra abaixo do percentual de 5%. Após o bioensaio, estes valores diminuem intensamente na réplica 11 (D11 - 0,73%), enquanto que nas algas 12 (D12 - 1,60%) e 15 (D15 - 3,03%) a redução foi pequena, um aumento foi detectado para a réplica 13 (D13 – 1,83%) e para a réplica 14 este pico não foi visualizado.

A área correspondente ao pico 8 se apresenta acima de 5% antes do cultivo, somente nas réplicas 12 (A12 - 6,52%) e 14 (A14 - 7,68%). Após o experimento houve diminuição da área para a réplica 11(A11 - 3,68% / D11- 0,66%), na alga 12 (A12 - 6,52% / D12 - 0,93%), a redução foi significativa,

entretanto para as réplicas 13 (A13 - 1,16% / D13 - 0,99%) e 14 (A14 - 7,68% / D14 - 3,61%), a variação negativa foi quase o dobro do percentual de antes. Desta forma, apenas para a alga 15 (A15 - 2,68% / D15 - 3,65%) houve aumento da concentração deste pico.

Já o pico 10, presente em todas as réplicas antes do cultivo, em concentrações elevadas, após o cultivo diminui quase 50% do percentual de área na alga 11 (A11 - 10,85% / D11 - 6,14%), assim como para a alga 12 (A12 - 10,06% / D12 - 6,91%) e 13 (A13 - 12,58% / D12 - 7,35%), porém uma diminuição elevada no percentual foi verificada na réplica 15 (A15 - 15,84% / D15 - 4,35%) e para a réplica 14 este pico não foi visualizado após o cultivo.

Para o pico 12 pode-se observar que este se apresenta acima de 5% em todas as réplicas antes do cultivo, exceto para a réplica 12 (A12 - 4,15%). Após o bioensaio as áreas correspondentes a este pico diminuem nas algas 11 (A11 - 5,58% / D11 - 4,21%), assim como nas algas 13 (A13 - 9,96% / D13 - 6,48%), 14 (A14 - 7,45% / D14 - 3,65%) e para a réplica 15 (A15 - 9,94% / D15 - 4,29%). Apenas um aumento inexpressivo foi verificado na réplica 12 (A12 - 4,15% / D12 - 4,21%).

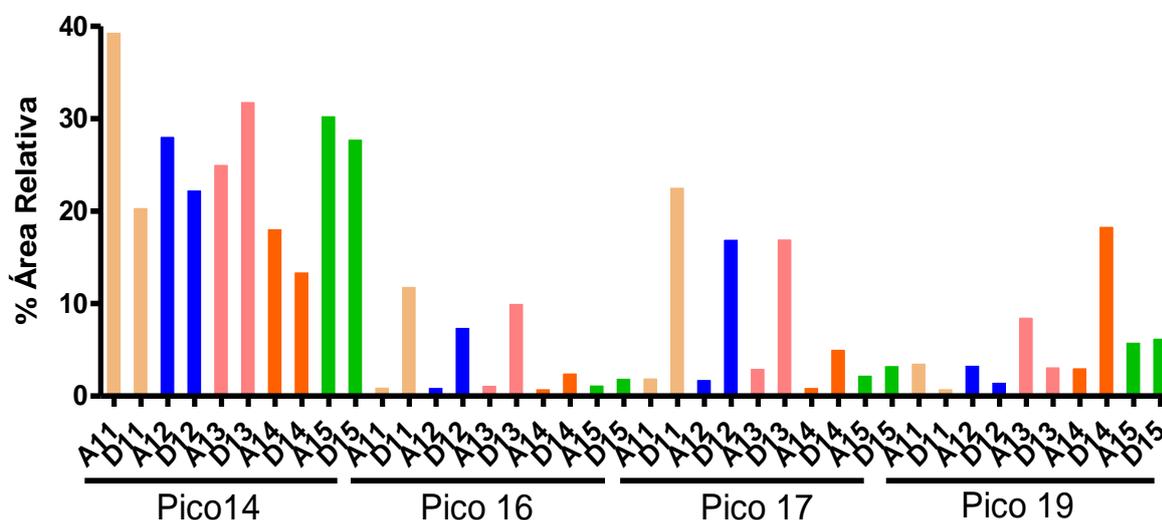


Figura 24 – Gráfico variação do percentual de área das réplicas antes e pós cultivo.

Ao analisar o pico 14, percebe-se que este se apresenta bastante intenso em todas as réplicas (antes e depois) deste cultivo, porém sua concentração diminuiu intensamente após o experimento com a réplica 11 (A11 - 39,50% / D11 - 20,55%), uma redução pequena foi visualizada na alga 12 (A12 - 28,24% / D12 - 22,46%), alga 14 (A14 - 18,25% / D14 - 13,57%) e para a alga 15 (A15 - 30,48% / D15 - 27,96%), sendo que apenas na réplica 13 um aumento da área (A13 - 25,2% / D13 - 32,00%) deste pico foi verificado.

Já o pico 16 encontra-se presente nas réplicas antes do cultivo em concentrações abaixo de 5%. Após o bioensaio um aumento intenso do percentual de área foi detectado para as réplicas 11 (A11 - 1,13% / D11 - 12,03%), seguido da alga 12 (A12 - 1,08% / D12 - 7,60%) e para a alga 13 (A13 - 1,32% / D13 - 10,19%), sendo que o maior aumento observado foi na réplica 11, ao passo que nas réplicas 14 e 15 o aumento foi menor (A14 - 0,95% / D14 - 2,64%) e (A15 - 1,34% / D15 - 2,08%), respectivamente.

Enquanto o pico 17 se apresenta abaixo de 5% em todas as réplicas antes do cultivo, após o bioensaio estes valores aumentaram consideravelmente para acima do percentual de área de 5% para as réplicas 11 (A11 - 2,11% / D11 - 22,76%), assim como para as algas 12 (A12 - 1,96% / D12 - 17,11%), alga 13 (A13 - 3,16% / D13 - 17,14%), alga 14 (A14 - 1,09% / D14 - 5,21%) e alga 15 (A15 - 2,42% / D15 - 3,46%), porém o aumento mais significativo foi da réplica 11, sendo o majoritário, seguido das algas 12 e 13.

Antes do cultivo o pico 19 se apresenta acima de 5% do percentual somente nas réplicas 13 (A13 - 8,70%) e 15 (A15 - 5,97%). Após o bioensaio uma diminuição foi verificada para a réplica 13 (A13 - 8,70% / D13 - 3,31%), seguido do aumento observado para a réplica 14 (A14 - 3,23% / D14 - 18,15%), sendo este pico o majoritário e para a alga 15 (A15 - 5,97% / D15 - 6,40%), que a variação positiva foi menos intensa em relação às demais.

As réplicas 11, 13 e 14, talvez pelo fato de não terem sido expostas ao meio de nutrientes, fizeram com que estas algas produzissem metabólitos para compensar a ausência de fontes nutricionais, e isto pode ser visualizado em alguns picos. Entretanto, estes indivíduos não resistiram às condições nutricionais.

É correto afirmar que, para cada pico avaliado entre as réplicas de cada grupo, a variabilidade química altera, por exemplo, a existência de picos no grupo I, que são mais concentrados, enquanto que em outros, o grupo II e controle foram mais efetivos. Desta forma, pode-se mostrar, que a variação nutricional influenciou na produção qualitativa ou quantitativa dos metabolitos pelas algas.

A variação qualitativa do perfil químico relativo aos experimentos antes e depois (Tabela 1A, apêndice), observada neste trabalho, ressalta a resposta diferenciada na produção dos metabólitos entre os indivíduos.

#### **5.4 – Experimental IV: Atividade antioxidante do extrato bruto e frações**

Atualmente, há um crescimento na procura por produtos naturais que fazem parte da dieta humana, desta forma, diversos estudos demonstram que um grande número de fontes marinhas biossintetizam compostos que possuem atividade antioxidante (Lachmam, et al., 2010; Zhang, et al., 2010).

No decurso deste estudo foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato diclorometânico, como sequestrante do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). O radical DPPH é frequentemente utilizado na avaliação geral da capacidade de amostras antioxidantes extinguirem radicais livres e, além disso, apresentam a vantagem de que suas reações não são afetadas por reações secundárias, tais como, reações de quelação de metais e inibição enzimática (Oliveira et al., 2009).

Os resultados do extrato bruto, das frações (ácida e neutra) e do padrão de referência submetidos ao ensaio antioxidante são apresentados na Tabela 14. Vale ressaltar que os testes, foram realizados em triplicata e em três concentrações distintas, sendo apresentados as médias aritméticas e o desvio padrão.

Os padrões empregados foram a quercetina, rutina e o BHT (butil-hidroxi-tolueno). Os flavonóides foram utilizados como padrões pelo seu efeito protetor nos sistemas biológicos, o qual é conferido à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres (Heim, 2002).

Segundo Ross e Kasum (2002), a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, especialmente com a facilidade com que um átomo de hidrogênio a partir de uma hidroxila do anel aromático pode ser doado a um radical livre. Além disso, o potencial antioxidante também está relacionado com a polaridade, natureza e posição dos grupos constituintes na estrutura dos compostos fenólicos (Fabri, 2008).

Tabela 14 - Atividade antioxidante do extrato, das frações (ácida e neutra) e dos padrões fenólico Quercetina, Rutina e BHT.

Amostras	Concentrações	
	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
<b>E.B</b>	<b>86,70± 2,7</b>	<b>52,26 ± 3,2</b>
<b>F.O.A</b>	<b>84,74 ± 3,2</b>	<b>35,29 ± 1,9</b>
F.O.N	54,53 ± 1,2	17,06 ± 1,8
Quercetina	93,4 ± 1,2	91,7 ± 1,7
Rutina	85,8 ± 1,7	0,82 ± 1,1
BHT	52,1 ± 2,2	43,6 ± 1,5

Média ± Desvio Padrão (n=3) triplicata. E.B (extrato bruto) F.O.A. (fração ácida)

De acordo com a Tabela 14, na concentração de 100 µg/mL, o E.B. (86,70%) apresentou atividade sequestrante de radicais livres superior aos padrões BHT (52,1%) e rutina (85,8%), fato este que evidencia a presença de substâncias antioxidantes presentes, entretanto em relação ao padrão quercetina (93,4%), este percentual é inferior. Na concentração de 10 µg/mL o E.B. exibiu atividade antioxidante superior ao BHT (43,6%) e à rutina (0,82%) e inferior à quercetina (91,7%).

A fração ácida (F.O.A – 84,74%), na concentração de 100 µg/mL se mostrou com percentual antioxidante mais elevado em relação ao padrão BHT (52,1%), semelhante à rutina (85,8%) e abaixo da quercetina (93,4%), porém, na concentração de 10 µg/mL o potencial sequestrante de radicais livres da F.O.A. (35,29%) é superior somente em relação ao padrão rutina (0,82%), nos demais este percentual é inferior do BHT (43,6%) e quercetina (91,7%).

Ao observar a fração neutra (F.O.N.), para a concentração de 100 µg/mL esta se apresenta com atividade antioxidante superior ao padrão BHT (52,1%) e inferior aos padrões rutina (85,8%) e quercetina (93,4%), enquanto que na concentração de 10 µg/mL, a F.O.N. (17,06%) se apresenta com percentual sequestrante de radicais livres superior ao padrão rutina (0,82%), porém quando comparado aos demais padrões (BHT – 43,6%, quercetina – 91,7%), este percentual se mostra inferior.

