Vanessa Urrea-Victoria

Efeito do estresse térmico sobre respostas fisiológicas, composição química e potencial antioxidante de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) e *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta)

Effect of thermal stress on physiological responses, chemical composition and antioxidant potential of *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) and *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta)

> Desenho modificado de Escher (1948)

> > São Paulo (SP) 2018

Vanessa Urrea-Victoria

Efeito do estresse térmico sobre respostas fisiológicas, composição química e potencial antioxidante de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) e *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta)

Effect of thermal stress on physiological responses, chemical composition and antioxidant potential of *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) and *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta)

> Desenho modificado de Escher (1948)

> > Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Fungyi Chow

São Paulo (SP) 2018 Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor no formulário: http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php

```
Urrea-Victoria, Vanessa
Efeito do estresse térmico sobre respostas
fisiológicas, composição química e potencial antioxidante
de Sargassum stenophyllum (Fucales, Ochrophyta) e
Pyropia spiralis (Bangiales, Rhodophyta). / Vanessa
Urrea-Victoria; orientadora Fungyi Chow. -- São Paulo,
2018.
195 f.
195 f.
Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.
1. Antioxidantes. 2. Bangiales. 3. Fisiologia. 4.
Fucales. 5. Nutrição. I. Chow, Fungyi , orient. II. Título.
```

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação: Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). **Dr**(a).

Profa. Dra. Fungyi Chow Orientadora

Ao Brasil

í



'Ordre et progrès' Comte

À Universidade de São Paulo, obrigadão!

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES** - N° 2326859) e a partir de março de 2015, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP** - 2014/25073-3) pelas avaliações anuais e concessão da verba para a realização deste projeto de investigação. Adicionalmente, ao Auxílio à Pesquisa **BIOTA/FAPESP** (2013/50731-1).

A **minha orientadora**, Profa. Dra. Fungyi Chow pela paciência, dedicação e múltiplos ensinamentos no processo de Doutorado Direto. *¡Muchas gracias!*

Aos técnicos do meu **Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula"** (LAM), Rosário Petti, William Oliveira e André Nakasato pela ajuda e auxílio nos experimentos e grata companhia ao longo destes anos. Aos colegas do LAM, especialmente ao Alexandre Souza, Allyson Nardelli, Ana Amorim, Carolina Azevedo, Cíntia Iha, Fabiana Marchi, Fábio Nauer, Janaína Pires, Patricia Guimarães e Talissa Harb pelas conversas e risadas. À Luz K Polo que se tornou uma irmã, "gracias por el apoyo y tiempo". Ao Bruno, Luis e Rodrigo pelo acompanhamento e ajuda técnica.

À Profa. Dra. Eny Floh pela disponibilidade do equipamento no Laboratório de Biologia Celular de Plantas. À técnica Amanda Macedo pela ajuda nas injeções dos extratos no CLAE com detector de fluorescência.

Às professoras Dra. Déborah Y.A.C. dos Santos e Dra. Cláudia Furlan pelos ensinamentos e disponibilidade dos equipamentos do **Laboratório de Fitoquímica**. Às técnicas Mourisa de Sousa Ferreira e Aline Bertinatto Cruz pela ajuda nas injeções nos ensaios de Cromatografía Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, especialmente, a Priscila Torres e a Alice Nagai pela constante ajuda, críticas nas revisões do documento, e amizade.

Às professoras Dra. Estela Maria Plastino, Dra. Mariana Cabral de Oliveira e Dra. Mutuê Toyota Fujii pelas críticas e sugestões durante meu exame de qualificação.

À minha **família**, Piedad Victoria, Tatiana Urrea-Victoria e Alfredo Urrea, pelo apoio, companhia e força à distância. "*Gracias por regresarme a la superfície*". À minha cara e charmosa companhia, **Kuroi**.

Aos meus amigos pela torcida toda!

Resumo geral

Urrea-Victoria, V. Efeito do estresse térmico sobre respostas fisiológicas, composição química e potencial antioxidante de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) e *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta). 2018. 195 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Botânica. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.

As flutuações de temperatura no ambiente marinho, decorrentes de processos naturais e de atividades antrópicas, como a flutuação das marés, o resfriamento de usinas e o aquecimento global afetam a dinâmica ecológica e as respostas fisiológicas de organismos marinhos, especialmente das macroalgas bentônicas. Macroalgas que ocorrem nos limites das faixas entremarés podem estar sujeitas a fortes variações de temperatura em curto-prazo, como por exemplo: Sargassum e Pyropia. Sob aquela perspectiva, o objetivo deste projeto foi prover subsídios para a compreensão do efeito da temperatura e dos mecanismos de tolerância e sensibilidade das espécies do mediolitoral paulista Sargassum stenophyllum (Fucales, Ochrophyta) e Pyropia spiralis (Bangiales, Rhodophyta) mediante a análise da performance fotossintetizante, variação na composição química e respostas antioxidantes, além de fornecer informação sobre o seu potencial como produto funcional. As respostas das algas modelos foram avaliadas sob temperaturas de 15, 20, 25 (controle), 30 e 35 °C ao longo de sete dias, em condições controladas de laboratório. As espécies de estudo mantiveram proporções semelhantes na dissipação de energia e taxa de crescimento, e poucas alterações no perfil químico (p. ex. pigmentos, carboidratos, carotenoides e aminoácidos) entre os 15 e 30 °C, o qual pode ser compreendido como faixa de tolerância. Em contraste, existiu sensibilidade no talo das macroalgas estudadas na temperatura de 35 °C, tendo diminuição na fotossíntese e crescimento desde o terceiro dia do período experimental. Em alta temperatura, acima de 30 °C, tanto os filoides de S. stenophyllum quanto o talo da P. spiralis podem ter liberado substâncias químicas, como substâncias fenólicas, evidenciado pela mudança de cor na água do mar. Em condição de baixa temperatura (15 °C), P. spiralis mostrou acúmulo de aminoácidos tipo-micosporinas. Em termos gerais, as espécies de estudo são promissoras como produto funcional envolvido na área de alimentação devido à sua composição nutricional e propriedades antioxidantes.

General abstract

Urrea-Victoria, V. Effect of thermal stress on physiological responses, chemical composition and antioxidant potential of *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) and *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta). 2018. 195 p. Doutoral thesis. Botanical postgraduate program. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Temperature fluctuations in the marine environment, due to natural processes and anthropogenic activities, caused by tidal fluctuation, cooling of energy power plants, and global warming affect the ecological dynamics and physiological responses of marine organisms, mainly in benthic macroalgae. Seaweeds inhabiting the boundaries of the intertidal zone may be subjected to strong short-term temperature variations, such as Sargassum and Pyropia. On this perspective, the aim of this project was to provide subsidies for understand the effect of temperature and the mechanisms of tolerance and sensitivity of the intertidal species Sargassum stenophyllum (Fucales, Ochrophyta) and Pyropia spiralis (Bangiales, Rhodophyta) from São Paulo, through the analysis of photosynthetic performance, chemical variation, and antioxidant responses, as well as, to provide information about its potential as functional product. The responses of the studied seaweeds were evaluated under temperatures of 15, 20, 25 (control), 30 and 35 °C over seven days in laboratory controlled conditions. The species displayed similar proportions in energy dissipation and growth rate, and few changes in the chemical profile (e.g. pigments, carbohydrates, carotenoids, and amino acids) between 15 and 30 °C, which can be identificated as thermal tolerance range. In contrast, algae were sensitive at 35 °C, with decrease in photosynthesis and growth since the third day of the experimental period. Under high temperature, above 30 °C, S. stenophyllum phylloids and P. spiralis thalli might have released chemical compounds, such as phenolic compounds, evidenced by color change of the seawater. Under low temperature condition (15 °C), P. spiralis showed accumulation of mycosporin-like amino acids. In general, the studied species are promising as a functional product involved in the feed area due to its nutritional composition and antioxidant properties.

Abreviaturas

α	eficiência fotossintetizante
λmáx	comprimento de onda máximo
А	absorbância
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AFC	aloficocianina
ANOVA	análise de variância (ANalysis Of VAriance)
A _p	absorptância
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada (Branched-Chain Amino Acids)
BHA	butil hidroxianisol
BHT	butil hidroxitolueno
BSA	albumina do soro bovino (Bovine serum albumin)
CHN	carbono, hidrogênio e nitrogênio
C:N	relação carbono: nitrogênio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COI-5P	região 5' do gene que codifica a subunidade 1 da citocromo c oxidase
	(Cytochrome c oxidase subunit I)
ADN	ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC50	concentração efetiva para alcançar 50% da atividade antioxidante (Half
	maximal Effective Concentration)
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
ETR	taxa transportadora de elétrons (Electron Transport Rate)
ETRmax	ETR máximo
ETR x PAR	curva de fotossíntese-irradiância
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and
	Agriculture Organization)
FC	ficocianina
FDT	fibra dietética total
FE	ficoeritrina
FRAP	atividade de redução de ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power)
F_v/F_m	rendimento quântico máximo
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HSP	proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein)

ICAT	índice de capacidade antioxidante total
Ik	saturação luminosa
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (Intergovernmental
	Panel on Climate Change)
ITS-2	região do espaçador interno transcrito DNA ribossômico nuclear (Internal
	Transcribed Spacer)
MAA	aminoácidos tipo-micosporinas (Mycosporine-like Amino Acids)
MF	massa fresca
MS	massa seca
$\mathrm{NH_4^+}$	amônio
NO	óxido nítrico
NO_2^-	nitrito
NO ₃ -	nitrato
O ₂	oxigênio
O2•-	superóxido
PAM	pulso de amplitude modulada
PAR	radiação fotossinteticamente ativa
PCA	análise de componentes principais (Principal Components Analysis)
PCR	reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RO•	radical alcoxila
ROO•	radical peroxila
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase
TC	taxa de crescimento
UV	ultravioleta
VS	von Stosch

Figura 1. Relação da temperatura no (A) cenário oceânico, (B) estuarino e (C) litorâneo. A imagem do item A foi produzida com dados de temperatura da superfície do mar de abril de 2018 feito pelo grupo Regional Ocean Modeling System (ROMS).

Figura 2. Modelo de predição da temperatura média anual conforme o relatório do IPCC (2014).

Figura 3. Simulação das variações da temperatura da superfície média global entre 2000 a 2100, segundo o relatório do IPCC (2014). (A) Gráfico de temperatura versus tempo, na qual a faixa vermelha representa um cenário pessimista com emissões de gases-estufa aumentando exponencialmente e a faixa azul representa um cenário otimista com drásticas reduções na emissão de gases-estufa. (B) Mapamundi com a previsão dos 32 °C e (C) Mapamundi com a previsão dos 39 °C.

Figura 4. Estágios sequenciais impostos pelo estresse à temperatura. Adaptado de Lichtenthaler (1998).

Figura 5. Produção de radicais livres, sendo que após um processo de estresse oxidativo induzido pelo estresse térmico, esses radicais são mitigados pelos antioxidantes.

Figura 6. Esquema geral da distribuição vertical (padrão de zonação) de alguns exemplares de macroalgas no costão rochoso, exemplificando a ocorrência das espécies em estudo, *Pyropia spiralis* e *Sargassum stenophyllum*. As linhas descontínuas indicam os limites das zonas do litoral.

Figura 7. Histórico de vida haplobionte diplonte de *Sargassum*. O talo diploide entra em meiose gamética no conceptáculo, no interior dos receptáculos, gerando gametas femininos. O conceptáculo masculino gera gametas masculinos, os quais são liberados ao ambiente e fecundam os gametas femininos contidos no conceptáculo feminino. Após a fecundação é formado o zigoto, que é liberado ao ambiente e germina produzido o talo juvenil que, por múltiplas divisões mitóticas gera o indivíduo adulto.

Figura 8. Histórico de vida bifásico com alternância de gerações de *Pyropia*. O talo corresponde à geração haploide gametofítica. Na sua porção marginal, dentro dos gametângios masculinos produzem-se os espermácios (gametas masculinos) que são liberados ao ambiente e fecundarão os carpogônios (gametas femininos) produzidos nos gamentângios femininos, formando um

zigoto diploide, o qual, por divisão mitótica, forma os conchosporos que são liberados, e por divisão meiótica, é formado o talo haploide.

Figura M.1. (A) Estado de São Paulo indicando a localização das praias de Cibratel 1 (Município de Itanhaém) e das Cigarras (Município de São Sebastião). (B) *Sargassum stenophyllum* na Praia de Cibratel 1, (C) *Sargassum stenophyllum* na Praia das Cigarras e (D) *Pyropia spiralis* na Praia de Cibratel. Fotos: V. Urrea-Victoria.

Figura M.2. Temperatura atmosférica mensal no período de janeiro de 2014 até dezembro de 2015 da (A) Praia de Cibratel (Fonte: INPE), indicando a média e os valores máximos e mínimos e da (B) Praia de Cigarras (Fonte: CEBIMar/USP), indicando o valor médio. Para cada uma das praias é assinalado (seta) o período de coleta das espécies de estudo.

Figura M.3. Esquema geral do delineamento experimental, incluindo coleta, aclimatação e as diferentes abordagens para *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis*, descrevendo a organização dos cinco capítulos deste estudo, os respectivos tempos de análise (Inicial, 1, 3, 5 e 7 dias) e as variáveis mensuradas.

Figure 1.1. General aspect of phylloids of *Sargassum stenophyllum* after seven days under different temperatures.

Figure 1.2. Photosynthetic performance of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures over time (Initial and after 1, 3, 5 and 7 days), measured as Y(PSII) - effective quantum yield or photochemical quenching, Y(NO) - non-regulated non-photochemical quenching and Y(NPQ) - regulated non-photochemical quenching. Different letters (white lowercase, black uppercase, and black lowercase) represent statistical differences for each variable (p < 0.05).

Figure 1.3. Electron transport rate (ETR)-PAR curves (mean \pm SD, n = 5) of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures over time: (A) day 1, (B) day 3, (C) day 5, and (D) day 7.

Figure 1.4. Contents of (A) chlorophyll *a*, (B) chlorophyll *c*, (C) total carotenoids, and (D) total soluble proteins of *Sargassum stenophyllum* (mean \pm SD, n = 5) cultivated under different temperatures over time. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).

Figure 1.5. Absorbance spectrum from 200 to 700 nm of (A) buffered extracts and (B) methanolic extracts of *Sargassum stenophyllum* (n = 5) cultivated under different temperatures at Initial time and after seven days of experimental period.

Figure 1.6. Content of soluble carbohydrates of *Sargassum stenophyllum* (mean \pm SD, n = 5) cultivated under different temperatures at Initial time and after seven days of experimental period. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).

Figure 1.7. Contents of amino acid profile (mean \pm SD, n = 5) of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).

Figure 1.8. Hierarchical clustering analysis (Gower's distance measure) and heat map representation among the amino acids of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period.

Figure 1.9. PCA biplot of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period and the Initial samples showing the loadings on PC1 and PC2, representing 32.99% and 20.03% of the total variance of the data, respectively.

Figura 2.1. Atividades antioxidantes de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento, expresso em porcentagem e equivalente de ácido gálico (µg.mL⁻¹) nos ensaios de (A) atividade sequestradora do radical DPPH; (B) atividade de captura do radical ABTS; (C) atividade quelante de metais; (D) atividade redutora do íon ferro, FRAP e (E) substâncias fenólicas e capacidade redutora pelo Folin-Ciocalteu. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Figura 2.2. Representação biplot da análise de PCA da atividade antioxidante de *Sargassum stenophyllum* no período Inicial e após sete dias submetido a diferentes temperaturas.

Figura 2.3. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de carotenoides e outros pigmentos de *Sargassum stenophyllum* ($\lambda = 450$ nm) de (A) amostra controle, (B) amostra de campo - extrato tamponado-metanólico e (C) amostra de campo - extrato metanólico.

Figura 2.4. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para substâncias fenólicas de *Sargassum stenophyllum* (λ = 270) de amostras do tratamento (A) Inicial, (B) 35 °C, com ampliação do cromatogramana indicando os 15 picos identificados.

Figura 2.5. Espectros de absorção em UV processados em $\lambda = 270$ de *Sargassum stenophyllum* dos 15 picos.

Figura 2.6. Quantificação dos 15 picos obtidos por CLAE para substâncias fenólicas de *Sargassum stenophyllum* para amostras antes do período experimental (Inicial) e após sete dias sob as diferentes temperaturas. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05), considerando a comparação dentro de cada pico independentemente.

Figura 3.1. Taxa de crescimento de (A) *Sargassum stenophyllum* e (B) *Pyropia spiralis* nas diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) durante os sete dias de experimento. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Figura 3.2. Biplot PCA das espécies de estudo nas diferentes condições de temperaturas no tempo Inicial e após sete dias em condições experimentais. Em preto, apresentam-se as respostas de *S. stenophyllum* e em vermelho (itálico), as respostas da *P. spiralis*.

Figura 4.1. Aspecto geral do talo de *Pyropia spiralis* após três dias de experimento dos tratamentos (A) controle a 25 °C e (B) de 35 °C. Escala de 1 cm.

Figura 4.2. Dissipação de energia de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas ao longo do tempo (Inicial e nos dias 1, 3, 5 e 7), estimados como rendimento quântico máximo (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo ou dissipação fotoquímica [Y(PSII)], dissipação não fotoquímica não regulada [Y(NO)] e dissipação não fotoquímica regulada [Y(NPQ)]. Diferenças estatísticas (p < 0.05) estão denotadas como letras minúsculas em branco para Y(PSII), letras maiúsculas em preto para Y(NO) e letras minúsculas em preto para [Y(NPQ)].

Figura 4.3. Curvas de indução da fotossíntese estimada como ETR (taxa de transporte de elétrons) *versus* intensidade luminosa (PAR) (média \pm DP; n = 5) de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas nos tempos experimentais (A) dia 1, (B) dia 3, (C) dia 5 e (D) dia 7. A respectiva curva do período Inicial está inclusa para cada tempo experimental.

Figura 4.4. Conteúdo de (A) ficoeritrina, (B) ficocianina, (C) aloficocianina, (D) proteínas solúveis totais, (E) clorofila *a* e (F) carotenoides totais de *Pyropia spiralis* (média \pm DP, *n* = 5) sob diferentes temperaturas ao longo do tempo. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ao longo do tempo (*p* < 0,05). As medições dos pigmentos fotossintetizantes nas amostras de 35 °C não foram feitas nos dias 5 e 7.

Figura 4.5. Espectro de absorbância de 200 a 700 nm dos extratos (A-B) tamponados e (C-D) metanólicos de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas no tempo Inicial e após sete dias do período experimental. Os dados representam a média de cinco repetições.

Figura 4.6. Conteúdo de aminoácidos de *Pyropia spiralis* (media \pm DP; n = 5) sob diferentes temperaturas no tempo Inicial e após sete dias de período experimental. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Figura 4.7. *Heatmap* e análise de cluster dos aminoácidos em *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas (n = 5) no tempo Inicial e após sete dias de período experimental.

Figura 5.1. Atividade antioxidante de *Pyropia spiralis* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento expresso em porcentagem de atividade antioxidante (eixo Y da esquerda) e equivalente ao ácido gálico (μ g.mL⁻¹) (eixo Y da direita) nos ensaios de: (A) atividade sequestradora do radical DPPH, (B) atividade de captura do radical ABTS, (C) atividade de quelante de metais, (D) atividade de redução de ferro, FRAP e (E) substâncias fenólicas e capacidade redutora pelo Folin-Ciocalteu. Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Figura 5.2. Cromatogramas obtidos por CLAE de carotenoides e outros pigmentos processados em $\lambda = 450$ nm de *Pyropia spiralis* de (A) amostra controle (25 °C), (B) amostra de campo - extrato tamponado-metanólico e (C) amostra de campo - extrato metanólico.

Figura 5.3. Cromatograma processados em λ = 330 nm de (A) *Gracilaria caudata* e (B) *Pyropia spiralis* do tratamento de 25 °C. n.i. substância não identificada.

Figura 5.4. Aminoácidos tipo-micosporinas de *Pyropia spiralis* após sete dias sob as diferentes temperaturas. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Figura A.1.1. Habito geral de *S. stenophyllum* coletado na Praia (A) de Cibratel e (B) das Cigarras, com detalhamento dos (C) filoides com (D) ausência de criptostomas (seta). (E) Habito geral de *P. spiralis* com (F) margem lisa e dobrada em aumento 4X e (G) borde liso com presença de monósporos (seta) em aumento 10X. Escala de 1 cm.

Figura. A.1.2. Árvore de *Neighbour-Joining* para as sequências do marcador ITS-2 para *Sargassum*. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) estão representados nos ramos. GE: grupo externo; A-Rn: réplicas da coleta na Praia de Cibratel 1; B-Rn: réplicas da coleta na Praia de Cigarras. Sequências do *GenBank*; IBC: amostras brasileiras do Instituto de Biociências analisadas pela estudante Vitória Miranda; e BR: amostras brasileiras analisadas pela Dra. Donaji, supervisadas pela Dra. Mariana Oliveira.

Figura. A.1.3. Árvore de *Neighbour-Joining* para as sequencias do marcador COI-5P para *Pyropia*. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) estão representados nos ramos. GE: grupo externo; C-R*n*: réplicas da coleta na Praia de Cibratel 1 e sequências do *GenBank*.

Figura A.2.1. Cromatogramas em $\lambda = 450$ nm de *Gracilariopsis tenuifrons* do (A) extrato tamponado-metanólico e (B) extrato metanólico.

Figura A.3.1. (A) Espectro de absorção na região ultravioleta e (B) porcentagem da atividade antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu nos extratos provenientes da extração de carboidratos de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperaturas. Na parte B, os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5); e as letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Tabela M.1. Marcador molecular e sequência dos iniciadores utilizados para amplificae e sequenciar o ADN alvo de *Sargassum* e *Pyropia*. F = Forward (iniciador sense); R = Reverse (iniciador anti-sense).

Tabela M.2. Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores moleculares. O ciclo ITS-2 baseado em Mattio & Payri (2009) e o ciclo COI-5P em Milstein *et al.* (2012).

Tabela M.3. Especificações das sequências selecionadas do banco de dados *GenBank* com marcadores moleculares ITS-2 utilizadas no método *Neighbour-Joining* para *Sargassum*.

Tabela M.4. Especificações das sequências selecionadas do banco de dados *GenBank* com marcadores moleculares COI-5P utilizadas no método *Neighbour-Joining* para *Pyropia*.

Table 1.1. Main effects and interactions related to the photosynthetic performance and chemical composition of repeated measures of ANOVA of *S. stenophyllum* cultivated under different temperatures over time. SS – square sum, d.f. – degree of freedom, MS – medium square, F – statistic index, p – probability (p < 0.05).

Table 1.2. Photosynthetic parameters estimated from the ETR x PAR curve as maximum ETR (ETRmax), light saturation (Ik), and photosynthetic efficiency (α) of *S. stenophyllum* cultivated under different temperatures over time. Values represent mean \pm standard deviation (n = 5). Letters represent statistically significant differences between treatments (p < 0.05).

Tabela 2.1. Valores de EC50 para os ensaios de atividade antioxidante de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento. O valor do EC50 para o padrão ácido gálico também foi calculado. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5) e as letras, representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05), considerando o mesmo tipo de ensaio.

Tabela 2.2. Índices antioxidantes para cada ensaio antioxidante de amostras de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes temperaturas. O ICAT foi estimado como a somatória dos índices para cada temperatura e como a somatória dos índices para cada ensaio.

Tabela 2.3. Composição de carotenoides e outros pigmentos de *Sargassum stenophyllum* identificados por CLAE-DAD (λ = 450 nm) para amostras controle dos extratos tamponadometanólico e metanólico. tR = tempo de retenção e λ máx = comprimento de onda máximo. Os valores em cinza indicam a absorção na faixa UV.

Tabela 2.4. Perfil quantitativo (%) de carotenoides identificados nos extratos de *Sargassum stenophyllum* e em algumas espécies de algas pardas.

Tabela 2.5. Composição de substâncias fenólicas de *Sargassum stenophyllum* identificados por CLAE-DAD ($\lambda = 270$ nm) para amostras nas diferentes temperaturas. tR = tempo de retenção e λ máx = comprimento de onda máximo.

Tabela 2.6. Compilação de estudos sobre identificação de substâncias fenólicas em espécies de algas pardas, com as respectivas bandas de absorção máxima.

Tabela 2.7. Tempos de retenção, íon quase molecular [M - H], fragmentos (MS2) e composto fenólico sugerido após as análises em CLAE/ESI-MS de *Sargassum stenophyllum*.

Tabela 2.8. Compilação de estudos em algas pardas de florotaninos identificados em CLAE/ESI-MS em modo negativo [M - H] e positivo [M + H].

Tabela 3.1. ANOVA de medidas repetidas para o efeito da temperatura na taxa de crescimento de *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis* ao longo do período experimental. SQ – Soma dos quadrados. GL – Grau de liberdade. MQ – Média dos quadrados. F – Índice estatístico. p – Probabilidade. Valores de p < 0.05 representam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 3.2. Percentual de umidade e conteúdos de CHN, minerais, carboidratos e composição proximal (média \pm DP, n = 5) de *Sargassum stenophyllum* submetidas nas diferentes condições de temperatura no período Inicial e após sete dias de experimento. Os carboidratos foram expressos em equivalente de fucose. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05). F - Índice estatístico. p – Probabilidade.

Tabela 3.3. Percentual de umidade e conteúdos de CHN, minerais, carboidratos e composição proximal (média \pm DP, n = 5) de *Pyropia spiralis* submetidas nas diferentes condições de temperatura no período Inicial e após sete dias de experimento. Os carboidratos foram expressos em equivalente de glicose. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05). F -Índice estatístico. p – Probabilidade.

Tabela 4.1. Parâmetros fotossintetizantes estimados a partir das curvas de ETR x PAR como ETR máximo (ETRmax), ponto de saturação luminosa (Ik) e eficiência fotossintetizante (α) de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas nos diferentes tempos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0,05), analisados separadamente para cada tempo experimental.

Tabela 5.1. Sumário das condições e parâmetros das respectivas curvas padrão para os diferentes ensaios da atividade antioxidante, especificando a faixa de concentração da substância de referência (μ g.mL⁻¹), equação da reta (y = ax + b) e coeficiente de regressão linear (R^2).

Tabela 5.2. Valores de EC50 para os ensaios de atividade antioxidante de *Pyropia spiralis* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento. O valor do EC50 para o padrão ácido gálico também foi calculado. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5) e as letras, representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0,05), considerando o mesmo tipo de ensaio.

Tabela 5.3. Índices antioxidantes para cada ensaio antioxidante de amostras de *Pyropia spiralis* nas diferentes temperaturas. O ICAT foi estimado como a somatória dos índices para cada temperatura e como a somatória dos índices para cada ensaio.

Tabela 5.4. Composição de carotenoides e outros pigmentos de *Pyropia spiralis* identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos ($\lambda = 450$ nm) para amostras controle, extrato tamponado-metanólico e extrato metanólico. tR = tempo de retenção e λ máx = comprimento de onda máximo.

Tabela 5.5. Perfil quantitativo (%) de carotenoides identificados nos extratos de *Pyropia spiralis* e em algumas espécies de algas vermelhas.

Tabela 5.6. Composição de MAAs de *Pyropia spiralis* identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos ($\lambda = 330$ nm) nas diferentes temperaturas. tR = tempo de retenção.

Tabela 5.7. Bandas de absorção máxima dos aminoácidos tipo-micosporinas e compilação de estudos reportados em espécies de nas algas vermelhas.

Tabela A.1.1. Características morfológicas de S. stenophyllum nos locais de coleta.

Tabela A.1.2. Sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Tabela A.2.1. Padrões de carotenoides suspendidos em metanol identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos (λ máx = comprimento de onda) com os respectivos espectros UV-visível. tR = tempo de retenção.

Tabela A.3.1. Comparação entre os métodos de extração para carboidratos (Masuko *et al.*, (2005) e substâncias fenólicas (Machu *et al.*, 2015).

Introdução

- I.1. A temperatura no ambiente marinho
- I.2. Efeito da temperatura nas macroalgas marinhas
- I.3. Espécies de estudo
 - I.3.1 Sargassum stenophyllum
 - I.3.2 Pyropia spiralis
- I.4. Justificativa do trabalho
- I.5. Objetivo geral

Materiais e Métodos Gerais

M.1 Locais e coleta do material

- M.2 Identificação taxonômica
 - M.2.1 Estudos morfológicos
 - M.2.2 Estudos moleculares
- M.3 Delineamento experimental
- M.4 Análises estatísticas

Capítulos

50

Capítulo 1: Respostas a curto prazo de *Sargassum stenophyllum* à temperatura em condições de laboratório: fotossíntese e composição química

Short-term responses of *Sargassum stenophyllum* to temperature in laboratory: photosynthesis and chemical composition Submitted to Journal of Applied Phycology

Capítulo 2: Potencial antioxidante e identificação de substâncias fenólicas em *Sargassum stenophyllum* em resposta à variação de temperatura

2.1. Introdução

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material de estudo e delineamento experimental

2.2.2. Atividade antioxidante

2.2.2.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

2.2.2.2. Atividade de captura do radical ABTS

36

21

- 2.2.2.3. Atividade quelante de metais
- 2.2.2.4. Atividade de redução do ferro
- 2.2.2.5. Substâncias fenólicas ou capacidade redutora
- 2.2.2.6. Índice de capacidade antioxidante total
- 2.2.3. Quantificação e identificação de carotenoides
- 2.2.4. Quantificação e identificação de substâncias fenólicas
- 2.2.5. Análises estatísticas
- 2.3. Resultados
- 2.4. Discussão

Referências bibliográficas

Capítulo 3: Crescimento *in vitro* e variação nutricional em *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis*: efeito da temperatura

- 3.1. Introdução
- 3.2. Materiais e métodos
 - 3.2.1. Material de estudo e delineamento experimental
 - 3.2.2. Taxa de crescimento
 - 3.2.3. Conteúdo de umidade
 - 3.2.4. Teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e minerais
 - 3.2.5. Quantificação de carboidratos solúveis totais
 - 3.2.6. Quantificação de fibras, cinzas e proteínas totais
 - 3.2.7. Análises estatísticas
- 3.3. Resultados
- 3.4. Discussão

Referências bibliográficas

Capítulo 4: Performance fotossintetizante e perfil de aminoácidos livres totais de *Pyropia spiralis* frente à temperatura

- 4.1. Introdução
- 4.2. Material e métodos
 - 4.2.1. Material de estudo e delineamento experimental
 - 4.2.2. Desempenho fotossintetizante

4.2.3. Pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis e espectro de absorção

- 4.2.4. Aminoácidos livres totais
- 4.2.5. Análises estatísticas
- 4.3. Resultados

4.4. Discussão

Referências bibliográficas

Capítulo 5: Efeito da temperatura na atividade antioxidante e no teor de aminoácidos tipo-micosporinas em *Pyropia spiralis*

- 5.1. Introdução
- 5.2. Material e métodos
 - 5.2.1. Material de estudo e delineamento experimental
 - 5.2.2. Atividade antioxidante
 - 5.2.3. Quantificação e identificação de carotenoides
 - 5.2.4. Quantificação de MAAs
 - 5.2.5. Análises estatísticas
- 5.3. Resultados
- 5.4. Discussão
- Referências bibliográficas

Considerações finais

Anexos	179
A.1. Identificação taxonômico das espécies de estudo.	

A.2. Avaliação da estabilidade dos carotenoides nos extratos tamponados e metanólicos obtidos da extração de pigmentos fotossintetizantes.

A.3. Teste de detecção de substâncias fenólicas.

176



I.1. A temperatura no ambiente marinho

No ambiente marinho, a temperatura comumente é estudada no cenário oceânico, estuarino e litorâneo (Fig. 1). No cenário oceânico (Fig. 1A), a temperatura diminui conforme aumenta a latitude, no sentido do trópico aos polos. No cenário estuarino (Fig. 1B), a temperatura diminui conforme aumenta a profundidade, caracterizado pelas termoclinas. A região do litoral (Fig. 1C), por sua vez, é dividida em três faixas delimitadas pelo nível de marés, sendo a zona supralitoral, mediolitoral e infralitoral, as quais também sofrem os impactos da variação de temperatura.



Figura 1. Relação da temperatura no (A) cenário oceânico, (B) estuarino e (C) litorâneo. A imagem do item A foi produzida com dados de temperatura da superfície do mar de abril de 2018 feito pelo grupo Regional Ocean Modeling System (ROMS).

A divisão do litoral está caracterizada pela zona do supralitoral que compreende a área acima do limite de máxima maré, com constante exposição ao ar e onde só chegam borrifos de

água. Nessa área, os fatores como temperatura e radiação possuem grande importância na distribuição dos organismos. A zona do mediolitoral, ou entremarés, é delimitada pela máxima preia-mar e mínima baixa-mar, impondo grandes flutuações de temperatura e radiação. A zona do infralitoral se estende desde o nível de baixa-mar até profundidades compatíveis com a existência de algas fotófilas, região que apresenta as menores variações de temperaturas quando comparadas com o supralitoral e o mediolitoral.

O bioma marinho possui importância ecológica e socioeconômica para o planeta e as atividades humanas, visto que fornece diversos bens e serviços ecossistêmicos, dentre eles, a ciclagem de carbono e nutrientes, a estruturação de comunidades oferecendo alimento, abrigo e berçário, paisagem e lazer, proteção contra desastres naturais e fonte de recursos pesqueiros, de turismo e outros produtos exploráveis (Harley *et al.*, 2006). Porém, é um ambiente delicado, influenciado pelas variações das condições ambientais, tais como, irradiância, salinidade e temperatura (Davison & Pearson, 1996) e mudanças climáticas globais (Harley *et al.*, 2006).

É fato que a temperatura global vem aumentando devido à industrialização global originada pelas atividades humanas, queima de combustíveis fósseis, desmatamento e aumento das emissões de gases do efeito estufa (Di Fonzo & Wagner, 2012; IPCC, 2014). Além disso, práticas de esfriamento dos reatores de usinas nucleares geram efluentes aquecidos que são lançados diretamente ao mar, os quais causam anomalias térmicas no ambiente marinho podendo elevar até 8 °C a temperatura das águas em uma faixa de alguns quilômetros quadrados a partir do ponto de despejo (Teixeira *et al.*, 2009). Nos últimos 30 anos teve incremento da temperatura média do planeta de aproximadamente 0,2 °C (Hansen *et al.*, 2006) e atualmente, os relatórios do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) fazem predições de 0,3 a 0,7 °C para o período 2016-2035 (IPCC, 2014; Fig. 2).



Figura 2. Modelo de predição da temperatura média anual conforme o relatório do IPCC (2014).

Segundo o relatório do IPCC (2014), nas últimas três décadas foram sucessivamente evidenciados aumento da temperatura na superfície da Terra, mais do que em qualquer década anterior desde 1850. Os dados globais de temperatura da superfície terrestre e oceânica,

calculados por uma tendência linear, mostram um aquecimento de 0,85 °C no período de 1880 a 2012. É fato que haverá baixas e altas temperaturas extremas na maioria das áreas terrestres à medida que aumenta a temperatura média global. Assim, é provável que as ondas de calor ocorram com maior frequência e duração, e ocasionalmente, ocorrerão frios extremos. No ambiente oceânico, haverá elevação da temperatura a partir do século XXI, com maior aquecimento projetado para as regiões subtropicais e do hemisferio norte (Fig. 3).



Figura 3. Simulação das variações da temperatura da superfície média global entre 2000 a 2100, segundo o relatório do IPCC (2014). (A) Gráfico de temperatura versus tempo, na qual a faixa vermelha representa um cenário pessimista com emissões de gases-estufa aumentando exponencialmente e a faixa azul representa um cenário otimista com drásticas reduções na emissão de gases-estufa. (B) Mapamundi com a previsão dos 32 °C e (C) Mapamundi com a previsão dos 39 °C.

Segundo Harley *et al.* (2006) a temperatura é uma variável que impulsionará futuras mudanças ecológicas nos sistemas marinhos. Marengo *et al.* (2007) reportaram, para o Brasil, aumento de aproximadamente 0,75 °C na temperatura média atmosférica até o final do século XX. Nesse cenário, os estudos de Horta *et al.* (2001), Spalding *et al.* (2007) e Bernandino *et al.* (2015), que avaliaram as tendências de temperaturas ao longo das regiões marinhas do Brasil, evidenciaram uma tendência latitudinal e flutuações sazonais durante as últimas quatro décadas. Assim, concluiu-se que a combinação de eventos de altas temperaturas e curtos eventos do

fenômeno de Oscilação Sul-El Niño (OSEN) pode ocasionar estresse térmico na dinâmica bentônica nas regiões do sudeste e no Rio Grande do Sul.

I.2. Efeito da temperatura nas macroalgas marinhas

As macroalgas marinhas constituem importantes componentes para o funcionamento dos ecossistemas, pois são responsáveis por cerca de 10% da produtividade primária global e 80% da produtividade primária em ambientes costeiros (Israel *et al.*, 2010).

Para cada espécie existe um intervalo definido de temperaturas máxima e mínima que determina a faixa de tolerância de crescimento; e qualquer mudança na faixa de temperatura ótima induziria ao estresse no organismo. Após a presença de um estressor, inicia-se o estágio de alarme, onde haverá a ativação de processos de aclimatação, reparo e adaptações metabólicas e morfológicas. Isto gerará uma estabilidade fisiológica sob o impacto do estressor, correspondendo ao máximo de tolerância, estágio de estresse. No entanto, sob um estresse prolongado ou sobrecarga da vitalidade do organismo, aumentará a sensibilidade e declinará o processo de sobrevivência progressivamente até a morte, estágio de sensibilidade (Lichtenthaler, 1998; Fig. 4).



Figura 4. Estágios sequenciais impostos pelo estresse à temperatura. Adaptado de Lichtenthaler (1998).

O intervalo de tolerância e a sensibilidade do crescimento de uma espécie está sujeita à sua distribuição na escala oceânica e na zona do litoral. Tem sido estudado em espécies de macroalgas vermelhas, como *Gracilaria verrucosa* Esper e *G. chorda* Holmes, com uma temperatura ótima para o crescimento durante a primavera (aproximadamente 13 °C) que em resposta a diferentes temperaturas (10, 17, 25, 30 e 35 °C) e salinidades (5, 15, 25 e 35 ups), essas espécies podem apresentar tolerância à alta temperatura de 35 °C e baixa salinidade de 5 ups (Choi *et al.*, 2006). Adicionalmente, nesse trabalho, foi exposto que a tolerância à salinidade de *G. verrucosa* facilitaria o crescimento nos estuários, e que *G. chorda* com uma maior tolerância nas salinidades mais altas (25 e 35 ups), pode ser uma alga mais adaptada às condições oceânicas com possibilidades de cultivo no mar (Choi *et al.*, 2006).

O estudo de Kim et al. (2007) analisando espécies da macroalga vermelha Porphyra a diferentes intensidades lumínicas (100 e 150 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹) em combinações de temperatura (10, 15 e 20 °C) e concentrações de amônio (25 e 250 µmoles.L⁻¹), reportaram um aumentou na taxa de crescimento em P. leucosticta Thuret, P. linearis Greville e P. umbilicalis Kützing conforme diminuía a temperatura, enquanto que em P. amplissima Setchell & Hus foi evidenciada conforme aumentava a temperatura. Dentre essas espécies, foi ressaltado a P. umbilicalis devido ao alto conteúdo de nitrogênio e ficoeritrina (pigmento fotossintetizante) nos 10 °C e 250 µmoles.L⁻¹, sendo que com a alta correlação positiva entre o teor de nitrogênio tecidual e armazenamento da ficoeritrina pode ser considerada como potencial candidata na biorremediação ou na maricultura de peixes e crustáceos (Kim et al., 2007). No estudo de Tala & Chow (2014), realizado com Porphyra spp., evidenciaram uma redução da eficiência fotossintetizante, do conteúdo de pigmentos e de proteínas solúveis em períodos quentes acompanhada pelo aumento na capacidade antioxidante. O estudo de Wang et al. (2018) que analisaram cepas termotolerantes e termosensíveis de P. haitanensis Chang & Zheng às altas temperaturas, identificaram que as cepas termosensíveis declinaram a biossíntese da clorofila e a regulação das proteínas antena associadas com processos fotossintetizantes, sendo que a redução na fotossíntese encaminhou ao déficit energético, inabilitando a resistência ao choque térmico (Wang et al., 2018).

Faveri *et al.* (2015) estudando a macroalga vermelha *Hypnea musciformis* Lamouroux (Rhodophyta) de três areas urbanizadas a diferentes temperaturas (15, 25 e 35 °C), evidenciaram diferenças entre os tratamentos sendo que os talos sob 35 °C, apresentaram redução nas taxas de crescimento, baixos valores nos parâmetros fotossintetizantes, tais como no rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e na taxa transportadora de elétrons (ETR), assim como, alterações na morfologia celular e redução de pigmentos fotossintetizantes, especificamente da clorofila *a* e carotenoides. Nesse estudo, foi observado por microscopia de luz que o sinergismo entre a temperatura e poluentes encontrados em águas eutróficas causou alterações na morfologia celular, tendo um espessamento da parede celular e diminuição de amido das florídeas (Faveri *et al.*, 2015).

A macroalga parda *Sargassum horneri* Agardh, quando foi analisada sob as temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C em conjunto com diferentes irradiâncias (20, 40 e 80 μ mol de fótons.m⁻².s⁻¹), reportaram uma temperatura ótima de crescimento nos 15 °C e sensibilidade aos 25 °C e 20 μ mol de fótons.m⁻².s⁻¹ após 12 dias de tratamento, evidenciando necrose de forma semelhante ao aspecto do talo em populações de campo (Choi *et al.*, 2008). O estudo de Zou *et al.* (2017) reportaram para S. *polycystum* Agardh tolerancia a diferentes condições de temperatura, salinidade e irradiância quando analisaram entre 15 a 25 °C, 20 a 40 psu, e 10 a 80 μ mol de fótons.m⁻².s⁻¹, obtendo o crescimento máximo nos 23 °C, 32 psu e 20 a 80 μ mol de fótons.m⁻².s⁻¹. Nesse trabalho foi indicado reduções no crescimento com

temperaturas menores de 10 °C e acima dos 30 °C. O estudo de Bui *et al.* (2018), analisando o crescimento de *S. linearifolium* Agardh e *S. podacanthum* Sonder a diferentes níveis de pH (6,5 e 8,2) e temperatura (20 e 26 °C) mostraram uma maior tolerância de *S. linearifolium* do que *S. podacanthum*, com maior taxa de crescimento e alto teor de proteína bruta nas condições de pH 8,2 e 20 °C. Ambas espécies após 14 dias do período de cultivo apresentaram mortalidade, com redução do teor de cinzas e de peso seco.

A macroalga verde *Ulva prolifera* Müller, quando foi analisada a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C) a 3, 6 e 24 h, evidenciaram indução de proteínas de choque termico (HSP) nas baixas temperaturas de 5 e 15 °C e nas altas temperaturas acima de 30 °C (Zhang *et al.*, 2012). Cruces *et al.* (2012) analisando *Ulva* sp. e *Porphyra columbina* Agardh, indicaram que as HSPs podem ser consideradas como agente potenciais de proteção em resposta a condições estressantes, especialmente durante a ação de altas temperaturas e alta radiação solar. Complementarmente à resposta do estresse, existem rápidos ajustes metabólicos (p. ex. fotoinibição e actividade antioxidante), assim como a ação de diferentes substâncias quimicas (p. ex. micosporinas, substâncias fenólicas, poliaminas, entre outras) (Cruces *et al.*, 2012).

Em síntese, as macroalgas marinhas lidam com as mudanças de temperatura alterando sua função fisiológica mediante plasticidade do perfil bioquímico, incluindo conteúdo de pigmentos, proteínas, ácidos graxos, substâncias fenólicas e carboidratos (Stengel et al., 2011). Nesses processos metabólicos, existem reações de oxidação que produzem espécies reativas, dentre eles os radicais livres (Fig. 5). Dentre essas espécies reativas, podemos distinguir as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que incluem os radicais: hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂^{•-}), peroxila (ROO[•]), alcoxila (RO[•]), entre outros como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) (Halliwell, 2006). Em condições homeostáticas, a detoxificação dos radicais ocorre por mecanismos antioxidativos, a fim de evitar o acúmulo dessas espécies altamente danosas. Sob condições de estresse, como, por exemplo, em extremos de altas ou baixas temperaturas, a formação destas espécies reativas é acelerada, ocorrendo seu acúmulo excessivo e gerando estresse oxidativo. Em resposta ao estresse oxidativo, podem se ativar os sistemas antioxidantes (Fig. 5), que inclue os enzimaticos e não enzimáticos (Hanson & Sharky, 2001; Barros et al., 2005; Dutra et al., 2007; Mittler, 2011; Michalak & Chojnacka, 2014), que podem contribuir com a sobrevivência do organismo e a sua tolerância a condições adversas. Os sistemas antioxidantes podem agir através de três mecanismos de ação: a) detoxificação oxidativa; b) quelação de metais pró-oxidantes e c) capacidade de interrupção da peroxidação lipídica (Almeida et al., 2001; Dutra et al., 2007; Küpper et al., 2008; Barre et al., 2010).



Figura 5. Produção de radicais livres, sendo que após um processo de estresse oxidativo induzido pelo estresse térmico, esses radicais são mitigados pelos antioxidantes.

Os antioxidantes nas macroalgas marinhas podem ser influenciados pela variação de temperatura. Um exemplo de antioxidantes não enzimáticos, são os polissacarídeos sulfatados. No estudo de Zhang et al. (2010) reportaram atividade de sequestro de radicais e quelação de metais dos polissacarídeos sulfatados na alga vermelha Porphyra haitanensis, nas algas pardas Laminaria japonica Areschoug, Enteromorpha linza Agardh, Bryopsis plumose Agardh e na alga verde Ulva pertusa Kjellman, com estabilidade nas altas temperaturas. De forma semelhante, Anastasakis et al. (2011) reportaram na alga parda Laminaria sp. um incremento de carboidratos, tais como, ácido algínico, manitol, laminarina e fucoidano, em resposta às altas temperaturas. Por outro lado, no estudo de Imjongjairak et al. (2016) analisando os polissacarídeos sulfatados da macroalga vermelha Gracilaria fisheri Abbott, Zhang & Xia, extraídos a baixa temperatura (25 °C) apresentaram o maior teor de substâncias fenólicas com efeitos significativos sobre a atividade sequestradora de radicais, do que extraídos a alta temperatura (55 °C). Nesse trabalho, os autores indicaram que os polissacarídeos sulfatados extraídos com água a baixa temperatura, podem ser uma alternativa fácil e econômica, demonstrando sua possível utilização como fonte de antioxidantes naturais com potencial aplicação na indústria de alimentos.

Um exemplo de antioxidantes enzimáticos, são a catalase e peroxidase, que influenciaram a alta atividade antioxidante em condições de baixa temperatura das espécies de macroalgas verdes *Ulva lactuca* Linnaeus, *Enteromorpha flexuoca* Agardh, *Cladophora prolifera* Kützing e *Chaetomorpha linum* Kützing, em comparação com outras estações do ano (Ansari & Ghanem, 2017). Em condições do aumento da temperatura, considerando o aquecimento global, tem sido estudado em *P. yezoensis* Hwang & Choi que o silício pode

efetivamente melhorar a tolerância ao estresse de temperatura, aumentando a expressão de genes das enzimas antioxidantes como a glutationa redutase, superóxido dismutase e catalase (Le *et al.*, 2018). A ação de enzimas antioxidantes possui um importante papel na prevenção da peroxidação das membranas lipídicas, denaturação de proteínas e dano dos ácidos nucleicos (Mittler, 2002).

O fato de alterar a capacidade antioxidante pelas variações de temperatura, pode ser aplicado na área de biotecnologia, para preservar os alimentos e retardar sua degradação e formação de compostos tóxicos (Parr & Bolwell, 2008). É importante mencionar que o emprego de produtos naturais pode trazer menos efeitos colaterais à saúde que os provocados pelos antioxidantes sintéticos BHA (butil hidroxianisol) e BHT (butil hidroxitolueno).

I.3. Espécies de estudo

Para o presente estudo foram escolhidas duas espécies de macroalgas marinhas de linhagens diferentes, a alga parda *Sargassum stenophyllum* Martius (Fucales, Phaeophyceae) e a alga vermelha *Pyropia spiralis* Oliveira & Coll (Bangiales, Rhodophyta). A escolha dessas espécies foi baseada por ocorrerem em faixas distintas no mediolitoral e, portanto, estarem expostas a condições ambientais diferentes. A macroalga marinha *S. stenophyllum* ocorre no mediolitoral inferior e infralitoral superior e *P. spiralis* no mediolitoral superior (Fig. 6). Além disso, ambas as espécies possuem tanto importância ecológica quanto econômica.



Figura 6. Esquema geral da distribuição vertical (padrão de zonação) de alguns exemplares de macroalgas no costão rochoso, exemplificando a ocorrência das espécies em estudo, *Pyropia spiralis* e *Sargassum stenophyllum*. As linhas descontínuas indicam os limites das zonas do litoral.

I.3.1. Sargassum stenophyllum

Esta espécie dentre a ordem Fucales (Ochrophyta) é caracterizada por apresentar um talo marrom com comprimento entre 15 e 60 centímetros, com apressório de até 2,5 centímetros de diâmetro, de onde partem numerosos ramos principais. Os ramos apresentam filoides finos, longos e pouco ramificados, com criptostomas escassos. Possui poucas vesículas de flutuação, sendo estas elípticas e apiculadas (Paula, 1988). Um aspecto de importância ecológica do gênero é o papel como refúgio de ampla diversidade de invertebrados marinhos, os quais utilizam os talos como substrato, crescendo como epífitos (Buzá-Jacobucci & Pereira-Leite, 2014). Como importância econômica, são fonte de minerais, carboidratos e alguns aminoácidos essenciais, com aplicações nas indústrias cosmética e farmacêutica (Széchy & Paula, 2000; Balboa *et al.*, 2013). Apresenta um histórico de vida haplobionte diplonte (Fig. 7).



Figura 7. Histórico de vida haplobionte diplonte de *Sargassum*. O talo diploide entra em meiose gamética no conceptáculo, no interior dos receptáculos, gerando gametas femininos. O conceptáculo masculino gera gametas masculinos, os quais são liberados ao ambiente e fecundam os gametas femininos contidos no conceptáculo feminino. Após a fecundação é formado o zigoto, que é liberado ao ambiente e germina produzido o talo juvenil que, por múltiplas divisões mitóticas gera o indivíduo adulto.

No Brasil, ocorre no mediolitoral inferior e infralitoral superior, com distribuição pelo Nordeste nos estados do Ceará e da Bahia; no Sudeste em Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro; e no Sul em Paraná e Santa Catarina. O padrão fenológico desta espécie está fortemente associado com as mudanças sazonais de luz e temperatura, estes fatores abióticos afetam a abundância e fertilidade (Nuñez & Casas, 1996).

I.3.2. Pyropia spiralis

Esta espécie dentre a ordem Bangiales (Rhodophyta) é caracterizada por apresentar um talo folhoso pequeno e irregular, com duas camadas de células de morfologia variada, desde alongadas até ovaladas e apressório inconspícuo (Milstein *et al.*, 2014). Um aspecto de importância ecológica do gênero é a sua produtividade primária em ambientes costeiros e economicamente é amplamente consumida pelo valor nutricional e conteúdo de antioxidantes (Rosenfeld, 2000; Crockford, 2009). Apresenta um histórico de vida bifásico com alternância de gerações (Fig. 8).



Figura 8. Histórico de vida bifásico com alternância de gerações de *Pyropia*. O talo corresponde à geração haploide gametofítica. Na sua porção marginal, dentro dos gametângios masculinos produzem-se os espermácios (gametas masculinos) que são liberados ao ambiente e fecundarão os carpogônios (gametas femininos) produzidos nos gamentângios femininos, formando um zigoto diploide, o qual, por divisão mitótica, forma os conchosporos que são liberados, e por divisão meiótica, é formado o talo haploide.

As espécies de *Porphyra* do Brasil foram revistas na sua classificação, sendo todas elas classificadas como *Pyropia* (Milstein *et al.*, 2014). No Brasil, ocorre no mediolitoral superior, o qual se estende desde o sudeste de Espírito Santo até Rio de Janeiro e São Paulo, evidenciando a fase gametofítica durante a estação de inverno.

I.4. Justificativa do trabalho

As macroalgas constituem importantes componentes ecológicos nos ambientes marinhos e costeiros, tendo uma importante função como serviços e bens ecossistêmicos. Além disso, servem de matéria-prima potencial para diversas aplicações industriais e biotecnológicas, bem como produtos funcionais e fármacos. A temperatura é um dos principais fatores que determina crescimento, desenvolvimento e reprodução nas macroalgas. Os estudos mostram que as macroalgas são susceptíveis às variações de temperatura, tendo as temperaturas elevadas os maiores efeitos adversos para esses organismos fotossintetizantes. Esses impactos afetam tanto a fisiologia da espécie como a regulação e biossíntese da sua composição e abundância química, além da capacidade adaptativa em virtude do estresse térmico (Diaz-Pulido *et al.*, 2006).

Por outro lado, o cenário de mudanças climáticas globais estima um aumento na temperatura dos oceanos em torno de 0,7 °C, situação que poderá afetar negativamente os processos de tolerância, aclimatação e adaptação de certas espécies, bem como a sua interação com o meio. Assim, estudos em laboratório sob condições controladas possibilitariam compreender os efeitos da temperatura sobre os organismos escolhidos neste estudo, a macroalga parda *S. stenophyllum* que ocorre no mediolitoral inferior e a macroalga vermelha *P. spiralis* que ocorre no mediolitoral superior, duas espécies de interesse ecológico e econômico, de grupos taxonômicos diferentes e de ocorrência distante na zonação costeira.

Desse modo, estudos das respostas fisiológicas e da composição química destas espécies tornam-se relevantes para melhor entender a sua vulnerabilidade e resiliência, e possibilitar subsídios que possam contribuir para as projeções de monitoramento e exploração da biodiversidade ou bioprospecção dessas espécies. Diante disso, as seguintes perguntas de investigação foram propostas:

- As flutuações da temperatura comprometerão a fisiologia das espécies em estudo de forma a interferir com a sua sobrevivência?
- A capacidade antioxidante das espécies em estudo aumentará nos limites extremos de baixa ou alta temperatura?
- Em qual temperatura a espécie apresentará um maior valor nutricional?

I.5. Objetivo geral

Prover subsídios para a compreensão do efeito da temperatura e dos mecanismos de tolerância e sensibilidade das macroalgas marinhas *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) e *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta) mediante a análise da performance fisiológica, das respostas antioxidativas e da variação na composição química, além de fornecer informação sobre o seu potencial como produto funcional.

Dentro desse marco, o presente trabalho foi dividido em cinco capítulos, nos quais os objetivos específicos são descritos em cada um dos respectivos capítulos.



Materiais e Métodos Gerais
M.1. Locais de coleta e coleta do material

As espécies em estudo foram coletadas no litoral do estado de São Paulo (Fig. M.1A). Exemplares de *S. stenophyllum* foram coletados, em novembro de 2014, na Praia de Cibratel 1 (24°13'31"S e 46°51'7"W; Fig. M.1B), no Município de Itanhaém, e em junho de 2015 na Praia das Cigarras (24°76'1"S e 45°41'7"W; Fig. M.1C), no Município de São Sebastião. Incialmente, a intenção era trabalhar com exemplares de *S. stenophyllum* apenas da população da Praia de Cibratel 1. No entanto, devido à dificuldade para se obter biomassa suficiente para a realização dos experimentos subsequentes, foi decidido trabalhar os capítulos II e III com *S. stenophyllum* coletado da Praia das Cigarras. Para cada um dos capítulos, a devida especificação do local de coleta é oportunamente apontada. Os estudos com *P. spiralis* foram coletados, em agosto de 2015, na Praia de Cibratel 1 (Fig. M.1D).



Figura M.1. (A) Estado de São Paulo indicando a localização das praias de Cibratel 1 (Município de Itanhaém) e das Cigarras (Município de São Sebastião). (B) *Sargassum stenophyllum* na Praia de Cibratel 1, (C) *Sargassum stenophyllum* na Praia das Cigarras e (D) *Pyropia spiralis* na Praia de Cibratel. Fotos: V. Urrea-Victoria.

A Praia de Cibratel (Itanhaém) está constituída por 20 Km de comprimento, estirâncio com declividade média de 2° com areia muito fina, feições sedimentares com perfil plano, barras longitudinais e cúspides, e estado morfodinâmico predominantemente dissipativo de alta energia (Gouveia, 2012). A Praia das Cigarras (São Sebastião), está constituída por 400 m de

comprimento, estirâncio com declividade média de 5,2°, com areia meio fina, feições sedimentares com barras longitudinais e cúspides, e estado morfodinâmico predominantemente reflexivo de baixa energia (Gouveia, 2012).

A fim de conhecer a flutuação da temperatura em cada um dos locais de coleta e assim possibilitar melhores subsídios para a escolha das condições experimentais de temperatura, para cada uma das praias foram obtidos os dados de temperatura atmosférica para o período de 2014 a 2015. Para a Praia de Cibratel (Fig. M.2A), os dados históricos foram obtidos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE; http://sinda.crn2.inpe.br). Durante o período de coleta de *S. stenophyllum*, na primavera, a temperatura média foi de 21,72 °C, máxima de 25,56 °C e mínima de 17,88 °C. Durante a coleta de *P. spiralis*, no inverno, a temperatura média foi de 21,01 °C, com máxima de 25,36 °C e mínima de 16,67 °C. Para a Praia das Cigarras (Fig. M.2B), os dados foram obtidos da Estação Meteorológica do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP; http://cebimar.usp.br). Durante o outono de 2015, a temperatura média do local foi de 22,04 °C.



Tempo (meses)

Figura M.2. Temperatura atmosférica mensal no período de janeiro de 2014 até dezembro de 2015 da (A) Praia de Cibratel (Fonte: INPE), indicando a média e os valores máximos e mínimos e da (B) Praia de Cigarras (Fonte: CEBIMar/USP), indicando o valor médio. Para cada uma das praias é assinalado (seta) o período de coleta das espécies de estudo.

As espécies de estudo foram sistematicamente coletadas, selecionando exemplares com aspecto saudável em coloração e conservação, colocadas dentro de sacos de tecido-rede sem água e transportadas dentro de uma caixa térmica para o Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. No laboratório, o material foi triado e lavado várias vezes com água do mar filtrada para remoção de areia, macroepibiontes, macroepífitos e fauna associada.

Porções de cinco indivíduos diferentes de cada espécie e local foram fixados em solução de formol 4% (diluído em água do mar) para posterior identificação taxonômica por caracteres morfológicos e subsequente herborização (ver item M.2). Adicionalmente, outros três indivíduos de aproximadamente 30 mg de massa fresca (MF) foram acondicionados em sílica gel para posterior identificação taxonômica por biologia molecular (ver item M.2). O restante do material triado e lavado foi devidamente acondicionado para cultivo em laboratório para aclimatação e subsequentes experimentos (ver item M.3).

M.2. Identificação taxonômica

A análise taxonômica das espécies de estudo foi baseada em caracteres morfológicos e análises moleculares pela técnica do ADN "*Barcode*" a partir dos indivíduos fixados em formol 4% (n = 5) e acondicionados em sílica gel (n = 3), respectivamente.

M.2.1. Estudos morfológicos

A análise da morfologia externa de ambas as espécies foi realizada em estereomicroscópio Discovery V8 (Zeiss, Alemanha) e quando necessário, as organizações celular e reprodutiva foram examinadas a partir de cortes à mão livre com o auxílio de lâmina de aço sob microscópio óptico Eclipse E200 (Nikon, Japão).

Os critérios taxonômicos empregados na delimitação de *Sargassum*, incluindo a análise morfológica vegetativa e dos receptáculos, foram baseados nos caracteres das chaves de identificação de Paula (1988) e Camacho *et al.* (2015). Foram considerados os caracteres: comprimento do talo, eixos cilíndricos lisos ou não, características do filoide (comprimento; largura; margem; simples ou ramificadas; lanceoladas, lineares ou linear-lanceolada; plana; ondulada), criptostomas, vesículas de flutuação, comprimento e posição dos receptáculos.

Por sua vez, a delimitação taxonômica de *Pyropia* seguiu-se a chave de identificação de Coll & Oliveira (2001). Foram analisados os caracteres: talo (comprimento; largura; margem liso ou dentada), e características dos carpósporos e espermatângios.

Após os estudos morfológicos e identificação do material de estudo (detalhes no Anexo A.1.1), foi feita a confecção de exsicatas e depositados no acervo do Herbário da Universidade de São Paulo (SPF) com os vouchers SPF 57850 para *S. stenophyllum* da Praia de Cibratel, SPF 57889 para *S. stenophyllum* da Praia das Cigarras e SPF 57900 para *P. spiralis*.

M.2.2. Estudos moleculares

A extração de ADN genômico total foi realizada a partir de aproximadamente 30 mg MF de alga desidratada em sílica gel. O material foi triturado em nitrogênio líquido em microtubo de 1,5 mL até a obtenção de um pó fino. A extração de ADN total foi realizada utilizando o kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do ADN total foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,7% e tampão de tris-borato-EDTA (TBE: tris-HCl 50 mM, borato 50 mM, EDTA 2 mM), corado com GelRed na concentração de 1:1500. A pureza e quantificação do ADN total foi verificada mediante a leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda em 260 e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Para a reação de amplificação do ADN alvo, para *Sargassum* foi selecionado o marcador molecular ITS-2 (região do espaçador interno transcrito do ADN ribossômico nuclear) e para *Pyropia* o COI-5P (região 5' do gene que codifica a subunidade 1 da citocromo *c* oxidase) (Tabela M.1). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com o kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), em volume total de 50 μL, conforme o protocolo do fornecedor, e segundo os ciclos descritos na Tabela M.2. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,7% e tampão de trisborato-EDTA, corado com GelRed, para verificar os tamanhos dos fragmentos amplificados com marcador de tamanho 1 Kb *DNA Ladder* (Invitrogen, EUA). Os produtos amplificados foram purificados com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Inglaterra), de acordo com o protocolo do fornecedor, e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000.

Tabela M.1. Marcador molecular e sequência dos iniciadores utilizados para amplificae e sequenciar o ADN alvo de *Sargassum* e *Pyropia*. F = Forward (iniciador sense); R = Reverse (iniciador anti-sense).

Marcador	Iniciador	Sequência do iniciador	Referência
ITS-2	5.8S B-F	CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT	Kawai et al. (1995)
	25 BR2-R	TCCTCCGCTTAGTATATGCTTAA	
COI-5P	GWS-F	TCAACAAAY-CAYAAAGATATYGG	Le Gall & Saunders (2010)
	GW-R	GGRTGTCCRAARAAYCARAA	Hind & Saunders (2013)

Tabela M.2. Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores moleculares. O ciclo ITS-2 baseado em Mattio & Payri (2009) e o ciclo COI-5P em Milstein *et al.* (2012).

Marcador	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclo
ITS-2	94 °C por 1'	94 °C por 40"	55 °C por 30"	72 °C por 45"	40x
COI-5P	94 °C por 4'	94 °C por 30"	52 °C por 1'	72 °C por 1'	38x

O ciclo de reação de sequenciamento foi de 40 ciclos a 94 °C por 2 minutos, 94 °C por 10 segundos e 60 °C por 3 minutos, utilizando o sequenciador automático ABI PRISMTM 3100 (Applied Biosystems, EUA). Após, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados em EDTA 125 mM, acetato de sódio 3 M e etanol 100% seguido pela lavagem com etanol 70%. O sequenciamento seguiu o método de Sanger (1977), sendo as reações de sequenciamento realizadas com o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante e utilizando os mesmos iniciadores da PCR (Tabela M.2).

As sequências obtidas foram manualmente alinhadas usando o programa *Bioedit* Sequence Alignment Editor (Hall, 1990) e as sequências-consenso foram definidas para cada local e espécie, as quais foram comparadas com sequências do banco de dados GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) com uso do BLAST-N (Altschul et al., 1990).

Após delimitado o taxo, foi construída uma árvore de agrupamento (detalhes no Anexo A.1.2) utilizando o método *Neighbour-Joining* (agrupamento de vizinhos) com 2000 réplicas de *Bootstrap*, utilizando o programa MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; Kumar *et al.*, 2016), considerando para *Sargassum* uma matriz com 45 sequências, sendo seis sequências do material de estudo (três réplicas por local de coleta), 13 sequências selecionadas do *GenBank* (Tabela M.3) e 26 sequências de amostras brasileiras compartilhadas da estudante Vitória Miranda e da Dra. Donaji, supervisadas pela Dra. Mariana Oliveira; e para *Pyropia* foi utilizada uma matriz com 17 sequências sendo três sequências do material de estudo e 14 sequências selecionadas do *GenBank* (Tabela M.4).

Espécie	Registro no GenBank	Referência
Sargassum cymosum Agardh	KF413691	Mattio et al. (2013)
Sargassum echinocarpum Agardh	EU100795	Mattio & Payri (2009)
Sargassum henslowianum Agardh	JQ807796	Zhang & Duan (submetido)
Sargassum herporhizum Setchell & Gardner	JX560130	Andrade-Sorcia et al. (submetido)
Sargassum howeanum Lucas	FJ170440	Mattio & Payri (2009)
Sargassum jonhstonii Setchell & Gardner	JX560129	Andrade-Sorcia et al. (submetido)
Sargassum lapazeanum Setchell & Gardner	JX560125	Andrade-Sorcia et al. (submetido)
Sargassum obtusifolium Agardh	EU100787	Mattio & Payri (2009)
Sargassum polyphyllum Agardh	EU833424	Mattio & Payri (2009)
Sargassum scabridum Hooker & Harvey	FJ170451	Mattio & Payri (2009)
Sargassum spinuligerum Sonder	FJ170462	Mattio & Payri (2009)
Sargassum vachellianum Greville	KJ855999	Bi et al. (submetido)
Sargassum vulgare Agardh	KJ572486	Chiarore & Patti (submetido)

Tabela M.3. Especificações das sequências selecionadas do banco de dados *GenBank* com marcadores moleculares ITS-2 utilizadas no método *Neighbour-Joining* para *Sargassum*.

Tabela M.4. Especificações das sequências selecionadas do banco de dados *GenBank* com marcadores moleculares COI-5P utilizadas no método *Neighbour-Joining* para *Pyropia*.

Espécie	Registro no GenBank	Referência
Porphyra acanthophora Oliveira & Coll	JN222743	Milstein et al. (2012)
Porphyra acanthophora Oliveira & Coll	KX036914	Dumilag & Aguinaldo (2017)
Pyropia abbottiae Lindstrom	HM915486	McDevit (submetido)
Porphyra dioca Brodie & Irvine	JN847311	Mols-Mortensen et al. (submetido)
Pyropia fallax Lindstrom	HQ544849	Saunders & Dixon (submetido)
Pyropia fucicola Lindstrom	JN028633	Kucera & Saunders (submetido)
Pyropia gardneri Lindstrom	JN028644	Kucera & Saunders (submetido)
Pyropia orbicularis	KF479504	Ramirez et al. (2014)
Ramírez, Contreras Porcia & Guillemin		
Porphyra rosengurttii Coll & Cox	AM943399	Brodie et al. (2008)
Pyropia smithii Lindstrom	JN028778	Kucera & Saunders (submetido)
Porphyra spiralis Oliveira & Coll	JN222753	Milstein et al. (2012)
Pyropia torta Lindstrom	JN028802	Kucera & Saunders (submetido)
Porphyra yamadae Yoshida	KP266582	Xie et al. (2015)
Pyropia yezoensis Hwang & Choi	JN028803	Kucera & Saunders (submetido)

M.3. Delineamento experimental

O material triado e lavado foi aclimatado por uma semana em água do mar (32 ups) filtrada e esterilizada, enriquecida com solução de von Stosch (VS) diluída a 50% [Ursi & Plastino (2001), modificado de Edwards (1970)], sob condições controladas de 25 ± 1 °C, $65 \pm 5 \mu$ mol de fótons.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 14 h e aeração a cada 30 minutos. A proporção de cultivo foi de 3 g de MF por 1 L de meio de cultivo. Para *S. stenophyllum* foram utilizadas porções apicais de 5 ± 1 cm de comprimento e para *P. spiralis* talos de 8 ± 2 cm de diâmetro.

A água do mar utilizada foi duplamente filtrada com filtro CUNO de porosidade de 5 μm e 1 μm, e esterilizada por radiação ionizante (lâmpada UV-C, sistema QUIMIS Q884-21; 3,8 L/min). A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Phillips/Osram, 5200 K/40 W) e periodicamente medida com auxílio de medidor de quanta modelo LI-250 (LI-COR, EUA) e sensor esférico LI-193SB (LI-COR, EUA). A aeração foi provida a cada 30 minutos por compressor radial Ibran modelo-CR3 (Brasil).

Após o período de aclimatação, as algas foram submetidas por sete dias às mesmas condições de aclimatação descritas acima, com exceção da temperatura, sendo estas 15, 20, 25 (controle), 30 e 35 °C. A temperatura de 25 °C foi escolhida como condição controle visto que para ambos locais e períodos de coleta, a média sazonal foi de aproximadamente 25 °C (Fig. M.2). Para cada tratamento de temperatura foram utilizadas cinco réplicas biológicas com algas cultivadas em frascos independentes.

O presente estudo foi dividido em cinco abordagens, correspondendo cada uma a um capítulo, como mostrado resumidamente a seguir. Na Figura M.3, indica-se o delineamento experimental geral especificando os tempos de amostragens e os respectivos parâmetros avaliados. Detalhes em relação às especificações do delineamento experimental e das metodologias empregadas serão tratados em cada um dos respectivos capítulos.



Figura M.3. Esquema geral do delineamento experimental, incluindo coleta, aclimatação e as diferentes abordagens para *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis*, descrevendo a organização dos cinco capítulos deste estudo, os respectivos tempos de análise (Inicial, 1, 3, 5 e 7 dias) e as variáveis mensuradas.

M.4. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados com cinco repetições independentes para cada tratamento e analisados estatisticamente verificando a normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade com o teste de Bartlett, segundo as especificações de Zar (1999). A análise estatística de comparação de médias foi mediante análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas ou unifatorial dependendo do caso, empregando intervalo de confiança de 95% (p < 0,05). Em tendo diferenças significativas, foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas entre as médias, utilizando o programa Statistica v. 12.

Em alguns casos foi realizada a análise de componentes principais (PCA) utilizando o programa Past v.2.17c.

Referências bibliográficas

- Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M., Melo, R., Severino, N. & Da Silva, J. (2001). Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. Phytochemistry. 57: 633-642.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 3: 403-410.
- Ansari, A. & Ghanem, S. (2017). Seasonal variation in the growth responses of some chlorophytic algal flora of the Red Sea. Egypt. J. Aquat. Res. 43: 129-134.
- Anastasakis, K., Ross, A. & Jones, J. (2011). Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. Fuel. 90: 598-607.
- Balboa, E., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. & Domínguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. Food. Chem. 138: 1764-1785.
- Barre, S., Potin, P., Leblanc, C. & Delage, L. (2010). The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. Mar. Drugs. 8: 988-1010.
- Barros, M., Pinto, E., Sigaud-Kutner, T., Cardozo, K. & Colepicolo, P. (2005). Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. Biol. Rhythm. Res. 36: 67-82.
- Bernardino, A., Netto, S., Pagliosa, P., Barros, F., Christofoletti, R., Rosa Filho, J., Colling, L. & Lana, P. (2015). Predicting ecological changes on benthic estuarine assemblages through decadal climate trends along Brazilian Marine Ecoregions. Estuar. Coast. Shelf. 166: 74-82.
- Borel, L. & Favrat, D. (2010). Thermodynamics and energy systems analysis: from energy to exergy. 795p.
- Brodie, J., Bartsch, I., Neefus, C., Orfanidis, S., Bray, T. & Mathieson, A.C. (2007). New insights into the cryptic diversity of the North Atlantic-Mediterranean 'Porphyra leucosticta' complex: P. olivii sp. nov. and P. rosengurttii (Bangiales, Rhodophyta). Euro. J. Phycol. 42: 3-28.
- Bui, H., Luu, T. & Fotedar, R. (2018). Effects of temperature and ph on the growth of *Sargassum linearifolium* and *S. podacanthum* in potassium-fortified inland saline water. Am. J. Appl. Sci. 15: 186-197.
- Buzá-Jacobucci, G. & Pereira-Leite, F. (2014). The role of epiphytic algae and different species of *Sargassum* in the distribution and feeding of herbivorous amphipods. Lat. Am. J. Aquat. Res. 42: 353-363.
- Camacho, O., Mattio, L., Draisma, S., Fredericq, S. & Diaz-Pulido, G. (2015). Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum*

schnetteri comb. nov. and *Sargassum section* Cladophyllum sect. nov. Syst. Biodivers. 13: 105-130.