É importante ressaltar que, quando se compara o extrato bruto e as frações (neutra e ácida) em relação ao padrão quercetina, todas as amostras apresentaram capacidade sequestrante de radicais livres inferiores, pois em ambas as concentrações seu percentual de sequestro está em torno de 90%.

Mediante estes resultados é possível constatar o potencial antioxidante exibido pelas amostras e também sua comparação com a atividade sequestrante de radicais livres do padrão BHT, rutina e quercetina.

## **5.5 - Parte Experimental V: Isolamento e identificação da substância majoritária**

### **5.5.1 – Perfil Químico da Fração Orgânica Ácida**

A extração ácido – base do extrato bruto, permitiu a separação de substâncias com características ácidas. De 3,2g de amostra inicial, 1g correspondeu à fração orgânica ácida no final do experimento, portanto esta técnica apresentou rendimento de 31,25%.

Inicialmente o perfil cromatográfico do extrato diclorometânico (Figura 25), foi submetido à Cromatografia em Camada Delgada.

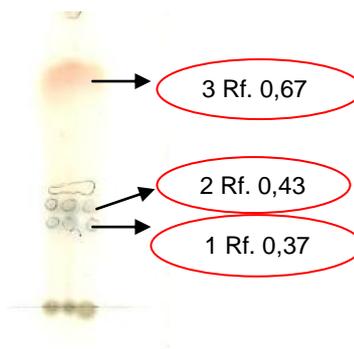


Figura 25 - Cromatograma da fração orgânica ácida com diclorometano realizado por CCD. Fase móvel: diclorometano : acetato de etila (60:40) e revelador químico sulfato cérico.

Verifica-se na Figura 25 que o sistema de solventes utilizado mostrou-se satisfatório, pois houve separação de três manchas majoritárias.

Essas manchas apresentam como valores de referência (Rf) 0,37; 0,43 e 0,67 que sob revelação em luz UV (254 nm) apresentam coloração azul e laranja - avermelhado (para as duas primeiras manchas). Nota-se nesta Figura (23) que as manchas 1 e 2 são as mais polares, quando comparadas com a mancha 3, e esta se apresenta com coloração azul mais intensa em luz visível. Devido às características observadas (manchas largas, intensa e com arraste), sugere ser uma mistura de substâncias que correspondem aos meroditerpenos presentes na fração ácida (Sabudak *et al.*, 2005), estas manchas são semelhantes às que foram identificadas em CCD de outro trabalho (Soares, 2003).

### 5.5.2 – Fracionamento da fração orgânica ácida

Após o fracionamento ácido-base do extrato (Figura 9, item 4.8.2, página 35) em coluna cromatográfica aberta em sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck), se obteve quatro conjuntos em que as frações foram unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado por CCD. A Figura 26 mostra a CCD destes conjuntos.

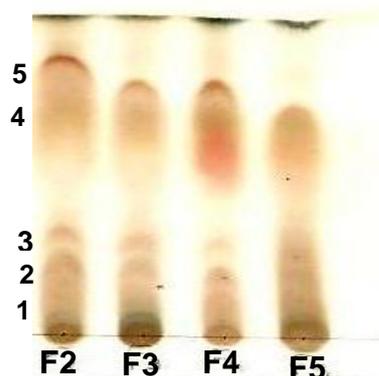


Figura 26 - Cromatograma da primeira coluna da fração orgânica ácida realizada por CCD, mostrando as manchas características nos quatro grupos, que foram reunidas formando o AS. Fase móvel: hexano: diclorometano (60:40) e revelado com sulfato cérico.

Tabela 15 – Valores de Rfs das manchas na CCD dos conjuntos

Amostras	Manchas (Rfs)						
	1	2	3	4	5		
F2	0,36	0,42	0,78	-	0,86		
F3	0,36	0,42	0,78	0,81	-		
F4	0,31	0,42	0,73	-	0,89		
F5	0,31	0,42	0,73	0,84	-		

De acordo com a CCD (Figura 26) e a Tabela 15 realizada logo após o fracionamento em coluna, notou-se que as manchas marrons, amareladas e alaranjadas se concentravam nos quatro conjuntos (F2, F3, F4 e F5), logo estes foram reunidos, devido à similaridade e cujos Rfs são 0,36; 0,31; 0,42; 0,73; 0,78; 0,81; 0,84; 0,86 e 0,89.

Pode-se notar que a mancha com Rf 0,73; 0,78; 0,81; 0,86 e 0,89 são mais apolares para o sistema de solvente utilizado, e suporte. A mancha cujo Rf são 0,31; 0,36 e 0,42 são mais polares, ressaltando que estas frações possuem em sua composição, substâncias similares quanto à polaridade, pois o fracionamento conduziu à separação de substâncias com Rf muito semelhantes (Figura 26).

Os conjuntos F2, F3 e F5 por apresentarem um perfil muito semelhante e devido a pouca massa, optou-se por unir todos os quatro conjuntos para injeção em CLAE para realização de Cromatografia em Coluna Preparativa com método isocrático Acetonitrila:Água em pH =3,00 (75%), a fim de se obter uma massa significativa.

### 5.5.3 – Substância isolada

O conjunto das frações reunidas foi renomeado SHS, e obteve-se uma massa total de 80mg, que foi submetida a uma purificação em coluna preparativa, o que originou treze frações. O cromatograma de SHS está ilustrado a seguir (Figura 27).

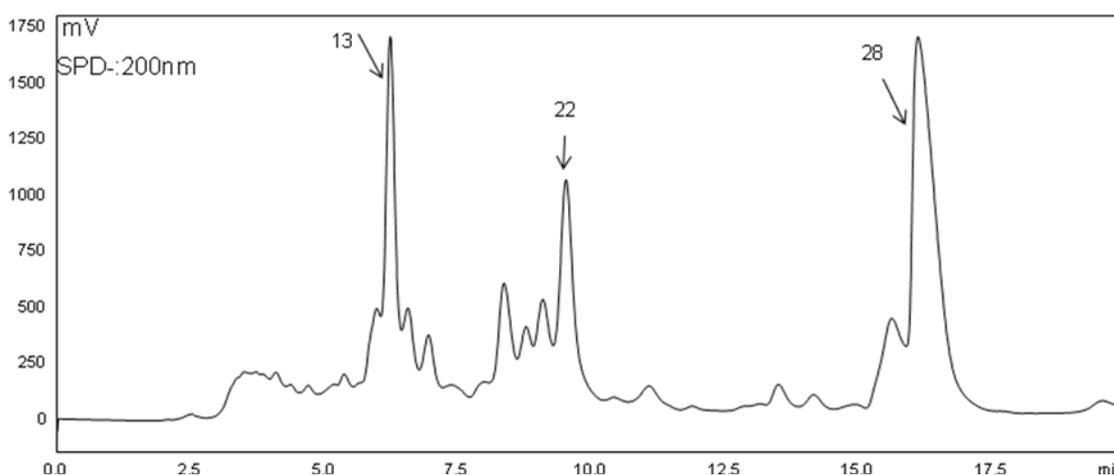


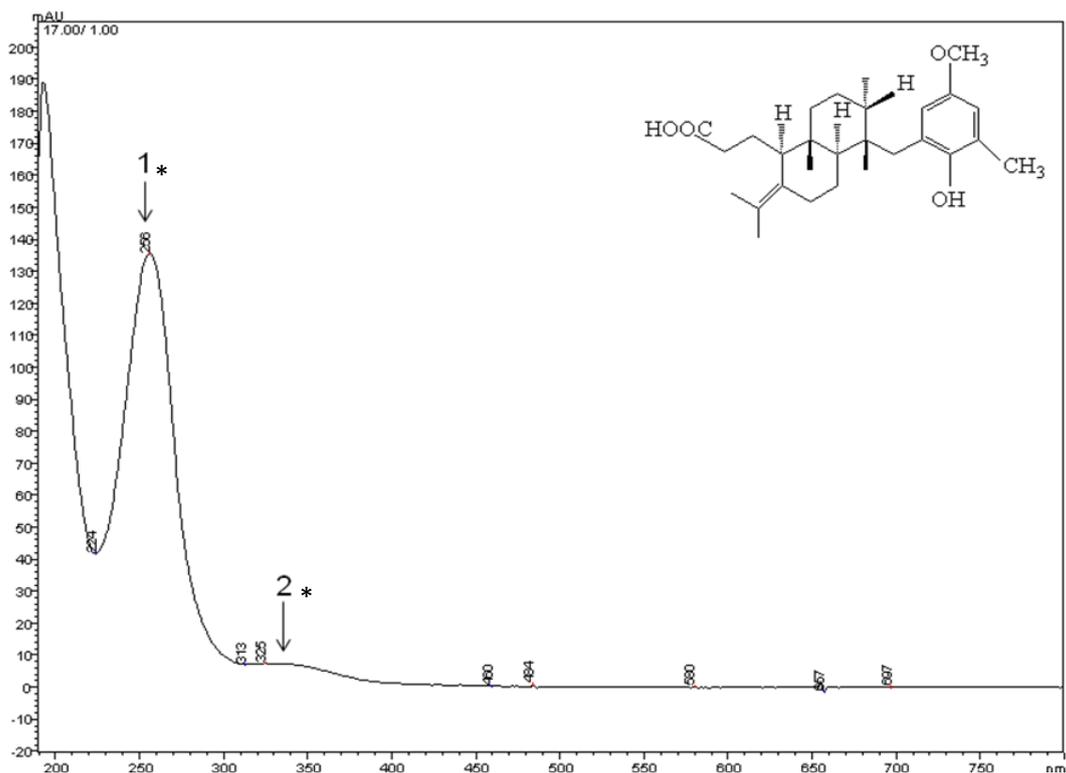
Figura 27 - Picos recolhidos da coluna preparativa do conjunto SHS.

A Cromatografia em Coluna Preparativa apresentou rendimento de 61,75% e as amostras SH13, SH22 e SH28 foram selecionadas por apresentar picos majoritários bem significativos.

As frações SH13, SH22 e SH28 foram enviadas para os laboratórios, LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN) e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Dept. de Bioquímica - UFRJ), para análise em colaboração com a Profa. Luzineide Tinoco e da técnica Camila Mansur. A elucidação estrutural do metabólito foi realizada pela Profa. Angélica Ribeiro Soares.

### 5.5.4 – Ultravioleta visível

O espectro de ultravioleta-visível (Figura 28) apresentou absorção máxima em metanol a  $\lambda$  256,0 nm ( $\lambda$  288,0 nm – Soares, 2001;  $\lambda$  293,0 nm – González *et al*, 1974, Soares, 2001), indicando transições tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ .



\* (Soares, 2005)

Figura 28 – Espectro de ultravioleta de SH28 (MeOH).

### 5.5.5 - Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) identifica os grupos funcionais presentes na molécula e envolve a interação da molécula com a radiação eletromagnética (McMurry, 2005).

No espectro da substância SH28 (Figura 29), identificada como ácido atomárico destacam-se bandas de absorção intensa, além de apresentar também bandas de absorção média e fraca (McMurry, 2005).

A banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$  ( $3440\text{ cm}^{-1}$ - Soares, 2001) é característica de grupamentos hidroxilas. De acordo com Silverstein e Webster (1998) a absorção na região entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$ , corresponde à região aromática.