- CEBIMar/USP. Estação Meteorológica do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo. Disponível em http://cebimar.usp.br/index.php/pt/informacoesambientais/estacao-meteorologica-do-cebimar-usp-sao-sebastiao-estacaodavis.html#Historico. Data de acceso: fevereiro 2016.
- Choi, H., Kim, Y., Kim, J., Lee, S., Park, J., Ryu, J. & Nam, K. (2006). Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. chorda*, with the potential for mariculture in Korea. J. Appl. Phycol. 18: 269-277.
- Choi, H., Lee, K., Yoo, H., Kang, P. & Kim Y. (2008). Physiological differences in the growth of *Sargassum horneri* between the germling and adult stages. J. Appl. Phycol. 20:729-735.
- Coll, J. & Oliveira, E. (2001). *Porphyra drewiana*, a new species of red algae (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil. Phycol. Res. 49: 67-72.
- Crockford, S. (2009). Evolutionary roots of iodine and thyroid hormones in cell-cell signaling. Integr. Comp. Biol. 49:155-166.
- Cruces, C., Huovinen, P. & Gómez, I. (2012). Stress proteins and auxiliary anti-stress compounds in intertidal macroalgae. Lat. Am. J. Aquat. Res. 40: 822-834.
- Davison, I. & Pearson, G. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. J. Phycol. 32:197-211.
- Di Fonzo, R. & Wagner, J. (2012). Mudanças climáticas globais no Estado de São Paulo. Cadernos de Educação ambiental. Secretaria do meio ambiente. São Paulo. 89p.
- Diaz-Pulido, G., McCook, L., Larkum, A., Lotze, H., Raven, J., Schaffelke, B., Smith, J. & Steneck, R. (2006). Vulnerability of macroalgae of the Great Barrier Reef to climate change. Marshall PA, Johnson J (eds) Climate change and the Great Barrier Reef. Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville, pp 153-192.
- Dumilag, R. & Aguinaldo, A. (2017). Genetic differentiation and distribution of *Pyropia* acanthophora (Bangiales, Rhodophyta) in the Philippines. Euro. J. Phycol. 52: 104-115.
- Dutra, F., Crespo, R., Coelho, M. & Laneuville, V. (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Braz. J. Pharm. Sci. 17:631-639.
- Edwards, P. (1970). Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contr. Mar. 15:1-228.
- Faveri, C. (2012). Avaliação do impacto da urbanização e extremos de temperatura sobre a fisiologia e morfologia de *Hypnea musciformis* J. V. Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): uma avaliação do efeito sinérgico. Dissertação de Mestrado, UFSC. 86 p.
- Fitton, J. (2003). Brown marine algae: A survey of therapeutic potentials. J. Altern. Complement. Med. 9: 29-33.

- Gouveia, C. (2012). Praias arenosas oceânicas do estado de São Paulo (Brasil): síntese dos conhecimentos sobre morfodinâmica, sedimentologia, transporte costeiro e erosão costeira. Revista do Departamento de Geografia - USP. 30: 307-371.
- Hall, T. (1990). Bioedit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for windows. Nucl. Acid. Symp. Ser. 41: 95-98.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant. Physiol. 141: 312-322.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D. & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 14288-14293.
- Hanson, D. & Sharkey, T. (2001). Rate of acclimation of the capacity for isoprene emission in response to light and temperature. Plant. Cell. Environ. 24: 937–946.
- Harley, C., Randall, A., Hultgren, K., Miner, B., Sorte, C., Thornber, C., Rodriguez, L., Tomanek, L. & Williams, S. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecol. Lett. 9: 228-241.
- Hind, K. & Saunders, G. (2013). A molecular phylogenetic study of the tribe corallineae (Corallinales, Rhodophyta) with an assessment of genus-level taxonomic features and descriptions of novel genera. J. Phycol. 49, 103-114.
- Horta, P., Amancio, E., Coimbra, C. & Oliveira, E. (2001). Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. Hoehnea. 28: 243-265.
- INPE (2014-2015). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/historico/passo2.php
- IPCC (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. 169 p.
- Israel, A., Einav, R. & Seckbach, J. (2010). Seaweeds and their role in globally changing environments. Springer. 480p.
- Kawai, H., Muto, H., Fujii, T. & Kato, A. (1995). A linked 5S rRNA gene in Scytosiphon lomentaria (Scytosiphonales, Phaeophyceae). J. Phycol. 31: 306-311.
- Kim, J., Kraemer, G., Neefus, N., Kyo, I. & Yarish, C. (2007). Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. J. Appl. Phycol. 19: 431-440.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- Küpper, F., Carpenter, L., McFiggans, G., Palmer, C., Waite, T., Boneberg, E. & Woitsch, S. (2008). Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 6954-6958.

- Le, B., Nadeem, M., Yang, S., Shin, J., Kang, M., Chung, G., & Sun, S. (2018). Effect of silicon in *Pyropia yezoensis* under temperature and irradiance stresses through antioxidant gene expression. J. Appl. Phycol. 1: 1-6.
- Le Gall, L. & Saunders, G. (2010). DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. J. Phycol. 46: 374-389.
- Lichtenthaler, H. (1998). The stress concept in plants: an introduction. Ann. N. Y. Acad. Sci. 30: 187-198.
- Marengo, J., Nobre, C., Salati, E. & Ambrizzi, T. (2007). Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Sumário Técnico. Brasília. 50p.
- Mattio, L. & Payri, C. (2009). Assessment of five markers as potential barcodes for identifying Sargassum subgenus Sargassum species (Phaeophyceae, Fucales). Cryptogamie. 31: 467-485.
- Michalak, I. & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: technology and advances. Eng. Life. Sci. 14: 581-591.
- Milstein, D., Medeiros, A., Oliveira, E. & Oliveira, M. (2012). Will a DNA Barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? J. App. Phycol. 24: 837-845.
- Milstein, D., Medeiros, A., Oliveira, E. & Oliveira, M. (2014). Native or introduced? A reevaluation of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil based on molecular analyses. Eur. J. Phycol. 1: 1-9.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends. Plant. Sci. 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. & Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? Trends. Plant. Sci. 16: 300-309.
- Nuñez, R. & Casas, M. (1996). Fenología de las especies Sargassum en tres zonas de Bahía, concepción (México). Rev. Biol. Trop. 44: 455-464.
- Parr, A. & Bolwell, G. (2008). Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J. Sci. Food. Agr. 80: 985-1012.
- Paula, E. (1988). O gênero Sargassum C. Agarth (Phaeophyta, Fucales) no estado de São Paulo. Bol. Bot. 10: 65-118.
- Ramirez, M., Contreras-Porcia, L., Guillemin, M., Brodie, J., Valdivia, C., Flores-Molina, M., Nunez, A., Bulboa-Contador, C. & Lovazzano, C. (2014). *Pyropia orbicularis* sp. nov.

(Rhodophyta, Bangiaceae) based on a population previously known as *Porphyra columbina* from the central coast of Chile. Phytotaxa. 158: 133-153.

Rosenfeld, L. (2000). Discovery and early uses of iodine. J. Chem. Education. 77: 984-987.

- Spalding, M., Fox, H., Allen, G., Davidson, N., Ferdana, Z., Finlayson, M., Halpern, B., Jorge, M., Lombana, A., Lourie, S., Martin, K., McManus, E., Molnar, J., Recchia, C. & Robertson, J. (2007). Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. Bio. Sci. 57: 573-583.
- Stengel, D., Connan, S. & Popper, Z. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. Biotech. Adv. 29:483-501.
- Széchy, M. & Paula, E. (2000). Padrões estruturais quantitativos de bancos de Sargassum (Phaeophyceae, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Brasil. Leandra. 12: 1-10.
- Tala, F. & Chow, F. (2014). Ecophysiological characteristics of *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta): seasonal and latitudinal variations in Chile. Aquat. Bot. 43p.
- Teixeira, T; Neves, L & Araújo, F. (2009). Effects of a nuclear power plant thermal discharge on habitat complexity and fish community structure in Ilha Grande Bay, Brazil. Mar. Environ. Res. 68: 188-195.
- Ursi, S. & Plastino, E. (2001). Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e marrom-esverdeada clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. Rev. Bras. Bot. 24: 587-594.
- Wang, W., Lin, Y., Teng, F., Ji, D., Xu, Y., Chen, C. & Xie, C. (2018). Comparative transcriptome analysis between heat-tolerant and sensitive *Pyropia haitanensis* strains in response to high temperature stress. Algal. Res. 29: 104-112.
- Xie, Z., Lin, S., Liu, L., Ang, P. & Shyu, J. (2015). Genetic diversity and taxonomy of foliose Bangiales (Rhodophyta) from Taiwan based on *rbcL* and *cox1* sequences. Bot. Mar. 58: 189-202.
- Zar, H. (1999). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. 663p.
- Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., & Zhang, Q. (2010). Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity *in vitro*. Carbohydr. Polym. 82: 118-121.
- Zhang, H., Li, J., Li, W., Fu, J. & Duan, D. (2012). Characterization and expression analysis of hsp70 gene from *Ulva prolifera* J. Agardh (Chlorophyta, Chlorophyceae). Mar. Gen. 5:53-58.
- Zou, X., Xing, S., Su, X., Zhu, J., Huang, H. & Bao, S. (2017). The effects of temperature, salinity and irradiance upon the growth of *Sargassum polycystum* C. Agardh (Phaeophyceae). J. Appl. Phycol. 30: 1207-1215.





Respostas a curto prazo de *Sargassum stenophyllum* à temperatura em condições de laboratório: fotossíntese e composição química

Short-term responses of *Sargassum stenophyllum* to temperature in laboratory conditions: photosynthesis and chemical composition

1.1. Introduction

In the natural environment, seaweeds are constantly exposed to variations in both biotic (*e.g.*, herbivory, competition) and abiotic (*e.g.*, temperature, irradiance, UV radiation, nutrient limitation, desiccation) factors imposed by the tidal fluctuation of an air-water interface ecosystem. The intertidal rocky shore zone, especially at upper and lower limits, the variation of the abiotic factors is more accentuated. Among these factors, temperature is one of the main abiotic conditions that determine geographical distribution, growth, development, reproduction, and survival of macroalgae (Mansilla *et al.*, 2014).

The temperature oscillation affects the performance traits such as growth, photosynthesis and respiration, inducing changes in metabolic reactions (Davison, 1991). Eggert (2012) point outs the differentiation of three types of temperature responses: (a) genetic adaptation to local conditions, (b) phenotypic acclimation in response to variation of environmental conditions, and (c) short-term physiological regulation. Macroalgae can exhibit physiological plasticity to temperature fluctuations displaying acclimation of metabolic pathways. Usually, both growth and photosynthetic rates increase with temperature until a maximal level, and then decline rapidly near the upper tolerance ability (Ji *et al.*, 2016). At low temperature, some species show high photosynthetic rates due to down-regulation of the ratio of photosynthetic antenna pigment complex coupled to the reaction centers (Ji *et al.*, 2016).

The cellular chemical composition has also been reported to be affected by temperature. Changes in carbon, nitrogen, proteins and storage carbohydrates contents have frequently been used as indicators of physiological state of seaweed health (Gagná *et al.*, 1982). The variation of the chemical composition probably is related to carbon-nutrient balance (Lerdau & Coley, 2002), in which the seaweeds allocate differentially C:N sources depending of the metabolic demands (Rosenberg & Ramus, 1982; Polo *et al.*, 2014). Under warmest seasons, Gómez and Wiencke (1998) observed decrease in N content, increase in protein level and inverse correlation to photosynthesis and variable pattern of storage carbohydrates, depending on the type of carbohydrate, with opposite response between mannitol and laminaran, two storage

polysaccharides found in brown algae. In addition, warm-acclimatized seaweeds tend to decrease the pigment content in contrast with cool-acclimated seaweeds that present higher chlorophyll levels and organic nitrogen and phosphorus bounds (Staehr & Wernberg, 2009). Notwithstanding previous studies with respect to amino acid content in *Sargassum* spp. (Ramos *et al.*, 1999; Lourenço *et al.*, 2002; Matanjun *et al.*, 2009), there are no studies about the relationship between amino acid profiles associated with temperature in laboratory conditions.

In tropical and subtropical regions, species of *Sargassum* Agardh (Ochrophyta, Fucales) can make up dense natural forest beds (De Wreede, 1976; Casas-Valdez *et al.*, 2016) and in Brazil, species of this genus represent one of the most important seaweeds in terms of abundance (Paula & Oliveira-Filho, 1980; Széchy and Paula, 2000). *Sargassum* beds are important community builders and structure essential habitats for numerous marine invertebrate and vertebrate species. Although, there is no economic use of *Sargassum* in Brazil, species outside the country have been more extensively explored by agro-food, textile, cosmetic and pharmaceutical industries, and bioactive properties (Prud'homme van Reine, 2002).

Therefore, considering the ecological importance and potential exploitation of *Sargassum* species, associated with the current scenario of increasing environmental degradation of marine ecosystem and projections of global climate changes, laboratorial studies under increasing temperatures that can mimic future global warming predictions are valuable for proper understanding the dynamic and vulnerability of this species, as well as contributing for the exploitation of the national biodiversity. Therefore, this *in vitro* study will contribute with the knowledge about carbon-nutrient balance as amino acids, pigments, proteins and carbohydrates content associated with temperature fluctuations. Hence, the aim of this study was to assess the physiological vulnerability of *Sargassum stenophyllum* Martius submitted to different temperatures under laboratorial conditions by analyzing responses of photosynthetic performance and carbon and nitrogen metabolism.

1.2. Material and methods

1.2.1. Sampling and experimental set-up

Sargassum stenophyllum was collected at Cibratel Beach (24°13'31"S and 46°51'7"W), localized in the Itanhaém District, southeast coast of the São Paulo State, Brazil, in November 2014 during the spring season and transported to the laboratory in thermo-cooler containers. In the laboratory, the algae were cleaned of macroepiphytes and associated fauna and then washed with filtered seawater. Portions of five different individuals were fixed in 4% formalin (v/v, diluted in seawater) and then herborized and deposited in the SPF Herbarium at the University of São Paulo (voucher SPF 57850). The remained material was used for subsequent experiments.

The experimental set-up was carried out with acclimated, cleaned apex portions of 5 ± 2 cm length, as described in Section M.3, and at experimental temperature conditions of 15, 20, 25 (control), 30 and 35 °C for seven days at the same laboratory-controlled conditions described in Section M.3. The control temperature of 25 °C was selected based on the average temperature data from National Institute for Space Research (INPE) database for the respective collection site. Photosynthetic performance and contents of total soluble protein and photosynthetic pigments were measured before start the experiment (Initial at 25°C) and then after 1, 3, 5 and 7 days. Total carbohydrate and amino acids contents were measured at Initial time and the end of the experiment (after seven days).

1.2.2. In vivo chlorophyll a fluorescence

The photosynthetic performance was estimated as *in vivo* fluorescence of the chlorophyll *a* of PSII by using a portable Pulse Amplitude Modulation fluorometer (PAM-2500, Walz, Germany) with red LED actinic light. The measurements were performed between 4 and 6 h after switching-on the photoperiod. Effective quantum yield of PSII [Y(II)], or photochemical quenching [Y(PSII)], was measured from light-adapted samples and calculated following Schreiber & Neubaer (1990). Non-regulated non-photochemical quenching [Y(NO)] and regulated non-photochemical quenching [Y(NPQ)] were also estimated following Kramer et al. (2004).

Electron transport rate - light (ETR x PAR) curves were estimated on light-adapted samples at ten increasing PAR intensities (0, 23, 41, 60, 80, 107, 185, 300, 455 and 751 µmol photons m⁻² s⁻¹). ETR was calculated as ETR = Y(II) × PAR × A_p × 0.8; where PAR is the photosynthetically active radiation, A_p is the absorptance of the seaweeds (Ramus & Rosenberg, 1980; Mercado *et al.*, 1996), and 0.8 is the fraction of chlorophyll *a* associated to the PSII in brown algae (Figueroa *et al.*, 2003). From the ETR x PAR curves were determined the maximum ETR (ETR_{max}), photosynthetic efficiency (α) and light saturation (Ik) by fitting the curves to a hyperbolic tangent model following Jassby & Platt (1976).

1.2.3. Soluble proteins, photosynthetic pigments and absorption spectrum

The extraction of soluble proteins was performed from 70 mg of fresh weight (FW) samples, following the method described by Harb *et al.* (2018). The material was ground in liquid nitrogen and extracted with 1 mL of cold sodium phosphate buffer (50 mM, pH 5.5), and then centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C (buffered extract). The precipitate of the buffered extract was used for extracting photosynthetic pigments (chlorophylls *a* and *c*; and carotenoids) by its resuspension in 1.5 mL of methanol, extracted for 3 h at 4 °C and protected from light, and then centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C (methanolic extract).

From buffered extracts, the total soluble protein was quantified following the spectrophotometric Bradford method (Bradford, 1976) by using the Bio-Rad® protein assay reagent (Bio-Rad, USA) and bovine serum albumin (BSA) as standard (2 to 16 μ g mL⁻¹; y = 0.0388x - 0.0711; R² = 0.9919).

From methanolic extracts, the chlorophylls *a* and *c* were calculated by using the absorbance coefficients for spectrophotometric equations of Ritchie (2008) following the equation: Chlorophyll *a* (μ g g⁻¹ FW) = (16.4351 x A₆₆₅) - (3.2416 x A₆₃₂) and Chlorophyll *c* (μ g g⁻¹ FW) = (34.2247 x A₆₃₂) - (1.5492 x A₆₆₅); where A is the absorbance. Total carotenoids were estimated based on the Lichtenthaler (1987) model, using the absorption coefficients in methanol of chlorophyll *a* (1.63) from Lichtenthaler & Buschmann (2001) and chlorophyll *c* (119.5) from Jeffrey (1963). The total carotenoids was calculated as the equation described below: Total carotenoids (μ g g⁻¹ FW) = {1000 x [A₄₇₀ - (1.63 x chlorophyll *a*) - (119.5 x chlorophyll *c*)} / 221; where A is the absorbance.

The absorption spectra from buffered and methanolic extracts were also determined at wavelengths from 200 to 700 nm using a volume of 200 μ L and a microplate UV-visible spectrophotometer (Epoch Biotek, USA).

1.2.4. Soluble carbohydrates

Total soluble carbohydrate content was analyzed from frozen samples of 165 mg FW with the phenol-sulfuric acid method described in Matsuko *et al.* (2005). The material was grounded in liquid nitrogen and extracted with 1 mL of ultrapure water at 70 °C for 3 h. Then, the homogenate was centrifuged at 12.000 rpm for 10 min at room temperature. The concentration of carbohydrates was calculated with fucose (60-240 µg mL⁻¹; y = 0.0044x - 0.0318; $R^2 = 0.9923$) and galactose (15-60 µg mL⁻¹; y = 0.0193x - 0.0527; $R^2 = 0.9906$) as standard curves and by using a microplate UV-visible spectrophotometer.

1.2.5. Amino acid

Amino acid profile was analyzed from frozen samples of 70 mg FW according to Santa-Catarina *et al.* (2006), with modifications. The samples were extracted with 6 mL of 80% ethanol for 2 h and centrifuged at 12.000 rpm for 10 min at room temperature, and concentrated in speed vacuum. Then, the precipitate was re-suspended in 2 mL of ultrapure water, centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at room temperature and the supernatant was filtrated with a 0.2 μ m Millipore membrane. Amino acids were derivatized with *o*-phthaldialdehyde (OPA) and identified by HPLC (Shimadzu Shin-pack CLC ODS) using a C18 reverse phase column (Supelcosil LC-18, 25 cm × 4.6 mm/L × i.d.). The gradient was developed by mixing increasing proportions of 65% methanol to a buffer solution (50 mM sodium acetate, 50 mM sodium phosphate, 20 mL L⁻¹ methanol, 20 mL L⁻¹ tetrahydrofuran and pH 8.1 adjusted with acetic

acid). The gradient of 65% methanol was programmed according to Egydio *et al.* (2013). Fluorescence excitation and emission wavelengths of 250 nm and 480 nm, respectively, were used for amino acid detection. Peak areas and retention times were measured by comparison with known quantities of standard amino acids (Sigma-Aldrich, USA).

1.2.6. Statistical analysis

Statistical analysis were performed according to Zar (1999), including five biological replicates for each treatment. Normality was verified by Kolmogorov-Smirnov test and homoscedasticity by Bartlett's test. Data of photosynthetic performance over time was analyzed by repeated measures analysis of variance (ANOVA) and the other parameters by one-way ANOVA. When statistical differences were noted, Newman-Keuls *post hoc* test was applied for multiple comparisons. All analysis were performed with a 95% of confidence interval (p < 0.05) using the software Statistica v.12. A multivariate analysis with the data set after seven days of experiment was performed by a principal component analysis (PCA) using the software PAST v.2.17c.

1.3. Results

The effect of temperature on photosynthetic performance and chemical composition of the brown seaweed *S. stenophyllum* was detected over the experimental time. At the end of the experiment, phylloids at 30 °C showed detachment from central axis and at 35 °C a deterioration and necrosis of the thalli was observed (Fig. 1.1). Additionally, changes in the coloration of seawater culture medium was noted (data not shown), which became increasingly yellowish at higher temperature condition.



Temperature (°C)

Figure 1.1. General aspect of phylloids of *Sargassum stenophyllum* after seven days under different temperatures.

Samples at 35 °C displayed significant reduction of Y(PSII) from the first day of experimentation (Fig. 1.2), with low levels at day five and seven and concomitant variations on non-photochemical quenchings. The Y(PSII) of samples at 25 °C, considered as control treatment, showed the same levels than Initial sample over time (Fig. 1.2). The photosynthetic

performance parameters Y(PSII), Y(NO), Y(NPQ), ETR_{max}, Ik, and α over time were statistically analyzed by repeated measures ANOVA and all the descriptors presented significant differences in relation to temperature, time and the interaction between time-temperature (Table 1.1).



Figure 1.2. Photosynthetic performance of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures over time (Initial and after 1, 3, 5 and 7 days), measured as Y(PSII) - effective quantum yield or photochemical quenching, Y(NO) - non-regulated non-photochemical quenching and Y(NPQ) - regulated non-photochemical quenching. Different letters (white lowercase, black uppercase, and black lowercase) represent statistical differences for each variable (p < 0.05).

Table 1.1. Main effects and interactions related to the photosynthetic performance and chemical composition of repeated measures of ANOVA of *S. stenophyllum* cultivated under different temperatures over time. SS – square sum, *d.f.* – degree of freedom, MS – medium square, F – statistic index, p – probability (p < 0.05).

Effect	SS	d.f.	MS	F	р
	Ph	otocher	nical quencl	hing [Y(PSII)]
Intercept	51.1129	1	51.1129	87252.84	< 0.001
Temperature	2.1667	4	0.5417	924.66	< 0.001
Error	0.0117	20	0.0006		
Time	0.3991	4	0.0998	142.62	< 0.001
Time x Temperature	1.3729	16	0.0858	122.65	< 0.001
Error	0.0560	80	0.0007		

Continue Tabl	le 1.1.
---------------	---------

	Non-regulate	d non-	photochemic	al quenching	g [Y(NO)]
Intercept	14.9103	1	14.9103	5213.00	< 0.001
Temperature	2.2064	4	0.5516	192.85	< 0.001
Error	0.0572	20	0.0029		
Time	0.5944	4	0.1486	103.16	< 0.001
Time x Temperature	1.4895	16	0.0931	64.62	< 0.001
Error	0.1152	80	0.0014		
	Regulated	non-p	hotochemical	quenching	[Y(NPQ)]
Intercept	0.0524	1	0.0524	53.50	< 0.001
Temperature	0.0164	4	0.0041	4.20	0.012
Error	0.0196	20	0.0010		
Time	0.0534	4	0.0133	7.73	< 0.001
Time x Temperature	0.0684	16	0.0042	2.47	0.004
Error	0.1382	80	0.0017		
		maxi	mum ETR (E	TRmax)	
Intercept	120755.3	1	120755.3	5053.69	< 0.001
Temperature	8978.0	4	2244.5	93.93	< 0.001
Error	477.9	20	23.9		
Time	3229.9	4	807.5	31.54	< 0.001
Time x Temperature	5910.1	16	369.4	14.43	< 0.001
Error	2047.9	80	25.6		
		L	ight saturation	n (Ik)	
Intercept	941046.1	1	941046.1	3723.42	< 0.001
Temperature	59771.6	4	14942.9	59.12	< 0.001
Error	5054.7	20	252.7		
Time	15026.5	4	3756.6	16.46	< 0.001
Time x Temperature	63030.5	16	3939.4	17.26	< 0.001
Error	18251.4	80	228.1		
		Photos	synthetic efficiency	ciency (α)	
Intercept	13.8809	1	13.8809	6332.71	< 0.001
Temperature	0.7091	4	0.1772	80.88	< 0.001
Error	0.0438	20	0.0021		
Time	0.1792	4	0.0448	35.21	< 0.001
Time x Temperature	0.4891	16	0.0305	24.02	< 0.001
Error	0.1018	80	0.0012		
			Chlorophyl	1 a	
Intercept	22719639	1	22719639	8872.30	< 0.001
Temperature	89038	4	22260	8.69	0.007
Error	17925	7	2561		
Time	40763	4	10191	5.38	0.002
Time x Temperature	89906	16	5619	2.96	0.005
Error	53007	28	1893		
			Chlorophyl	1 <i>c</i>	
Intercept	7602184	1	7602184	3114.51	< 0.001
Temperature	96273	4	24068	9.86	0.005
Error	17086	7	2441		
Time	40207	4	10052	5.65	0.001
Time x Temperature	58404	16	3650	2.05	0.046
Error	49789	28	1778		

Continue Ta	able	1.1
-------------	------	-----

			Carotenoi	ds	
Intercept	52149.3	1	52149.30	1016.95	< 0.001
Temperature	3146.24	4	786.56	15.33	< 0.001
Error	410.24	8	51.28		
Time	372.23	4	93.06	1.91	0.131
Time x Temperature	8913.44	16	557.09	11.47	< 0.001
Error	1553.99	32	48.56		
			Proteins		
Intercept	1897.17	1	1897.17	21397.50	< 0.001
Temperature	14.69	4	3.67	41.42	< 0.001
Error	1.77	20	0.08		
Time	34.12	4	8.53	58.30	< 0.001
Time x Temperature	11.77	16	0.73	5.03	< 0.001
Error	11.70	80	0.14		

Figure 1.3 shows the ETR x PAR curves grouped by the experimental time of 1, 3, 5 and 7 days (Fig. 1.3A-D, respectively), including the Initial ETR x PAR curve for all experimental time. The ETR x PAR kinetic of samples at 35 °C was evidently lower than the other temperatures from the third day (Fig. 1.3B-D) and differences between the treatments for the ETR x PAR parameters were also noted (Table 1.2), especially for the treatment at 35 °C. At 25 °C, ETR_{max} and Ik data were the highest values in relation to the other treatments.



Figure 1.3. Electron transport rate (ETR)-PAR curves (mean \pm SD, n = 5) of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures over time: (A) day 1, (B) day 3, (C) day 5, and (D) day 7.

Time	Temperature	ETRmax	Ik	α
(day)	(°C)	(µmol electrons.m ⁻² .s ⁻¹)	(µmol photons.m ⁻² .s ⁻¹)	(electron/photon)
Initial	25	39.61 ± 7.57 bc	$105.61\pm20.47\ bcde$	$0.377 \pm 0.042 \text{ a}$
1	15	$31.15\pm4.74\ cdef$	104.01 ± 3.67 bcde	$0.300\pm0.043~bcd$
	20	$22.95\pm5.60~f$	$65.54 \pm 22.09 \text{ fg}$	$0.364 \pm 0.067 \text{ ab}$
	25	31.83 ± 5.23 cdef	$86.93 \pm 16.96 \text{ efg}$	0.371 ± 0.046 a
	30	$30.30 \pm 5.71 \text{ def}$	$80.19 \pm 19.28 \ cdefg$	$0.382\pm0.026~ab$
	35	$24.88 \pm 3.12 \text{ ef}$	$87.85 \pm 11.60 \text{ bcdef}$	$0.286\pm0.045\ cd$
3	15	37.56 ± 3.64 bcd	111.07 ± 9.73 bcd	0.338 ± 0.008 abc
	20	$29.43 \pm 6.44 \text{ def}$	$77.88 \pm 11.59~defg$	$0.378\pm0.058~ab$
	25	36.19 ± 6.21 bcde	$103.80\pm24.43~bcdef$	0.355 ± 0.042 a
	30	$34.13 \pm 8.06 \text{ bcde}$	$86.42\pm28.87~cdef$	0.409 ± 0.064 a
	35	$13.95 \pm 4.14 \text{ g}$	$54.27\pm19.94~g$	$0.262 \pm 0.043 \text{ d}$
5	15	38.69 ± 4.36 bcd	119.86 ± 11.30 b	0.323 ± 0.021 abcd
	20	$24.88\pm7.20~ef$	$64.73 \pm 19.30 \text{ fg}$	0.386 ± 0.029 a
	25	42.62 ± 5.89 bcd	123.91 ± 16.26 bc	$0.345\pm0.040~abc$
	30	$22.74\pm5.87~f$	$62.43 \pm 25.48 \text{ fg}$	0.387 ± 0.076 a
	35	$0.10\pm0.00\ h$	$0.10\pm0.00\ h$	$0.100 \pm 0.000 \text{ e}$
7	15	$43.96\pm8.64\ b$	113.46 ± 22.71 bc	0.388 ± 0.017 a
	20	33.53 ± 5.86 bcde	97.26 ± 13.44 bcde	0.344 ± 0.031 abc
	25	51.41 ± 3.24 a	153.93 ± 8.91 a	0.330 ± 0.033 abc
	30	33.21 ± 2.11 bcde	87.60 ± 7.76 bcdef	0.380 ± 0.023 ab
	35	$0.10 \pm < 0.00 \ h$	$0.10 \pm < 0.00 \ h$	$0.100 \pm < 0.001 e$

Table 1.2. Photosynthetic parameters estimated from the ETR x PAR curve as maximum ETR (ETRmax), light saturation (Ik), and photosynthetic efficiency (α) of *S. stenophyllum* cultivated under different temperatures over time. Values represent mean \pm standard deviation (n = 5). Letters represent statistically significant differences between treatments (p < 0.05).

The concentration of photosynthetic pigments, chlorophyll *a*, chlorophyll *c* and total carotenoids (Fig. 1.4A-C, respectively), did not show significant differences between the treatments at 25 °C and Initial sample for any time. Photosynthetic pigment contents displayed differences for temperature, time, and the interaction of time-temperature (Table 1.1). The treatments at high temperatures (30 and 35 °C) under longer exposure time (5 and 7 days) exhibited lower amounts of pigments (Fig. 1.4A-C).

The total soluble protein content of *S. stenophyllum* (Fig. 1.4D) after 1, 3 and 5 days at 25 °C did not show difference when compare to Initial sample. When compared to the control, the treatment at 35 °C showed significant differences at 1, 3 and 5 day. All treatments showed a reduction on protein content for the day 7. Soluble protein content exhibited differences for temperature, time, and the interaction of time-temperature (Table 1.1).



Figure 1.4. Contents of (A) chlorophyll *a*, (B) chlorophyll *c*, (C) total carotenoids, and (D) total soluble proteins of *Sargassum stenophyllum* (mean \pm SD, n = 5) cultivated under different temperatures over time. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).

The UV absorption spectrum for buffered extracts (Fig. 1.5A) presented a similar trend among the treatments, except for 35 °C, with maximal absorption bands between 214 to 226 nm and 264 to 280 nm, and non-peak bands were identified in visible spectrum. In the methanolic extracts (Fig. 1.5B) a similar trend among the treatments was verified, with maximal absorption bands in 206 to 214 nm, 266 to 276 nm, 320 to 340 nm, 416 to 446 nm, and 660 to 670 nm.



Figure 1.5. Absorbance spectrum from 200 to 700 nm of (A) buffered extracts and (B) methanolic extracts of *Sargassum stenophyllum* (n = 5) cultivated under different temperatures at Initial time and after seven days of experimental period.

The total soluble carbohydrates content at 25 °C showed higher concentration than the Initial sample (Fig. 1.6). From 15 to 30 °C the carbohydrate levels increased significantly with

values up to 82.89 ± 8.54 mg fucose g⁻¹ FW, equivalent to 78.35 ± 7.85 mg galactose g⁻¹ FW, with higher concentration at 30 °C. At 35 °C, a reduction of approximately 43% was observed in relation to 25 °C (F = 38.09; df = 5; p < 0.001).



Figure 1.6. Content of soluble carbohydrates of *Sargassum stenophyllum* (mean \pm SD, n = 5) cultivated under different temperatures at Initial time and after seven days of experimental period. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).

The amino acid profile of *S. stenophyllum* exhibited significant differences among the treatments (Fig. 1.7). The amino acid content under 25 °C was variable from the Initial time for most of the amino acids. The amino acids were variable at different temperatures, except for cysteine, phenylalanine, threonine, tryptophan, and tyrosine. After seven days, arginine, glutamate and glutamine content at 15 and 35 °C was reduced. On the other hand, at high temperature (35 °C), higher values of isoleucine and leucine were detected. Total amino acid content showed increase from 15 to 30 °C (Fig. 1.7). Additionally, a clustering heat map graphic of the amino acid profile (Fig. 1.8) showed similarity between Initial and 25 °C treatments and clustering with 15 and 30 °C. More distant grouping was noted for 15 and 30 °C, and extreme distance with 35 °C (Fig. 1.8).

From the distance clustering plus the heat map, a reduction on all amino acids content is evidenced. Whereas differential amino acids biosynthesis is observed among the thermal treatments.



Figure 1.7. Contents of amino acid profile (mean \pm SD, n = 5) of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period. Different letters represent statistical differences (p < 0.05).



Figure 1.8. Hierarchical clustering analysis (Gower's distance measure) and heat map representation among the amino acids of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period.

In addition, PCA analysis (Fig. 1.9) was used to compare the evaluated parameters Y(PSII), Y(NO), Y(NPQ), carotenoids, proteins, carbohydrates (fucose), and amino acids loading in the different temperatures for Initial treatment and after seven days of experiment. The first component represented 32.99% of the data variation and the second component was of 20.03%. The PCA of the component scale identified four groups: (I) low temperature at 15 °C; (II) Initial samples, 20, and 25 °C; (III) high temperature at 30 °C; and (IV) high extreme temperature at 35 °C. In general, the Group II carried almost all measured variables, characterized by Y(PSII), Y(NPQ), carotenoids, proteins, and several amino acids. The Group I correlated with a reduction of the metabolism. The Group III correlated with the decrease of fucose. In contrast, the Group IV reported the greatest distance between the components, with positive correlation with isoleucine and leucine.



Figure 1.9. PCA biplot of *Sargassum stenophyllum* cultivated under different temperatures after seven days of experimental period and the Initial samples showing the loadings on PC1 and PC2, representing 32.99% and 20.03% of the total variance of the data, respectively.

1.4. Discussion

Species of *Sargassum* form extensive benthic beds in tropical and subtropical low intertidal or subtidal areas and they are important species for marine structuring communities. As the main abiotic factor, temperature affects the seaweed's performance traits and triggers diverse changes in metabolic responses. Therefore, laboratorial experiments under a range of temperatures are valuable tools for understanding the sensitivity and vulnerability of this engineering seaweed. Furthermore, under the current scenario of global climate changes, this knowledge could serve as important subsidy for understanding and predict potential effects of increasing temperature and feasible consequences for the marine ecosystem.

The results of this study show variable short-term responses on the physiology and chemical composition of *S. stenophyllum* at different temperatures, with a tolerance range between 15 to 30 °C and evident sensitivity at 35 °C. The control temperature for *S. stenophyllum* was estimated be 25 °C as it was the average for the collection site during spring season. The water temperature is the main factor affecting the seaweed's growth, due that an increase may reduce the amount of dissolved oxygen content, affecting photosynthesis processes (Widyartini *et al.*, 2017). In temperate region, the optimum growth temperature for *Sargassum* spp. include lower values of temperature as registered by Yuan *et al.* (2014) in *S.*

muticum Fensholt at 15 °C and negative effect at 30 °C. In contrast, species in tropical region had optimal temperature at 25 °C and a range of thermotolerance between 25 to 35 °C as observed in *S. polycystum* (Widyartini *et al.*, 2017) and between 20 to 28 °C for *S. fusiformis* Setchell (Kokubu *et al.*, 2015). The upper limit of temperature tolerance, up to 30 °C, seems to remain similar for *S. stenophyllum* (present study) and *S. fusiformis* (Kokubu *et al.*, 2015), in which negative effects were observed in photosynthesis and declined the chemical composition by misbalance in the carbon and nitrogen metabolism.

In the photoprotective defense system, exists a decrease of the photosynthetic lightharvesting complex for mitigating the excess of energy and dissipate it from the reaction center of PSII, preventing oxidative damage of the photosynthetic apparatus. At 15 and 35 °C, *S. stenophyllum* reported low values of glutamate, that is precursor for chlorophyll synthesis (Forde & Lea, 2007), which explains the decrease in photosynthetic pigment content. In association to photoprotective and photoinhibitory mechanisms, exist correlation in the reduction of pigment content with the limitation in the photosynthetic rate (Louda *et al.*, 1998). There are two reactions for chlorophylls, one involving an structural adjustment of the molecule without destroying the macrocyclic conjugation, probably taking place in *S. stenophyllum* with samples at 15 °C at the seventh day. And another one including the cleavage of the macrocyclic ring with pigment destruction, which was possibly to consider for the samples at 35 °C with the lowest values of the photosynthetic pigments after the fifth day.

The reduction of carotenoid content from the fifth day at 35 °C for *S. stenophyllum* can be characterized a thallus-bleaching feature (Lewey & Gorham, 1984), which was analogous for *S. muticum* at 30 °C (Yuan *et al*, 2014). The alteration of thalli pigmentation from bright brown in early summer to a yellowish brown in mid-summer has been associated with the reduction of the content of chlorophyll *a*, β -carotene and the major xanthophylls, such as fucoxanthin and violaxanthin (Lewey and Gorham, 1984). In spite of not observing this bleaching for *S. stenophyllum*, in extreme temperatures it was noticed damage of the phylloids.

The photoprotective xanthophyll cycle, including the participation of fucoxanthin (Mikami & Hosokawa, 2013), might be active between the ranges of 15 to 30 °C, as nondifferences were observed for photosynthetic performance for *S. stenophyllum*. The carotenoid fucoxanthin is almost 80% of the measured xanthophylls in brown seaweeds (Lewey & Gorham, 1984), displaying diverse functions as essential component of the photosynthetic antenna complex, de-excitating chlorophyll *a* by quenching reactive singlet and triplet oxygen molecules (Schofield *et al.*, 1998), and photoprotecting against oxidative stress (Latowski *et al.*, 2011). Yip *et al.* (2014) reported that fucoxanthin of *S. binderi* Sonder is stable at pH 5 to 7, stored in dark condition and temperature of 4 °C and 25 °C. Consequently, abiotic factors as heat (up to 30 °C for *S. stenophyllum*), low pH and light exposure, influence the stability of carotenoids (Mercadante, 2008). Fucoxanthin is highly susceptible to degradation, leading to cis-trans isomerization, oxidative cleavage and epoxidation of the backbone as reported the photo stability study in the brown alga *Undaria pinnatifida* Suringar (Piovan *et al.*, 2013). In this way, could be probably that *S. stenophyllum* after fifth day at 35 °C chronic damage in the entire metabolic responses was triggered, including fucoxanthin degradation.

Despite the constant photosynthetic performance of *S. stenophyllum* from 15 to 30 °C over time, the contents of protein decreased over time, presumably related to the increase of nitrogen demand to support other metabolic pathways. Furthermore, this fluctuation could evidence carbon and nitrogen balance (Hamilton *et al.*, 2001) associated with the allocation and storage of the photoassimilates. Notwithstanding, a longer cultivation period could deplete the nitrogen sources needed to maintain the adequate balance of C:N. Seasonal variation in total nitrogen in two brown algae of Laminariales, *Macrocystis integrifolia* Bory and *Nereocystis luetkeana* Postels & Ruprecht, was reported with higher values during fall-winter and lower values during spring-summer, and opposite response for the total carbon content. Additionally, it was indicated that the most of the nitrogen in these algae was stored as protein with few amounts being accounted by free amino acids, low molecular weight peptides and, in fall winter, by stored nitrate (Rosell & Srivastava, 1985). Concomitantly, these authors report the same seasonal variation trends in nitrogen content and amino acid profile.

In S. stenophyllum, the amino acid profiles of cysteine, phenylalanine, threonine, tryptophan, and tyrosine did not show significance differences. Phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are also precursors for many secondary metabolites, which are implicated in the synthesis of phenolic compounds, important metabolites that act as defense systems against abiotic stressors. The UV spectra in S. stenophyllum reported absorption bands around 260 to 280 nm, that are representative of chemical classes of phenolic acids and polyphenols as phlorotannins, typical in brown algae (Myung et al., 2005; Ferreres et al., 2012; Chakraborty & Joseph, 2016). These phenolic compounds could accrue to intracellular space or release in seawater. Gómez & Huovinen (2010) reported insoluble phlorotannins that remain into physodes for intrinsic morpho-functional processes, and soluble phlorotannins, which are released to the water as a defense mechanism. During the experimental period, in S. stenophyllum, it was observed a change in the appearance of the seawater color at high temperatures, presenting a yellowish color which might indicate the release of these compounds. Similar results were reported for S. cymosum submitted to UV radiation, evidenced by the absorbance screening of seawater, in which an increase at 300 nm was observed (Polo et al., 2014). Therefore, abiotic factors such as temperature could be induced the liberation of phenolic compounds to the seawater as protection et al., 2013). Additionally, Stern et al. (1996) reported the ability of tannins to precipitate proteins generating the formation of tannin-protein complexes. Therefore, the progressive reduction observed in the protein content might also be related with a release to the seawater of phlorotannins-protein complexes.

Regarding amino acid profile associated with temperature, S. stenophyllum showed increase of glycine content at 15 and 20 °C that could be linked with the production or accumulation of glycine betaine, an intracellular osmolyte that increase under environmental stresses and could act as antioxidant (Airs & Archer, 2010). At 20 to 25 °C, the content of certain amino acids, such as glutamate and glutamine, were significantly higher, which could be associated with nitrogen availability to support growth (Azevedo et al., 2006). Additionally, these temperatures induced accumulation of ornithine, asparagine, and γ -aminobutyrate (GABA), which are amino acids related with polyamines, phytohormone-like aliphatic amine compounds, involved in many processes of growth and development, thereby, acting as antisenescence and anti-stress agents (Gill & Tuteja, 2010; Belghit et al., 2017). At 30 °C, the high values in methionine, histidine, and tryptophan contents may be involved as a defense response to thermal stress. For example, methionine is a substrate for the synthesis of various polyamines with important roles in stress tolerance, the most prominent being putrescine, spermidine, and spermine (Alcázar et al., 2010). Moreover, under extreme high temperature at 35 °C, S. stenophyllum reported the highest values of isoleucine and leucine, which are two branchedchain amino acids (BCAAs). The accumulation of BCAAs has been proposed to serve for the synthesis of stress-induced proteins or as signaling molecules to regulate gene expression (Joshi et al., 2010). As a final point, threonine content increased gradually as the temperature increases, which could participated of antioxidant processes (Wu, 2009).

In this study was observed coloration changes in the phylloids of *S. stenophyllum* under warmer conditions, showing dark-brown color that can be attributed to the presence of melanoidins, heterogeneous polymers of sugars and amino acids synthetized at high temperatures and low water activity, produced by non-enzymatic browning reaction, known as Maillard reaction that takes place between the carbonyl groups of reducing sugar and the amino groups of amino acids, peptides or proteins (Echavarría *et al.*, 2016). These authors reported absorption in UV spectra between 280 and 325 nm when the browning development of melanoidins was presented by glucose and aspartate complexes. In this study, melanoidins synthesis could be produced at 30 °C. In this species melanoidins can be present by the association with fucose, the major carbohydrate recorded for the genus (reported by Duarte *et al.*, 2001), in couple with amino acids such as alanine, aspartate, isoleucine or leucine, although deserves further study. Even though the melanoidin chemical structures is relatively unknown, it has been reported that some combinations contribute to the prevention of oxidative damage, acting as antioxidant with radical-scavenging activity and metal chelating capacity (Wang *et al.*, 2011).

In conclusion, *S. stenophyllum* showed a tolerance range of temperature between 15 to 30 °C, with similar physiological and chemical responses over this extent, indicating probably changes in the carbon and nitrogen metabolism; and chronic sensibility to 35 °C evidenced by a

reduction of photosynthetic efficiency and electron transport rate as well as protein and carbohydrate contents. Physiological and chemical responses at 35 °C could be used for supporting metabolic changes that this brown seaweed could have under the impact of increasing temperature by global warming, predicted for the southeastern coast of Brazil of 0.7 °C for decade (Gosling *et al.*, 2011). Additionally, this study could contribute to projections in the diversity and national bio-prospection necessary for science and political agendas of Latin America (Turra *et al.*, 2013; Scherner *et al.*, 2013; Figueroa *et al.*, 2014).

Referências bibliográficas

- Airs, R. & Archer, S. (2010). Analysis of glycine betaine and choline in seawater particulates by liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. Limnol. Oceanogr. 8: 499-506.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. & Tiburcio, A. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta. 6: 1237-1249.
- Azevedo, R., Lancien, M. & Lea, M. (2006). The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. J. Amino. Acids. 30: 143-162.
- Bradford, M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Casas-Valdez, M., Sánchez-Rodriguez, I., Serviere-Zaragoza, E. & Aguila-Ramirez, R. (2016). Temporal changes in the biomass and distribution of *Sargassum* beds along the southeastern coast of the Baja California Peninsula. Cienc. Mar. 42: 99-109.
- Chakraborty, K. & Joseph, D. (2016). Antioxidant potential and phenolic compounds of brown seaweeds *Turbinaria conoides* and *Turbinaria ornata* (class: Phaeophyceae). J. Aquat. Food. Prod. 1: 29-49.
- Davison, I. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. J. Phycol. 27: 2-8.
- De Wreede, R. (1976). The phenology of the three species of *Sargassum*. Phycologia. 15: 175-183.
- Duarte, M., Cardoso, M., Noseda, M. & Cerezo, A. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. Carbohydr. Res. 333: 281-293.
- Echavarría, A., Pagán, J. & Ibarz, A. (2016). Kinetics of color development in glucose/Amino Acid model systems at different temperatures. Scientia. Agropec. 7: 15-21.
- Edwards, P. (1970). Ilustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contr. Mar. 15:1-228.
- Eggert, A. (2012). Seaweed responses to temperature. In: Wiencke C, Bischof K (ed). Seaweed biology: novel insights into ecophysiology, ecology and utilization. Springer. pp 47-50.
- Egydio, A., Santa-Catarina, C., Floh, E. & Santos, D. (2013). Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. Ind. Crops. Prod. 45: 373-376.
- Endo, H., Suehiro, K., Kinoshita, J., Gao, X. & Agatsuma, Y. (2013). Combined effects of temperature and nutrient availability on growth and phlorotannins concentration of the brown alga *Sargassum patens* (Fucales; Phaeophyceae). Am. J. Plant. Sci. 4: 1-7.
- Ferreres, F., Lopes, G., Gil, A., Andrade, P., Sousa, C., Mouga, T. & Valentão, P. (2012). Phlorotannin extracts from fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches

to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. Mar. Drugs. 10: 2766-2781.

- Figueroa, F., Bonomi, J., Malta, E., Conde-Álvarez, R., Nitschke, U., Arenas, F., Matal, M., Connan, S., Abreu, M., Marquardt, R., Vaz-Pinto, F., Konotchick, T., Celis-Plá, P., Ordoñez, M., Ruiz, E., Flores, P., De los Ríos, J., Kirke, D., Chow, F., Nassar, C., Robledo, D., Pérez-Ruzafa, A., Bañares-España, E., Altamirano, M., Jiménez, C., Korbee, N., Bischof, K. & Stengel, D. (2014). Short-term effects of increasing CO₂, nitrate and temperature on three Mediterranean macroalgae: biochemical composition. Aquat. Biol. 22:177-193.
- Figueroa, F., Nygard, C., Ekelund, N. & Goméz, I. (2003). Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from Southern Spain. J. Photochem. Photobiol. B. 72: 35-44.
- Forde, B. & Lea, P. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. J. Exp. Bot. 58: 2339-2358.
- Gagné, J., Mann, K. & Chapman, A. (1982). Seasonal patterns of growth and storage in *Laminaria longicruris* in relation to differing patterns of availability of nitrogen and in the water. Mar. Biol. 69: 91-101.
- Gill, S. & Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant. Signal. Behav. 5: 26-33.
- Gómez, I. & Wiencke, C. (1998). Seasonal changes in C, N and major organic compounds and their significance to morpho-functional processes in the endemic Antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis*. Polar. Biol. 19: 115-124.
- Gosling, S., Dunn, R., Carrol, F., Christidis, N., Fullwood, J., Gusmao, D., Golding, N., Good, L., Hall, T., Kendon, L., Kennedy, J., Lewis, K., McCarthy, R., McSweeney, C., Morice, C., Parker, D., Perry, M., Stott, P., Willett, K., Allen, M., Arnell, N., Bernie, D., Betts, R., Bowerman, N., Brak, B., Caesar, J., Challinor, A., Dankers, R., Hewer, F., Huntingford, C., Jenkins, A., Klingaman, N., Lewis, K., Lloyd-Hughes, B., Lowe, J., McCarthy, R., Miller, J., Nicholls, R., Noguer, M., Otto, F., Lind, P. & Warrem, R. (2011). Climate: Observations, projections and impacts: Brazil. Met office. 147p.
- Hamilton, J., Zangeri, A., Delucia, E. & Berenbaum, M. (2001). The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. Ecol. Letters. 4: 86-95.
- Harb, T., Nardelli, A. & Chow, F. (2018). Physiological responses of *Pterocladiella capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales) under two light intensities. Photosynthetica. 56: 1-14.
- Hirsch, R., Hartung, W. & Gimmler, H. (1989). Abscisic acid content of algae under stress. Bot. Acta. 102: 326-334.
- INPE (2014) Instituto nacional de pesquisas espaciais. http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/historico/passo2.php

- Jassby, A. & Platt, T. (1976). Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 21: 540-547.
- Jeffrey, S. (1963). Purification and properties of chlorophyll *c* from *Sargassum flavicans*. J. Biochem. 86: 313-318.
- Ji. Y., Xu. Z., Zou. D. & Gao, K. (2016). Ecophysiological responses of marine macroalgae to climate change factors. J. Phycol. 5: 2953-2967.
- Joshi, V., Joung, J., Fei, Z. & Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. Amino Acids. 39: 933-947.
- Kokubu, S., Nishihara, G., Watanabe, Y., Tsuchiya, Y., Amamo, Y. & Terada, R. (2015). The effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of a native alga *Sargassum fusiforme* (Fucales) from Kagoshima, Japan. Phycologia. 54: 235-247.
- Kramer, D., Johnson, G., Kiirats, O. & Edwards, G. (2004). New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. Photosynth. Res. 79: 209-218.
- Latowski, D., Kuczynska. P. & Strzalka, K. (2011). Xanthophyll cycle: a mechanism protecting plants against oxidative stress. Redox. Rep. 16: 78-90.
- Lerdau, M. & Coley, P. (2000). Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. Oikos. 98: 534-536.
- Lewey, S. & Gorham, J. (1984). Pigment composition and photosynthesis in Sargassum muticum. Mar. Biol. 80: 109-115.
- Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce, R., Packer, L. (Eds.), Methods. Enzymol. pp. 350-382.
- Lichtenthaler, H. & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. Curr. Protoc. Food Anal. Chem. 1–8. F4.3.1-F4.
- Louda, J., Li, L., Liu, L., Winfree, N. & Baker, E. (1998). Chlorophyll-*a* degradation during cellular senescence and death. Org. Geochem. 29: 1233-1251.
- Lourenço, S., Barbarino. E., De-Paula, J., Otávio, L. & Lanfer, U. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. Phycol. Res. 50: 233-241.
- Mansilla, A., Rosenfeld, S., Rendoll, J., Murcia, S., Werlinger, C., Yokoya, N. & Terrados, J. (2014). Tolerance response of *Lessonia flavicans* from the sub-Antarctic ecoregion of Magallanes under controlled environmental conditions. J. Appl. Phycol. 26: 1971-1977.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N. & Muhammad, K. (2009). Nutrient content of tropical edible seaweeds *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. J. Appl. Phycol. 21: 75-80.
- Matsuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. & Lee, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Anal. Biochem. 339: 69-72.
- Mercadante, A. (2008). Carotenoids in foods: Sources and stability during processing and storage. In Socaciu C (ed) Food Colorants: Chemical and Functional Properties, CRC Press, New York, pp. 213-240.
- Mercado, J., Jiménez, C., Niell, F. & Figueroa, F. (1996). Comparison of methods for measuring light absorption by algae and their application to the estimation of package effect. Sci. Mar. 60: 39-45.
- Mikami, K. & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. Int. J. Mol. Sci. 14: 13763-13781.
- Myung, C., Shin, H., Bao, H., Yeo, S., Lee, B. & Kang. J. (2005). Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. Arch. Pharm. Res. 28: 691-698.
- Paula, E. & Oliveira-Filho, E. (1980). Phenology of two populations of *Sargassum cymosum* (Phaeophyta Fucales) of São Paulo State coast, Brazil. Boletim de Botânica. 8: 21-39.
- Piovan, A., Seraglia, R., Bresin, B., Caniato, R. & Filippini, R. (2013). Fucoxanthin from Undaria pinnatifida: photostability and coextractive effects. Molecules. 18: 6298-6310.
- Polo, L., Felix M, Kreusch, M., Pereira, D., Costa, G. Simioni, C., Martins, R., Latini, A., Floh, E., Chow, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z. & Schmid, E. (2014). Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. J. Appl. Phycol. 27: 887-899.
- Prud'homme van Reine, W. (2002) Sargassum Agardh. In Prud'homme van Reine, W. F. & Trono, G. C. [Ed.] Plant ressources of South-East, Asia. 15: 240-246.
- Ramos, M., Oliveira, A., Azevedo, R. & Carvalho, A. (1999). Aminoacid composition of some brazilian seaweed species. J. Food. Biochem. 24: 33-39.
- Ramus, J. & Rosenberg, G. (1980). Diurnal photosynthetic performance of seaweeds measured under natural conditions. Mar. Biol. 56: 21-28.
- Ritchie, R. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. Photosynthetica. 46: 115-126.
- Rosell, K. & Srivastava, L. (1985). Seasonal variations in total nitrogen, carbon and amino acids in *Macrocystis integrifolia* and *Nereocystis luetkeana* (Phaeophyta). J. Phycol. 21: 304-309.
- Rosenberg, G. & Ramus, J. (1982). Estratégias de crecimiento ecológico en *Gracilaria* (Rhodophyceae) y *Ulva* sp. (Chlorophyceae): nitrógeno soluble y reserva hidratos de carbono. Mar. Biol. 66: 251-259.

- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T., Viana, A., Estelita, M., Handro, W. & Floh, E. (2006). IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. Plant. Growth. Regul. 49: 237-247.
- Scherner F., Horta. P., Cabral de Oliveira, E., Simonassi, J., Hall-Spencer, J., Chow, F., Nunes, J. & Barreto, S. (2013). Coastal urbanization leads to remarkable seaweed species loss and community shifts along the SW Atlantic. Mar. Poll. Bull. 76: 106-115.
- Schofield, O., Evenes, T. & Millie, D. (1998). Photosystem II quantum yield and xanthophyllcycle pigments to the macroalga *Sargassum natans* (Phaeophyceae): responses under natural sunlight. J. Phycol. 34: 102-112.
- Schreiber, U. & Neubaer, C. (1990). O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Photosynth. Res. 25: 279-293.
- Staehr, P. & Wernberg, T. (2009). Physiological responses of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to a latitudinal gradient in ocean temperature. J. Phycol. 45: 91-99.
- Stengel, D., Conde-Álvarez, R., Connan, S., Nitschke, U., Arenas, F., Abreu, H., Bonomi, J., Chow, F., Robledo, D., Malta, E., Mata, M., Konotchick, T., Nassar, C., Pérez-Ruzafa, A., López, D., Marquardt, R., Vaz-Pinto, F., Celis-Plá, P., Hermoso, M., Ruiz, E., Ordoñez, G., Flores, P., Zanolla, M., Bañares-España, E., Altamirano, M., Korbee, N., Bischof, K. & Figueroa, F. (2014). Short-term effects of CO₂, nutrients and temperature on three marine macroalgae under solar radiation. Aquatic. Biol. 22:159-176.
- Stern, J., Hagerman, E., Steinberg, P. & Mason, P. (1996). Phlorotannin-protein interactions. J. Chem. Ecol. 22: 1877-1899.
- Széchy, M. & Paula, E. (2000). Padrões estruturais quantitativos de bancos de Sargassum (Phaeophyta - Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Bot. 23: 121-132.
- Turra, A., Cróquer, A., Carranza, A., Mansillas, A., Areces, A., Werlinger, C., Martínez-Bayón, C., Nassar, C., Plastino, E., Schwindt E., Scarabino, F., Chow, F., Figueroa F., Berchez, F., Hall-Spencer, H., Soto, L., Buckeridge, M., Copertino, M., Széchy, M., Pirani N., Horta, P., Coutinho, R., Fraschetti, S. & Margarida, Z. (2013). Global environmental changes: setting priorities for Latin American coastal habitats. Glob. Chang. Biol. 19: 1965-1969.
- Ursi, S. & Plastino, E. (2001) Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e marrom-esverdeada clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. Rev. Bras. Bot. 24:587-594.
- Wang, H., Qian, H. & Yao, W. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. Food. Chem. 128: 573-584.

- Widyartini, D., Widodo, P. & Susanto A. (2017). Thallus variation of *Sargassum polycystum* from Central Java, Indonesia. Biodiversitas. 18: 1004-1011.
- Wu, G. (2009). Aminoacids: metabolism, functions and nutrition. Aminoacids. 37: 1-17.
- Yip, W., Joe, L., Mustapha, W., Maskat, M. & Said, M. (2014). Characterization and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah. Sains. Malays. 43: 1345-1354.
- Yuan, C., Yang, S., Wang, Y. & Cui, K. (2014). Effect of temperature on the growth and biochemical composition of *Sargassum muticum*. Adv. Mat. Res. 989: 747-750.
- Zar, H. (1999). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. 663 p.



CAPÍTULO 2

Potencial antioxidante e identificação de substâncias fenólicas em *Sargassum stenophyllum* em resposta à variação de temperatura

2.1. Introdução

Dentre as algas pardas, a ordem Fucales inclui algumas das espécies de macroalgas mais comuns de ambientes temperados e subtropicais, sendo um dos mais representativos o *Sargassum* (Phillips, 1995). O gênero é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Paula, 1988), importante componente da flora marinha e constitui um recurso significativo na estruturação de comunidades marinhas, fornecendo abrigo, refúgio, alimento e local para recrutamento, desenvolvimento e reprodução para uma ampla diversidade de organismos marinhos (Széchy & Paula, 2000). Além da importância ecológica, espécies de *Sargassum* são comercializadas como fertilizantes (Wells *et al.*, 2017) e vários extratos mostram potencial terapêutico possibilitando novos ingredientes funcionais para o tratamento e prevenção de doenças (Yende *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2017). Outros usos potenciais derivam da ampla gama de substâncias, incluindo carotenoides (p. ex. fucoxantina), polissacarídeos sulfatados (p. ex. fucoidanos), substâncias fenólicas (p. ex. florotaninos), terpenoides (p. ex. ácido sargaquinoico), dentre outros (Oyesiku & Egunyomi, 2014; Yende *et al.*, 2014).

Os bancos de *Sargassum* ocorrem especialmente no mediolitoral inferior e infralitoral superior e estão constantemente expostos às bruscas oscilações de dessecação, radiação solar e temperatura, devido à flutuação das marés (Davison & Pearson, 1996). Assim como outras algas e plantas terrestres, *Sargassum* sob condições de estresse abiótico promovem a formação e acúmulo de espécies reativas, dentre eles os radicais livres, que propiciam danos oxidativos severos a diversos componentes celulares (p. ex. ácidos nucléicos, lipídeos e proteínas), gerando estresse oxidativo. Apesar dessas condições adversas, *Sargassum* raramente revela danos fotodinâmicos perceptíveis durante sua exposição ao ar, sugerindo a presença de eficientes mecanismos de defesa antioxidativos, os quais podem agir como sistema de prevenção, sequestro ou ainda como sistema de reparo de extresse oxidativo, favorecendo a reconstituição das estruturas biológicas prejudicadas (Clarkson & Thompson, 2000; Barbosa *et al.*, 2010).

A ativação de respostas antioxidantes é essencial para a manutenção do nível estadoestável das espécies reativas. Além de enzimas antioxidantes, compostos antioxidantes possuem um importante papel como linha de defesa de detoxificação desses radicais. A dinâmica dos mecanismos de defesa e a concentração dos antioxidantes variam de acordo com a espécie, a fase vegetativa ou reprodutiva do talo, a estação, a distribuição geográfica, dentre outras. Algas que ocorrem em ambientes altamente estressantes, comumente possuem maior potencial de síntese de antioxidantes, ou seja, substâncias que retardam ou prevêm processos de oxidação celular. Os florotaninos, ficoidanos sulfatados, fucoxantina, entre outros, são os principais antioxidantes de algas pardas (Lann *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014).

Connan *et al.* (2006a), a partir de estudos com *S. muticum*, reportaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e o acúmulo de conteúdo de substâncias fenólicas, além de variações quantitativas nas difentes porções do talo. Tem sido documentado para espécies de *Sargassum* um maior conteúdo de substâncias fenólicas na seção apical que o encontrado na parte basal (Rao & Untawale, 1991). Também foi reportado que a sazonalidade influencia os mecanismos antioxidativos, como referido por Pires (2016) analisando a atividade antioxidante de *S. vulgare* em duas estações do ano (seca e chuvosa), detectando maior acúmulo de substâncias fenólicas na época chuvosa em contraposição à época de seca; nesse estudo, os altos níveis de sequestro de radicais livres foram atribuídos à presença de polissacarídeos sulfatados.

As espécies de Sargassaceae são caracterizadas por apresentar fucoxantina como antioxidante com atividade sequestradora de radicais (Lann *et al.*, 2012). Segundo Yip *et al.* (2014), analisando a estabilidade de carotenoides em *S. binderi*, a fucoxantina permanece estável quando armazenada sob baixas temperaturas até temperatura ambiente (de 4 a 25 °C). No trabalho de Terasaki *et al.* (2017), estudando cinco espécies de algas pardas, incluindo *S. horneri* Agardh, foi evidenciado alto conteúdo de duas substâncias lipofílicas, fucoxantina e fucosterol durante os períodos de inverno e primavera, onde são apresentadas baixas condições de luz e temperatura. Assim como a fucoxantina, outros carotenoides contribuem com o sequestro de espécies reativas de oxigênio (Young, 1991), regulando condições de estresse oxidativo (Latowski *et al.*, 2011) e participando no ciclo das xantofilas (Mikami & Hosokawa, 2013).

Susanto *et al.* (2017) reportaram uma maior participação de carotenoides do que de substâncias fenólicas ao analisar a capacidade antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical DPPH em *S. ilicifolium* Agardh quando compararam diferentes métodos de processamento térmico (branqueamento, esterilização, ebulição e evaporação). Em condições de altas temperaturas, tem sido evidenciado que ocorre liberação de metabólitos pela matriz celular, tais como substâncias fenólicas e açúcares, os quais contribuem como mecanismo de proteção. Existem ainda, trabalhos que indicam a exsudação de substâncias fenólicas e, concomitantemente, redução da atividade antioxidante (Stengel *et al.*, 2011).

Dentre as substâncias fenólicas, encontram-se os florotaninos formados pela polimerização de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno), os quais podem estar presentes como: i) florotaninos solúveis localizados dentro dos fisoides no citoplasma e, ii) florotaninos insolúveis associados estruturalmente à parede celular (Koivikko *et al.*, 2005). A exsudação destas substâncias pode ser influenciada por processos morfológicos intrínsecos ou aclimatação

à sazonalidade com funções de bloqueador da radiação ultravioleta (UV) (Gómez & Huovinen, 2010). Estudos com *S. cymosum* detectaram a exsudação de substâncias fenólicas para a água após a exposição à radiação ultravioleta (Polo *et al.*, 2014), evidenciando a migração de fisoides contendo substâncias fenólicas através da parede celular.

Dessa forma, um aumento de florotaninos bem como altas taxas de exsudação de substâncias fenólicas têm sido apontadas como reflexo do potencial de aclimatação das algas às mudanças ambientais (Gómez & Huovinen, 2010; Abdala-Díaz *et al.*, 2014). É importante ressaltar que tanto nas condições ótimas de crescimento quanto sob estresse, as algas pardas podem exsudar substâncias fenólicas na água do mar, tornando-se importante componente da matéria orgânica dissolvida (Mannino *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos pelo qual é regulada a exsudação de substâncias fenólicas ainda permanecem pouco conhecidos.

Sargassum spp. representam importantes fontes naturais de antioxidantes com diferentes propriedades biológicas e potencial para utilização comercial (Lim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Yende *et al.*, 2014), além de constituirem importantes estruturadores de comunidades fitais e de fauna associada (Leite & Turra, 2003). Considerando o potencial de *Sargassum* como bens e serviços ecossistêmicos e as previsões de mudanças climáticas globais e aquecimento global, estudos em laboratório do efeito da temperatura podem auxiliar na elucidação e compreensão dos mecanismos subjacentes à sobrevivência desta alga, mediados pela sua capacidade antioxidante, assim como da variabilidade na sua composição química frente ao estresse oxidativo gerado pelas flutuações de temperatura. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a variação da atividade antioxidante de *Sargassum stenophyllum* sob diferentes temperaturas e correlacioná-la com carotenoides e substâncias fenólicas.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material de estudo e delineamento experimental

A coleta de *S. stenophyllum* foi realizada em novembro de 2014 na Praia de Cibratel 1 (24°13'31''S e 46°51'7''W), no Município de Itanhaém (ver detalhes no item M.1 de Materiais e Métodos Gerais). O material triado e limpo foi aclimatado por sete dias nas condições descritas no item M.3 de Materiais e Métodos Gerais. Após aclimatação, as algas foram submetidas aos diferentes tratamentos de temperatura (15, 20, 25 (controle), 30 e 35 °C).

As atividades antioxidantes foram analisadas antes de começar o experimento (Inicial) e sete dias após as algas serem submetidas aos tratamentos de temperatura. Na literatura, alguns resultados de potencial antioxidante são expressos em massa seca, portanto, a fim de possibilitar a comparação deste estudo com os valores das atividades antioxidantes reportados na literatura, foi considerado 17% como fator de conversão da massa fresca (MF) para massa seca (MS). Adicionalmente, a fim de relacionar possíveis substâncias de defesa em resposta às condições

de temperatura, foram analisados os perfis de carotenoides e de substâncias fenólicas em amostras submetidas nos diferentes tratamentos, seguindo os procedimentos descritos a seguir.

2.2.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada a partir de amostras de 200 mg MF, trituradas em nitrogênio líquido e extraídas em 1 mL de metanol por 3 h a temperatura ambiente. Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi recolhido em um microtubo (extrato algáceo) e armazenado sob -80 °C, protegido da luz até sua análise. Todos os ensaios antioxidantes correspondem a reações colorimétricas, na qual as absorbâncias foram lidas utilizando um espectrofotômetro de microplacas de 96 poços UV-visível (Epoch, Biotek, EUA).

A atividade antioxidante foi avaliada mediante cinco ensaios. Para cada ensaio antioxidante foram avaliados quatro ou cinco concentrações de extrato algáceo, dependendo do caso. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante (%), equivalente de ácido gálico (µg.mL⁻¹) e EC50 (concentração efetiva para alcançar 50% da atividade antioxidante; mg.mL⁻¹). O EC50 foi calculado fazendo uso do programa GraphPad Prism v. 6.01, com ajuste sigmoidal de dose-resposta (Chen *et al.*, 2013).

2.2.2.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

O ensaio da atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado segundo o método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) e adaptado por Pires *et al.* (2017a). A solução do radical DPPH (80 μ M; Sigma-Aldrich, Brasil) foi preparada em metanol, sonicado por 10 min, com a absorbância verificada em espectrofotômetro de microplaca UV-vis para obter um valor em torno de 1. A mistura da reação foi feita em microplaca de 96 poços para alcançar as concentrações finais de extrato algáceo de 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL⁻¹. Após incubar a mistura de reação sob agitação constante por 20 min, a leitura da absorbância foi realizada a 515 nm. A curva padrão foi elaborada com ácido gálico (Sigma-Aldrich, Brasil; 0,5 - 3 μ g.mL⁻¹; y = -0,2483x + 0,8207; R² = 0,9889).

2.2.2.2. Atividade de captura do radical ABTS

O ensaio da atividade de captura do radical ABTS (2,2–azinobis (3-etilbenzotiazolina-6ácido sulfônico)) foi realizado segundo Torres *et al.* (2017), adaptado de Rufino & Alves (2007) e Yang *et al.* (2011). A solução do radical ABTS (Sigma-Aldrich, Brasil) foi preparada misturando 1 mL da solução aquosa de ABTS 7,46 mM com 17,6 μ L de persulfato de potássio 140 μ M, deixando 16 h reagindo no escuro antes do uso. Após isso, a solução do radical ABTS foi diluída em metanol na proporção 1:55 atingindo uma absorbância em torno de 1 em 734 nm. A mistura de reação foi feita em microplaca de 96 poços para alcançar concentrações finais de extrato algáceo de 1, 2, 4 e 8 mg.mL⁻¹. A mistura de reação ficou incubada por 20 min a temperatura ambiente e, posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância a 734 nm. O ácido gálico foi utilizado para preparar a curva padrão (0,5 - 2 μ g.mL⁻¹; y = -0,5421x + 1,0693; R² = 0,9749).

2.2.2.3. Atividade quelante de metais

O ensaio da atividade quelante de metais foi realizado segundo Harb *et al.* (2016), modificado de Min *et al.* (2011). A mistura de reação foi preparada em microplaca de 96 poços para alcançar concentrações finais de extrato algáceo de 1, 2, 4 e 8 mg.mL⁻¹. Após 5 min de reação, foram adicionados 15 μ L da solução de ferrozine 6,1 mM, sendo incubada por 10 min com agitação de 100 rpm e a leitura da absorbância realizada a 562 nm. Curva padrão de ácido gálico (3 - 9 μ g.mL⁻¹; y = -0,0534x + 0,8107; R² = 0,9868) foi utilizada como curva de calibração.

2.2.2.4. Atividade de redução de ferro

O ensaio da atividade antioxidante de redução do íon ferro (FRAP) foi realizado segundo Urrea-Victoria *et al.* (2016) e adaptado de Brito *et al.* (2006). A solução reativa de FRAP foi feita da mistura de 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M, 5 mL da solução TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-*s*-triazina) e 5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, homogeneizada e mantida a temperatura ambiente. A mistura de reação foi preparada em microplaca de 96 poços para alcançar concentrações finais de extrato algáceo de 6, 8, 10, 12 e 13,3 mg.mL⁻¹. A mistura de reação ficou incubada por 30 min a 37 °C e, posteriormente, a leitura da absorbância feita a 595 nm. O ácido gálico foi utilizado para preparar a curva padrão $(0,5 - 4,5 \ \mu g.mL^{-1}; \ y = 0,4416x; \ R^2 = 0,9961).$

2.2.2.5. Substâncias fenólicas ou capacidade redutora

O ensaio pelo reagente do Folin-Ciocalteu é comumente utilizado para quantificar o teor de substâncias fenólicas, mas também detecta substâncias redutoras. Esse ensaio foi realizado segundo Pires *et al.* (2017b), modificado de Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1994). A mistura de reação foi preparada em microplaca de 96 poços para atingir concentrações finais de extrato algáceo de 1, 2, 4 e 8 mg.mL⁻¹. A mistura de reação ficou incubada por 30 min e, posteriormente, foram realizadas leituras da absorbância a 760 nm. Curva padrão de ácido gálico (3 - 12 μ g.mL⁻¹; y = 0,1000x; R² = 0,9941) foi utilizada como calibração.

2.2.2.6. Índice de capacidade antioxidante total

O índice de capacidade antioxidante total (ICAT) foi calculado baseado em Seeram *et al.* (2008), atribuindo um mesmo peso para cada ensaio, designando o valor de 100 para o maior

nível de atividade e calculado pela divisão entre o escore da amostra e o melhor escore, multiplicado por 100. O ICAT foi estimado para cada ensaio considerando todos os tratamentos e para cada temperatura considerando a estimativa de todos os ensaios.

2.2.3. Quantificação e identificação de carotenoides

Uma análise preliminar da composição de carotenoides foi realizada com os extratos tamponados e metanólicos das diferentes temperaturas obtidos da extração de pigmentos fotossintetizantes descritos no item 1.2.3 do Capítulo I. Após essa avaliação, foi evidenciada a degradação dos carotenoides (ver detalhes no item A.2 de Anexos), portanto, não foi possível estimar o perfil de carotenoides para cada tratamento. Em substituição, foi possível apenas caracterizar o perfil de carotenoides de amostras provenientes de campo, e comparada com a amostra controle (25 °C), a fim de conhecer quais possíveis carotenoides poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante.

Para tal, o perfil de carotenoides foi avaliado a partir de material processado mediante dois métodos de extração, cada uma com três repetições. Um primeiro grupo de amostras de 70 mg MF foi triturado em nitrogênio líquido e extraído com 1 mL de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 5,5). Após centrifugação a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C, o precipitado foi ressuspendido em 1,5 mL de metanol e extraído por 3 horas, obtendo-se o extrato tamponadometanólico. Um segundo grupo de amostras de 70 mg MF foi extraído diretamente em 1,5 mL de metanol durante 3 horas, obtendo-se o extrato metanólico. Os extratos tamponadometanólico e metanólico foram liofilizados, ressuspendidos em metanol grau cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na concentração de 5 mg.mL⁻¹ MS e analisados mediante a técnica de CLAE (Agilent 1260 Infinity LC; Agilent Technologies, EUA) utilizando uma coluna de fase reversa (Ultracarb ODS C30, Phenomenex, EUA; 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), seguindo o método de Torres et al. (2014) e volume de injeção de 30 μ L. Os cromatogramas foram estudados e processados em $\lambda = 450$ nm. A identificação foi feita através da comparação com padrões de carotenoides comerciais: β -caroteno (Sigma-Aldrich, EUA), fucoxantina (CaroteNature, Suiça), violaxantina (CaroteNature, Suiça) e zeaxantina (CaroteNature, Suiça). A quantificação de carotenoides considerou a área sob a curva, calculando-se a sua porcentagem. As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) em colaboração com a Dra. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos.