A banda em  $761\text{ cm}^{-1}$  ( $980\text{ cm}^{-1}$ - Soares, 2001) corresponde à ligação carbono - Hidrogênio no anel aromático monossustituído (Silverstein e Webster, 1998). Sinais em  $1706\text{ cm}^{-1}$  ( $1740\text{ cm}^{-1}$  – Soares, 2001),  $1195\text{ cm}^{-1}$  e em  $1483\text{ cm}^{-1}$ , correspondem à carbonila, à ligação carbono - oxigênio presente em ésteres e carbono - carbono em anel aromático, respectivamente.

O espectro de I.V apresenta uma banda em  $1059\text{ cm}^{-1}$ , também correspondente à ligação carbono – hidrogênio (McMurry, 2005).

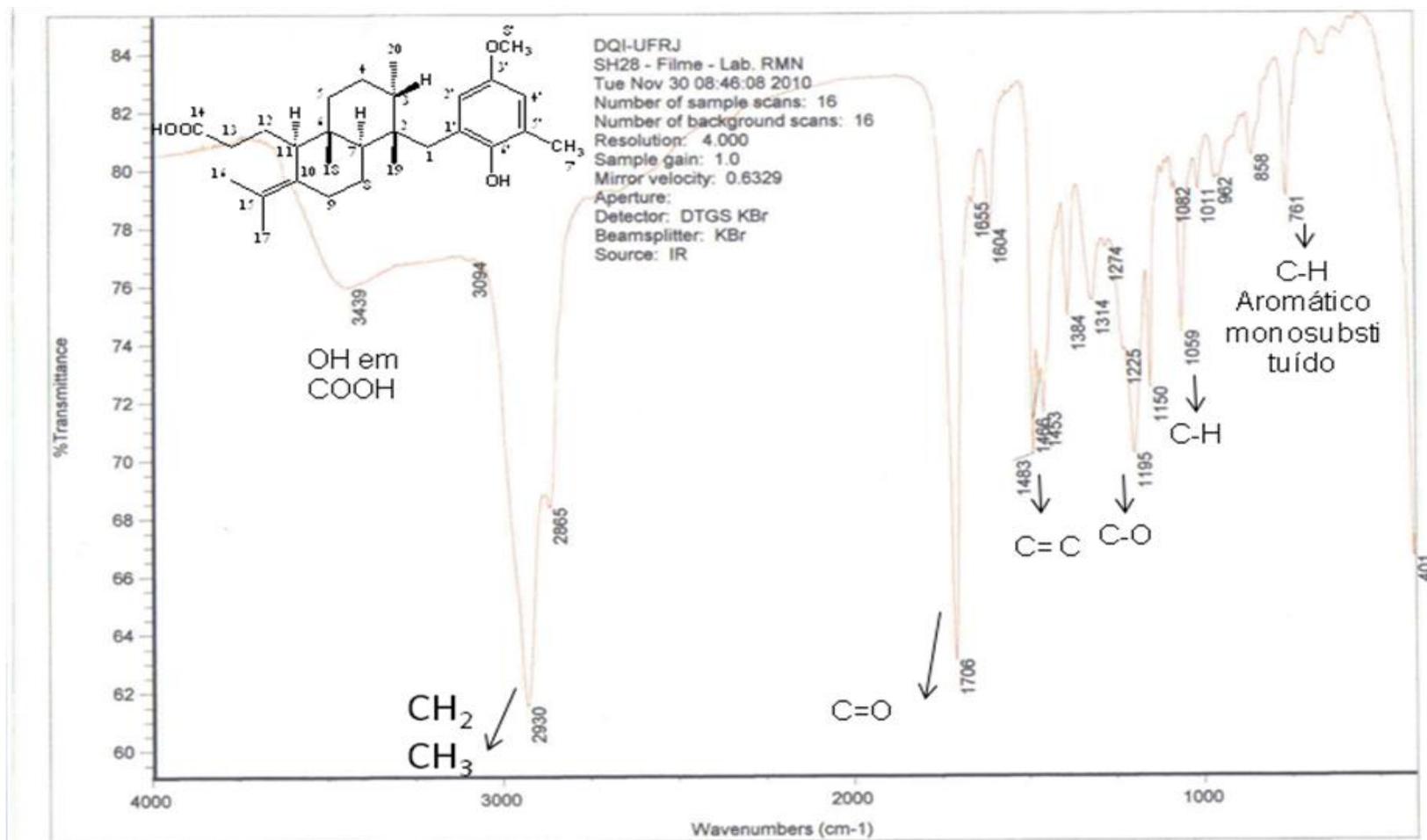


Figura 29 - Espectro de infravermelho de SH28 (CHCl<sub>3</sub>, filme).

Comparando-se todos os dados espectroscópicos obtidos com os dados da literatura (Tabela 17, página 84) foi possível identificar a substância SH28 como sendo o ácido atomárico (Figura 35). Este meroditerpeno foi isolado pela primeira vez quando *S. zonale*, era denominada *Taonia atomaria*, por González e colaboradores em 1974, e, posteriormente, por outros autores (Gerwick e Fenical, 1981, Gerwick et al., 1985). Em *S. flabelliforme*, este meroditerpeno foi identificado por Wessels et al., 1999, e em *S. zonale* por Soares, 2001, Soares et al., 2003 e Soares, 2005.

Neste estudo o ácido atomárico foi isolado e identificado como metabólito majoritário nos espécimes de *S. zonale* da região de Búzios, o que corrobora com os resultados obtidos anteriormente por (Soares e colaboradores, 2003), com destaque da presença do ácido atomárico como substância majoritária presente na população de Búzios.

Metabólitos isolados de macroalgas marinhas têm apresentado atividades biológicas com potencial farmacológico. Os extratos de *S. zonale* vêm sendo testados para a capacidade biológica e dentre os metabólitos, o ácido atomárico se destaca por inibir a atividade da tirosina quinase, e excelente atividade como antiviral frente ao herpes simples humano tipo – 1(HSV-1) (Soares, 2005).

## **5.5.6 - Elucidação estrutural da substância majoritária**

### **5.5.6.1. Técnica monodimensional**

Após a purificação do conjunto, a substância SH28, majoritária, foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ , e os dados estão listados na Tabela 16.

#### **5.5.6.1.1 RMN $^1\text{H}$**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30) apresentou sinais correspondentes a sete metilas: em 3,73  $\delta$  (3H; s) ligada a heteroátomo, em 2,22  $\delta$  (3H; s) ligada a

anel aromático, em 1,68  $\delta$  (3H; s) e 1,66  $\delta$  (3H; s) ligadas ao carbono  $sp^2$  e três metilas simples em 1,15  $\delta$  (3H; d; 6,9), 1,02  $\delta$  (3H; s) e 0,93  $\delta$  (3H; s). Os sinais em 6,69  $\delta$  (1H; d; 3,0) e 6,54  $\delta$  (1H; d; 2,7) indicam presença de dois hidrogênios ligados ao anel aromático (Espectro 1).

Os sinais de  $^1H$  encontrados remetem aos sinais da estrutura do ácido atomárico. Para confirmar esta estrutura, os dados de RMN  $^1H$  foram comparados com os dados para esta substância existente na literatura (Tabela 16) (Wessels et al, 1999, Soares, 2001).

Tabela 16 - Comparação dos sinais de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400,00 MHz) da amostra SH28 e os sinais do ácido atomárico observados na literatura.

H	$\delta_H$ (n H, m, J)	$\delta_H$ (n H, m, J) #
1	2,84 (1H, d, 12,0) 2,25 (1H, d, 12,0)	2,85 (1H, d, 14,3) 2,25 (1H, d, 14,3)
2		
3	1,73 (1H, m)	1,73 (1H, m)
4	1,26 (1H, sl) 1,88 (1H, m)	1,23 (1H, d, 15,4) 1,88 (1H, m)
5	1,49 (2H, m)	1,49 (1H, m)
6		
7	1,38 (1H, dd, 4,8 e 9,6)	1,38 (1H, dd, 5,7 e 11,7)
8	1,74 (1H, m) 1,51 (1H, m)	1,75 (1H, m) 1,52 (1H, m)
9	2,39 (1H, 4,0) 1,96 (1H, dd, 8,0 e 16,0)	2,39 (1H, q, 8,7 e 13,2) 1,96 (1H, m)
10		
11	2,32 (1H, 3,2 e 8,0)	2,32 (1H, m)
12	1,81 (1H, m) 1,57 (1H, m)	1,81 (1H, m) 1,58 (1H, m)
13	2,26 (2H, m)	2,26 (2H, m)
14		
15		
16	1,68 (3H, s)	1,68 (3H, s)
17	1,66 (3H, s)	1,66 (3H, s)
18	1,02 (3H, s)	1,02 (3H, s)
19	0,93 (3H, s)	0,94 (3H, s)
20	1,15 (3H, d, 6,9)	1,15 (1H, d, 6,8)
1'		
2'	6,69 (1H, d, 3,0)	6,69 (1H, d, 3,0)
3'		
4'	6,54 (1H, d, 2,7)	6,54 (1H, d, 2,6)
5'		
6'		
7'	2,22 (3H, s)	2,22 (3H, s)
8'	3,73 (3H, s)	3,73 (3H, s)

nH = n° de hidrogênios; m = multiplicidade; J em Hertz = constante de acoplamento # Soares, 2001

Dessa forma, com os sinais de  $^1H$  obtidos por este espectro e comparando com os dados da literatura, se pode confirmar que a substância majoritária é o meroditerpeno, ácido atomárico.

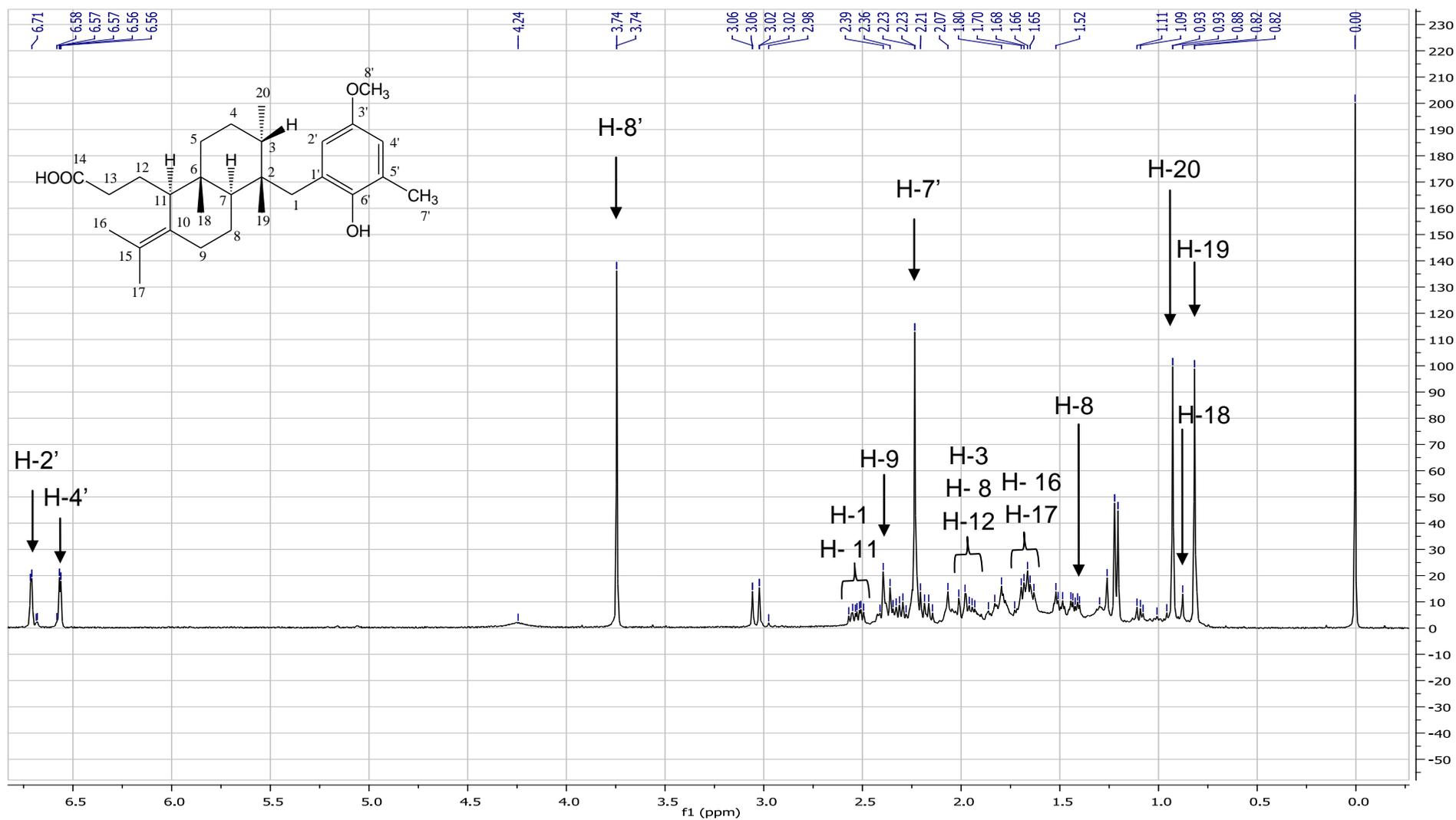


Figura 30 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH28 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

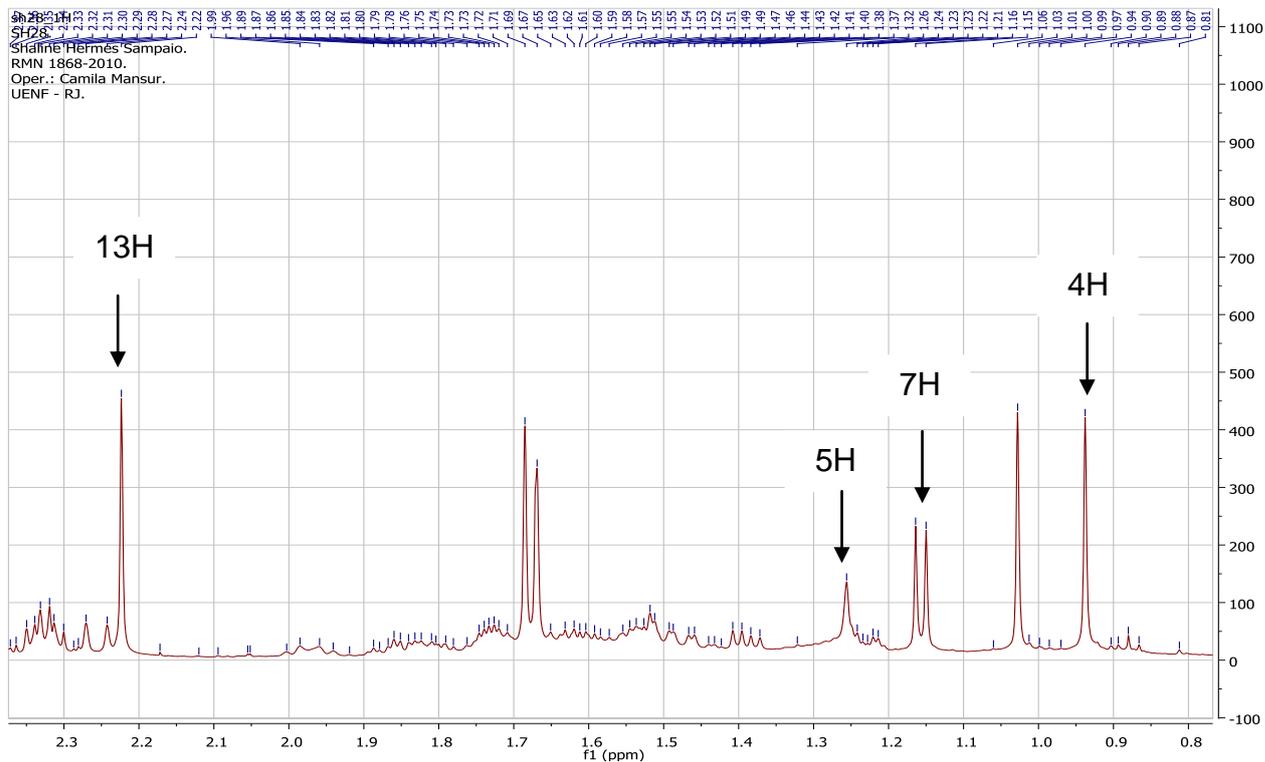


Figura 31 - Ampliação da região do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH28 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

## 5.5.7 - Técnicas bidimensionais

### 5.5.7.1 - COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos, mostrando a sua correlação. A figura 32 mostra o espectro de COSY  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  com essas correlações.

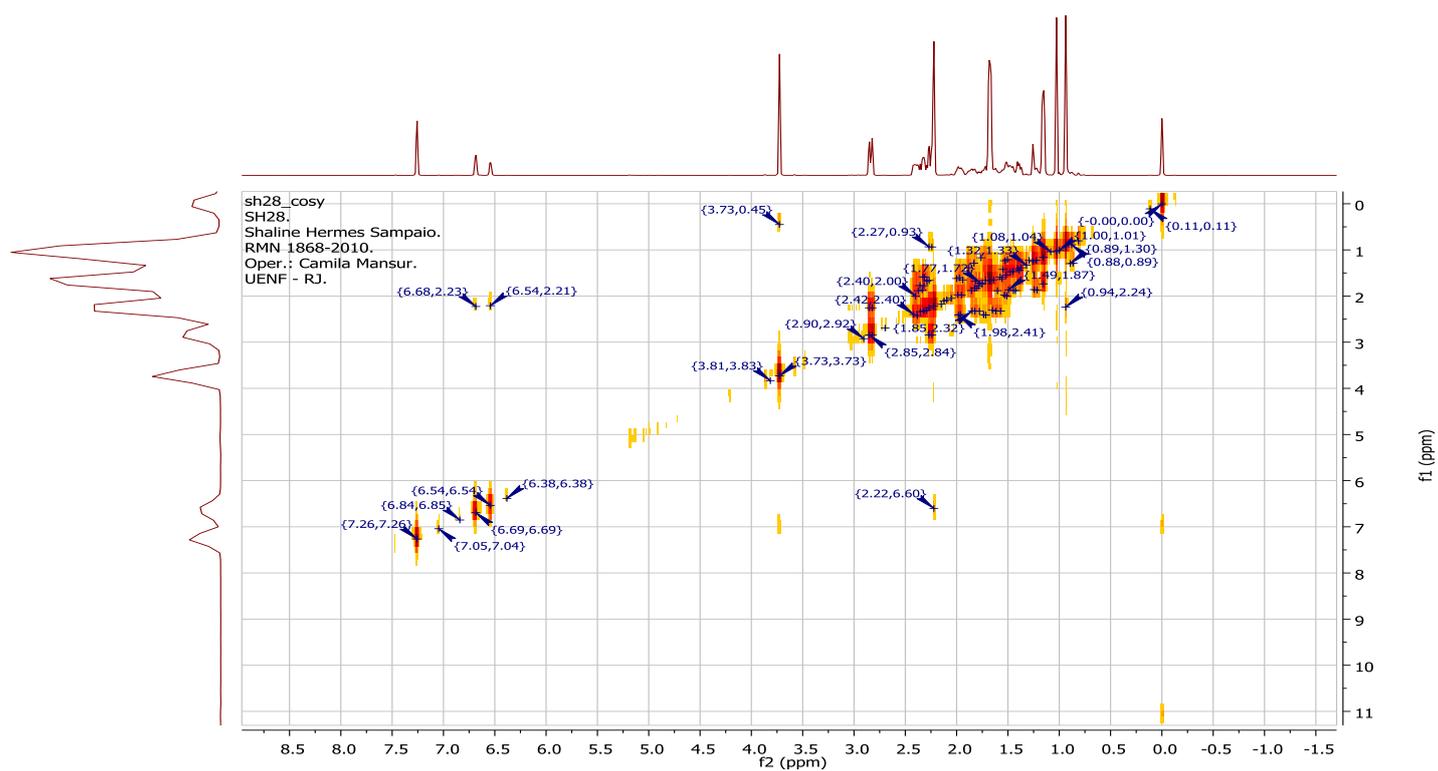


Figura 32 - Espectro de RMN 2D- COSY para SH28 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

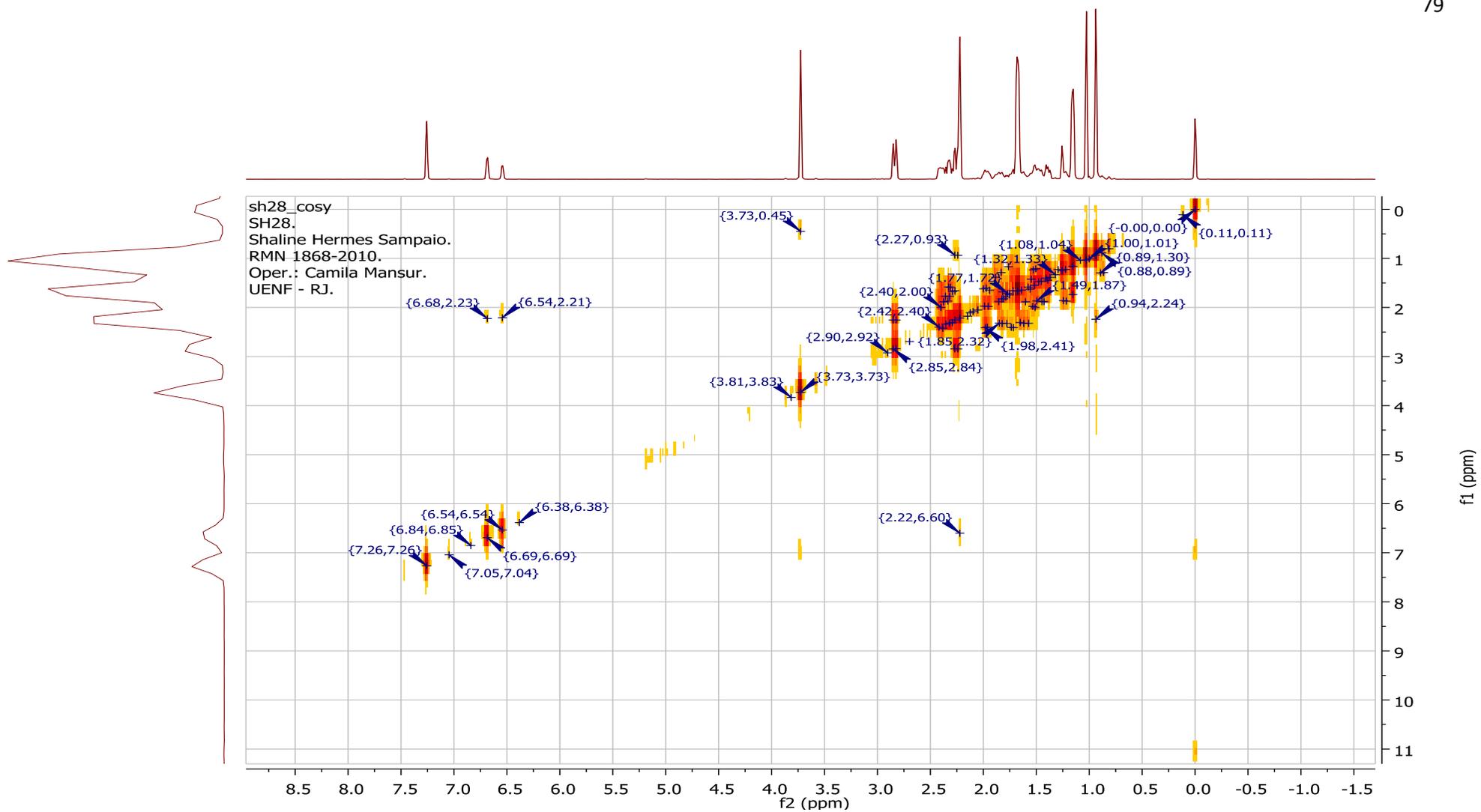


Figura 33 – Ampliação do espectro de RMN 2D- COSY para SH28 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