2.2.4. Quantificação e identificação de substâncias fenólicas

A quantificação de substâncias fenólicas foi avaliada a partir de amostras de 165 mg MF, com cinco réplicas para cada tratamento, trituradas em nitrogênio líquido e extraído em 1 mL de água ultrapura durante 3 h a 70 °C. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a

12.000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente e o sobrenadante liofilizado e ressuspendido em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% na concentração de 5 mg.mL⁻¹ MS. As amostras foram analisadas mediante CLAE utilizando uma coluna de fase normal (Zorbax Eclipse Plus C18, Agilent Technologies, EUA; 150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm). O gradiente da fase móvel utilizado constituiu-se de ácido acético 0,1% em água ultrapura (A) e acetonitrila (B) com a seguinte programação: 10% B por 10 min, seguido de 25% B por 10 min, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹; e 100% B por 20 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹; temperatura da coluna ajustado a 45 °C; e volume de injeção de 10 µL. Os cromatogramas foram processados em λ = 270 nm. A quantificação foi feita com curva de calibração com o padrão floroglucinol (Sigma-Aldrich, EUA; 2,5 - 1000 µg.mL⁻¹; y = 6,553x; R² = 0,9988). As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do IB-USP em colaboração com a Dra. Cláudia Maria Furlan.

A identificação das substâncias fenólicas foi realizada mediante avaliação da fragmentação de moléculas pela análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) em modo negativo, mantendo as mesmas condições de programação descritas anteriormente. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

2.2.5. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados com cinco repetições. Os dados das atividades antioxidantes e do teor de substâncias fenólicas foram analisados por ANOVA unifatorial, prévia avaliação de normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade com o teste de Bartlett, utilizando o programa Statistica v. 12 (p < 0,05). Tendo diferenças significativas verificadas, foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Adicionalmente, para identificar padrões de agrupamento entre os dados dos ensaios antioxidantes foi feita a PCA utilizando o programa Past v.2.17c.

2.3. Resultados

2.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de *S. stenophyllum* sob diferentes temperaturas foi avaliada mediante cinco ensaios e em diferentes concentrações de extrato amostral, e expresso em porcentagem de atividade antioxidante e atividade equivalente ao ácido gálico (Fig. 2.1). A atividade antioxidante mediante o ensaio de DPPH (Fig. 2.1A) apresentou níveis acima de 70% para algas cultivadas de 15 a 30 °C, em todas as concentrações de extrato algáceo. Algas sob os 35 °C mostraram potencial antioxidante reduzido, abaixo de 25%. Os extratos mostraram saturação do ensaio DPPH (valores próximos a 100%) a partir de concentrações de 8 ou 10 mg.mL⁻¹ de extrato algáceo. A atividade antioxidante pelo método do ABTS (Fig. 2.1B)

mostrou resposta dose-dependente nas concentrações de extrato testadas nos tratamentos de 15 a 30 °C, variando de 30% até 100%. Já os níveis antioxidantes pelo ensaio de ABTS sob 35 °C não exibiu diferenças significativas, tendo atividade abaixo de 40%. A ação quelante dos extratos das algas (Fig. 2.C) foram menores que 50%, não apresentando diferenças estatísticas entre as concentrações de extrato. O ensaio antioxidante pelo método de FRAP (Fig. 2.1D) evidenciou potencial antioxidante dose-dependente para os tratamentos de 15 a 30 °C, variando de 40 a 120%. Extratos de amostras cultivadas em 35 °C tiveram níveis antioxidantes menores que 25% e não foram diferentes estatísticamente. A porcentagem de substâncias fenólicas, mensuradas pelo método do Folin-Ciocalteu (Fig. 2.1E), aumentou sob maiores concentrações de extrato. O maior teor de substâncias fenólicas foi observado sob 35 °C, com potencial antioxidante acima de 160%.



Figura 2.1. Atividades antioxidantes de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento, expresso em porcentagem e equivalente de ácido gálico (μ g.mL⁻¹) nos ensaios de (A) atividade sequestradora do radical DPPH; (B) atividade de captura do radical ABTS; (C) atividade quelante de metais; (D) atividade redutora do íon ferro, FRAP e (E) substâncias fenólicas e capacidade redutora pelo Folin-Ciocalteu. Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

A partir das respostas dose-dependência do potencial antioxidante foram calculados os valores de EC50 para cada tratamento nos diferentes ensaios antioxidantes (Tabela 2.1). No ensaio de DPPH, os índices de EC50 não mostraram diferenças significativas, tendo valor médio de 4,57 mg.mL⁻¹. Para o ensaio de ABTS, o extrato de algas sob 15 °C mostrou o menor valor de EC50 ($0,88 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$), mas foi estatisticamente diferente apenas com o do tratamento de 30 °C. As atividades dos extratos estimadas no ensaio de quelante de metais foram menores do que 50%, portanto, não foram calculados os índices de EC50. Os valores de EC50 para o ensaio de FRAP não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos, apresentando valor médio de 6,18 mg.mL⁻¹. No ensaio do Folin-Ciocalteu para substâncias fenólicas, menores valores significativos foram observados nos tratamentos de 15 e 35 °C, enquanto os outros tratamentos apresentaram valores de EC50 estatisticamente semelhantes.

Tabela 2.1. Valores de EC50 para os ensaios de atividade antioxidante de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento. O valor do EC50 para o padrão ácido gálico também foi calculado. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5) e as letras, representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05), considerando o mesmo tipo de ensaio.

Temperatura	EC50 (mg.mL ⁻¹)									
(°C)	DPPH	ABTS	Quelante de metais	FRAP	Fenólicos					
Inicial	4,23 ± 4,10 a	$1,45 \pm 0,55$ ab	n.d.	6,16 ± 0,61 a	2,70 ± 0,08 a					
15	$4,62 \pm 0,33$ a	$0,88 \pm 0,23$ b	n.d.	$5,79 \pm 0,08$ a	$1,\!87\pm0,\!07~\mathrm{b}$					
20	$4,68 \pm 0,06$ a	$1,45 \pm 0,26$ ab	n.d.	$5,97 \pm 0,28$ a	3,09 ± 0,39 a					
25	$4,79 \pm 0,50$ a	$1,30 \pm 0,04$ ab	n.d.	$5,91 \pm 0,54$ a	$2,90 \pm 0,56$ a					
30	$4,55 \pm 1,08$ a	$1,68 \pm 0,20$ a	n.d.	$7,08 \pm 1,03$ a	$2,99 \pm 0,41$ a					
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$1,36 \pm 0,11$ b					
Ácido gálico	0,00168	0,00048	0,00762	0,00305	0,00662					
		-								

n.d. As porcentagens de atividade foram menores que 50%, portanto, não foi possível calcular o EC50.

De forma complementar, foram calculados os índices de capacidade antioxidante total (ICAT) para cada ensaio antioxidante e registrados na Tabela 2.2. Os índices indicam maior ICAT para temperatura no tratamento de 15 °C, seguido de 25 °C > Inicial = 20 °C > 30 °C > 35 °C. Em termos dos valores de ICAT para o ensaio, o DPPH foi mais sensível na estimativa da ação antioxidante, seguido por ABTS > quelante de metais > FRAP > fenólicos.

Temperatura	Índice	Índice	Índice	Índice	Índice	ICAT para a
(°C)	DPPH	ABTS	quelante	FRAP	Fenólicos	temperatura
Inicial	95,22	90,01	83,56	87,76	54,86	82,28
15	100	100	76,71	100	74,85	90,31
20	98,08	87,97	94,30	82,95	50,58	82,78
25	94,24	95,02	100	83,80	54,55	85,52
30	93,33	81,93	75,81	48,91	53,77	70,75
35	22,80	35,32	66,79	23,31	100	49,65
ICAT para o ensaio	83,94	81,71	82,86	71,12	64,77	

Tabela 2.2. Índices antioxidantes para cada ensaio antioxidante de amostras de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes temperaturas. O ICAT foi estimado como a somatória dos índices para cada temperatura e como a somatória dos índices para cada ensaio.

O agrupamento dos resultados de atividade antioxidante nas diferentes temperaturas foi avaliado mediante análise de PCA (Fig. 2.2). A componente principal 1 representou 92,18% da variação dos dados e a componente principal 2 mostrou 7,35%. Houve a formação de dois agrupamentos: (I) amostras do período Inicial, 15 °C, 20 °C, 25 °C, e 30 °C e (II) alta temperatura extrema a 35 °C.



Figura 2.2. Representação biplot da análise de PCA da atividade antioxidante de *Sargassum stenophyllum* no período Inicial e após sete dias submetido a diferentes temperaturas.

2.3.2. Quantificação e identificação de carotenoides

Os cromatogramas e a identificação de carotenoides da amostra controle (25 °C) e das amostras provenientes de campo (extrato tamponado-metanólico e extrato metanólico) estão apresentados na Figura 2.3 e na Tabela 2.3. A amostra controle apresentou apenas presença de dois picos, um no tempo de retenção (tR) 3,67 min e outro no tR 28,4 min (Fig. 2.3A), os que foram identificados como fucoxantina e derivado clorofílico, respectivamentre (Tabela 2.3). A ausência de clorofila *a* na amostra controle, verificado no tR 17,22 min (Tabela 2.3), evidencia a degradação dos carotenoides na amostra experimental. As demais amostras do experimento de temperatura também apresentaram o mesmo perfil (dados não mostrados), por esse motivo, os cromatogramas não foram subsequentemente analisados.

A fim de descrever a composição de carotenoides na espécie, o qual poderia indicar quais possíveis carotenoides seriam os responsáveis pela ação antioxidante, o perfil foi analisado em extratos tamponado-metanólico e metanólico. Os extratos tamponado-metanólico e metanólico mostraram composição semelhante nos cromatogramas (Fig. 2.3B e 2.3C, respectivamente), exceto para os picos com tR 4,87 min, 19,25 min e 28,44 min, identificados como fucoxantinol e derivados clorofílicos, respectivamente (Tabela 2.3). O extrato tamponado-metanólico apresentou fucoxantinol e derivado clorofílico 2, enquanto o extrato metanólico apresentou violaxantina e derivado clorofílico 1. Além desses pigmentos, também foi possível identificar zeaxantina (tR 6,94 min) e β -caroteno (tR 34,66 min) (Tabela 2.3).

As magnitudes dos picos detectados nos cromatogramas evidenciaram diferenças substanciais entre o extrato tamponado-metanólico (magnitude em torno de 2000 mAU; Fig. 2.3B) e o extrato metanólico (magnitude em torno de 700 mAU; Fig. 2.3C).

A quantificação de carotenoides de *S. stenophyllum* presentes em amostras de extrato tamponado-metanólico e de extrato metanólico foi calculada em porcentagem a fim de comparar sua composição e teor relativo com outros estudos com algas pardas, considerando a somatória total como 100% de carotenoides (Tabela 2.4). A tabela mostra a presença quase unânime de β -caroteno, fucoxantinol, violaxantina e zeaxantina como os carotenoides maioritários. Porém, existem outros carotenoides como ε -caroteno, diatoxantina, luteoxantina e neoxantina minoritários.



Figura 2.3. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de carotenoides e outros pigmentos de *Sargassum stenophyllum* ($\lambda = 450$ nm) de (A) amostra controle, (B) amostra de campo - extrato tamponado-metanólico e (C) amostra de campo - extrato metanólico.

Tabela 2.3. Composição de carotenoides e outros pigmentos de *Sargassum stenophyllum* identificados por CLAE-DAD ($\lambda = 450$ nm) para amostras controle dos extratos tamponadometanólico e metanólico. tR = tempo de retenção e λ máx = comprimento de onda máximo. Os valores em cinza indicam a absorção na faixa UV.

tR (min)		λmáx	x (nm)		Identificação	Controle	Extrato tamponado- metanólico	Extrato Metanólico
3,67	266	428	448	468	Fucoxantina	Х	Х	Х
4,87	268	332	400	440	Fucoxantinol		Х	
4,82	252	398	422	448	Violaxantina			Х
6,94	274	426	450	478	Zeaxantina		Х	Х
17,22	262	382	416	434	Clorofila a		Х	Х
19,25	262	338	384	432	Derivado clorofílico 1			Х
28,44	276	324	504	536	Derivado clorofílico 2	Х	Х	
34,66	270	428	452	480	β-caroteno		Х	Х

Espécie	β-Caroteno	γ-Caroteno	ɛ-Caroteno	Anteraxantina	β-Cryptoxantina	Diatoxantina	Fucoxantinol	Fucoxantina	Latoxantina	Luteoxantina	Mactraxantina	Neocrome	Neoxantina	Violaxantina	Zeaxantina	Referência
Ascophyllum nodosum Jolis	10,7						0,3	77,0	8	8,0	C),2	0,2	3,0	0,6	Haugan & Liaaen-Jensen (1994)*
Carpophyllum angustifolium Agardh	38,2			10,3			11,8							15,5	24,2	Czeczuga & Taylor (1987)
Carpophyllum maschalocarpum Greville	15,0		12,0			22,2	3,8	18,8						7,6	20,6	Czeczuga & Taylor (1987)
Carpophyllum plumosum Agardh	14,6		10,3			24,9		25,3						16,8	8,1	Czeczuga & Taylor (1987)
Cystophora torulosa Agardh	33,2		5,0				6,0	14,4							41,4	Czeczuga & Taylor (1987)
Cystophora retroflexa Agardh	15,8	10,2	15,0			24,8		9,7							24,5	Czeczuga & Taylor (1987)
Ecklonia radiata Agardh	28,8		15,3			4,2	24,1							27,6		Czeczuga & Taylor (1987) Haugan &
Fucus serratus Linnaeus	5,9						0,4	45,8	2	5,5	C),4	0,4	21,6		Liaaen-Jensen (1994)*
Fucus vesiculosus Linnaeus	4,3						0,3	80,2	1	0,0	C),6	0,3	4,3	0,1	Haugan & Liaaen-Jensen (1994)* Haugan
Laminaria digitata Lamouroux	5,1			0,9	0,4		0,1	87,6	0,3	0,6	0,1	0,4	0,1	3,8	0,5	&Liaaen- Jensen (1994)*

Tabela 2.4. Perfil quantitativo (%) de carotenoides identificados nos extrato	s de <i>Sargassum</i>	<i>i stenophyllum</i> e er	n algumas	espécies o	de algas pardas.
---	-----------------------	----------------------------	-----------	------------	------------------

Continuação da Tabela 2.4.

Sargassum stenophyllum (extrato metanólico)	3,22			91,78			3,51	1,49	Presente estudo
<i>Sargassum stenophyllum</i> (extrato tamponado- metanólico)	4,29		3,75	89,96				2,00	Presente estudo
Sargassum sinclaira Batters	65,5	7,4	5,5	6,3		3,6		11,7	Czeczuga & Taylor (1987)
Saccorhiza polyschides				96,1			1,8	2,1	Fernandes <i>et al.</i> (2016)*
<i>Saccharina latissima</i> Lane, Mayes, Druehl & Saunders				95,2			4,8		Fernandes <i>et al.</i> (2016)*
& Thuret	16,0		0,2	42,0	6,0	0,7	34,0	1,0	Liaaen-Jensen (1994)
Polyotia canaliculata Decoisne									Haugan &
Laminaria ochroleuca Pylaie	1,6			71,7			3,0	23,7	Fernandes <i>et al.</i> (2016)*

* Os dados de Haugan & Liaaen -Jensen (1994) e Fernandes et al. (2016) foram padronizados para 100%.

2.3.3. Quantificação e identificação de substâncias fenólicas

Amostras de *S. stenophyllum* no período Inicial e submetidas às diferentes temperaturas foram analisadas por CLAE-DAD para avaliar a composição e teor de substâncias fenólicas. Os cromatogramas dos tratamentos Inicial, 15, 20 e 25 °C apresentaram a mesma composição, assim como os dos tratamentos 30 e 35 °C, portanto, são apresentados apenas dois cromatogramas representativos, o do tratamento Inicial (Fig. 2.4A) e do tratamento de 35 °C (Fig. 2.4B). Nos tratamentos Inicial, 15, 20 e 25 °C foram identificados três picos (Fig. 2. 4A), enquanto que nos tratamentos 30 e 35 °C foram identificados 15 picos (Fig. 2.4B). Esses picos tiveram bandas de absorção máxima entre 250 e 270 nm (Fig. 2.5), e na Tabela 2.5 é reportada a sua presença nos diferentes tratamentos.

Os 15 picos observados nos cromatogramas de *S. stenophyllum* foram quantificados e comparados entre os tratamentos (Fig. 2.6). Os picos 1, 2 e 4 foram presentes em todos os tratamentos, apresentando diferenças significativas entre eles. No pico 1, valores menores foram observados nos tratamentos de 15, 20 e 25 °C. No pico 2, maiores concentrações foram evidenciadas nos tratamentos de 25 e 30 °C. O pico 4 foi relativamente semelhante entre os tratamentos, com menor concentração no tratamento de 20 °C. Os picos 3, 6, 7, 8, 10, 13 e 15 foram observados apenas nos tratamentos de 30 e 35 °C, com maiores concentrações observados em 35 °C. Os picos 5, 9, 11, 12 e 14 estiveram presentes no tratamento de 35 °C.

As substâncias fenólicas da espécie de estudo pode estar relacionada com taninos, flavonoides e ácidos fenólicos conforme a literatura para algas pardas (Tabela 2.6), tais como, *Sargassum virgatum* Agardh (Ghareib, 2010); *Cystoseira nodicaulis* Roberts, *C. tamariscifolia* Papenfuss, *C. usneoides* Roberts e *Fucus spiralis* Linnaeus (Ferreres *et al.*, 2012); *Fucus serratus* Linnaeus, *F. spiralis*, *Sargassum muticum* e *Laminaria digitata* (Farvin & Jacobsen, 2013); *Hizikia fusiformis* (*Sargassum fusiformis*) Okamura (Machu *et al.*, 2015); e *Turbinaria conoides* Kützing e *T. ornata* Agardh (Chakraborty & Joseph, 2016).



Figura 2.4. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para substâncias fenólicas de *Sargassum stenophyllum* ($\lambda = 270$) de amostras do tratamento (A) Inicial, (B) 35 °C, com ampliação do cromatogramana indicando os 15 picos identificados.

Tabela 2.5. Composição de substâncias fenólicas de Sargassum stenophyllum identificados por
CLAE-DAD (λ = 270 nm) para amostras nas diferentes temperaturas. tR = tempo de retenção e
λ máx = comprimento de onda máximo.

# Dico	tR	λm	náx		Τe	emperatura (°	C)	
# 1100	(min)	(n	m)	15	20	25	30	35
1	2,4	262		Х	Х	Х	Х	Х
2	2,7	262		Х	Х	Х	Х	Х
3	3,7	262					Х	Х
4	4,2	264		Х	Х	Х	Х	Х
5	4,5	250					X	Х
6	5,0	266					Х	Х
7	5,7	260					Х	Х
8	5,9	258					X	Х
9	6,7	260						Х
10	7,1	250	276				Х	Х
11	7,8	250	272					Х
12	7,9	252	274					Х
13	8,4	258					Х	Х
14	8,6	258						Х
15	9,2	266					Х	Х



Figura 2.5. Espectros de absorção em UV processados em $\lambda = 270$ de *Sargassum stenophyllum* dos 15 picos.

Sut	stâncias fenóli	icas em algas nardas	Referência da identificação	Con	nprime	ento
Sut	stancias ienon	icas em argas partias	Referencia da identificação	de o	nda (1	nm)
	Taninos	Catequina	Chakraborty & Joseph (2016)		277	
	condensados	Enicatequina	Machu et al. (2015)		277	
	condensados	Epicatequina	Chakraborty & Joseph (2016)			
		Dieckol	Ferreres et al. (2012)	225		
		DICCKOI	Myung <i>et al.</i> (2005)			
SO		Florofucofuroeckol	Ferreres et al. (2012)	227		
nin		Погогасогатосског	Myung <i>et al.</i> (2005)			
T_{∂}	Florotaninos	Floreglucinol	Shibata <i>et al.</i> (2002)		266	
	Florotaminos	Piorograciiioi	Hasan <i>et al.</i> (2013)		200	
		Fucodifloroetol	Ferreres et al. (2012)			
		Fucofloroetol	Ferreres et al. (2012)			
		Fucotrifloroetol	Ferreres et al. (2012)			
		7-floroeckol	Ferreres et al. (2012)			
		Quercetina	Chakraborty & Joseph (2016)			
		Miricetina	López et al. (2011)			
ides	Flavonol	Manina	Yoshie-Stark et al. (2003)		265	207
ouo		Morina	Bark <i>et al.</i> (2013)		203	201
lav		Rutina	López et al. (2011)			
Щ	Flavanona	Apigenina	Abirami & Kowsalya (2016)	210	240	370
		Hesperidina	Yoshie-Stark et al. (2003)			
		Ácido cafeico	Chakraborty & Joseph (2016)	220		325
		Ácido cinâmico	Ghareib (2010)	220	280	
		Ácido clorogênico	Chakraborty & Joseph (2016)		240	320
		Á aida aumárica	Ghareib (2010)	220		210
	S	Acido cumarico	Chakraborty & Joseph (2016)	250		510
	lico	Á .: 1. C: 11	Ghareib (2010)		240	215
	enól	Acido ferunco	Chakraborty & Joseph (2016)		240	315
	os fi		Ghareib (2010)			
	cido	Á .: 1 (1:	Farvin & Jacobsen (2013)	220	070	
	Á	Acido galico	Machu et al. (2015)	230	212	
			Chakraborty & Joseph (2016)			
		Ácido salicílico	Chakraborty & Joseph (2016)			
		Ácido siríngico	Chakraborty & Joseph (2016)		272	
		Ácido valínico	Ghareib (2010)		271	

Tabela 2.6. Compilação de estudos sobre identificação de substâncias fenólicas em espécies de algas pardas, com as respectivas bandas de absorção máxima.



Figura 2.6. Quantificação dos 15 picos obtidos por CLAE para substâncias fenólicas de *Sargassum stenophyllum* para amostras antes do período experimental (Inicial) e após sete dias sob as diferentes temperaturas. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05), considerando a comparação dentro de cada pico independentemente.

A identificação das substâncias detectadas nos cromatogramas por CLAE-DAD foram analisadas pela técnica de ESI-MS em modo negativo. Para tal, foram selecionadas duas amostras representativas, sendo elas os tratamentos Inicial e 35 °C. Desafortunadamente, devido a problemas procedimentais na Central Analítica do IQ-USP em relação à corrida do sistema e às análises das amostras, os resultados de CLAE-DAD e CLAE/ESI-MS não tiveram correspondência nos seus tempos de retenção, pelo qual impossibilitou a identitifcação dos mesmos. No entanto, são apresentados os dados como forma de caracterização da possível composição.

Nas análises de CLAE/ESI-MS foram detectados 10 picos, dos quais apenas seis deles foram possíveis de sugerir a sua identificação hipotética de classe química ou fórmula molecular (Tabela 2.7), mediante comparação com informações disponíveis na literatura para espécies de algas pardas (Tabela 2.8).

Tempo de retenção (min)	[M - H]	MS2		Íons pr	Classe química ou fórmula sugerida		
2,6	329,0210	143,0202	187,0095	457,0160	599,0268	743,0000	Floroetol (Eckol)
2,8	260,8735	196,9600	127,0013	282,9487	342,8765		n.i.
2,9	268,8019	196,9220	560,5924	502,6338	326,7606	794,4241	n.i.
3,2	204,9812	125,0243	141,9653	322,8938	490,9260	410,9692	Floroetol (C ₁₂ H ₁₂ O ₈)
3,6	203,9741	125,0230	141,9657	322,8947	476,9654		Floroetol (C ₁₂ H ₁₂ O ₈)

Tabela 2.7. Tempos de retenção, íon quase molecular [M - H], fragmentos (MS2) e composto fenólico sugerido após as análises em CLAE/ESI-MS de *Sargassum stenophyllum*.

Continuação da Tabela 2.7.

 3,9	203,9746	124,0164	141,9661	322,8953	501,9808	756,4590	Floroetol (C ₁₂ H ₁₂ O ₈)
 4,2	204,9825	125,0251	284,9389				n.i.
 4,5	277,0936	197,0654	185,0456	322,8941	395,0658	112,9656	n.i.
 4,9	246,9919	108,0215	141,9653	284,9396	494,9899		Floroetol (Eckol)
 8,1	230,9976	107,0504					Dímero de C ₁₂ H ₈ O ₅

n.i. não identificado

Tabela 2.8. Compilação de estudos em algas pardas de florotaninos identificados em CLAE/ESI-MS em modo negativo [M - H] e positivo [M + H].

	MS2		S2 Identificação		Espécie	Referência
[M - H]						
247	203			Dímero de floroglucinol	Ascophyllum nodosum	Nwosu et al. (2011)
249	181	113		Difloretol	A. nodosum	Corona <i>et al.</i> (2016)
249	181	113		Difucol	A. nodosum	Corona <i>et al.</i> (2016)
387	369	230		7-hidroxieckol	A. nodosum	Corona <i>et al.</i> (2016)
389	375			Trifuhalol	A. nodosum, Bifurcaria bifurcata Ross e Fucus vesiculosus	Agregán <i>et al.</i> (2018)
405	387	191		Hidroxifuhalol A	A. nodosum	Corona <i>et al.</i> (2016)
497	479	353	205	Tetrafucol	A. nodosum	Corona <i>et al.</i> (2016)
513	385			Tetrafuhalol	A. nodosum, B. bifurcata e F. vesiculosus	Agregán <i>et al.</i> (2018)
[M + H]						
267	127			Bifuhalol	Carpophyllum flexuosum Greville, C. plumosum e Ecklonia	Zhang <i>et al.</i> (2018)
391	130			Trifuhalol	raaiata C flexuosum C	Thang $\rho t al (2018)$
571	150			Titulialoi	plumosum e E. radiata	Znung et ut. (2010)
514	515			Tetrafuhalol	C. flexuosum, C. plumosum e E. radiata	Zhang <i>et al.</i> (2018)

2.4. Discussão

Sargassum stenophyllum, junto com outras espécies de *Sargassum*, são importantes estruturadores das comunidades fitobêntonicas. Portanto, estudos fisiológicos que visem a compreensão da biologia frente a condições abióticas são fundamentais para entender a sensibilidade frente às mudanças climáticas globais. A capacidade antioxidante das macroalgas pode ser estimulada por diversos fatores bióticos e abióticos, e dentre estes, a temperatura.

Na literatura, existem diversas reações químicas para determinar a atividade antioxidante total visando evidenciar as alterações do sistema de defesa, classificando-se em ensaios baseados em reações de transferência de elétrons e de transferência de hidrogênio (Haung et al., 2005). Nessas reações existe uma dependência ao solvente e potencial de hidrogênio (pH) (Apak et al., 2016). Neste estudo, foi evidenciado que dentre os cinco ensaios de atividade antioxidante, baseados em reações de transferência de hidrogênio, e sem considerar as temperaturas, houveram maiores ICAT nos ensaios da atividade de sequestro de radicais DPPH e ABTS com 80 e 68, respectivamente; seguido pelos índices da atividade de quelação de metais (índice: 58) e do ion ferro (índice FRAP: 47); e o menor índice foi reportado no ensaio da capacidade reductora (índice Fenólicos: 35). A diferença destes índices pode estar relacionada à sensibilidade ao pH nos ensaios antioxidantes, sendo que nas condições de pH neutro houveram os maiores índices (ensaios de DPPH e ABTS) do que nos outros ensaios que possuem condições ácidas (ensaios de quelação de metais e FRAP) e alcalinas (ensaio Folin). Dentre as substâncias antioxidantes, um exemplo são as substâncias fenólicas que são indissociadas, parcialmente dissociadas e predominantemente dissociadas nos valores de pH ácida, neutra e alcalina, respectivamente, sendo que como menciona Akap et al. (2016) pode refletir uma subestimação (no caso de quelante de metais e FRAP) ou superestimação (no caso de Folin) da ação antioxidante in vitro simulando condições fisiológicas.

Com o interesse de comparar os dados obtidos de *S. stenophyllum* com a literatura do potencial antioxidante em espécies de *Sargassum*, foi comparado com valores de EC50 do controle (25 °C) quantificados em massa fresca, os quais foram transformados em massa seca com o fator de conversão de 17%. Com isso, foi evidenciado dentre os ensaios da atividade de sequestro de radicais, valores mais promissores da espécie de estudo em relação a outros trabalhos. No presente estudo, obteve-se EC50 em torno de 0,81 mg.mL⁻¹ diferente do apresentado nos extratos metanólicos de *S. marginatum* Agardh cujo EC50 foi de 2,87 mg.mL⁻¹ MS (Vinayak *et al.*, 2011). Zubia *et al.* (2007) analisando extratos diclorometano-metanólicos de *S. ramifolium* Kuetzing e *S. pteropleuron* Grunow tiveram EC50 de 6,42 mg.mL⁻¹ MS e 6,64 mg.mL⁻¹ MS, respectivamente. A diferença de valores entre estas espécies poderia estar relacionada às condições locais, fatores ambientais e até no solvente utilizado no método de extração, tendo efeito na captura de determinadas substâncias químicas.

No estudo de Maneesh *et al.* (2017) analisando a atividade antioxidante em extratos metanólicos com acetato de etila em *S. wightii* Greville indicou que a eliminação dos radicais livres está relacionada a substâncias fenólicas associados com grupos hidroxila que, em conjunto com duplas ligações, contribuem a formar complexos dos íons metálicos de transição, como ferro e cobre; ou também com a doação de um próton para o radical livre por transferência de átomos de hidrogênio que pode desativar os radicais livres.

Complementarmente, *S. stenophyllum* mostrou os menores EC50 na atividade antioxidante de captura do radical ABTS do que o obtido com o ensaio DPPH. Segundo Kim *et al.* (2002) a vantagem do ensaio ABTS é que o cromógeno do radical ABTS pode ser dissolvido em fases aquosas e orgânicas, enquanto que o cromógeno do radical DPPH somente é solubilizado em meios orgânicos. Assim, o ensaio ABTS pode medir a atividade antioxidante total de uma amostra que contenha substâncias lipofílicas ou hidrofílicas. Tanto substâncias fenólicas ou outros antioxidantes podem possuir reatividades diferentes para o sequestro de radicais dependendo do tipo de fase, aquosa e/ou orgânica. Assim, com a alta capacidade antioxidante de sequestro de radicais, pode se considerar uma espécie promissora.

Embora a espécie de estudo não tenha tido potencial antioxidante mediante o ensaio de quelante de metais, foram evidenciados dados interessantes com os resultados obtidos com o ensaio de quelação do íon ferro (FRAP), uma vez que teve porcentagens acima de 60% utilizando a concentração de 8 mg.mL⁻¹ MF, o qual representa aproximadamente 0,004 mg.mL⁻¹ em equivalente de ácido gálico, sabendo que o equivalente de acido gálico tem três vezes maior potencial do que o Trolox (Gulçin *et al.*, 2010), evidenciando maior atividade do que a encontrada em outras espécies de *Sargassum* que utilizando 1 mg.mL⁻¹ MS, tiveram 283,7 mg equivalente de Trolox (TE) por gramo de extrato em *S. vestitum* Agardh; 12,5 mg TE por gramo de extrato em *S. linearifolium*; e 15,9 mg TE por gramo de extrato em *S. podocanthum* (Dang *et al.*, 2018). É sugerido que o padrão utilizado do ensaio FRAP seja o ácido gálico, já que tem sido demonstrado uma maior capacidade de ligação ao ferro, com ação protetora frente à peroxidação (Gulçin *et al.*, 2010).

Continuando com a comparação dentre os cinco ensaios de atividade antioxidante, e considerando a temperatura, houve um ICAT entre 70,75 e 90,30 na faixa de 15 a 30 °C e um ICAT de 49,65 nos 35 °C. A diferença destes índices pode estar relacionada a que nas altas temperaturas de 35 °C, existe exsudação de substâncias químicas, como foi observada a mudança da cor de água (dados não apresentados neste capítulo). Mannino *et al.* (2015) indicaram que, com o acréscimo das temperaturas, existe a ativação e mobilização das substancias fenólicas, como os florotaninos insolúveis, a fim de aumentar o pool de defesas químicas. Connan *et al.* (2006a) indicaram uma correlação positiva entre o acúmulo de substâncias fenólicas e atividade antioxidante em *S. muticum*. Adicionalmente, Connan *et al.* (2006b) avaliando a variação sazonal em espécies de algas pardas, reportaram que as espécies da ordem Fucales exibem maior conteúdo de substancias fenólicas no verão, com altas temperaturas e irradiância, que contribuem como mecanismo de proteção.

Comparando entre as temperaturas, e retomando o ensaio da atividade antioxidante com o ensaio de Folin-Ciocalteu somente houve diferenças significativas nos tratamentos de 15 e 35 °C, reportando os menores valores de EC50 do que o obtido com o controle. Assim, embora nos 35 °C tenha tido uma exsudação provavelmente de florotaninos insolúveis, entre outras substâncias químicas. Nessa temperatura pode se ressaltar que a alta capacidade antioxidante está atribuída a substâncias fenólicas acumuladas no citoplasma, tais como os florotaninos solúveis localizados dentro dos fisoides (Koivikko *et al.*, 2005).

Uma vez analisados os extratos aquosos dos tratamentos na identificação das substâncias fenólicas pela CLAE/ESI-MS, foi evidenciado aos 35 °C o maior número de picos do que o reportado nos outros tratamentos. As substâncias fenólicas características das algas pardas com atividade antioxidante está associada com a classe dos florotaninos, os quais podem ser agrupados segundo Isaza & Torres (2013) de acordo com as ligações do floroglucinol, em três subclasses: (a) fucol, com única ligação fenólica; (b) floroetol, com união ariléter e (c) fucofloroetol, sendo a combinação de (a) e (b). Com a anterior classificação e analisando os espectros de massas foi possível identificar que as substâncias fenólicas encontradas para S. stenophyllum estiveram associadas majoritariamente à subclasse de floroetol, sendo que no tempo de retenção de 2,6 min foram calculadas diferenças de pelo menos três unidades de floroglucinol associadas a oxigênio com um fragmento de 142 m/z, indicando a presença de um floroetol, possivelmente relacionado ao eckol conforme as massas moleculares reportadas por Isaza & Torres (2013). De forma semelhante, as substâncias fenólicas avaliadas nos tempos de retenção de 3.2; 3.6 e 3.9 min podem estar associadas com florotaninos da subclasse floroetol, considerando os padrões de fragmentação do floroglucinol e a quebra do floroglucinol ligado ao oxigênio com fragmentos de 126 e 144 m/z, respectivamente (Lopes et al., 2018). No tempo de retenção de 4,9 min foi detectado o íon quase molecular de 246,9919 m/z, o qual pode estar associado a um dímero de floroglucinol como reportado por Nwosu et al. (2011) e relacionando a estrutura de dibenzo-p-dioxina, sugere-se que seja um eckol. Segundo Li et al. (2017) a complexidade na identificação dos florotaninos pode estar atribuída às ligações estruturais resultantes do processo de polimerização e aos grupos hidroxilas adicionais. No tempo de retenção de 8,1 min se propõe que seja um dímero com uma fórmula molecular de $C_{12}H_8O_5$ o qual pode estar relacionado com um florotanino, mas seriam necessárias outras análises para confirmar a estrutura da molécula.

De forma geral, a atividade antioxidante em *Sargassum*, como em espécies de algas pardas, tem sido atribuída aos polissacarídeos sulfatados extraídos com solventes aquosos (Vijayabaskar *et al.*, 2012; Farvin & Jacobsen, 2013), às substâncias fenólicas extraídas com solventes alcoólicos ou com a mistura de solventes aquosos e alcoólicos (Khaled *et al.*, 2012), e os pigmentos fotossintetizantes, como os carotenoides, extraídos com solventes alcoólicos (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016).

No presente estudo, embora os extratos metanólicos provenientes da extração de pigmentos fotossintetizantes tivessem sido armazenados -80 °C, não foi possível realizar a quantificação dos carotenoides devido a vários fatores que afetam a estabilidade dessas moléculas, sendo sugerido uma caracterização logo após a extração, pois como mencionam Meléndez-Martínez *et al.* (2004), o tempo de armazenamento, luz, aquecimento e oxidação levam à possível degradação dos carotenoides. Porém, o estudo de Yip *et al.* (2014) analisando diferentes temperaturas de armazenamento sobre a estabilidade de carotenoides com extratos de *S. binderi* indicou que a fucoxantina foi estável quando armazenada a 4 °C até temperatura ambiente (25 °C). Assim, temperaturas acima de 25 °C, a fucoxantina seria instável devido à possível ruptura de duplas ligações na molécula (Boon *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2014.