### 5.5.7.2 - HMQC

Através da técnica bidimensional HMQC, que avalia a correlação direta de hidrogênios ligados a carbonos foi possível identificar os carbonos ( $^{13}\text{C}$ ) da substância SH28.

A partir dos dados do espectro de HMQC (Figura 34) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de  $^1\text{H}$  com os núcleos de  $^{13}\text{C}$  a eles diretamente ligados. Dessa forma, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar os valores dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos do meroditerpeno que possuíam um hidrogênio a eles ligado.

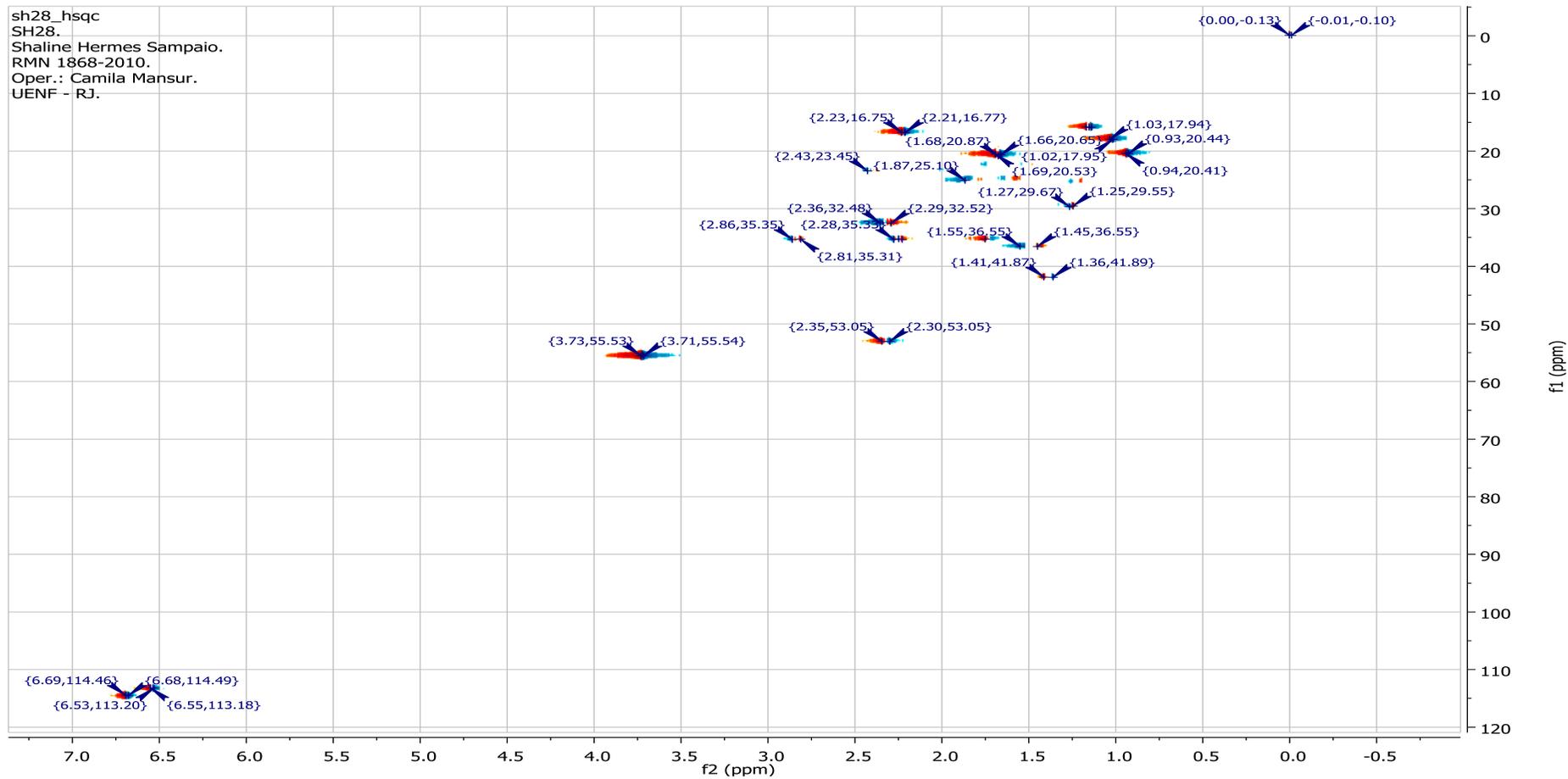


Figura 34 - Espectro de RMN-2D HMQC para SH28 ampliado ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

### 5.5.7.3 - HMBC

Através da análise das correlações a longa distância  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  (Figura 35 e 36) foi possível detectar a correlação entre os núcleos de  $^1\text{H}$  e os núcleos de  $^{13}\text{C}$ , a duas ou mais ligações de distância. A partir da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais apresentados na Figura 35 abaixo.

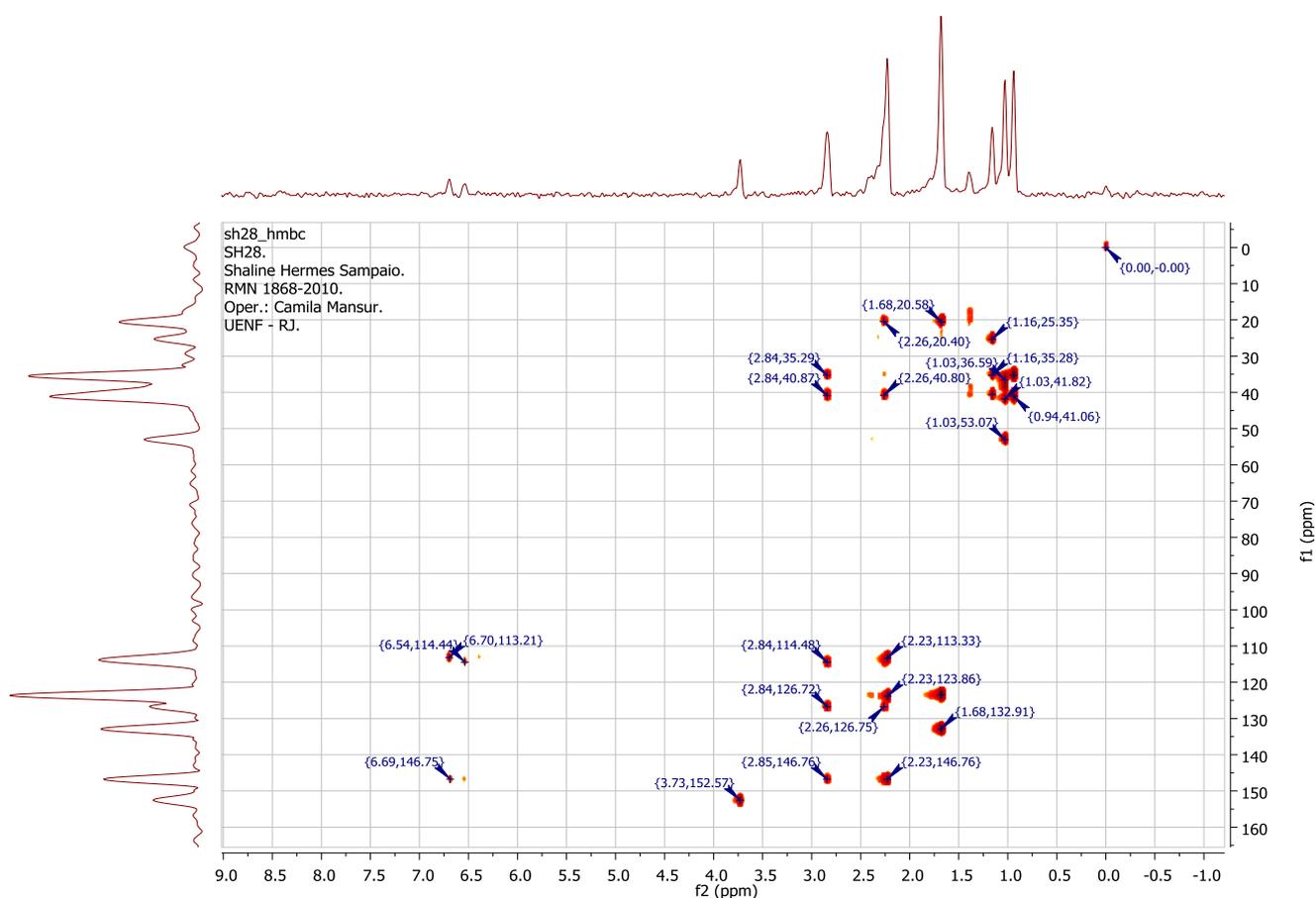
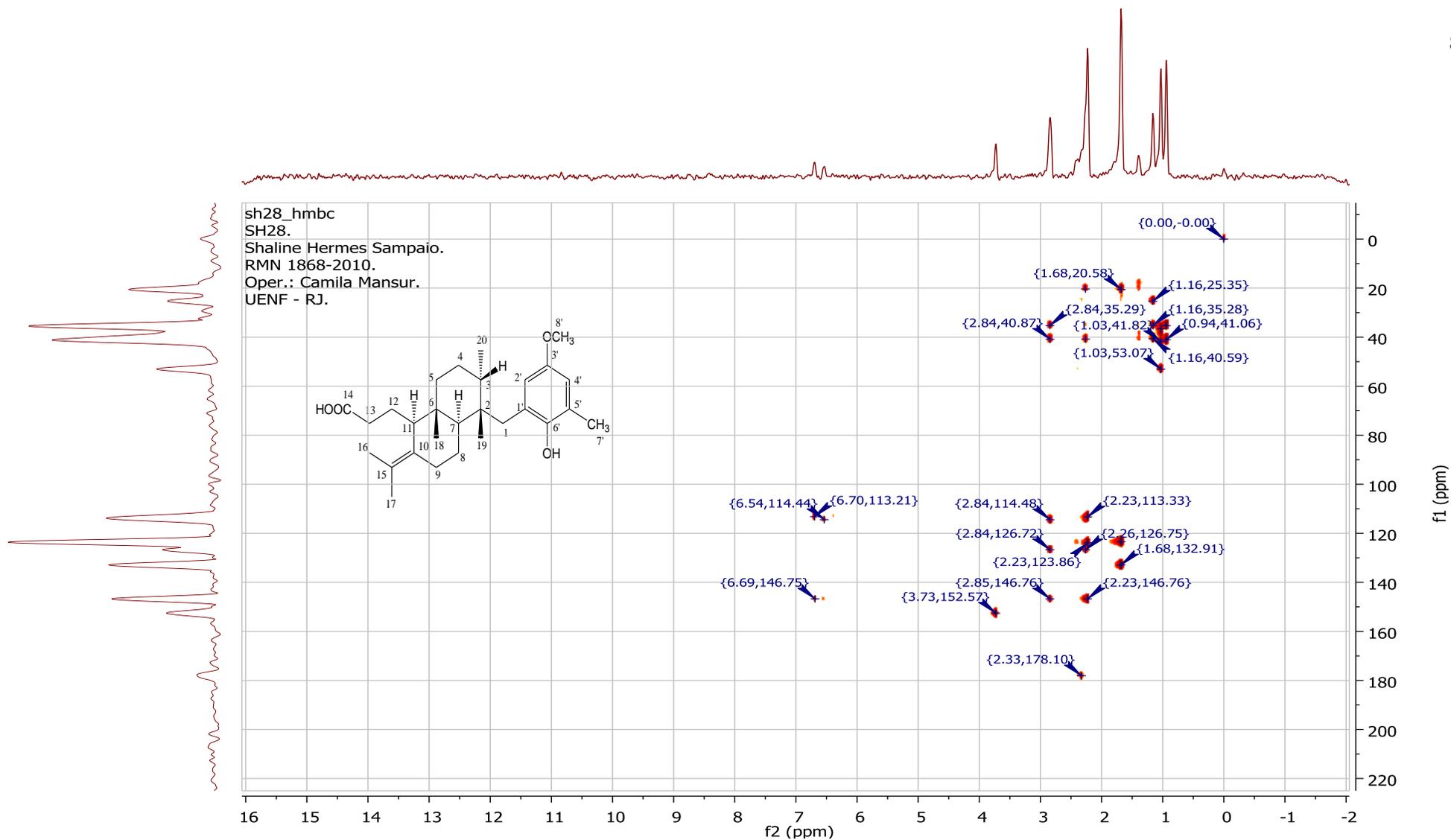


Figura 35 - Espectro de RMN-2D HMBC para SH28 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Figura 36 - Espectro de RMN-2D HMBC para SH28 ampliado (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

### 5.5.8 - Proposta Estrutural

A análise dos espectros mono e bidimensionais revelou a presença do meroditerpeno ácido atomárico (Figura 35). Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  estão listados na Tabela 17 e a comparação com dados da literatura (Wessels et al., 1999, Soares, 2001).

Tabela 17 - Comparação dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do ácido atomárico

C/H	$\delta_c$ (m)	$\delta_c$ (m) #	$\delta_H$ (n H, m, J)	$\delta_H$ (n H, m, J) #
1	34,70(CH <sub>2</sub> )	35,3 (CH <sub>2</sub> )	2,84 (1H, d, 13,8) 2,25 (1H, d, 13,8)	2,85 (1H, d, 14,3) 2,25 (1H, d, 14,3)
2	40,02 (C)	40,6 (C)		
3	35,08 (CH)	35,3 (CH)	1,73 (1H, m)	1,73 (1H, m)
4	24,97(CH <sub>2</sub> )	25,3 (CH <sub>2</sub> )	1,26 (1H, d, 14,4) 1,88 (1H, m)	1,23 (1H, d, 15,4) 1,88 (1H, m)
5	36,15(CH <sub>2</sub> )	36,5 (CH <sub>2</sub> )	1,49 (2H, m)	1,49 (1H, m)
6	38,53 (C)	38,9 (C)		
7	41,78 (CH)	41,9 (CH)	1,38 (1H, dd, 6,0 e 12,0)	1,38 (1H, dd, 5,7 e 11,7)
8	22,25(CH <sub>2</sub> )	22,4 (CH <sub>2</sub> )	1,74 (1H, m) 1,51 (1H, m)	1,75 (1H, m) 1,52 (1H, m)
9	23,34(CH <sub>2</sub> )	23,5 (CH <sub>2</sub> )	2,39 (1H, m) 1,96 (1H, m)	2,39 (1H, q, 8,7 e 13,2) 1,96 (1H, m)
10	122,29 (C)	123,2 (C)		
11	52,63 (CH)	53,2 (CH)	2,32 (1H, m)	2,32 (1H, m)
12	24,97(CH <sub>2</sub> )	25,1 (CH <sub>2</sub> )	1,81 (1H, m) 1,57 (1H, m)	1,81 (1H, m) 1,58 (1H, m)
13	32,75(CH <sub>2</sub> )	33,7 (CH <sub>2</sub> )	2,26 (2H, m)	2,26 (2H, m)
14	174,89 (C)	180,9 (C)		
15	133,31 (C)	133,0 (C)		
16	20,41(CH <sub>3</sub> )	20,4 (CH <sub>3</sub> )	1,68 (3H, s)	1,68 (3H, s)
17	20,61(CH <sub>3</sub> )	20,8 (CH <sub>3</sub> )	1,66 (3H, s)	1,66 (3H, s)
18	17,68(CH <sub>3</sub> )	17,9 (CH <sub>3</sub> )	1,02 (3H, s)	1,02 (3H, s)
19	20,41(CH <sub>3</sub> )	20,3 (CH <sub>3</sub> )	0,93 (3H, s)	0,94 (3H, s)
20	15,53(CH <sub>3</sub> )	15,8 (CH <sub>3</sub> )	1,15( 3H, d, 6,9)	1,15 (1H, d, 6,8)
1'	147,55 (C)	146,8 (C)		
2'	113,59(C)	126,8 (C)	6,69 (1H, d, 3,0)	6,69 (1H, d, 3,0)
3'	128,27 (CH)	114,4 (CH)		
4'	112,89(CH)	152,5 (C)	6,54 (1H, d, 2,7)	6,54 (1H, d, 2,6)
5'	151,74 (C)	113,2 (CH)		
6'	125,65 (C)	124,0 (C)		
7'	17,53(CH <sub>3</sub> )	16,7 (CH <sub>3</sub> )	2,22 (3H, s)	2,22 (3H, s)
8'	55,03(CH <sub>3</sub> )	55,5 (CH <sub>3</sub> )	3,73 (3H, s)	3,73 (3H, s)

# Wessels et al., 1999, Soares, 2001

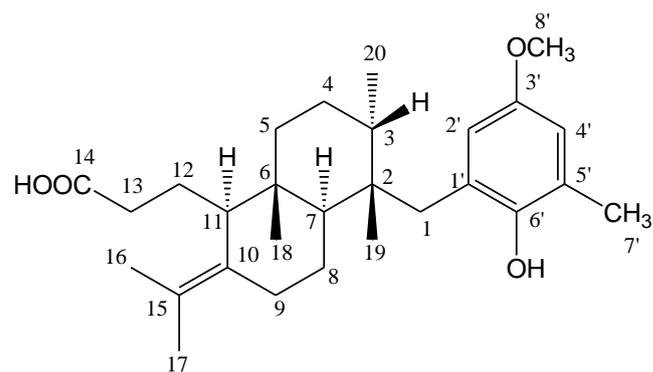


Figura 35 - Estrutura do ácido atomárico

## 6 - RESUMOS E CONCLUSÕES

Neste trabalho se avaliou a variação de biomassa, o perfil cromatográfico dos extratos de *Styopodium zonale* antes e após o cultivo bem como do extrato bruto para isolamento e elucidação estrutural, a medida da quantificação da atividade antioxidante e do teor de lipídio e proteína nas algas frescas, o que em tese pode justificar seu uso popular como um possível alimento funcional. Para a obtenção do extrato, as algas foram secas à temperatura ambiente, trituradas e maceradas com diclorometano. Os extratos brutos das réplicas antes e pós - cultivo foram injetados no CLAE, os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter uma substância purificada e para o conhecimento do perfil químico do extrato bruto. Após a purificação da substância isolada, esta foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural. O extrato bruto, as frações (ácida e neutra) e padrões químicos foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante. As principais conclusões do estudo podem ser assim resumidas:

### **6.1 - Avaliação do teor de proteínas e lipídios totais**

Observou-se que o teor de lipídio, que foi detectado nas amostras de algas frescas permaneceu dentro dos limites relatados pela literatura, enquanto que o teor de proteínas, ficou acima dos valores protéicos encontrados em outros estudos para algas pardas. Estes teores observados na espécie *S. zonale*, mostram de forma clara, que esta espécie é nutricionalmente promissora e pode ser transformada em um alimento funcional de origem marinha.

### **6.2 – Variação de biomassa**

A variação negativa de biomassa ocorreu em 86,66% das réplicas, sendo que em 13,34% (algas 5 e 6) apresentaram ganho de biomassa, pois, elas aproveitaram de maneira eficiente a alocação dos nutrientes presentes no meio para produção de matéria orgânica. A redução de biomassa na maior parte dos espécimes fez com que estatisticamente este experimento não apresentasse diferença significativa. Estas variações intra - específicas que ocorreram naturalmente, através de processos fisiológicos, foi uma resposta destes organismos à existência de parâmetros ambientais (nutricional) e/ou parâmetros bióticos relacionados à idade, ao tipo de tecido, genética e estado físico das algas.

### **6.3 - Variação do perfil químico após cultivo**

Os extratos brutos das réplicas da *Styopodium zonale* quando avaliados por CLAE, apresentaram perfis cromatográficos. A partir da análise dos picos e das informações contidas nas tabelas construídas, foi possível visualizar as variações de substâncias presentes nos espécimes antes e após a realização do cultivo sob estresse nutricional. As variações ocorreram em

todos os sentidos: picos que aumentaram a área, picos que reduziram a concentração, picos que se tornaram mais visíveis, picos que se tornaram inexpressivos. As condições experimentais testadas, que duraram uma semana, proporcionaram suportar a hipótese de que alterações nas concentrações de nutrientes, bem como, a idade e estado físico das réplicas podem interferir na resposta química qualitativa. Estes resultados corroboram com outros estudos no sentido de confirmar que variações nos parâmetros bióticos e abióticos, interferem no metabolismo químico das algas.

#### **6.4 - Avaliação da atividade antioxidante**

O extrato e as frações (ácida e neutra) e padrões foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante. O extrato (E.B), e a fração ácida (F.A) apresentaram uma capacidade antioxidante superior a 80 % na concentração de 100 µg/mL. Um aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada à presença de meroditerpenos.