Embora não se tenha conseguido avaliar as variações dos carotenoides em resposta à temperatura para *S. stenophyllum*, devido à possível degradação das moléculas nos extratos, foi caracterizado o perfil dos carotenoides nas amostras provenientes de campo com dois processos de extração, detectando-se a fucoxantina como principal carotenoide, característico das algas pardas (Lewey & Gorham, 1984; Czeczuga & Taylor, 1987), e que participa de mecanismos de proteção no ciclo de xantofilas (Mikami & Hosokawa, 2013). O potencial antioxidante da fucoxantina na atividade de sequestro de radicais livres pode ser atribuído a um grupo funcional acetilado presente na molécula (Wang *at al.*, 2014).

Dentre o perfil de carotenoides nas amostras provenientes de campo, foi evidenciada maior abundância no extrato tamponado-metanólico (em torno de 2000 mAU) do que o reportado com o extrato metanólico (em torno de 700 mAU), podendo ser explicado devido a que com a primeira extração com o tampão fosfato, são separadas algumas substâncias quimicas como os complexos de clorofila e proteínas (Smith, 1941), e com a extração posterior em metanol, pode se detectar maior quantidade de clorofilas e carotenoides.

Adicionalmente, houve uma diferença do carotenoide no tempo de retenção de 4,8 minutos entre os diferentes extratos, sendo cis-fucoxantinol no extrato tamponado-metanólico e violaxantina no extrato metanólico; o qual pode ser atribuída mudanças nas conformações estruturais ou reações como desacetilação da fucoxantina para fucoxantinol. O fucoxantinol tem sido considerado como a forma fisiologicamente ativa da fucoxantina no sistema biológico (Wang *et al.*, 2014). O estudo de Czeczuga & Taylor (1987) com *S. sinclaira,* identificou o fucoxantinol mediante a extração com metanol 95%, sem presença da violaxantina. Já a extração das xantofilas, como a fucoxantina e violaxantina, são detectadas com solventes como metanol ou acetona (Haugan & Liaaen-Jensen, 1994; Fernandes *et al.*, 2016).

Como conclusão, evidenciou-se pouca variação da atividade antioxidante de *S. stenophyllum* nos tratamentos de 15 a 30 °C, indicando que diversas substâncias químicas podem contribuir para a inibição ou supressão dos processos de oxidação decorrentes do efeito da temperatura, como as substâncias fenólicas, carotenoides, entre outras. Adicionalmente, foi evidenciado que um acréscimo de 10 °C acima da temperatura controle pode encaminhar acúmulo de substâncias fenólicas da classe dos florotaninos.

Sugere-se, para estudos futuros, a revisão do efeito da temperatura na síntese de carotenoides pois podem ser uma fonte promissora nas indústrias cosmética e nutricional, contribuindo para prevenir os efeitos induzidos pelos radicais livres.

Referências bibliográficas

- Abdala-Díaz, R., Cabello-Pasini, A. & Marquez, E. (2014). Intra-thallus variation of phenolic compounds, antioxidant activity, and phenolsulphatase activity in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) from southern Spain. Ciencias Marinas. 40: 1-10.
- Abirami, R. & Kowsalya, S. (2016) Quantification and Correlation Study on Derived Phenols and Antioxidant Activity of Seaweeds from Gulf of Mannar. J. Herbs. Spices. Med. Plants. 23: 9-17.
- Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J. & Lorenzo, J. (2018). Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.043.
- Apak, R., Mustafa, O., Kubilay, G. & Çapanoglu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. J. Agric. Food. Chem. 64: 997-1027.
- Atoui, A., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food. Chem. 89: 27-36.
- Barbosa, K., Costa, N. & Alfenas, R. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. Rev. Nutr. 23: 629-643.
- Bark, K., Im, S., Seo, J., Park, O., Park, C. & Park, H. (2015). Spectroscopic study on the stability of morin in aqueous solution. Korean. Chem. Soc. 36: 498-502.
- Boon, C., McClements, D., Weiss, J. & Decker, E. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50: 515-532.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Food. Sci. Technol. 28: 25-30.
- Brito, E., Morais, S., Sampaio, C. & Saura-Calixto, F. (2006). Metodologia cientifica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Embrapa. 3-6.
- Chakraborty, K. & Joseph, D. (2016). Antioxidant potential and phenolic compounds of brown seaweeds *Turbinaria conoides* and *Turbinaria ornata* (class: Phaeophyceae). J. Aquat. Food. Prod. T. 1: 29-49.
- Chen, Z., Bertin, R. & Froldi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. Food. Chem. 138: 414-420.
- Clarkson, P & Thompson, H. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. Am. J. Clin. Nutr. 72: 637-646.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. & Gall, A. (2006a). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. Bot. Mar. 49: 39-46.

- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. & Gall, A. (2006b). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. Bot. Mar. 47: 410-116.
- Corona, G., Yang, J., Anegboonlap, P., Hotchkiss, S., Gill, C. & Yaqoob, P. (2016). Gastrointestinal modifications and bioavailability of brown seaweed phlorotannins and effects on inflammatory markers. British. J. Nutrition. 115: 1240-1253.
- Czeczuga, B. & Taylor, F. (1987). Carotenoid content in some species of the brown and red algae from the coastal area of New Zealand. Biochem. Syst. Ecol. 15: 5-8.
- Dang, T., Bowyer, M., Altena, I. & Scarlett, C. (2018). Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. Int. J. Food. Sci. Technol. 53: 174-181.
- Davison, I. & Pearson, G. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. J. Phycol. 32: 197-211.
- Farvin, K. & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. Food. Chem. 138: 1670-1681.
- Fernandes, F., Barbosa, M., Oliveira, A. Azevedo, I., Sousa-Pinto, I. Valentão, P. & Andrade, P. (2016). The pigments of *kelps* (Ochrophyta) as part of the flexible response to highly variable marine environments. J. Appl. Phycol. 1:1-8.
- Ferreres, F., Lopes, G., Gil, A., Andrade, P., Sousa, C., Mouga, T. & Valentão, P. (2012). Phlorotannin extracts from fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. Mar. Drugs. 10: 2766-2781.
- Ghareib, H. (2010). Effect of methanol extract of Sargassum virgatum: A marine brown macroalga on seed germination and seedling growth of some agricultural crops. Thalassas. 26: 13-21.
- Gómez, I. & Huovinen, P. (2010). Induction of phlorotannins during UV exposure mitigates inhibition of photosynthesis and DNA damage in the kelp *Lessonia nigrescens*. Photochem. Photobiol. 86: 1056-1063.
- Gulçin, I., Huyut, Z., Elmastas, M. & Aboul-Enein, H. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arab. J. Chem. 3: 43-53.
- Harb, T., Torres, P., Pires, J., Dos Santos, D. & Chow, F. (2016). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-63-2. 1-5.
- Hasan, N., Chaiharn, M., Khan, S., Khalid, H., Sher, N., Siddiqui, F. & Siddiqui, M. (2013).
 Dual wavelength RP-HPLC method for simultaneous determination of two antispasmodic drugs: an application in pharmaceutical and human serum. J. Anal. Methods. Chem. 297285.

- Haugan, J. & Liaaen-Jensen, S. (1994). Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). Biochem. Syst. Ecol. 22: 31-41.
- Haung, D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Chem. 53: 1841-1856.
- Isaza, J. & Torres, H. (2013). Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. J. Chromatogr. Sci. 1: 1-14.
- Khaled, N., Hiba, M. & Asma, C. (2012). Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. Adv. Environ. Biol. 6: 42-48.
- Kim, D., Lee, K., Lee, J. & Lee, C. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (vceac) of phenolic phytochemicals. J. Agric. Food. Chem. 50: 3713-3717.
- Kim, S., Choi, D., Athukorala, Y., Jeon, Y., Senevirathne, M. & Rha, C. (2007). Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. J. Food. Sci. Nutr. 12: 65-73.
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T. & Jordmalainen, V. (2005). Contents of soluble, cellwall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. J. Chem. Ecol. 31: 195-212.
- Lann, K., Ferret, C., VanMee, E., Spagnol, C., Lhuillery, M., Payri, C. & Stiger-Pouvreau. (2012). Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. Phycol. Res. 60: 37-50.
- Latowski, D., Kuczynska, P. & Strzalka, K. (2011). Xanthophyll cycle: a mechanism protecting plants against oxidative stress. Redox. Rep. 16: 78-90.
- Leite, F. & Turra, A. (2003). Temporal variation in *Sargassum* biomass, *Hypnea* epiphytism and associated fauna. Braz. Arch. Biol. Technol. 46: 665-671.
- Lewey, S. & Gorham, J. (1984). Pigment composition and photosynthesis in Sargassum muticum. Mar. Biol. 80: 109-115.
- Li, Y., Fu, X., Duan, D., Liu, X., Xu, J. & Gao, X. (2017). Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. Mar. Drugs. 15: 1-15.
- Lim, S., Cheung, P., Ooi, V. & Ang, P. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. J. Agr. Food. Chem. 50: 3862-3866.
- Lopes, G., Barbosa, M., Vallejo, F., Gil-Izquierdo, M., Andrade, P., Valentão, P., Pereira, D. & Ferreres, F. (2018). Profiling phlorotannins from *Fucus* spp. of the Northern Portuguese coastline: Chemical approach by HPLC-DAD-ESI/MSn and UPLC-ESI-QTOF/MS. Algal. Res. 29: 113-120.

- López, A., Rico, M., Suarez, M. & Tangeil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food. Chem. 125: 1104-1109.
- Machu, L., Misurcova, L., Varva, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J. & Jurikova, T. (2015). Phenolics content and antioxidant capacity in algal food products. Molecules. 20: 1118-1133.
- Maneesh, A., Chakraborty, K. & Makkar, F. (2017). Pharmacological activities of brown seaweed Sargassum wightii (Family Sargassaceae) using different in vitro models. Int. J. Food. Prop. 20: 931-945.
- Mannino, A., Vaglica, V., Cammarata, M & Oddo, E (2015). Effects of temperature on total phenolic compounds in *Cystoseira amentacea* C. Agardh Bory (Fucales, Phaeophyceae) from southern Mediterranean Sea. Plant. Biosyst. 1-10.
- Meléndez-Martínez, A, Vicario, I. & Heredia, F. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch. Latinoam. Nutr. 54: 149-154.
- Mikami, K. & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. Int. J. Mol. Sci. 14: 13763-13781.
- Min B., Mcclung, A. & Chen, M. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. J. Food. Sci. 76: 117–126.
- Myung, C., Shin, H., Bao, H., Yeo, S., Lee, B. & Kang, J. (2005). Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. Arch. Pharm. Res. 28: 691-698.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V., Stewart, D., Rossa, H. & McDougall. (2011) Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. Food. Chem. 126: 1006-1012.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M. & Hurtado-Oliva, M. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico, Pharma. Biol. 54: 2196-2210.
- Oyesiku, O. & Egunyomi, A. (2014). Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) gaillon and *S. fluitans* (Borgessen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 13: 1188-1193.
- Paula, J. (1988). Gênero Sargassum C. Ag. (Phaeophyta- Fucales) no litoral do estado de São Paulo, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo. 10:65-118.
- Phillips, N. 1995. Biogeography of Sargassum (Phaeophyta) in the Pacific basin. In Abbott, I. A. [Ed.] Taxonomy of economic seaweeds with reference to some pacific species. 5: 107-144.

- Pires, J. (2016). Perfil antioxidante e bioatividades de três espécies de macroalgas da Praia do Morro de Pernambuco no litoral Sul da Bahia. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 225 p.
- Pires, J., Torres, P., Dos Santos, D. & Chow, F. (2017a). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-71-7. 1-6.
- Pires, J., Torres, P., Dos Santos, D. & Chow, F. (2017b). Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-70-0. 1-5.
- Polo, L., Felix M, Kreusch, M., Pereira, D., Costa, G. Simioni, C., Ouriques, L, Chow, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z., Schmid, E. (2014). Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. Photochem. Photobiol. 90: 560-573.
- Rao, C. & Untawale, A. (1991). Polyphenols content of Indian seaweeds. Mahasagar. 24: 99-102.
- Rufino, M. & Alves, R. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa. 3-6.
- Seeram N., Aviram, M. & Zhang Y. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. J. Agric. Food. Chem. 56:1415-1422.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K. & Nakamura, T. (2002) Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. Int. J. Food. Sci. Tech. 37: 703-709.
- Singleton, V. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158.
- Smith, E. (1941). The chlorophyll-protein compound of the green leaf. J. Gen. Physiol. 1:565-582.
- Stengel, D., Connan, S. & Popper, Z. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. Biotechnol. Adv. 29: 483-501.
- Susanto, E., Fahmi, A., Agustini, T., Rosyadi, S. & Wardani, D. (2017). Effects of different heat processing on fucoxanthin, antioxidant activity and colour of Indonesian brown seaweeds. Environ. Earth. Sci. 55: 1-11.
- Széchy, M. & Paula, J. (2000). Padrões estruturais quantitativos de bancos de Sargassum (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica. 23:121-132.
- Terasaki, M., Kawagoe, C., Ito, A., Kumon, H., Narayan, B., Hosokama, M. & Miyashita, K. (2017) Spatial and seasonal variations in the biofunctional lipid substances (fucoxanthin and fucosterol) of the laboratory-grown edible Japanese seaweed (*Sargassum horneri* Turner) cultured in the open sea. Saudi. J. Biol. Sci. 24: 1475-1482.
- Torres, P., Chow, F., Furlan, C., Mandelli, F., Mercadante, A. & Santos, D. (2014). Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll *a* and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. Zhang and Xia (Rhodophyta). Braz. J. Oceanogr. 62: 57-63.
- Torres, P., Pires, J., Dos Santos, D. & Chow, F. (2017). Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS⁺⁺ em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-69-4. 1-4.
- Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P., Dos Santos, D. & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-62-5. 1-6.
- Vijayabaskar, P., Vaseela, N. & Thirumaran, G. (2012). Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae Sargassum swartzii. Chin. J. Nat. Med. 10: 421-428.
- Vinayak, R., Sabu, A. & Chatterji, A. (2011). Bio-prospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 1-9.
- Waterman, P. & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell. Sci. 1-7.
- Wang, T., Jonsdottir, R., Olafsdottir, G. & Kristinsson, G. (2014). Chapter 10 "Antioxidant properties of marine macroalgae". In Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods. 344p.
- Wells, M., Potin, P., Craigie, J., Raven, J., Merchant, S., Helliwell, K., Smith, A., Camire, M., Brawley, S. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. J. Appl. Phycol. 29: 949-982.
- Yang H., Dong, Y., Du H., Shi, H., Peng, Y. & Li X. (2011). Antioxidant compounds from própolis collected in Anhui, China. Molecules. 16: 3444-3455.
- Yende, S., Harle, U. & Chaugule, B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. Pharmacogn. Rev. 8: 1-7.
- Yip, W., Joe, L., Mustapha, W., Maskat, M & Said, M. (2014). Characterization and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah. Sains. Malays. 43: 1345-1354.
- Yoshie-Stark, Y., Ya-Pe, H. & Takeshi, S. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. J. Tokyo. Univ. Fish. 89: 1-6.
- Young, T. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. Physiol. Planta. 83: 702-708.

- Zhang, R., Yuen, A., Magnusson, M., Wright, J., Nys, R., Masters, A. & Maschmeyer, T. (2018). A comparative assessment of the activity and structure of phlorotannins from the brown seaweed *Carpophyllum flexuosum*. Algal. Res. 29: 130-141.
- Zubia, M., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. J. Appl. Phycol. 19: 449-458.



Crescimento *in vitro* e variação nutricional em Sargassum stenophyllum e Pyropia spiralis: efeito da temperatura

3.1. Introdução

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2018), estima-se que cerca de 96% da produção de plantas aquáticas comestíveis, como as macroalgas, é produto de aquicultura. A produção mundial de aquicultura continua a crescer, e embora a um ritmo lento, atingiu 23,8 milhões de toneladas das algas cultivadas no ano 2012 (FAO, 2014). Dessa parcela de algas, uma parte é direcionada para consumo direto e outra para processamento no uso como fertilizante e em produtos farmacêuticos, cosméticos e outros afins (FAO, 2016).

As algas marinhas têm sido, desde há muito tempo utilizadas como alimento em algumas culturas orientais, principalmente em países asiáticos (p. ex. China e Japão), consumidas em sopas ou saladas (FAO, 2018). Em países ocidentais como o Brasil, as algas estão sendo progressivamente incorporadas no mercado cotidiano devido à ampliação da culinária oriental e ao destaque do seu valor nutricional, tornando-se um ingrediente saudável. Desde 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) liberou e regulamentou o uso de algas marinhas como alimento para seres humanos.

A contribuição nutricional das algas consiste principalmente de ácidos graxos de cadeia longa (p. ex. ômega-3), minerais (p. ex. cálcio, ferro, iodo, potássio e selênio) e vitaminas (FAO, 2018). Dentre as espécies majoritariamente consumidas, há uma alta porcentagem das algas pardas (Ochrophyta), principalmente de *Alaria esculenta* Greville, *Himanthalia elongata* Gray, *Laminaria digitata, L. japonica, Saccaharina japonica* Lane, Mayes, Druehl & Saunders, *Sargassum fusiforme* Setchell e *Undaria pinnatifida*; seguido pelas algas vermelhas (Rhodophyta), ressaltando *Chondrus crispus* Stackh, *Palmaria palmata* Weber & Mohr e *Porphyra umbilicalis, P. yezoensis* e *P. tenera* Kjellman; e uma pequena porcentagem pelas algas verdes (Chlorophyta) como *Ulva lactuca* (Dawczynski *et al.*, 2006; Marinho-Soriano *et al.*, 2006; Rioux *et al.*, 2017).

O conteúdo de nutrientes pode apresentar variações nas diferentes espécies de macroalgas marinhas, além de serem afectadas pela exposição a fatores ambientais, tanto abióticos (p. ex. irradiância, temperatura, salinidade e ação das ondas) quanto bióticos (p. ex. predação, competição e alelopatia) (Wan *et al.*, 2018). Os parâmetros ambientais variam de acordo com a estação do ano, a qual estimula ou inibe a biossíntese de nutrientes (Lobban &

Harrison, 1994). Um índice sensível para caracterizar o potencial de crescimento e estado fisiológico das algas encontra-se baseado na relação carbono:nitrogênio (C:N) ou relação proteína:carboidrato (Rosenberg & Ramus, 1982).

Em condições de baixas densidades de fluxo de fótons e temperatura, que ocorrem principalmente no inverno, tem sido descrito que o crescimento das macroalgas marinhas coincide com o acúmulo de reservas de nitrogênio provenientes das concentrações de nitrato na água; e do armazenamento e translocação de carbono previamente fixado na fotossíntese (Rosenberg & Ramus, 1982). O acúmulo de fontes nitrogenadas durante o inverno tem sido interpretado como estratégia, tais como as proteínas, que possibilitariam sustentar o rápido crescimento das algas durante os subsequentes meses de verão (Chapman & Craigie, 1977; Adams *et al.*, 2011; Schiener *et al.*, 2014). Por outro lado, sob condições de altas temperaturas, que ocorrem principalmente no verão e no outono, tem sido relatado o acréscimo do teor de carboidratos em diferentes macroalgas (Kumar, 1993; Renaud & Luong-Van, 2006).

Além das flutuações de temperaturas que ocorrem ao longo do ano, a composição nutricional dependerá da espécie e da distribuição geográfica (Marinho-Soriano *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2018). Em ambientes tropicais e subtropicais, distribuem-se espécies de *Sargassum* e *Porphyra/Pyropia* ricas em carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas (Kumar *et al.*, 2015). Segundo Schiener *et al.* (2014), o acúmulo de nutrientes está relacionado ao conjunto de minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio) e metais (alumínio, cobre, ferro, manganês e zinco), constituindo um alto conteúdo de cinzas. Em *Sargassum* tem sido reportado alto conteúdo de cinzas, com presença de minerais como o cálcio, magnésio, potássio e sódio durante os meses de verão (Murugaiyan *et al.*, 2008). A tendência em *Porphyra/Pyropia* de acúmulo das cinzas, sódio, potássio e magnésio foi reportada nos meses de inverno (Fajardo *et al.*, 1998).

Tendo em consideração a qualidade nutricional de *Sargassum* e *Porphyra/Pyropia*, os quais poderiam ser explorados como ingredientes funcionais, e as flutuações de temperatura dentro do marco do aquecimento global, o objetivo deste estudo foi analisar alterações na composição nutricional sob diferentes temperaturas das macroalgas marinhas *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material de estudo e delineamento experimental

Sargassum stenophyllum foi coletada em novembro de 2014 e *Pyropia spiralis* em agosto de 2015, na Praia de Cibratel 1 (24º13'31"S e 46º51'7"W) no Município de Itanhaém.

Especificações da coleta das espécies de estudo e das condições de aclimatação e de experimentação estão descritas no item M.3 de Materiais e Métodos Gerais.

A taxa de crescimento e a quantificação de carbono, hidrogênio, nitrogênio, minerais, carboidratos, fibras, cinzas e proteínas foram analisadas após as algas serem submetidas a diferentes temperaturas: 15, 20, 25 (controle) e 30 °C. A taxa de crescimento foi avaliada antes de iniciar o experimento (Inicial) e nos dias 1, 3, 5 e 7 e, a composição química foi avaliada no tempo Inicial e após sete dias de tratamento.

3.2.2. Taxa de crescimento

A taxa de crescimento (TC) foi calculada segundo Penniman *et al.* (1986) com segue: cálculo: TC (%. dia⁻¹) = {[(massa fresca final/massa fresca inicial)^{1/t}] – 1}/ 100.

3.2.3. Conteúdo de umidade

O conteúdo de umidade foi calculado após a secagem de 1,5 g MF até peso constante (aproximadamente 3 dias) em estufa com circulação de ar (Fanem, Brasil) a 45 °C. A equação está descrita a seguir: Umidade (%) = {[(massa inicial (mg) - massa final (mg)] x 100} / massa final (mg).

3.2.4. Teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e minerais

As análises de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) e minerais (cálcio, ferro, magnésio, potássio, sódio e zinco) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil. Para CHN foram utilizadas amostras de 50 mg de MS, que foram sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, causando a oxidação da matéria orgânica das amostras, a qual foi convertida em dióxido de carbono, hidrogênio, agua e nitrogênio. Os gases resultantes dessa combustão foram quantificados em um detector de condutividade térmica no analisador de composição elementar (2400 Series II, Perkin-Elmer, EUA). Para os minerais foram utilizadas amostras de 250 mg MS, os quais foram trituradas e digeridas com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30% em um bloco de digestor térmico (DigiPrep, SCP Science, EUA). Logo, foram quantificados pela técnica de espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES, Arcos, EUA).

O teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio foi expresso em $\mu g.g^{-1}$ MS e os minerais em mg.100 g⁻¹ MS. A fim de comparar nossos resultados com dados da literatura, os resultados de massa fresca (MF) para massa seca (MS) foram convertidos considerando os fatores de conversão de 17% para *S. stenophyllum* e 23% para *P. spiralis*.

3.2.5. Quantificação de carboidratos solúveis totais

O teor de carboidratos solúveis totais foi analisado conforme o descrito no Capítulo I. A quantificação para *S. stenophyllum* foi feita com curva padrão de fucose (Cayman Chemical,

Brasil; 60 - 240 µg.mL⁻¹; y = 0,0044x - 0,0318; $R^2 = 0,9923$) e para *P. spiralis* com curva de glicose (Sigma-Aldrich, EUA; 10 - 50 µg.mL⁻¹; y = 0,04x - 0,0519; $R^2 = 0,9714$).

3.2.6. Quantificação de fibras, cinzas e proteínas totais

A quantificação da fibra dietética total (solúvel e insolúvel) foi analisada mediante o método gravimétrico não enzimático 993.21 (AOAC, 2001), com modificações. Para isso, foram utilizados dois grupos de amostras de 100 mg MS. Um primeiro grupo de amostras de 100 m MS foi extraído em 5 mL de água ultrapura durante 90 min a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 20 mL de etanol 95% e extraído por 1 h à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 12.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente e o precipitado recuperado e lavado sequencialmente com 4 mL de etanol 78%, 4 mL de etanol 95% e 2 mL de acetona. Em seguida, o pellet foi queimado a 105 °C durante 2 h. Após esfriado em dessecador por 2 h, foi incinerado a 525 °C durante 5 h num forno (Mufla, Quimis, Brasil) e após esfriado em dessecador por 2 h, foi calculado a porcentagem de cinzas.

Para calcular o teor de fibra dietética total foi necessário estimar a porcentagem de proteína da amostra, que foi estimada indiretamente pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio (quantificado conforme o item 3.2.3) e o fator de conversão de 4,93 para *S. stenophyllum* (fator indicado para *S. filipendula* Agardh) e 4,9 para *P. spiralis* (média das espécies em Rhodophyta) (Diniz *et al.*, 2011). As porcentagens de fibra dietética total (FDT), cinzas e proteínas foram convertidas em g.100 g⁻¹ MS.

A porcentagem de fibra dietética total foi calculada segundo AOAC (2001) com a seguinte fórmula: FDT (%) = {[Resíduo (mg) - {[Proteína (%) + Cinza (%)] / 100} x Residuo (mg)] / massa inicial (mg)} x 100.

3.2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas seguiram as especificações descritas no item M.4 de Materiais e Métodos Gerais. Os dados da taxa de crescimento foram analisados com ANOVA de medidas repetidas e as outras variáveis com ANOVA unifatorial, com prévia avaliação de normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade com o teste de Bartlett, utilizando o programa Statistica v. 12 (p < 0,05). Após a ANOVA, em tendo diferenças significativas, foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Adicionalmente, para identificar padrões de agrupamento entre os dados mediante um conjunto reduzido de variáveis foi feita uma PCA.

3.3. Resultados

3.3.1. Taxa de crescimento

O efeito da temperatura na taxa de crescimento ao longo do período experimental na alga parda *S. stenophyllum* e na alga vermelha *P. spiralis* é apresentada na Figura 3.1 e as diferenças significativas mediante ANOVA de medidas repetidas é exibida na Tabela 3.1. A partir do terceiro dia de experimento, foram observadas reduções significativas na taxa de crescimento de ambas as espécies sob 30 °C (Fig. 3.1), valores que permaneceram baixos nos subsequentes dias experimentais. A partir do quinto dia, *S. stenophyllum* mostrou redução na taxa de crescimento sob 15 °C (Fig. 3.1A), enquanto que *P. spiralis* exibiu taxas semelhantes entre os tratamentos de 15 a 25 °C (Fig. 3.1B).



Figura 3.1. Taxa de crescimento de (A) *Sargassum stenophyllum* e (B) *Pyropia spiralis* nas diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) durante os sete dias de experimento. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Tabela 3.1. ANOVA de medidas repetidas para o efeito da temperatura na taxa de crescimento de *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis* ao longo do período experimental. SQ – Soma dos quadrados. GL – Grau de liberdade. MQ – Média dos quadrados. F – Índice estatístico. p – Probabilidade. Valores de p < 0,05 representam diferenças estatisticamente significativas.

Efeito	SQ	GL	MQ	F	р
Sargassum stenophyllum					
Intercepto	253,8922	1	253,8922	2889,699	< 0,001
Temperatura	23,6588	3	7,8863	89,758	< 0,001
Erro	0,7029	8	0,0879		
Tempo	11,0377	3	3,6792	45,137	< 0,001
Temperatura x Tempo	15,5131	9	1,7237	21,146	< 0,001
Erro	1,9563	24	0,0815		

Johnnuação da Tabela 5.1.					
Pyropia spiralis					
Intercepto	281,8318	1	281,8318	380,3646	< 0,001
Temperatura	19,8369	3	6,6123	8,9241	0,0062
Erro	5,9276	8	0,7410		
Tempo	31,3719	3	10,4573	17,1349	< 0,001
Temperatura x Tempo	41,8099	9	4,6455	7,6120	< 0,001
Erro	14,6471	24	0,6103		

Continuação da Tabela 3.1

3.3.2. Conteúdo de umidade, CHN, minerais, carboidratos e composição proximal

A média da porcentagem de umidade no tratamento controle (25 °C) em S. *stenophyllum* foi de $83,51 \pm 1,02$ e em *P. spiralis* foi de $77,14 \pm 0,70$.

A Tabela 3.2 e 3.3 apresenta os valores da umidade, CHN, minerais, carboidratos, fibras, cinzas e proteínas, com os respectivos índices estatísticos e valores de significância para S. stenophyllum e P. spiralis, respectivamente. Em S. stenophyllum (Tabela 3.2), o teor de CHN do tratamento controle foi semelhante ao respectivo valor Inicial. Comparando entre os tratamentos, houve diminuição no conteúdo de nitrogênio aos 30 °C, o qual levou a apresentar uma alta relação C:N. Em relação aos minerais, apresentou-se diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que o teor de cálcio e zinco diminuiu em 15 °C, o teor de potássio aumento em 20 °C e diminui em 30 °C; e o teor de sódio diminui em 30 °C. Já o conteúdo de ferro e magnésio não apresentaram diferenças significativas. Adicionalmente, a composição proximal teve variações entre as temperaturas, sendo que no tratamento de 30 °C houve redução no teor de fibras e proteínas e aumento no teor de cinzas e carboidratos. Em P. spiralis (Tabela 3.3), quando comparados os tratamentos com o controle (25 °C), o teor de carbono não apresentou diferenças significativas; o teor de hidrogênio teve diminuição aos 15 °C; e o teor de nitrogênio declinou aos 15 °C e aumentou aos 30 °C. Não houve variações significativas na relação C: N entre os tratamentos de 15, 20 e 30 °C em relação a controle. Em relação aos minerais somente houve diferenças significativas no teor de zinco aos 30 °C e no teor de potássio houve diminuição em 20 e 30 °C. Em relação à composição proximal, pode se destacar que em comparação ao controle, houve diminuição no teor de cinzas e aumento no teor de proteína aos 30 °C. Adicionalmente, houve aumento no teor de carboidratos aos 15 °C.

Tabela 3.2. Percentual de umidade e conteúdos de CHN, minerais, carboidratos e composição proximal (média \pm DP, n = 5) de *Sargassum stenophyllum* submetidas nas diferentes condições de temperatura no período Inicial e após sete dias de experimento. Os carboidratos foram expressos em equivalente de fucose. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05). F -Índice estatístico. p – Probabilidade.

	Inicial	15°C	20°C	25°C	30°C	F	р
Umidade (%)	$81,76 \pm 0,76$ a	81,41 ± 0,43 a	83,53 ± 0,86 a	83,51 ± 1,02 a	83,10 ± 1,01 a	2,88	0,080
CHN ($\mu g/g$)							
Carbono	$276,38 \pm 15,03$ ab	281,85 ± 5,95 a	$278,66 \pm 5,47$ ab	273,07 ± 7,30 ab	$262,\!68 \pm 6,\!59$ b	3,56	0,026
Hidrogênio	$46,88 \pm 3,69$ a	$48,26 \pm 0,86$ a	$46,92 \pm 1,02$ a	$45,67 \pm 1,48$ a	$44,09 \pm 0,24$ a	2,24	0,113
Nitrogênio	$8,19 \pm 0,40$ a	$7,29 \pm 0,24$ a	$8,00 \pm 0,52$ a	$8,58 \pm 0,36$ a	$3,26 \pm 0,15 \text{ b}$	12,16	0,001
C: N	33,33 ± 9,33 b	$28,63 \pm 7,37$ b	$32,15 \pm 7,56$ b	35,78 ± 5,73 b	59,92 ± 26,71 a	3,70	0,026
Minerais (mg/100 g)							
Cálcio	$1845,00 \pm 7,07$ b	1565,00 ± 21,21 c	2350,00 ± 8,16 a	2420,00 ± 98,99 a	2350,00 ± 52,92 a	9,37	0,002
Ferro	23,51 ± 1,00 a	22,15 ± 0,93 a	$21,78 \pm 1,10$ a	$22,92 \pm 1,15$ a	23,06 ± 1,37 a	1,00	0,455
Magnésio	774,67 ± 25,89 a	659,67 ± 22,28 a	732,67 \pm 28,02 a	753,25 ± 90,16 a	$730,50 \pm 17,68$ a	1,93	0,181
Potássio	9045,00 ± 275,77 c	$10240,00 \pm 190,99$ ab	10515,00 ± 190,92 a	$9895,00 \pm 7,07$ b	$8845,67 \pm 49,50$ c	34,92	< 0,001
Sódio	1176,67 \pm 15,28 b	1163,33 ± 47,26 ab	$1130,00 \pm 10,00$ ab	1113,33 ± 15,28 b	$1066,67 \pm 15,28$ c	160,79	< 0,001
Zinco	2,99 ± 0,21 a	$2,47 \pm 0,02 \text{ b}$	$2,97 \pm 0,04$ a	$2,91 \pm 0,08$ a	$3,01 \pm 0,14$ a	6,74	0,009
Carboidratos (g/100 g)	$24,96 \pm 2,89 \text{ b}$	23,21 ± 4,06 b	$26,12 \pm 4,85$ b	$26,82 \pm 4,95$ b	38,91 ± 2,84 a	9,64	< 0,001
Composição proximal (g/	/100 g)						
Fibra dietética	$46,00 \pm 0,41$ b	$42,60 \pm 2,05$ ab	41,10 ± 1,37 a	$43,60 \pm 1,20$ ab	28,70 ± 3,01 c	27,26	< 0,001
total							
Cinzas	$26,88 \pm 0,23$ b	20,98 ± 1,21 b	31,99 ± 2,08 b	$30,08 \pm 2,05$ b	52,24 ± 4,72 a	22,96	< 0,001
Proteínas	$4,84 \pm 0,57$ a	$4,34 \pm 0,77$ a	$4,53 \pm 0,76$ a	$3,89 \pm 0,57$ a	$1{,}57\pm0{,}10~b$	7,68	0,001

Tabela 3.3. Percentual de umidade e conteúdos de CHN, minerais, carboidratos e composição proximal (média \pm DP, n = 5) de *Pyropia spiralis* submetidas nas diferentes condições de temperatura no período Inicial e após sete dias de experimento. Os carboidratos foram expressos em equivalente de glicose. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05). F -Índice estatístico. p - Probabilidade.

	Inicial	15°C	20°C	25°C	30°C	F	р
Umidade (%)	$76,85 \pm 0,83$ a	77,77 ± 0,52 a	$77,08 \pm 0,12$ a	$77,14 \pm 0,70$ a	74,07 ± 1,57 b	6,67	0,007
CHN ($\mu g/g$)							
Carbono	295,21 ± 13,78 ab	$286,35 \pm 12,32$ b	$307,12 \pm 2,35$ ab	305,18 ± 3,17 ab	319,61 ± 11,49 a	4,79	0,009
Hidrogênio	$52,58 \pm 1,55$ b	51,30 ± 3,73 b	57,08 ± 1,11 a	$57,92 \pm 0,61$ a	59,06 ± 0,20 a	7,07	0,002
Nitrogênio	19,97 ± 1,71 d	$30,23 \pm 2,64$ c	$33,79 \pm 2,79$ bc	37,98 ± 1,11 b	46,71 ± 1,30 a	35,14	< 0,001
C: N	$15,40 \pm 2,19$ a	$9,58 \pm 0,52 \text{ b}$	$8,75 \pm 0,22 \text{ b}$	$7,86 \pm 0,21$ bc	6,81 ± 1,83 c	26,61	< 0,001
Minerais (mg/100 g)							
Cálcio	20151,00 ± 24,04 a	20417,50 ± 391,03 a	20143,50 ± 3,54 a	20183,00 ± 32,53 a	20272,00 ± 137,18 a	0,80	0,593
Ferro	$13,61 \pm 0,33$ a	$13,30 \pm 0,41$ a	$14,\!68 \pm 0,\!29$ a	13,96 ± 2,42 a	15,11 ± 0,77 a	0,70	0,618
Magnésio	599,33 ± 19,66 a	584,67 ± 13,32 a	587,33 ± 12,22 a	629,67 ± 28,68 a	$634,00 \pm 38,63$ a	2,71	0,092
Potássio	4482,33 ± 225,41 b	5304,67 ± 316,84 a	$4212,00 \pm 156,98$ b	5679,00 ± 175,62 a	$4303,00 \pm 287,02$ b	19,50	< 0,001
Sódio	2760,33 ± 61,78 a	2795,67 ± 558,36 a	3165,75 ± 107,62 a	3167,00 ± 51,18 a	$3082,00 \pm 103,24$ a	1,85	0,196
Zinco	$5,07 \pm 0,24$ b	$5,15 \pm 0,42$ b	$5,40 \pm 0,19 \text{ b}$	$5,43 \pm 0,08$ b	6,41 ± 0,10 a	15,14	< 0,001
Carboidratos (g/100 g)	102,71 ± 3,29 c	160,57 ± 7,24 a	$102,71 \pm 2,36$ c	119,08 ± 8,33 b	89,18 ± 6,09 d	74,56	< 0,001
Composição proximal (g/	(100 g)						
Fibra dietética	$46,30 \pm 1,58$ a	$42,57 \pm 1,14$ b	$38,74 \pm 2,38$ b	41,53 ± 1,13 b	$38,78 \pm 1,60 \text{ b}$	9,27	0,003
total							
Cinzas	$18,48 \pm 1,29$ a	$20,19 \pm 0,06$ a	$20,09 \pm 1,01$ a	17,73 ± 1,18 a	$14,99 \pm 1,63$ b	9,96	0,002
Proteínas	$10,53 \pm 0,82 \text{ e}$	$15,51 \pm 0,99 \text{ d}$	$16,91 \pm 0,59 \text{ c}$	$18,\!61 \pm 0,\!55 \text{ b}$	$24,28 \pm 2,04$ a	101,48	< 0,001

Os dados de PCA (Fig. 3.2) agruparam os parâmetros de taxa de crescimento, CHN, minerais e composição proximal nas diferentes temperaturas para ambas as espécies. A variação dos dados esteve representada pelo componente principal 1 com 61,09% e pela componente principal 2 que mostrou 21,69%. A análise de PCA agrupou os tratamentos em três clusters: (I) baixa temperatura a 15 °C; (II) amostras do Inicial, 20 e 25 °C e (III) temperatura elevada a 30 °C. O Grupo II, com os indicadores da taxa de crescimento, carbono e minerais (magnésio e sódio), podem elucidar a faixa ótima de temperatura para ambas as espécies de estudo. Evidenciou-se para *P. spiralis* influência dos carboidratos na baixa temperatura (grupo I) em contraste com *S. stenophyllum* que foi na alta temperatura (grupo III).