#### **6.5 - Avaliação do perfil químico**

O extrato bruto foi submetido ao fracionamento acidobásico dando origem à fração orgânica ácida. Desta fração, após a realização das técnicas cromatográficas de separação de substâncias, resultou em subfrações, que por apresentarem semelhança no perfil químico, foram reunidas e separadas por Cromatografia Líquida em Coluna Preparativa, na qual a substância que apresentou o pico codificado SH28 foi escolhida. A substância purificada (SH28) foi enviada para RMN, e elucidada a sua estrutura, de acordo com dados espectroscópicos, foi identificada como ácido atomárico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALI, S. S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A., BORA, U. (2009) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41: 1–15.

AGENCIA FAPESP (2010) acessado em dezembro. Disponível em: <http://www.agenciafapesp.com.br>.

ALGAEBASE (2010) listing the world's algae. on line acessado em agosto. Disponível em: <http://www.algaebase.org>.

ALMEIDA, V .P.; CERIONE, E. M.; CAVGIONI, M. G.; BREIER, T. B.; BARRELLA W.; (2008). Levantamento de Espécies de Algas Planctônicas e Análise da Água do Lago do Zoológico Quinzinho de Barros, Sorocaba (SP). *Revista Eletrônica de Biologia*. Volume 1 (2):18-27.

ALONSO, D.; MAROTO, F. Plant as chemical factories for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.* , v. 18, p. 481-497, 2000.

AMBIENTE BRASIL (2010). acesso em agosto. <http://www.ambientebrasil.com.br>.

ARAÚJO, T. S.; ARAÚJO, L. H. G. D.; OLIVEIRA, D. C.; CARVALHO, R. C. X.; JIMENEZ, G. C.; BARZA, E. C. N.; ANJOS, F. B. R. 2005. Morfometry of the thorns of the sea urchins found in beaches of the south coast of Pernambuco-Brazil. *Encontro Intercotinental Sobre a Natureza*. Fortaleza. 1-7.

BARROS, M.P.; PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; CARDOZO, K.H.M. & BELL, J.G. e SARGENT, J.R (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, v.218, p.491-499.

BERCHEZ, F.A (2010). Projeto Ecossistemas Costeiros, IB-USP. acesso em outubro. [http:// www.ib.usp.br/ecosteios](http://www.ib.usp.br/ecosteios). acesso em setembro.

BERNARDES, N. R., (2010). Tese de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos de Extratos dos Frutos da Aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi). 105 p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917.

BLUNDEN, G (1991). Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. In: GUIRY, M. D.; BLUNDEN, G. (Ed.) Seaweed resources in Europe: uses and potential. England: John Wiley & Sons. p. 65-94.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., MUNRO, M.H., NOTHCOTE, P.T. & PRINSET, M.R. (2006) Marine Natural products. *Natural Product Reports*, 23(1), p.26-78.

BURTIN P (2003) Nutritional value of seaweeds. *Elec J Environ Agric Food Chem* 2, 498–503

CALDER P. C (2003). Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res*. 36(4):433.

CARVALHO, I. S (2004). Paleontologia. 2 ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 12-32.

CARVALHO, L., R., ROQUE, N. F. (2000); Revisão fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *química nova*, 23(6).

CASSOLATO, J. E. F. (2008). Determinação da estrutura química e atividade Biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (ulvales - chlorophyta). Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHANDINI, S. K., GANESAN, P., & BHASKAR, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107, 707–713.

COSTA, J. A. V.; RADMANN M. E.; CERQUEIRA, S. V.; SANTOS, C. dos G.; CALHEIROS, N. M (2006). Perfil dos ácidos graxos das microalgas *chlorella vulgares* e *chlorella minutíssima* cultivados em diferentes condições. Vol.17, Nº 4, p. 429-436.

DEGÁSPARI, C. H. (2004) Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI). Tese de Doutorado – Curitiba – PR. Universidade Federal do Paraná, 104 páginas.

DORTA, E., CUETO, M., BRITO, I., DARIAS, J., (2002). New terpenoids from the brown alga *Styopodium zonale*. *J. Nat. Prod.* 65, 1727–1730.

DORTA, E., M., DIAZ-MARRERO, A.R., CUETO, M. & DARIAS, J., (2003). On the relative stereochemistry of atomaric acid and related compounds. *Tetrahedron* 59, 2059-2062.

EDWARDS KF, PFISTER CA, VAN ALSTYNE KL (2006) Nitrogen content in the brown alga *Fucus gardneri* and its relation to light, herbivory and wave exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 99-109.

FABRI, R. L. (2008) Estudo fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. Biomonitorado pela atividade antimicrobiana e avaliação das atividades citotóxica, leishmanicida e antioxidante. Dissertação de

Mestrado – Juiz de Fora – MG, Universidade Federal de Juiz de Fora, 148 páginas.

FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2007). El Estado Mundial de La Acuicultura. Roma, Itália.p. 218.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S, (2001). Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 86, n. 6, p. 1540-1546.

FLEURENCE, J (1999). Seaweeds proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, London, v.10, n.1, p. 25-28.

FREITAS, O., S., P. (2006) . Perfil Químico e ação defensiva comparativa de extratos brutos de diferentes localidades do litoral brasileiro da alga parda marinha *Dictyota mertensii* (DICTYOTALES, PHAEOPHYTA). Tese de Doutorado, UFF.

GALLAND-IRMOULI, A.V.; FLEURENCE, J.; LAMGHARI, R.; LUCON, M.; ROUXEL, C.; BARBAROUX, O.; BRONOWICKI, J.P.; VILLAUME, C.; GUEANT, J.L. (2009). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *Journal of Nutritional Biochemistry*, New York, v.10, n.6, p. 353-359.

GLOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Revisão. *Química Nova*, Vol. 30 (2): 374-381.

GONZALEZ, A. G. ; DARÍAS, J. e MARTÍN, J. D (1973). *Tetrahedron*, 29, 1605.

GONZALEZ, A. G. ; DARÍAS, J. e MARTÍN, J. D. & NORTE, M. (1974). Atomaric acid, anew component from *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters.*, 45 , 3951-3954.

HALILOGLU, H.I. et al (2003). Comparisons of fatty acid composition in some tissues of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chemistry*, v.86, p.55-59.

HALLIWEL, B. et al. (2009) The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford.33 (7): 601-17.

HARDY, E. R. e CASTRO, J. G. D. (2000). Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. *Acta Amazônica*, 30 : 39/47.

HAVEN, P.; EVERT. R.; EICHHORN, S. (2001). *Biologia Vegetal*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HEIM, K. E. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*. 13: 572-584.

JENSEN, S. L, FAULKNER, D. J.; FENICAL, W. H.(1977). in *Marine Natural Products Chemistry*; Eds.; Plenum Press; New York, p 239.

KAVALCO, K.; (2010). Algas Marinhas - Importância Econômica e Ecológica. acessado em outubro .<http://www.biociencia.org>.

KH WONG, E CHEUNG PCK, (2000). Avaliação de algas vermelha e verde. *Nutricional CSMCRI, Bhavanagar*, pp: 277-288.

KHOTIMCHENKO, S. V., VASKOVSKY, V. E., & TITLYANOVA, T. V. 2002. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of north California. *Botanica Marina*, 45, 17–22.

LACHMAN, J., ORSAK, M., HEJTMANKOVA, A., KOVAROVA, E. (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology*. 43:52–58.

LI, B.; WEI, X. –J.; SUN, J. –L.; XU, S. –Y (2006). Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.*, v. 341, p. 1135-1146.

LIMA, R. F. et al. (2004). Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 11, n. 56, p. 1415-1421.

LOPANIK NB, TARGETT NM, LINDQUIST N (2006) Ontogeny of a symbiont-produced chemical defense in *Bugula neritina* (Bryozoa). *Marine Ecology Progress Series* 327: 183-191.

MAMATHA, B. S. et al. (2007). Studies on use of *Enteromorpha* in snack food. *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1707-1713.

MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W.S.C.; CARNEIRO, M.A.A (2006). Some aspects of the growth of *G. Birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in Northeast Brazil. *Aquaculture Internacional*. V. 14(4), p.327-336.

MARIOD, B. A., IBRAHIM, R. M., ISMAIL, M., ISMAIL, N. (2009) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* 118: 120–127.

MATANJUN P, MOHAMED S, MUSTAPHA NM, MUHAMMAD K, MING CH (2008) Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-007-9264-6.

MAYER, A. M. S., & LEHMANN, V. K. B. (2000). *Marine Pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antiinflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoan, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action.* *The Pharmacologist*, 42(2), 62–69.

McHUGH, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em <<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4765E/y4765e00.htm#Contents>> Acesso em:14.08.2004. 2003.

McLEAN, J. A.; KARADAS, F.; SURAI, P.; McDEVITTI, R.; SPEAKE, B. (2005) Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 141, n. B, p. 366- 372.

McMURRY, J. (2005) Química orgânica. 6ª edição, 1, Thomson: São Paulo.

MENONE, M.L., PESCE, S.F., DÍAZ, M.P., MORENO, V.J., WUNDERLIN, D.A. (2008). Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry* 69, 1150–1157.

MOLYNEUX, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 26(2) : 211-219.

MONTERO, D. et al. Vegetable lipids source for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, v.225, p. 353-370, 2003.

MORAIS, M. G. (2006). Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

MURAMAKI, E. A.; RODRIGUES, L. (2009). Resposta das algas perifíticas às alterações de temperatura e ao enriquecimento artificial de nutrientes em curto período de tempo. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. Maringá, v. 31, n. 3, p. 273-284.

NALDI, M.; WHEELER, P. A.; (1999). *J. Phycol.* 35, 70.

NETO, T M. (2009). Cultivo de carregenófita *Hypnea musciformis* (wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales – Rhodophyta) em estruturas long – line. Tese de mestrado. Universidade Federal do Ceará – Ce. Fortaleza, 46p.

NIMPTSCH, J., PFLUGMACHER, S., (2007). Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. *Chemosphere* 66 (4), 708–714.

NISHIHARA, G.N., TERADA, R. & NORO, T. (2005). Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). *Journal of Applied Phycology* 17: 371–377.

NORZIAH, M. H., & CHING, Ch.Y. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry*, 68, 69–76.

NORZIAH, MH E CH CHING Y., (2002). Composição comestível *Gracilaria changgi* algas. *Nutricional Sci acadêmico indiano*, B 45 43-63.

OLIVEIRA, D. B.; PESSANHA, N. N. C.; BERNARDES, N. R.; SILVA, W. D.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. R. (2009) Extrato dos frutos de *Cereus Fernambucensis*: Atividade Antioxidante e Inibição da Produção de Óxido Nítrico (NO) por Macrófagos. *Interscienceplace*, ano 2 , n. 07, Maio/Junho.

ORTIZ, J., ROMERO, N., ROBERT, P., ARAYA, J., LOPEZ-HERNANDEZ, BOZZO, C., NAVARRETE, E., OSORIO, A., e RIOS, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry* 99 (1), 98-104.

PAINTER, T.J. (1983). Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). *The polysaccharides*, v. 2, p. 195-285.

PATARRA, R. F.; (2008). Pesquisa de Ácidos gordos em macroalgas marinhas do litoral de Açores. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de mestre em Ciências do mar – Recursos Marinhos, especialidade em Biologia Marinha, Porto.

PAUL, V.J., CRUZ-RIVERA, E.; THACKER, R.W. (2001). Chemical Mediation Of Macroalgal Herbivore Interactions: Ecological And Evolutionary Perspectives. In: Marine Chemical Ecology. (J.B. McClintock And B.J. Baker, Eds.) Crc Press, Baton Rouge. P. 227–265.

PAVIA, H & BROCK, E. 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, 193: 285-294.

PEREIRA, R. C. & DA GAMA, B. A. P. 2008. Macroalgal chemical defense and their roles in structuring tropical marine communities, *In: Amsler, C. D. (ed.) Biological Rhythm Research*, 36: 67-82.

PEREIRA, R.C.; SOARES, A.R.; TEIXEIRA, V.L.; VILLAÇA, R. (2004); Da Gama, B.A.P.; *Bot. Mar.* 47, 202.

PFETZING, J.D. et al. Effects of temperature and prolonged emersion on photosynthesis, carbohydrate content and growth on the brown intertidal alga *Pelvetia canaliculata*. *Botanica Marina*, New York, v. 40, p. 399-407, 2000.

PINTO, M. V., GRACAGLIA, G. E. O., ASSIS, M. R. (2009). Aquicultura sustentável – Produção de alga marinha da espécie “*Kappaphycus Alvarezii*” em Ubatuba – Sp. V congresso nacional de excelência em gestão. Niterói – Rj.

PODSEDEK, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol*, v. 40, p. 1-11.

POHNERT, G. 2004. Chemical defense strategies of marine organisms. *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*, 239: 179-219.

POMPÊO, M.L.M. (1999). As macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais: aspectos ecológicos e propostas de monitoramento e manejo. In: Pompêo, M.L.M. (Ed.) *Perspectivas da Limnologia no Brasil*. p.105-119.

PREISSER E.L., GIBSON, S.E., ADLER, L., LEWIS, E.E. (2007). Underground herbivory and the costs of constitutive defense in tobacco. *Acta Oecol.*, 31, 210-215.

PROVASOLI, L. (1968). Media and prospects for cultivation of marine algae. *In* Cultures and Collections of Algae (A. Watanabe & A. Hattori, eds.). Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo, p. 47-74.

REINFERATH, K., MULL, C. (2007). Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. *Phytochemistry* 68, 875–885.

REIS, R. P.; LEAL, M. C. R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. and BELLUCO, F., Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). *Acta Bot. Bras.* [online]. 2003, vol.17, n.2, pp. 279-286. ISSN 0102-3306.

RENAUD, S. M. e LUONG-VAN, J. T. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 18, 381- 387.

ROBIN, J.H. e VINCENT, B. (2003). Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture*, p.463-474.

ROSS, J. A., KASUM, C. M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19–34.

ROUSSIS, V., VAGIAS, C., KEFALAS, P., ANAGNOSTOPOULOU, M. A., ABATIS, D., NAHAS, R. (2007). Radical-Scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Chem. Food.*, 102, 577-581.

SALGADO, L. T.; VIANA, N. B.; ANDRADE, L. R., LEAL, R. N., DA GAMA, B.A.P; ATTIAS M., PEREIRA R. C. AND AMADO FILHO, G. M. (2008). Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Structural Biology*, 162:345-355.

SÁNCHEZ-MACHADO DI, LÓPEZ-HERNANDÉZ J, PASEIRO-LOSADA P (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem*, 85, 439–444.

SANCHEZ-MACHADO, D. I., LÓPEZ-HERNANDEZ, J., & Paseiro-Losada, P. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of a-tocopherol in macroalgae. *Journal of Chromatography A*, 976, 277–284.

SANDER, A.B.T. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 71, p. 176-178.

SANTEIRO, R. M.; PINTO-COELHO, R. M.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. (2006).

SARGENT, J.G.M. et al. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v.177, p.191-199.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 10: 308-313.

SHIBATA, Y.; MORITA, M. (1998). *Agric. Biol. Chem.* 52, 1087.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, London, v. 107, p. 50-55.

SILVA, R.C.C. (2004). Macroalgas marinhas bentônicas das Unidades de Conservação de Grumari e Prainha no Município do Rio de Janeiro – RJ. 164f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. (1998) Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª edição, LTC.

SIMÕES, C. M. O., (2006). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. Universidade/ UFRGS. Cap. 16, pág. 323.

SOARES, A. R. (2001). Variação dos diterpenos da alga parda marinha *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). Tese de mestrado em Química Orgânica, UFF, 121p.

SOARES, A. R. (2005). Produtos naturais da alga parda marinha *stypopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta) do litoral brasileiro. Tese de Doutorado em Química Orgânica, UFF, 193p.

SOARES, A.R.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C.; VILLAÇA, R.C. (2003). Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 1347-1350.

SOUSA, M. B. (2005). Extração e quantificação de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em macroalgas marinhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. (2007). Fatty acids Omega-3 and Omega-6 in fish nutrition-sources and relations. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.6, n.1, p. 63-71.

SUDATTI, D. B., RODRIGUES, S. V. & PEREIRA, R. C. (2006). Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: Determination of surface and withinthallus elatol of *Laurencia obtusa*. *Journal of Chemical Ecology*, 32:835-43.

SUKRAN D.; DALKIRAN N., DIDEM G. K.; YILDIZ G., DERE E. A determinação do total de proteínas, carboidratos solúveis totais e pigmentos conteúdo de algumas algas coletadas Gemlik-Karacaali (Bursa) e Ormanlı-Erdek (Balıkesir) no Mar de Mármara, na Turquia. *Oceanologia*, 45 (3), 453-471, 2003.

SZE-TAO, K. W. C.; SATHE, S. K. (2000). Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, v. 69, p. 153-160.

TEIXEIRA, V.L. CAVALCANTI, D.N. & PEREIRA, R.C. (2001) Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemistry Systematics and Ecology*, 29, p. 313 - 316.

TIWARY, A.K., (2001). Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr Sci* 81: 1179-1187.

TONON, T.; HARVEY, D.; LARSON, T.R.; GRAHAM, I.A. (2003). Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid D4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS letters*, v.533, p.440-444.

URBANO, M. G.; GOÑI, I. (2002). Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fiber. *Food Chemistry*, v. 76, p. 281-286.

VALLIM, A.; DE PAULA, J.C.; PEREIRA, R.C. e TEIXEIRA, V.L. (2005). The Diterpenes from Dictyotacean marine Brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33 (1), 1-16.

VERGÉS A, PAUL NA, STEINBERG PD (2008) Sex and life-history stage alter herbivore responses to a chemically defended red alga. *Ecology* 89: 1334-1343

VERLAQUE, M., STEEN, F. & DE CLERCK, O. (2009). *Rugulopteryx* (Dictyotales, Phaeophyceae), a genus recently introduced to the Mediterranean. *Phycologia* 48(6): 536-542.

VIDOTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Química Nova. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>> Acesso em: 22.09.2005. 2004.

VILLENEUVE, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244-282.

WAITZBERG DL, BORGES VC. (2002). Gorduras. In: Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3ª edição. São Paulo: Atheneu.p: 59-64.

WARD JR. (2007) Within-colony variation in inducibility of coral disease resistance. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 371-377.

WESSELS, M., KONIG, G.M., WRIGHT, A.D., (1999). A new tyrosine kinase inhibitor from the marine brown alga *Styopodium zonale*. *J. Nat. Prod.* 62, 927–930.

WONG, K. H., & CHEUNG, P. C. K. (2000). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I–proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 71, 475–482.

[www.smithsonianresearchinstitute.com](http://www.smithsonianresearchinstitute.com), (2010). acessado em novembro.

YOUNG, I. S., WOODSIDE, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54:176-186.

ZHANG, S., KLESSIG, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *TRENDS Plant Sci.*, 6 (11), 523-527.

ZHANG, Z., ZHANG, Q., WANG, J., SONG, H., ZHANG, H., NIU, X. (2010) Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyran from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydrate Polymers*. 79:290–295.

## APÊNDICE

Tabela 1A - Taxas de Variação do Perfil Químico em % Relativo aos Experimentos antes e depois

Grupos	Réplicas	Picos																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Grupo I	1	-0,26	-4,23	+0,11	- 3,12	+1,24	+0,04	-10,13	-0,80	-1,50	+3,80	+0,07	+0,24	+0,53	+14,13	+0,08	+3,35	+8,56	-0,18	+1,34
	2	+0,05	0	+1,47	+2,55	+6,58	0	+1,85	+2,00	0	+15,9	-0,50	+9,80	-32,13	+34,69	+1,25	-3,68	+8,57	-6,24	+0,14
	3	-1,34	+3,80	+1,43	+2,80	-3,34	+0,81	+3,55	+3,87	+0,95	-7,78	+3,22	-2,02	+0,02	-1,86	+1,74	-3,57	+2,39	-1,08	+5,04
	4	-1,45	+1,92	+0,47	+19,6	-1,90	-1,61	-15,77	-5,43	+0,76	-8,49	+1,66	-2,69	-0,68	-5,40	+1,74	-0,09	+0,99	-5,74	-0,34
	5	-1,85	+1,44	-0,02	+17,9	-1,49	-3,37	-21,82	-7,01	+0,69	-7,38	+1,99	-1,67	-1,01	+0,03	+1,02	+1,37	+1,90	+0,03	+1,64
Grupo II	6	+2,06	-1,14	+0,21	+0,33	+2,77	-5,43	+2,46	+0,83	-1,05	-0,44	-0,34	-0,05	+0,35	-8,75	-0,56	+4,12	+12,47	+0,70	-0,93
	7	+0,49	-1,08	+0,61	+7,08	+5,51	-5,82	-1,45	+0,54	-1,16	-1,08	+0,41	-1,02	+0,34	-5,06	-0,82	+1,85	-0,31	+0,59	-2,50
	8	-0,50	+2,01	+1,19	-2,37	+2,25	-2,41	-1,53	-1,34	+1,07	-2,71	+0,10	-0,77	-0,31	+0,90	-0,27	+1,22	-1,34	+0,87	-2,90
	9	-0,39	-1,07	-0,05	-2,11	+3,30	-5,95	-4,92	-2,46	-1,25	-1,54	-0,17	+1,58	+0,09	-3,28	-0,01	+9,46	+11,55	+0,90	-2,32
	10	+0,08	0	0	+0,55	+3,40	0	-3,18	-1,45	0	-7,16	-0,36	-4,39	+0,36	-8,76	+1,01	+7,94	+17,14	+1,31	-4,18
Grupo III	11	-0,80	-3,14	+0,32	+2,41	-0,68	-0,36	-9,43	-3,02	-0,98	-4,71	-0,51	-1,37	+0,37	-18,55	+1,28	+10,90	+20,65	+1,18	-2,77
	12	-0,87	-0,83	-1,38	-0,57	-1,83	0	-0,87	-5,59	-1,23	-3,15	-0,19	+0,06	+0,09	-5,78	+0,58	+6,52	+15,15	+0,77	-1,84
	13	-2,43	0	-0,73	-3,82	+0,10	0	+0,67	-0,17	0	-5,23	-0,45	-3,48	+0,40	+6,78	+1,01	+8,87	+13,98	+0,95	-5,39
	14	-1,35	+1,70	-0,44	-5,77	-2,97	-2,42	-18,57	-4,07	-0,47	-9,30	+2,76	-3,80	+0,43	-4,68	+1,57	+1,69	+4,12	+0,84	+15,28
	15	-0,52	+2,47	+1,62	-2,14	-2,08	0	-2,09	+0,97	+0,86	-11,49	+3,08	-5,65	+0,18	-2,52	+2,28	+0,74	+1,04	-1,09	+0,43

Variação % (**Positiva (+)** **Negativa (-)**)