Figura 3.2. Biplot PCA das espécies de estudo nas diferentes condições de temperaturas no tempo Inicial e após sete dias em condições experimentais. Em preto, apresentam-se as respostas de *S. stenophyllum* e em vermelho (itálico), as respostas da *P. spiralis*.

3.4. Discussão

As macroalgas são uma fonte potencial de constituintes nutricionais ricos em minerais, carboidratos, proteínas e fibras (Well *et al.*, 2017). Estudos mostram que essa composição pode variar com a flutuação sazonal, como a temperatura (Patarra *et al.*, 2011). Espécies de *Sargassum* e *Pyropia* têm sido usadas como alimento devido à sua riqueza de constituintes químicos (Osman *et al.*, 2011; Patarra *et al.*, 2011). Dessa forma, o interesse deste estudo em investigar a variação do crescimento e da composição nutricional nas macroalgas marinhas *S*.

stenophyllum e *P. spiralis* submetidas a diferentes temperaturas visa à compreensão de possíveis alterações que possam subsidiar esforços de cultivo e de coleta em condições de temperatura específicas e/ou em épocas mais propícias que permitam resguardar uma qualidade nutricional adequada. Por outro lado, estudos em laboratório sob diferentes temperaturas podem auxiliar na compreensão de modificações nas composições químicas das espécies frente ao aquecimento global. Segundo Schiener *et al.* (2014), a análise da composição química sazonal das algas pode ser usada para determinar a melhor época de coleta para fins comercias.

Vários estudos relatam que a temperatura é um fator importante para o crescimento e o desenvolvimento das algas. Em populações de *Sargassum* foi reportada a correlação positiva entre a temperatura da água e a biomassa (Paula & Oliveira Filho, 1980; Veloso & Széchy, 2008). No presente estudo, *S. stenophyllum* apresentou um crescimento semelhante entre os 20 a 25 °C ao longo dos sete dias do período experimental, o qual foi correspondente ao reportado por Paula (1994) com *S. cymosum*, cujo maior crescimento foi entre os 22 a 26 °C. De forma geral, os estudos de crescimento com populações de *Sargassum* apresentaram valores máximos de crescimento durante a primavera, com temperatura ambiental de 24 °C (Hwang *et al.*, 2004; Almada *et al.*, 2008). Acima dos 30 °C, os estudos fenológicos em *Sargassum* relatam respostas deletérias (Paula & Oliveira Filho, 1980).

Em relação a *P. spiralis*, os valores de crescimento foram semelhantes entre os tratamentos de 15 a 25 °C ao longo dos sete dias do período experimental, faixa reportada com condições de temperatura ótima para o desenvolvimento da fase gametofítica de *Porphyra*, fase foliácea, durante as estações de inverno e primavera do hemisfério sul (Joly & Yamaguishi, 1963). Resultado semelhante foi verificado para *P. vietnamensis* Tanaka & Ho, com 25 °C como a temperatura ótima para o desenvolvimento (Ruangchuay & Masahiro, 2003). Cabe ressaltar que a fase conchocelis de espécies de *Porphyra* aparece em épocas de maior temperatura, enquanto que temperaturas menores estimulam o desenvolvimento da fase gametofítica. Deste modo, o estudo de Kim *et al.* (2007) indicou a influência significativa das baixas temperaturas, com um aumento na taxa de crescimento para *P. leucosticta* sob 10 e 15 °C e para *P. linearis* Greville e *P. umbilicalis* sob 20 °C.

Nas espécies de estudo, sob a exposição por uma semana a 30 °C, o crescimento declinou significativamente, sendo que provavelmente houve processos de fotoinibição causados pelo dano ao fotossistema II (PSII), especificamente à degradação da proteína D1, responsável pelo arranjo do fotossistema (Che *et al.*, 2013), e à desestruturação da membrana dos tilacoides. Adicionalmente, em altas temperaturas pode ser afetada a taxa de fixação de carbono comprometendo a regulação da enzima Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RuBisCO) (Weis, 1980), a qual atua na assimilação dos produtos do ciclo de Calvin-Benson (Figueroa *et al.*, 2014).

As alterações de temperatura podem ocasionar ajustes no balanço de carbono e nitrogênio, que dependerá da demanda energética e metabólica do momento. Segundo Kim *et al.* (2007) a formação das macromoléculas como ácidos nucleicos, pigmentos fotossintetizantes e proteínas são dependentes do nitrogênio, sendo esse um nutriente limitante.

Lapointe *et al.* (2014) indicaram para populações de *Sargassum* uma relação C:N de 27 a 47. No presente estudo, *S. stenophyllum* teve um resultado dentre essa faixa, sendo que o controle (25 °C) foi de 35,78 ± 5,73. No entanto, foi evidenciado que o aumento de temperatura, no tratamento de 30 °C houve uma relação C:N de 59, devido ao baixo conteúdo de nitrogênio. Young *et al.* (2007) apontaram que durante o verão houve uma maior relação C:N e menor armazenamento do nitrogênio devido a uma restrição de assimilação de nitrogênio inorgânico dissolvido. Nas altas temperaturas, como aos 30 °C, espécies de *Sargassum* podem apresentar limitações na captura de nutrientes, como fósforo e nitrogênio (Hwang *et al.*, 2004).

Por outro lado, durante o crescimento de *P. spiralis*, a relação C:N permaneceu semelhante entre os tratamentos, tendo uma proporção de 7,86 ± 0,21 (dado do controle). A morfologia foliácea de *Porphyra* possibilita uma alta eficiência na absorção dos nutrientes devido à razão área de superfície por volume (Pedersen *et al.*, 2004). Dentre as formas de nitrogênio que são absorvidas pelo gênero, indica-se a preferência de amônio (NH₄⁺) sob outras fontes nitrogenadas tais como ureia, nitrato (NO_{3⁻}) e nitrito (NO_{2⁻}), como foi observado em *P. yezoensis* (Amano & Noda, 1987). Analogamente, o NH₄⁺ foi a principal fonte de nitrogênio em com *P. umbilicalis* (Hernandez *et al.*, 1993) e em *P. dioica* Brodie & Irvine (Pereira *et al.*, 2008).

Wells *et al.* (2017) indicaram um menor valor nutricional em macroalgas que habitam a região equatorial quando comparado com aquelas das regiões com maior latitude. Porém, o presente estudo, analisando duas espécies da região subtemperada, reportaram altos valores nutricionais semelhantes aos reportados para regiões tropicais (Patarra *et al.*, 2011). Adicionalmente, este estudo evidenciou variação do conteúdo nutricional em função à temperatura, como foi reportado no teor de carboidratos, favorecida em alta temperatura (30 °C) na alga parda e na baixa temperatura (15 °C) na alga vermelha. Em contraposição ao nível de carboidratos, foi evidenciado que o teor de proteínas sob 30 °C diminuiu na alga parda e aumentou na alga vermelha, relacionado possivelmente à assimilação e armazenamento de nitrogênio. Nestas espécies de estudo foi evidenciado o padrão da relação inversa entre carboidratos e proteínas, descrito também para outras macroalgas marinhas (Mourandi-Givernaud *et al.*, 1993; Marinho-Soriano *et al.*, 2006).

O conteúdo de carboidratos nas espécies de estudo pode estar associado à presença de polissacarídeos sulfatados, dos tipos fucanos e galactanas para algas pardas e algas vermelhas, respectivamente. No estudo de Turan *et al.* (2017), *S. vulgare* apresentou maior rendimento de fucanos no outono e verão; e os menores valores no inverno. Em contraste, em *P. leucosticta* e

P. lucasii Levring, os altos valores de carboidratos foram reportados no inverno e valores menores no verão (Karsten, 1999). O estudo de Sfriso *et al.* (2017) analisando a variação sazonal dos polissacarídeos sulfatados em *Gracilaria*, evidenciou diferença significativa na produção de ágar com temperaturas em torno dos 15 °C e baixa produção acima dos 26 °C. Porém, existem algumas espécies com altas temperaturas o ano todo, como alga parda *Dictyota ciliolata* Sonder e a alga vermelha *Acanthophora muscoides* Bory na Austrália que apresentam porcentagens significativamente maiores de carboidratos no inverno do que no verão. Complementarmente aos carboidratos, as espécies de estudo nas diferentes condições de temperatura, apresentaram altos porcentagens da fibra dietética, maior que 38%, quando comparado com os reportados por Fleurence (2016) e Rioux *et al.* (2017).

A absorção de substâncias inorgânicas é devido à presença de carboidratos da parede celular que permite o armazenamento dos minerais, tais como cálcio, magnésio, potássio e sódio, já que possuem fortes propriedades de intercambio iônico e podem agir como cofatores de enzimas e proteínas (Krishnaiah *et al.*, 2008). O teor desses minerais nas macroalgas marinhas varia de 400 a 10070 mg/100 g MS (Ruperez, 2002; Krishnaiah *et al.*, 2008). No presente estudo, *S. stenophyllum* reportou valores desses minerais de 660 a 10515 mg/100 g MS e *P. spiralis* de 584 a 20417 mg/100 g MS, observando-se maior captura de minerais na alga vermelha. As espécies estudadas reportaram uma proporção maior no teor de potássio do que o teor de sódio, o qual possibilita o uso destas espécies de estudo como fontes de minerais promissoras para o consumo, já que segundo as recomendações dietéticas esses níveis estão dentro dos valores permitidos, podendo contribuir na redução da pressão arterial e obesidade (Smith *et al.*, 2010).

Em relação à temperatura, houve poucas alterações no teor de minerais nas espécies de estudo. Por exemplo, na alga vermelha o teor de zinco aumento de $5,43 \pm 0,08 \text{ mg}/100 \text{ g MS}$ reportado no controle para $6,41 \pm 0,10 \text{ mg}/100 \text{ g MS}$ em 30 °C. É possível que esse aumento tenha relação com funções de estabilidade da membrana (Norziah & Ching, 2000).

Como conclusão, *S. stenophyllum* exibiu maior sensibilidade na taxa de crescimento frente às flutuações de temperatura do que a *P. spiralis*. As duas espécies tiveram alterações na composição nutricional influenciada pela temperatura. Esse conhecimento pode servir como ferramenta para estimular a síntese de um determinado elemento que seja de interesse na indústria de alimentos ou farmacêuticas.

Referências bibliográficas

- Adams, J., Ross, A., Anastasakis, K., Hodgson, E., Gallagher, J., Jones, J. & Donnison, I. (2011). Seasonal variation in the chemical composition of the bioenergy feedstock *Laminaria digitata* for thermochemical conversion. Bioresour. Technol. 102: 226-234.
- Almada, C., Yoneshigue-Valentin, Y. & Nassar, C. (2008). Aspectos populacionais de Sargassum vulgare C. Agardh (Ochrophyta, Fucales) Na Ponta do Arpoador - Rio de Janeiro. Oecol. Bras. 12: 291-298.
- Amano, H. & Noda, H. (1987). Effect of nitrogenous fertilizers on the recovery of discoloured fronds of *Porphyra yezoensis*. Bot. Mar. 30: 467-473.
- ANVISA. (2008). Lista dos novos alimentos aprovados. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novosalimentos.htm
- AOAC Official method 993.21. (2001). Total dietary fiber in foods and food products with \leq 2% starch: non-enzimatic-gravimetric method.
- Chapman, A. & Craigie, J. (1977). Seasonal growth in *Laminaria iongicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. Mar. Biol. 40: 197-205.
- Che, Y., Fu, A., Hou, X., McDonald, K., Buchanan, B., Huang, W. & Luanb, S. (2013). Cterminal processing of reaction center protein D1 is essential for the function and assembly of photosystem II in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. (40): 16247-16252.
- Dawczynski, C., Schubert R. & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fiber in edible seaweed product. Food. Chem. 103: 891-899.
- Diniz, G., Barbarino, E., Oiano-Neto, J., Pacheco, S. & Lourenço, S. (2011). Gross chemical profile and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for five tropical seaweeds. Am. J. Plant. Sci. 2: 287-296.
- Fajardo, M., Alvarez, F., Pucci, O. & De Portela, M. Contenido de algunos nutrientes, minerales y variaciones estacionales em *Porphyra columbina*, alga comestible de la costa Patagônica Agentina. Arch. Latinoam. Nutr. 48: 260-264.
- FAO. (2014). The state of the world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome, p 223.
- FAO. (2016). The state of the world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all. Rome, p 204.
- FAO. (2018). The state of the world fisheries and aquaculture: meeting the sustainable development goals. Rome, p 227.
- Figueroa, F., Bonomi, J., Malta, E., Conde-Álvarez, R., Nitschke, U., Arenas, F., Matal, M., Connan, S., Abreu, M., Marquardt, R., Vaz-Pinto, F., Konotchick, T., Celis-Plá, P., Ordoñez, M., Ruiz, E., Flores, P., De los Ríos, J., Kirke, D., Chow, F., Nassar, C., Robledo, D., Pérez-Ruzafa, A., Bañares-España, E., Altamirano, M., Jiménez, C., Korbee, N., Bischof, K. & Stengel, D. (2014). Short-term effects of increasing CO₂,

nitrate and temperature on three Mediterranean macroalgae: biochemical composition. Aquat. Biol. 22: 177-193.

- Fleurence (2016). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Food. Sci. Tech. 10: 25-28.
- Hernandez, I., Corzo, A., Gordillo, F., Robles, M., Saez, E., Fernandez, J. & Niell, F. (1993). Seasonal changes of gametophytic form of *Porphyra umbilicalis*: nitrogen and carbon. Mar. Ecol. Prog. 99: 301-311.
- Hwang, R., Tsai C. & Lee, T. (2004). Assessment of temperature and nutrient limitation on seasonal dynamics among species of *Sargassum* from a coral reef in Southern Taiwan. J. Phycol. 40: 463-473.
- Joly, A. & Yamaguishi, N. (1963). The life history of *Porphyra atropurpurea* (Olivi) de Toni. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de São Paulo. 19: 1-17.
- Karsten, U. (1999). Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. New Phytol. 143: 561-571.
- Kim, J., Kraemer, G., Neefus, C., Chung, K. & Yarish, C. (2007). Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. J. Appl. Phycol. 19: 431-440.
- Krishnaiah, D, Sarbatly, R, Prasad, D. & Bono, A. (2008). Mineral content of some seaweeds from Sabah's South China Sea. Asian J. Sci. Res. 1: 166-170.
- Kumar, S., Sahoo, D. & Levine, I. (2015). Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. Algal. Res. 9:117-125.
- Kumar, V. (1993). Biochemical constituents of marine algae from Tuticorin coast. Indian J. Mar. Sci. 22: 138-140.
- Lapointe, B., West, L., Sutton, T. & Hu, C. (2014). Ryther revisited: nutrient excretions by fishes enhance productivity of pelagic *Sargassum* in the western North Atlantic Ocean.J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 458: 46-56.
- Lobban, C. & Harrison, P. (1994). Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press. 366p.
- Marinho-Soriano, E., Fonseca, P., Carneiro, M. & Moreira, W. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. Biores. Tech. 97: 2402-2406.
- Mourandi-Givernaud, A., Givernaud, T., Morvan, H. & Cosson, J. (1993). Annual variations of the biochemical composition of *Gelidium latifolium* (greville) Thuret et Bornet. Hydrobiologia. 260: 607-612.

- Murugaiyan, K. & Sivakumar, K. (2008). Seasonal variation in elemental composition of Stoechospermum marginatum (Ag.) Kutz and Sargassum wightii (Greville Mscr.) J.G. Agardh in relation to chemical composition of seawater. Biointerfaces. 64: 140-144.
- Norziah, M. & Ching, C. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. Food. Chem. 68: 69-76.
- Osman, N., El-Manawy, M. & Amin, A. (2011). Nutritional composition and mineral content of five macroalgae from Red sea. Egyptian J. Phycol. 12:1-14.
- Patarra, R., Paiva, L., Neto, A., Lima, E. & Baptista, J. (2011). Nutritional value of selected macroalgae. J. Appl. Phycol. 23:205-208.
- Paula, E. & Oliveira Filho, E. (1980). Aspectos fenológicos de duas populações de Sargassum cymosum (Phaeophyta Fucales) do litoral de São Paulo, Brasil. Boletim da Universidade de São Paulo. 8: 21-39.
- Paula, E. (1994). Influência da temperatura, luz e salinidade no crescimento das plântulas de Sargassum cymosum C. Agardh var. cymosum (Phaeophyta - Fucales). Rev. Bras. Botânica. 17: 53-60.
- Pedersen, A., Kraemer, G. & Yarish, C. (2004). The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra* from Long Island Sound (USA). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 312: 235-252.
- Penniman, C., Mathieson, A. & Penniman C. (1986). Reproductive phenology and growth of *Gracilaria tikvahiae* Mclachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. Bot. Mar. 29: 147-154.
- Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I. (2008). Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. J. Phycol. 43: 107-118.
- Renaud, S. & Luong-Van, J. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. J. Appl. Phycol. 18: 381–387.
- Rioux, L., Beaulieu, L. & Turgeon, S. (2017). Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. Food. Hydrocoll. 68: 255-265.
- Rosenberg, C. & Ramus, J. (1982). Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): Soluble nitrogen and reserve carbohydrates. Mar. Biol. 66: 251-259.
- Ruangchuay, R. & Masahiro, M. (2003). Physiological responses of blade and conchocelis of *Porphyra vietnamensis* Tanaka et Pham-Hoang Ho (Bangiales, Rhodophyta) from Thailand in culture. Algae. 18: 21-28.
- Ruperez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweed. Food. Chem. 79: 23-26.

- Schiener, P., Black, K., Stanley, M. & Green, D. (2014). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. J. Appl. Phycol. 1: 1-11.
- Sfriso, A., Gallo, M. & Baldi, F. (2017). Seasonal variation and yield of sulfated polysaccharides in seaweeds from the Venic. Bot. Mar. 60: 339-349.
- Smith, J., Summers, G. & Wong, R. (2010). Nutrient and heavy metal content of edible seaweeds in New Zealand. New. Zeal. J. Crop. Hort. 38: 19-28.
- Turan, G., Cirik, S., Tekogul, H., Koru, E., Karacalar, U. & Seyhaneyildiz, S. (2017). Determination of the seasonal yields of total fucose and fucoidan yields in brown seaweeds (order Fucales) distributed along the coast of Urla (Izmir, T). J. Aquac. Fisheries. 1: 1-5.
- Veloso, A. & Széchy, M. (2008). Variações espaciais e temporais no desenvolvimento vegetative e reprodutivo da macroalga *Sargassum* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae). Oecol. Bras. 12: 275-290.
- Wan, A., Davies, S., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R. & Johnson, M. (2018). Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. Aquaculture. 1: 1-35.
- Weis, E. (1980). Reversible heat-inactivation of the Calvin cycle: a possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis. Planta. 151: 33-39.
- Wells, M., Potin, P., Craigie, J., Raven, J., Merchant, S., Helliwell, K., Smith, A., Camire, M. & Brawley, S. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. J. Appl. Phycol. 29: 949-982.
- Young, E., Dring, M., Savidge, G., Birkett, D. & Berges, J. (2007). Seasonal variations in nitrate reductase activity and internal N pools in intertidal brown algae are correlated with ambient nitrate concentrations. Plant. Cell. Environ. 30: 764-774.



Performance fotossintetizante e perfil de aminoácidos livres totais de *Pyropia spiralis* frente à temperatura

4.1. Introdução

As macroalgas marinhas das zonas entremarés, mediolitoral, estão periodicamente expostas a uma diversidade de condições abióticas como irradiância, temperatura, dessecação, estresse osmótico e limitação de nutrientes, que em situações extremas provocam alterações nas taxas metabólicas dos organismos (Davison & Pearson, 1996). Algas que habitam o mediolitoral superior são consideradas mais tolerantes às flutuações ambientais que aquelas que habitam a região média ou inferior da faixa do mediolitoral inferior (Frazer *et al.*, 1988), devido ao desenvolvimento de diversas estratégias morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que possibilitam sua sobrevivência nesses ambientes (Lüning, 1990; Sampath-Wiley, 2008).

Espécies de *Porphyra/Pyropia* correspondem a uma das poucas algas capazes de habitar a região superior do limite do mediolitoral ou ainda crescer em locais onde chegam apenas os borrifos das ondas (Lipkin *et al.*, 1993). Este gênero apresenta variações quanto a características morfológicas (p. ex. espessura do talo, forma e tamanho) e fisiológicas (p. ex. composição pigmentar), bem como diferentes respostas frente aos fatores ambientais (Watanabe *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2016). Devido à natureza séssil e sob condições extremas de exposição ao ar, alta luminosidade e elevada temperatura impostas pelo limite superior do mediolitoral, possuem estratégias-chave de aclimatação para a sobrevivência, e assim, minimiza efeitos danosos resultantes do estresse oxidativo.

A temperatura e o fotoperíodo são os principais fatores que regulam o crescimento, desenvolvimento e estágio reprodutivo de *Porphyra/Pyropia*. Esses fatores podem controlar a produtividade primária do gênero, sendo o nitrogênio e o fósforo os nutrientes limitantes naquela produção (Hanisak *et al.*, 1983). Adicionalmente, a disponibilidade de nutrientes, além da temperatura, pode regular enzimas-chave no metabolismo fotossintetizante, tais como a anidrase carbônica e a nitrato reductase, as quais participam na assimilação e estocagem de carbono e nitrogênio (Lobban & Harrison, 1994). Portanto, as fontes nitrogenadas como os ácidos nucléicos, aminoácidos, proteínas, entre outras, apresentam variações decorrente das variações ambientais e ao longo do ano (Hernandez *et al.*, 1993).

Mundialmente, *Porphyra/Pyropia* constitui uma das algas mais cultivadas e comercializadas, amplamente utilizada na elaboração do *sushi* e de outros alimentos populares da culinária asiática. A porção comercial, folhosa e macroscópica (fase gametofítica), é

predominante durante o inverno, alternando-se com um estágio microscópico e filamentoso (fase esporofítica ou conchocelis) presente ao longo de todo o ano crescendo sobre conchas. Este gênero apresenta o ciclo de vida bifásico com alternância de gerações. A eficiência fotossintetizante para as fases esporofítica e gametofítica apresenta diferenças relacionadas às temperaturas que caracterizam a ocorrência de cada uma das fases do histórico de vida. Em condições de baixa temperatura, a fase gametofítica destas espécies pode apresentar desidratação celular pela formação de cristais de gelo, o qual pode danificar a membrana plasmática e dos tilacoides, reduzindo assim a taxa fotossintetizante (Dudgeon *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 2017). No entanto, a fotossíntese de gametofítica também sofre alterações no desempenho fotossintetizante (Watanabe *et al.*, 2014, 2017). Porém, para limitar os danos frente às mudanças de alta temperatura, é desencadeado uma regulação positiva de sistemas antioxidantes (Shi *et al.*, 2017).

O recrutamento sazonal da fase gametofítica parece ser controlado pela temperatura e pelo fotoperíodo (Brown *et al.*, 1990; Israel, 2010). Dessa forma, estudos sobre crescimento e fotossíntese, assim como a sua composição química, em resposta à temperatura são essenciais para entender a termotolerância e susceptibilidade de uma alga. Além disso, espécies potenciais de interesse podem futuramente vir a constituir um recurso interessante de exploração, com inúmeras propriedades funcionais e bioatividades, assim como podem fornecer conhecimento sobre variações fisiológicas da espécie frente às mudanças climáticas.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a tolerância de *Pyropia spiralis* frente a condições variáveis de temperatura, mediante a análise das respostas fotossintetizantes e sua relação com o balanço e alocação de fontes nitrogenadas como os aminoácidos.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material de estudo e delineamento experimental

A coleta de *P. spiralis* foi feita em agosto de 2015 na Praia de Cibratel 1, litoral sul do estado de São Paulo (24°13'31"S e 46°51'7"W). Após triagem e lavagem, o material foi aclimatado por uma semana em condições controladas de laboratório e, em seguida, submetidas às condições experimentais nos tratamentos de 15, 20, 25 (controle), 30 e 35 °C, segundo procedimentos e condições descritos em detalhe em Materiais e Métodos Gerais, no item M.3.

Parâmetros fotossintetizantes, conteúdos de pigmentos e proteínas solúveis foram avaliados antes de começar o tratamento experimental (Inicial) e nos dias 1, 3, 5 e 7. Porém, as amostras na condição de 35 °C foram avaliadas apenas até o terceiro dia, devido à evidente necrose dos talos. No período Inicial e após sete dias nos diferentes tratamentos, foram também

avaliados os espectros de absorção UV-visível dos extratos utilizados para a quantificação do teor de pigmentos e também foram quantificados os aminoácidos livres totais.

4.2.2. Desempenho fotossintetizante

Os parâmetros fotossintetizantes foram analisados por meio da mensuração da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* usando um fluorômetro portátil de pulso de amplitude modulada (PAM-2500, Walz, Alemanha), como descritos no item 1.2.2 do Capítulo I. Além dos parâmetros da dissipação de energia [Y(PSII), Y(NO) e Y(NPQ)], foi o rendimento quântico máximo (F_v/F_m).

A curva de fotossíntese-irradiância (ETR x PAR) e os parâmetros estimados como o ETRmax, α e Ik, foram determinados conforme o descrito no item 1.2.2 do Capítulo I. Na curva ETR x PAR foi considerado o valor de 0,15 como a fração da clorofila *a* associada ao PSII para algas vermelhas (Grzymski *et al.*, 1997).

4.2.3. Pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis e espectro de absorção

O teor de pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas, clorofila a e carotenoides) e de proteínas solúveis foram analisados a partir de amostras de 70 mg de massa fresca (MF), seguindo o método descrito em Harb *et al.* (2018).

O material foi triturado em nitrogênio líquido e extraído com 1 mL de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 5,5) e depois centrifugado a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C, sendo denominado extrato tamponado. O sobrenadante deste extrato foi utilizado para a determinação de pigmentos hidrossolúveis (ficobiliproteínas) e proteínas solúveis totais.

O precipitado do extrato tamponado foi ressuspendido em 1,5 mL de metanol e foi extraído por 3 h a 4 °C e protegido da luz. Após essa etapa, foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C e este extrato foi denominado de metanólico. Com o extrato metanólico foram quantificados os pigmentos lipossolúveis (clorofila a e carotenoides).

As ficobiliproteínas (FE: ficoeritrina, FC: ficocianina e AFC: aloficocianina) foram estimadas segundo as fórmulas de Kursar *et al.* (1983): FE (μ g g⁻¹ MF) = (155,8 x A₄₉₈) – (40 x A₆₁₄) – (10,5x A₄₉₈); FC (μ g g⁻¹ MF) = (151,1 x A₆₁₄) – (99,1 x A₆₅₂); e AFC (μ g g⁻¹ MF) = (181,3 x A₆₅₂) – (22,3 x A₆₁₄); sendo A a absorbância no respectivo comprimento de onda.

O teor de proteínas solúveis totais foi avaliado seguindo o método espectrofotométrico de Bradford (Bradford, 1976), usando o reagente de análise de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, EUA). Como padrão foi utilizado albumina de soro bovino (2 - 16 μ g.mL⁻¹, y = 0,0415x - 0,0497, R² = 0,9903). O teor de proteínas solúveis totais foi expresso em μ g.g⁻¹ MF.

Com os extratos metanólicos foi quantificada a clorofila *a* mediante a fórmula descrita em Harb *et al.* (2018), e os carotenoides segundo Lichtenthaler & Buschmann (2001); com as seguintes fórmulas: Clorofila *a* (μ g g⁻¹ MF) = (12,61 x A₆₆₄) e Carotenoides (μ g g⁻¹ MF) = { $1000 \times [A_{470} - 1,63 \times Concentração de clorofila a]$ } / 221; sendo A a absorbância no respectivo comprimento de onda.

Adicionalmente, foram analisados os espectros de absorção dos extratos tamponados e metanólicos nos comprimentos de onda de 200 a 700 nm, usando um volume de 200 µL de extrato em microplaca de 96 poços e um espectrofotômetro UV-visível de microplacas (Epoch, Biotek, EUA).

4.2.4. Aminoácidos livres totais

O perfil de aminoácidos livres totais foi analisado como descritas no item 1.2.5. do Capítulo II, seguindo a programação de Egydio *et al.* (2013). A identificação foi feita através da comparação com os padrões de aminoácidos (Sigma-Aldrich, EUA) e quantificados com curvas de calibração em concentrações de 10 - 200 nmol.mL⁻¹. Foi construído um *Heatmap*, normalizando os valores de 1 a 0 obtidos da quantificação dos aminoácidos.

4.2.5. Análises estatísticas

Todas as variáveis foram avaliadas com cinco repetições. Os dados de desempenho fotossintetizante, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e teor de proteínas solúveis foram analisados com ANOVA fatorial (sendo o co-fator: tempo). Os aminoácidos livres foram avaliados com ANOVA unifatorial. Todas as variáveis foram previamente avaliadas quanto a sua normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade com o teste de Bartlett. Em tendo diferenças significativas, foi aplicado o teste de comparação de médias *post hoc* de Newman-Keuls. As análises foram realizadas utilizando o programa Statistica v. 12 (p < 0,05).

4.3. Resultados

O efeito da temperatura no desempenho fotossintetizante e na composição química de *P. spiralis* foi estudado nas condições de 15, 20, 25 (controle), 30 e 35 °C. Após três dias de exposição às diferentes temperaturas, as algas submetidas a 35 °C evidenciaram notável deterioração e necrose do talo (Fig. 4.1). As algas dos demais tratamentos apresentaram aspecto geral do talo semelhante ao tratamento controle (dados não mostrados). Por essa razão, o experimento do tratamento de 35 °C foi finalizado no terceiro dia de exposição.



Figura 4.1. Aspecto geral do talo de *Pyropia spiralis* após três dias de experimento dos tratamentos (A) controle a 25 °C e (B) de 35 °C. Escala de 1 cm.

4.3.1. Desempenho fotossintetizante

O rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e o rendimento quântico efetivo [Y(PSII)] não foram diferentes estatisticamente entre os tratamentos para o mesmo período experimental ou ao longo do tempo para o mesmo tratamento de temperatura, exceto para o tratamento de 35 °C que mostrou redução no rendimento em cerca de 80% após três dias de experimento (Fig. 4.2). O F_v/F_m foi maior que o Y(PSII) para todos os casos. A dissipação não fotoquímica não regulada [Y(NO)] e a dissipação não fotoquímica regulada [Y(NPQ)] mostraram pequenas variações entre os tratamentos ou entre o tempo, sendo visivelmente significativo para o tratamento de 35 °C (Fig. 4.2).

Os parâmetros fotossintetizantes do tratamento controle sob 25 °C, para qualquer período experimental, não apresentaram diferenças estatísticas com o tempo Inicial.



Figura 4.2. Dissipação de energia de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas ao longo do tempo (Inicial e nos dias 1, 3, 5 e 7), estimados como rendimento quântico máximo (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo ou dissipação fotoquímica [Y(PSII)], dissipação não fotoquímica não regulada [Y(NO)] e dissipação não fotoquímica regulada [Y(NPQ)]. Diferenças estatísticas (p < 0.05) estão denotadas como letras minúsculas em branco para Y(PSII), letras maiúsculas em preto para Y(NO) e letras minúsculas em preto para [Y(NPQ)].

As curvas de fotossíntese-irradiância (ETR x PAR) foram agrupadas separadamente segundo os tempos 1, 3, 5 e 7 dias e apresentadas, respectivamente, nas Figuras 4.3A-D. A resposta obtida nas amostras no tempo Inicial também foi incluída em cada um dos gráficos, a fim de se comparar a resposta da alga antes de iniciar o experimento. Em cada um dos períodos experimentais, a dinâmica das curvas de ETR x PAR se mostrou semelhante e sem a presença de resposta de fotoinibição. Para cada curva, foi calculada a área sob a curva e os dados foram avaliados estatisticamente (dados não mostrados). Os valores de área não apresentaram variações significativas entre os tratamentos, exceto nas amostras do tratamento de 35 °C.

Os parâmetros fotossintetizantes, ETRmax, Ik e α são apresentados na Tabela 4.1. Todos os parâmetros corroboram as diferenças significativas já descritas para fotossíntese, sendo as diferenças evidenciadas apenas para as amostras do tratamento de 35 °C no terceiro dia de experimento.



Figura 4.3. Curvas de indução da fotossíntese estimada como ETR (taxa de transporte de elétrons) *versus* intensidade luminosa (PAR) (média \pm DP; n = 5) de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas nos tempos experimentais (A) dia 1, (B) dia 3, (C) dia 5 e (D) dia 7. A respectiva curva do período Inicial está inclusa para cada tempo experimental.

Tabela 4.1. Parâmetros fotossintetizantes estimados a partir das curvas de ETR x PAR como ETR máximo (ETRmax), ponto de saturação luminosa (Ik) e eficiência fotossintetizante (α) de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas nos diferentes tempos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0,05), analisados separadamente para cada tempo experimental.

Tempo	Temperatura	ETRmax Ik		α	
(dias)	(°C)	(µmol elétrons.m ⁻² .s ⁻¹)	(µmol fótons.m ⁻² .s ⁻¹)	(elétron/fóton)	
Inicial	25	$4,55 \pm 1,27$ ab	101,89 ± 15,60 a	$0{,}048 \pm 0{,}002 \text{ bc}$	
1	15	5,59 ± 1,68 a	88,59 ± 12,77 a	$0,049 \pm 0,002 \text{ bc}$	
	20	$4,30 \pm 0,57$ ab	74,63 ± 22,53 a	$0{,}059\pm0{,}008$ abc	
	25	$3,79 \pm 0,67$ ab	74,55 ± 15,00 a	$0{,}058\pm0{,}008$ abc	
	30	$4,19 \pm 1,12$ ab	54,55 ± 9,66 a	$0,061 \pm 0,008$ abc	
	35	$3,33 \pm 0,28$ ab	60,61 ± 15,36 a	$0,044 \pm 0,003 \text{ b}$	
3	15	$3,48 \pm 0,66$ ab	74,47 ± 10,66 a	$0,057 \pm 0,005$ abc	
	20	$3,56 \pm 0,87$ ab	78,63 ± 27,22 a	$0,054 \pm 0,006$ abc	
	25	$\textbf{3,09} \pm \textbf{0,89} \text{ ab}$	$53,\!28 \pm 16,\!26$ a	$0{,}055\pm0{,}005$ abc	
	30	$2,70 \pm 0,15$ b	49,13 ± 3,46 a	$0,056 \pm 0,005$ abc	
	35	$1,09 \pm 0,05 \text{ c}$	$22,81 \pm 0,05$ b	$0,012 \pm 0,005 \text{ d}$	
5	15	$3,49 \pm 0,38$ ab	51,14 ± 13,07 a	$0,055 \pm 0,012$ abc	
	20	$3,34 \pm 0,33$ ab	$63,80 \pm 6,89$ a	$0{,}059\pm0{,}010$ abc	
	25	$2,38 \pm 0,13$ b	45,39 ± 4,37 a	$0,053 \pm 0,011$ abc	
	30	$3,32 \pm 0,06$ ab	$67,15 \pm 12,75$ a	$0,055 \pm 0,010$ a	
	35	n.a.	n.a.	n.a.	
7	15	$3,12 \pm 0,43$ ab	43,01 ± 8,39 a	0,068 ± 0,002 a	
	20	$3,16 \pm 1,44$ ab	49,94 ± 22,01 a	$0,063 \pm 0,007 \text{ ab}$	
	25	$3,\!87\pm2,\!19~ab$	$76,46 \pm 52,22$ a	$0{,}052\pm0{,}004~abc$	
	30	$3,\!17\pm0,\!40~b$	59,39 ± 11,94 a	$0,054 \pm 0,004$ abc	
	35	n.a.	n.a.	n.a.	

n.a. não se aplica, pois nesse período expeimental a fotossíntese não foi mensurada.

4.3.2. Pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis totais e espectro de absorção

As concentrações de ficoeritrina (Fig. 4.4A), ficocianina (Fig. 4.4B) e aloficocianina (Fig. 4.4C) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e nem ao longo do período experimental. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas, no quinto e sétimo dia de experimentação é possível observar uma tendência de diminuição do teor de ficobiliproteínas.

O conteúdo de proteínas solúveis totais (Fig. 4.4D) apresentou diminuição significativa no tratamento de 35 °C no dia 3. Adicionalmente, foi evidenciada redução no teor de proteínas nos tratamentos de 25 e 30 °C no sétimo dia.

O conteúdo de clorofila *a* (Fig. 4.4E) não teve diferenças significativas entre os tratamentos, quando avaliados separadamente para cada tempo experimental, exceto a partir do terceiro dia no tratamento de 35 °C. No entanto, ao longo do tempo é possível verificar uma redução, embora não significativa, no final do experimento (dia 7), principalmente nos tratamentos de 15 a 25 °C. O teor de carotenoides totais (Fig. 4.4F) não apresentou diferença entre os tratamentos, exceto para o tratamento de 35 °C nos dias 1 e 3. Ao longo do tempo, a concentração de carotenoides também teve redução no final do experimento.



Figura 4.4. Conteúdo de (A) ficoeritrina, (B) ficocianina, (C) aloficocianina, (D) proteínas solúveis totais, (E) clorofila *a* e (F) carotenoides totais de *Pyropia spiralis* (média \pm DP, *n* = 5) sob diferentes temperaturas ao longo do tempo. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ao longo do tempo (*p* < 0,05). As medições dos pigmentos fotossintetizantes nas amostras de 35 °C não foram feitas nos dias 5 e 7.

Os espectros de absorção nos comprimentos de onda UV-visível, de 200 a 700 nm, dos extratos tamponados (Fig. 4.5 A-B) e dos extratos metanólicos (Fig. 4.5 C-D) de *P. spiralis*

mostraram diferentes padrões de bandas de absorção. Nos extratos tamponados, na faixa do espectro UV (Fig. 4.5A), é possível identificar bandas máximas de absorção em 210 a 228 nm, 246 a 266 nm e 310 a 342 nm; já na faixa do espectro visível (Fig. 4.5B), bandas máximas de absorção foram distinguidas em 408 a 420 nm, 484 a 508 nm, 516 a 574 nm e 596 a 642 nm. Os extratos metanólicos, na faixa do espectro UV (Fig. 4.5C), tiveram as bandas máximas de absorção em 204 a 218 nm e 320 a 344 nm; e na faixa do espectro visível (Fig. 4.5D) bandas máximas de absorção foram verificadas em 402 a 456 nm, 464 a 480 nm e 642 a 682 nm.



Figura 4.5. Espectro de absorbância de 200 a 700 nm dos extratos (A-B) tamponados e (C-D) metanólicos de *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas no tempo Inicial e após sete dias do período experimental. Os dados representam a média de cinco repetições.

4.3.3. Aminoácidos livres totais

O teor de cada um dos aminoácidos de *P. spiralis* apresentou diferenças significativas entre os tratamentos após sete dias de experimentação (Fig. 4.6), exceto para arginina e lisina. No geral, o teor dos aminoácidos, individualmente, tendeu a aumentar conforme incrementava a temperatura, situação que foi também evidenciada no teor de aminoácidos totais (Fig. 4.6). Essa resposta de incremento foi observada para os aminoácidos aspartato, asparagina, cisteína, fenilalanina, GABA, glicina, glutamina, glutamato, histidina, isoleucina, leucina, metionina, ornitina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina.

A fim de analisar a resposta global na composição e conteúdo de aminoácidos, foi realizada uma análise de agrupamento associado a um gráfico de *heatmap* (Fig. 4.7) que evidencia o aumento geral no teor dos aminoácidos nas temperaturas de 25 e 30 °C, mas especialmente sob 30 °C. Certos aminoácidos apresentaram menores concentrações sob temperaturas abaixo do que 25 °C (controle). A análise de agrupamento evidenciou que o tratamento de 30 °C forma um grupo separado dos demais, tendo agrupado as respostas dos tratamentos de 20 e 25 °C. Por sua vez, a análise de agrupamento mostra três grandes agrupamentos de aminoácidos, sendo um primeiro grupo constituído por ornitina, cisteina, metionina, GABA e histidina com acréscimo nos 25 e 30 °C, um segundo grupo composto por serina, trenina, gicina, gutamat, fenilalanina, triptofano, leucina, isoleucina, valina, asparagina, aspartato, tirosina, glutamina e arginina com acréscimo nos 30 °C, e um terceiro grupo composto por lisina e alanina.



Figura 4.6. Conteúdo de aminoácidos de *Pyropia spiralis* (media \pm DP; n = 5) sob diferentes temperaturas no tempo Inicial e após sete dias de período experimental. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).



Figura 4.7. *Heatmap* e análise de cluster dos aminoácidos em *Pyropia spiralis* sob diferentes temperaturas (n = 5) no tempo Inicial e após sete dias de período experimental.

4.4. Discussão

Medidas da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* têm sido uma ferramenta útil para examinar a performance fotossintetizante em resposta a fatores abióticos (Guidi & Degl'Innocenti, 2011). No presente estudo, avaliando o efeito da temperatura na alga vermelha *P. spiralis*, evidenciou-se uma tendência semelhante, sem apresentar diferenças significativas, entre os tratamentos de 15 a 30 °C no rendimento quântico máximo (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo [Y(PSII)] e na dissipação de energia. Analogamente, Watanabe *et al.* (2014) avaliando a performance fotossintetizante da fase gametofítica de *P. tenera* reportou o F_v/F_m de 0,55 em baixas temperaturas até 22,7 °C (temperatura ótima). Assim, nestas espécies pode se indicar que é utilizado cerca de 55% da energia incidente para os processos fotossintetizantes, embora tenham potencial de absorver em torno de 65% de luz, como foi evidenciado com os resultados do rendimento quântico ótimo.

Em contraste, no tratamento de 35 °C houve uma redução no valor de F_v/F_m de 0,62 para 0,25. Essa resposta foi semelhante ao observado em *P. tenera*, no qual de 0,55 foi restringido a 0,14 em 36 °C (Watanabe *et al.*, 2014) e em *P. yezoensis*, que foi de 0,6 a 0,25 (Watanabe *et al.*, 2017). Frente à diminuição na taxa fotossintetizante, observou-se uma

correlação positiva com a redução de pigmentos fotossintetizantes (Louda *et al.*, 1998). No presente estudo foram observadas, desde no terceiro dia de experimento, reduções no teor da clorofila, possivelmente associada com a clivagem do anel macrocíclico da clorofila (Louda *et al.*, 1998). Concomitantemente, *P. spiralis* apresentou necrose geralizada no talo aos 35 °C, sendo uma condição deletéria para a espécie como foi observado desde o terceiro dia de experimento cuja sensibilidade foi evidenciada com redução da performance fotossintetizante, perda de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas solúveis.

Em altas temperaturas, a capacidade da transferência da energia luminosa que migra da ficoeritrina à ficocianina, seguindo para a aloficocianina e finalmente à clorofila *a* é inibida (Shi *et al.*, 2017). Diferentemente de outros dados da literatura como o reportado em Sampath-Wiley *et al.* (2008), o presente estudo não apresentou diferenças significativas na concentração das ficobiliproteínas, e se evidenciaram perfis semelhantes dos espectros visíveis nos extratos tamponados, com bandas de absorção máxima em 540 a 570 nm, 610 a 620 nm e 650 a 655 nm. Estes pigmentos accesórios além de contribuir na absorção e captura de luz utilizada nos processos fotossintetizantes, possuem propriedades antioxidantes (Holdt & Kraan, 2011; Lage-Yusty *et al.*, 2013). Contreras-Porcia *et al.* (2011) associam um mecanismo de tolerância ao estresse oxidativo em *P. columbina* em nível do cloroplasto, relacionado às ficobiliproteínas (ficoeritrina e ficocianina), pois poderiam agir dissipando o excesso de energia como calor. Isto é indiretamente apoiado pelo estudo de Romay *et al.* (2003), que descreveram funções antioxidantes devido à capacidade das ficobiliproteínas de coletar diretamente diferentes tipos de espécies reativas de oxigenio e reduzir a peroxidação lipídica.

O estudo de Xu *et al.* (2013), analisando *P. haitanensis* Chang & Zheng sob altas temperaturas, clasificaram as proteínas em nove categorias funcionais: fotossíntese (27,12%), metabolismo energético (22,03%), outras vias metabólicas (11,86%), homeostase redox (11,86%), resposta a estímulos ambientais (8,47%), proteínas envolvidas na transcrição e tradução (6,78%), proteínas relacionadas ao citoesqueleto (5,08%), proteínas que medeiam a transdução de sinal (1,69%) e proteínas desconhecidas (5,08%). Neste estudo, houve uma redução no teor de proteínas solúveis totais em altas temperaturas, a qual pode estar relacionada a processos de desnaturação e desdobramento, como também foi observado em *P. haitanensis* (Shi *et al.*, 2017). A degradação proteica pode ser devido ao rearranjo de peptídeos ou à disponibilização de aminoácidos livres para reciclagem, evidenciando diminuição das proteínas relacionadas ao proteínas relacionadas ao PSII, ficobiliproteínas e proteínas no ciclo de Calvin (Shi *et al.*, 2017).

Tala & Chow (2014), analisando a alga vermelha *Porphyra*, evidenciaram um padrão geral de redução da eficiência fotossintetizante, pigmentos e proteínas solúveis em períodos quentes, acompanhado por um aumento na capacidade antioxidante. Nas algas vermelhas, os carotenoides, os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e as enzimas antioxidantes

(superóxido dismutase, peroxidase e catalase) podem constituir linhas de defesa mais ativas que as substâncias fenólicas. Por exemplo, em *P. umbilicalis* foi sugerido que o conteúdo de carotenoides contribui como mecanismo de proteção agindo mais como antioxidantes do que como pigmentos fotossintetizantes (Sampath-Wiley *et al.*, 2008). Neste estudo, pode se relacionar que a luteína, o principal carotenoide para o gênero, com bandas de absorção máxima em 418, 444 e 474 nm (Karrer & Jucker, 1948), pode estar envolvida no mecanismo de proteção, agindo como antioxidante (Jahns & Holzwarth, 2012).

A exploração da composição geral de extratos de algas mediante o estudo do espectro de absorção é uma ferramenta útil para elucidar as principais classes químicas (Schmitz *et al.*, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2018), assim como para determinar possíveis funções em resposta às variações de temperatura. Os espectros ultravioleta dos extratos tamponado e metanólico apresentaram bandas de absorção relacionados provavelmente com acetogeninas, uma vez que teve absorbância máxima em torno de 210 a 230 nm (Maschek & Baker, 2008); substâncias fenólicas com absorção entre os 250 a 270 nm, como por exemplo a flavona apigenina com bandas de absorção máxima em 267 e 336 nm (Shoubaky *et al.*, 2016); os MAAs com absorbância nos 310 a 346 nm (Rozema *et al.*, 2002); e aminoácidos que absorbem em torno de 270 a 280 nm. Aquelas substâncias podem representar fontes nitrogenadas disponíveis que seriam liberadas como mecanismo de proteção ou como fonte de reserva, como por exemplo, os MAAs (Korbee *et al.*, 2006).

Existem estudos que sugerem o acúmulo de alanina em resposta à exposição a condição de estresse, como anóxia e temperaturas extremas (Nissim et al., 1992; Ye et al., 2013). Ye et al. (2013) reportaram acúmulo desse aminoácido quando analisaram P. haitanensis em condições de altas temperaturas. Monselise et al. (2005) propuseram que a alanina é um sinal de estresse primário universal expresso pelas células. Assim, pode se indicar que as temperaturas analisadas em P. spiralis, exceto no controle, provocaram alterações no metabolismo celular. De forma geral, o presente estudo evidenciou uma tendência de acréscimo no conteúdo dos aminoácidos, sendo o tratamento de 30 °C aquele que reportou maior quantidade de cisteína, glicina e glutamato, os quais participam na constituição da glutationa, importante nos processos antioxidativos. Além disso, nessa temperatura houve aumento do teor de aminoácidos asparagina, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, treonina, triptofano e valina, elementos relacionados a mecanismos de osmoproteção (Ye et al., 2013). Esta situação pode ser aproveitada sob condições de cultivo ou de colheita, quando níveis diferenciais de aminoácidos sejam objeto de interesse. Por exemplo, o incremento de isoleucina, leucina e valina, pertencentes aos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), poderiam ser aproveitados como suplemento funcional.

A performance fotossintetizante de *P. spiralis*, com poucas oscilações entre 15 a 30 °C, provavelmente é resultado da estabilidade fotoquímica dos estados excitados dos singletos nos

centros de reação, mediante a dissipação de excesso energético em forma de calor, um mecanismo de extinção não-fotoquímica que impede a ocorrência de fotoinibição da maquinaria fotossintetizante. Os mecanismos de dissipação de energia não-fotoquímica em espécies de *Porphyra/Pyropia* apresentam estados de transição mais ativos do que outras espécies de macroalgas, podendo-se adaptar sob intensidades de luz pelo fluxo cíclico no PSII (Figueroa *et al.*, 2003) ou em condições de dessecação com ativação de sistemas antioxidantes (Contreras-Porcia *et al.*, 2011). Com as poucas alterações frente às flutuações de temperatura como evidenciado neste estudo, é possível indicar a tolerância deste gênero para habitar a região do mediolitoral superior.

Existe uma tendência sazonal no histórico de vida deste gênero, apresentando duas gerações, cujo gametófito folhoso experimenta as estações de inverno e primavera e o esporófito filamentoso (conchocelis) se desenvolve durante os meses de verão sob condições ambientais adversas, sendo mais tolerante às altas temperaturas (Luo *et al.*, 2014). Watanabe *et al.* (2016) mencionaram que o ciclo de vida heteromórfico é um mecanismo potencial para aprimorar a sobrevivência a condições sazonais. Estas respostas da fase gametofítica das espécies de *Porphyra/Pyropia* sob altas temperaturas, condições típicas de verão, induzem a liberação de esporos como mecanismo determinante para dar continuidade ao ciclo reprodutivo. Com a mudança de fatores ambientais, como a temperatura, a taxa de crescimento e o estado fisiológico do talo podem sofrer alterações principalmente na parede celular, a qual pode se tornar mais espessa e assim reduz o fotodano e os custos de reparo do PSII (Zhang *et al.*, 2013).

A estabilidade fotoquímica e do rendimento quântico de P. spiralis é corroborada pelos valores de ETRmax, os quais se mantiveram sem diferenças estatísticas entre 15 a 30 °C. De forma geral, Luning (1981) indica que as espécies do supralitoral e mediolitoral são frequentemente saturadas sob irradiância em torno a 150 µmol fótons.m⁻².s⁻¹. Neste estudo com P. spiralis que habita a região superior da faixa do médiolitoral, os índices de intensidade de saturação luminosa (Ik) estiveram entre 43 a 88 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ entre os 15 a 30 °C. Esses valores são semelhantes ao reportado por Watanabe et al. (2014) para P. tenera, com Ik entre 35 a 64 µmol fótons.m⁻².s⁻¹, sugerindo que diferentes espécies de *Porphyra/Pyropia* possuem baixos requerimentos luminosos, devendo consequentemente contar com um eficiente mecanismo de dissipação energética para evitar a fotoinibição, especialmente devido à sua ocorrência numa região do litoral extremamente estressante. Zhang et al. (2012) mostraram características fotofisiológicas diferentes em duas linhagens de Porphyra sob diferentes temperaturas, uma com maior eficiência de uso de luz e pigmentos fotossintetizantes em baixas temperaturas e outra com menor eficiência de uso de energia luminosa em temperaturas ótimas de crescimento. O estudo de Martins et al. (2018) ao comparar o desempenho fotossintizante de macroalgas vermelhas, pardas e verdes, indicaram que os menores valores de lk foram reportadas nas algas vermelhas, o qual está envolvido com a adaptação cromática para realizar

processos fotossintetizantes com baixa irradiância (Dring, 1981), semelhando um organismo com características de sombra (Necchi, 2004).

Como conclusão, com a análise dos parâmetros fotossintetizantes e o perfil químico de carotenoides, aminoácidos e proteínas em resposta à temperatura em *P. spiralis*, conseguiu-se estabelecer uma faixa de tolerância entre 15 a 30 °C, destacando que 30 °C pode ser uma temperatura para a indução de síntese de aminoácidos, como por exemplo de BCAAs que possuem propriedades funcionais. Ademais, a espécie de estudo foi susceptível aos 35 °C, o qual indica que o aumento da temperatura, produto das mudanças climáticas globais ou outra ação antrópica, pode comprometer a sobrevivência da espécie. Porém, esta espécie possui histórico de vida sazonal e com alternância de gerações, o que poderia sevir como estratégia adaptativa para sobreviver sob temperaturas elevadas, favorecendo o desenvolvimento da fase conchocelis.
Referências bibliográficas

- Bradford, M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brown, M., Frazer, A., Brasch, D., Melton, L. (1990). Growth and reproduction of Porphyra columbina Mont. (Bangiales, Rhodophyceae) from southern New Zealand. J. App. Phycol. 2: 35-44.
- Contreras-Porcia, L., Thomas, D., Flores, V, Correa, J. (2011). Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). J. Exp. Bot. 62:1815-1829.
- Davison, I. & Pearson, G. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. J. Phycol. 32: 197-211.
- Dring, M. (1981). Chromatic adaptation of photosynthesis in benthic marine algae: an examination of its ecological significance using a theoretical model. Limnol. Oceanogr. 26: 271-284.
- Dudgeon, S., Davison, I. & Vadas, R. (1989). Effect of freezing on photosynthesis of intertidal macroalgae: relative tolerance of *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus* (Rhodophyta). Mar. Biol. 101: 107-14.
- Egydio, A., Santa Catarina, C., Floh, E. & Santos, D. (2013). Free amino acid composition of Annona (Annonaceae) fruit species of economic interest. Ind. Crops. Prod. 45: 373-376.
- Figueroa, F., Conde-Alvarez, R. & Gómez, I. (2003). Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. Photosynth. Res. 75: 259-275.
- Frazer, A., Brown, M. & Bannister, P. (1988). The frost resistance of some littoral and sublittoral alga from southern New Zealand. Bot. Mar. 31: 461-464.
- Grzymski *et al.*, 1997). Grzymski, J., Johnsen, G., Sakshug, E., 1997. The significance of intracellular self-shading on the bio-optical properties of brown, red and green macroalgae. J. Phycol. 33: 408-414.
- Guidi, L. & Degl'Innocenti, E. (2012). Chlorophyll a fluorescence in abiotic stress. pp. 359–398. In: Venkateswarlu, B., A.K. Shanker, C. Shanker y M. Maheswari (eds.). Crop stress and its management: Perspectives and strategies. Springer.
- Hanisak, M. (1983). The nitrogen relationships of marine macroalgae. In: Carpenter, E. J., Capone, D. G. (eds.) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, New York, p. 699-730.
- Harb, T., Nardelli, A. & Chow, F. (2018). Physiological responses of *Pterocladiella capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales) under two light intensities. Photosynthetica. 56: 1-14.

- Hernandez, I., Corzo, A., Gordillo, F., Robles, M., Saez, E., Fernandez, J. & Niell, F. (1993). Seasonal cycle of the gametophytic form of *Porphyra umbilicalis*: nitrogen and carbon. Mar. Ecol. Prog. Ser. 99: 301-311.
- Holdt, S. & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. J. App. Phycol. 23: 543-597.
- Israel, A., Einav, R. & Seckbach, J. (2010). Seaweeds and their role in globally changing environments. Springer. 480p.
- Jahns, P. & Holzwarth, A. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1817: 182-193.
- Jassby, A. & Platt, T. (1976). Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 21: 540-547.
- Kramer, D., Johnson, G., Kiirats, O. & Edwards, G. (2004). New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. Photosynth. Res. 79: 209-218.
- Karrer, P. & Jucker, E. (1948). Caroteinoids. Verlag Birkh/iuser, Basel. 388p.
- Korbee, N., Figueroa, F. & Aguilera, J. (2006). Acumulación de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. Rev. Chil. Hist. Nat. 79: 119-132.
- Kursar, T., Van Der Meer, J. & Alberte, R. (1983). Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigments mutation. Plant. Physiol. 73: 353-360.
- Lage-Yusty, M., Caramés-Adán, P. & López-Hernández, J. (2013) Determination of phycobiliproteins by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry method in red algae. J. Food. 11: 243-247.
- Lichtenthaler, H. & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. Curr. Protoc. Food Anal. Chem. 1–8. F4.3.1-F4.
- Lipkin, Y., Beer, S. & Eshel, A. (1993). The ability of *Porphyra linearis* (Rhodophyta) to tolerate prolonged periods of desiccation. Bot. Mar. 36: 517-523.
- Lobban, C. & Harrison, P. (1994). Seaweed ecology and physiology. Cambridge. University press. 366p.
- Louda, J., Li, L., Liu, L., Winfree, N. & Baker, E. (1998). Chlorophyll-*a* degradation during cellular senescence and death. Org. Geochem. 29: 1233-1251.
- Luo, Q., Zhenggang, Z., Zhujun, Z., Rui, Y, Qian, F, Chen, F & Yan, X. (2014). Different responses to heat shock stress revealed heteromorphic adaptation strategy of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). Plos. 9: 1-12.
- Lüning, K. (1981). Photobiology of seaweed: ecophysiological aspects. Proc. Int. Seaweed. Symp. 10: 35-55.

- Lüning, K. (1990). Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley-Interscience Publication. 527p.
- Maschek, J. & Baker, B. (2008). The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler CD (ed.). Algal chemical ecology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 1-20.
- Martins, A., Zambotti-Villela, L., Yokoya, N., & Colepicolo, P. (2018). Biotechnological potential of benthic marine algae collected along the Brazilian coast. Algal. Res. 33: 316-327.
- Migita, S. (1966). Freeze-preservation of *Porphyra thalli* in viable state-II. Effect of cooling velocity and water content of thalli on the frost-resistance. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. 21: 131-138 (in Japanese).
- Monselise, E., Parola, A. & Kose, D. (2005). Low-frequency electromagnetic fields induce a stress effect upon higher plants; as evident by the universal stress signal; alanine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 302: 427-434.
- Navarro, N., Houvinen, P. & Gómez, I. (2016). Stress tolerance of Antarctic macroalgae in the early life stages. Rev. Chil. Hist. Nat. 89: 5-14.
- Necchi, O. (2004). Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. Hydrobiologia. 525:139-155.
- Nissim, I., Hardy, M., Pleasure, J., Nisim, I. & States, B. (1992). A mechanism of glycine and alanine cytoprotective action; stimulation of stress-induced HSP70 mRNA. Kidney Int. 42: 775-782.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Remirez, D. & Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin, a biliprotein with antioxidant, anti-Inflammatory and neuroprotective effects. Current Protein and Peptide Science. 4: 207-216.
- Rozema, J., Björn, L., Bornman, J., Gaberscik, A., Häder, D., Trost, T., Germ, M., Klisch, M., Gröniger, A & Sinha, R. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. J. Photochem. Photobiol. 66: 2-12.
- Sampath-Wiley, P., Neefus, C. & Jahnke, L. (2008). Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 361: 83-91.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T., Viana, A., Estelita, M., Handro, W. & Floh, E. (2006). IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. Plant. Growth. Regul. 49: 237-247.
- Schmitz, C., Ramlov, F., Lucena, A., Uarrota, V., Bernardes, M., Sissinia, M., Oliveira, I., Briania, B., Martins, C., Nunes, J., Rörig, L., Horta, P., Figueroa, F., Korbee, N. & Bonomi-Barufi, J. (2018). UVR and PAR absorbing compounds of marine brown

macroalgae along a latitudinal gradient of the Brazilian coast. J. Photochem. Photobiol. 178: 165-174.

- Schreiber, U. & Neubaer, C. (1990). O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Photosynth. Res. 25: 279-293.
- Shi, J., Chen, Y., Xu, Y., Ji, D., Chen, C. & Xie, C. (2017). Differential proteomic analysis by iTRAQ reveals the mechanism of *Pyropia haitanensis* responding to high temperature stress. Nature.7:1-11.
- Shoubaky, G., Abdel-Daim, M., Mansour, M. & Salem, E. (2016). Isolation and identification of a flavone apigenin from marine red alga *Acanthophora spicifera* with antinociceptive and anti-inflammatory activities. J. Exp. Neurosci. 10: 21-29.
- Tala, F. & Chow, F. (2014). Phenology and photosynthetic performance of *Porphyra* spp. (Bangiophyceae, Rhodophyta): Seasonal and latitudinal variation in Chile. Aquatic. Bot. 13: 107-116.
- Vasconcelos, J., Vasconcelos, e., Urrea-Victoria, V., Bezerra, P., Reis, T., Cocentino, A., Navarro, D., Chow, F., Areces, A. & Fujii, M. (2018). Antioxidant activity of three seaweeds from tropical reefs of Brazil: potential sources for bioprospecting. J. Photochem. Photobiol. 1: 1-12.
- Wanderley, A. (2009). Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade de nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em Gracilariopsis tenuifrons (Gracilariales, Rhodophyta). Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo. 140p.
- Wang, W., Wang, F., Zhu, J., Sun, X., Yao, C. & Xu, P. (2011). Freezing tolerance of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) gametophyte assessed by chlorophyll fluorescence. J. Appl. Phycol. 23: 1017–22.
- Watanabe, Y., Morikama, T., Mine, T., Kawamura, Y., Nishihara, G. & Terada, R. (2017). Chronological change and the potential of recovery on the photosynthetic efficiency of *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* (Bangiales) during the sporelings frozen storage treatment in the Japanese Nori cultivation. Phycol. Res. doi: 10.1111/pre.12185.
- Watanabe, Y., Nishihara, G., Tokunaga, S. & Terada, R. (2014). Effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of a cultivated red alga, *Pyropia tenera* (=*Porphyra tenera*), at the southern limit of distribution in Japan. Phycol. Research. 62: 187-196.
- Watanabe, Y., Yamada, H., Mine, T., Kawamura, Y., Nishihara, G. & Terada, R. (2016).
 Photosynthetic responses of *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* (Bangiales, Rhodophyta) to a thermal and PAR gradient vary with the life-history stage. Phycologia. 55: 665-672.

- Xu, Y., Chen, C., Ji, D., Hang, N. & Xie, C. (2003). Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress. J. Appl. Phycol. DOI 10.1007/s10811-013-0066-8.
- Ye, Y., Zhang, L., Yang, R., Luo, Q., Chen, H., Yan, X., Tang, H. (2013). Metabolic phenotypes associated with high-temperature tolerance of *Porphyra haitanensis* strains. J. Agric. Food Chem. 61: 8356–8363.
- Zhang, T., Shen, Z., Xu, P., Zhu, J., Lu, Q., Shen, Y., Wang, Y., Yao, C., Li, J., Wang, Y. & Jianf, H. (2012). Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*. J. Appl. Phycol. 24: 881-886.
- Zhang, T., Li, J., Ma, F., Lu, Q., Shen. & Zhu, J. (2013). Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* thallus during the cultivation process. J. Appl. Phycol. 26: 859-865.



CAPÍTULO 5

Efeito da temperatura na atividade antioxidante e no teor de aminoácidos tipomicosporina em *Pyropia spiralis*

5.1. Introdução

Os ensaios antioxidantes são uma importante ferramenta na elucidação das respostas fisiológicas, já que permitem associar os possíveis mecanismos de ação e metabólitos que interagem frente a um estresse imposto, estabelendo uma tolerância e homeostase celular. Assim, uma condição de estresse oxidativo e consequentemente um desequilíbrio das espécies reativas pode manifestar dano celular com diminuição ou degradação de biomoléculas (p. ex. pigmentos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, entre outros), o qual pode ser controlado mediante sistemas antioxidantes enzimáticos (p. ex. superóxido dismutase, catalase e glutationa redutase) e/ou não enzimáticos (p. ex. carotenoides, flavonoides) (Das & Roychoudhury, 2014).

Um conhecimento tão abrangente dos antioxidantes frente a um estresse abiótico permite compreender as estratégias de tolerância e sensibilidade das espécies frente às mudanças climáticas globais, como por exemplo, o marco do aquecimento global. Adicionalmente, essas respostas possibilitam a seleção de linhagens aptas para prospecção. Por exemplo, o estudo de Zhang *et al.* (2011) analisou linhagens de *P. haitanensis* sob os 21, 26 e 30 °C durante 10 dias para identificar cepas tolerantes às altas temperaturas e usá-las assim para cultivo. Os autores observaram aumento nos níveis de EROs e de malodialdeído, induzindo respostas de osmoregulação, além da ativação de proteínas de choque térmico (HSP) e de enzimas antioxidantes. Adicionalmente, Luo *et al.* (2014) observaram na mesma espécie um aumento nos florideosídeos, carboidratos de reserva típico de algas vermelhas, sob estresse de alta temperatura, sugerindo-os como antioxidantes. Esses açúcares solúveis desempenham um papel importante na regulação osmótica e estabilidade estrutural das membranas celulares (Hou *et al.*, 2008).

Em períodos quentes, o estudo de Tala & Chow (2014) com *Porphyra* spp. evidenciou aumento da capacidade antioxidante, mas não foi observado aumento no teor de substâncias fenólicas, provavelmente devido ao fato de que estes compostos não são abundantes neste gênero e, portanto, não desempenham um papel importante na defesa oxidativa como ocorre em algas pardas (Huovinen *et al.*, 2004). Espécies de Bangiales são caracterizadas por apresentar carotenoides como a luteína (Schubert *et al.*, 2006), a qual está envolvida no ciclo das xantofilas como mecanismo de proteção no processo fotossintetizante, agindo como antioxidante mediante a desativação da clorofila singlete e triplete (Jahns & Holzwarth, 2012). Em comparação com as

taxas de degradação dos carotenoides, a luteína apresenta uma alta estabilidade em altas temperaturas (Henry *et al.*, 1988).

Em condições de baixas temperaturas, Green & Neefus (2014) analisando P. umbilicalis, indicaram que a sobrevivência da espécie dependeria da redução do teor de água para minimizar a quantidade de formação de gelo intracelular, da indução de mecanismos de proteção (p. ex. síntese de antioxidantes e sequestradores de EROs), e do descongelamento rápido dos talos folhosos após a cristalização. Embora espécies de Porphyra/Pyropia possam perder até 95% de água no seu talo durante o dia, são metabolicamente ativas quando reidratadas pela maré crescente (Brawley et al., 2016), evidenciando mecanismos eficientes para lidar com estresse sob maré baixa. Dentre as substâncias que propiciam a retenção de umidade e que agem como material higroscópico, estão os polissacarídeos sulfatados (Percival, 1979), os quais dependendo do seu grau de sulfatação propiciamuma maior atividade sequestradora de radicais livres, como foi observado em P. haitanesis (Zhang et al., 2003). Adicionalmente, Santos et al. (2017) analisando P. endiviifolia Choi & Hwang em condições de congelamento, evidenciaram o incremento de ácidos graxos poli-insaturados. Assim, os estudos demonstraram que a diminuição das temperaturas geralmente leva ao aumento do grau de insaturação nos ácidos graxos para contribuir com a estabilidade e fluidez das membranas (Lynch & Thompson, 1984).

Outra estratégia de proteção das algas vermelhas é a síntese de MAAs, os quais possuem propriedades antioxidantes como doadores de hidrogênio para os radicais livres (Nakayama *et al.*, 1999). Hoyer *et al.* (2001) indicaram que as espécies podiam ser classificadas de acordo com a presença de MAAs, sendo: (1) sem capacidade para a biossíntese destas substâncias; (2) com teor basal ajustável em relação a mudanças na radiação ambiental e (3) com teor elevado independentemente das condições ambientais. Existem estudos em *Porphyra/Pyropia* que indicam a correlação positiva entre a concentração de MAAs com a dose de radicação solar (Karsten *et al.*, 1998); e correlação negativa entre os MAAs e nitrogênio (Litchman *et al.*, 2002; Korbee, 2003). Embora existam estudos da influência dos fatores ambientais sob o conteúdo de MAAs em *Porphyra/Pyropia* (Briani *et al.*, 2018), o presente estudo contribuirá com o entendimento da temperatura sob a composição e o teor de MAAs.

Considerando o impacto que poderia ser causado pelas variações de temperatura decorrentes do aquecimento global e o potencial antioxidante de *Porphyra/Pyropia* spp., além de diversas propriedades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (Isaka *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016), a análise dos mecanismos antioxidantes e da variabilidade na composição química frente ao estresse oxidativo gerado pelo estresse térmico pode contribuir com a pesquisa para áreas aplicadas de biotecnologia.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antioxidante sob diferentes temperaturas de *Pyropia spiralis* e associar essas alterações com a abundância e composição de carotenoides e MAAs.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Material de estudo e delineamento experimental

A coleta de *P. spiralis* foi realizada em agosto de 2015 na Praia de Cibratel 1 (24°13'31"S e 46°51'7"W), no Município de Itanhaém (ver detalhes no item M.1 de Materiais e Métodos Gerais). As condições de triagem, aclimatação e delineamento experimental estão descritas no item M.3 de Materiais e Métodos Gerais. Após aclimatação, e considerando a resposta deletéria do tratamento de 35 °C observado no Capítulo IV, foram estudadas as respostas da atividade antioxidante no tempo Inicial e sob as temperaturas de 15, 20, 25 (controle) e 30 °C após sete dias de exposição.

Adicionalmente, a fim de relacionar possíveis substâncias de defesa em resposta às condições de temperatura, foram analisados os perfis de carotenoides e de MAAs em amostras submetidas aos diferentes tratamentos após sete dias, seguindo os procedimentos descritos a seguir.

5.2.2. Atividade antioxidante

As atividades antioxidantes foram analisadas como descritas no item 2.2.2 do Capítulo II. Foram analisados cinco ensaios: atividade sequestradora do radical DPPH (ver item 2.2.2.1), atividade de captura do radical ABTS (ver item 2.2.2.2), atividade quelante de metais (ver item 2.2.2.3), atividade de redução de ferro – FRAP (ver item 2.2.2.4) e ensaio para quantificar o teor de substâncias fenólicas pelo reagente de Folin-Ciocalteu (ver item 2.2.2.5). Todos os ensaios antioxidantes foram avaliados nas concentrações de 4, 8, 12, 16 e 20 mg.mL⁻¹ MF de extrato algáceo. Como substância de referência para os ensaios, foi utilizado ácido gálico (Sigma-Aldrich, Brasil) nas concentrações descritas na Tabela 5.1. O índice de capacidade antioxidante total (ICAT) também foi calculado, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 2.2.2.6 do Capítulo II.

Com o interesse de comparar os valores das atividades antioxidantes com os publicados na literatura, os resultados de massa fresca (MF) foram convertidos para massa seca (MS), utilizando o fator de conversão de 23%.

Tabela 5.1. Sumário das condições e parâmetros das respectivas curvas padrão para os diferentes ensaios da atividade antioxidante, especificando a faixa de concentração da substância de referência (μ g.mL⁻¹), equação da reta (y = ax + b) e coeficiente de regressão linear (R^2).

Ensaio antioxidante	Ácido gálico (µg.mL ⁻¹)	Equação da reta	\mathbb{R}^2
DPPH	0,5 – 3	y = - 0,3064 x + 0,9580	0,9948
ABTS	0,5-2	y = - 0,4882 x + 0,9569	0,9862
Quelante de metais	3 – 9	y = - 0,0562 x + 0,6957	0,9997
FRAP	0,5 - 4,5	y = 0,3569 x + 0,0826	0,9888
Folin-Ciocalteu	3 – 12	y = 0,0933 x + 0,0557	0,9943

Com o interesse de comparar os valores das atividades antioxidantes com os publicados na literatura, os resultados de massa fresca (MF) foram convertidos a massa seca (MS) utilizando o fator de conversão de 23%.

5.2.3. Quantificação e identificação de carotenoides

Após analisar os ensaios com os extratos tamponados e metanólicos das amostras submetidas às diferentes temperaturas obtidos da extração de pigmentos fotossintetizantes descritos no item 4.2.3 do Capítulo IV, foi evidenciada a degradação dos carotenoides (ver detalhes no item A.2 de Anexos). Consequentemente, não foi possível estimar o perfil de carotenoides para cada tratamento. Porém, foi realizada uma caracterização geral de carotenoides com material coletado diretamente de campo, a fim de analisar os possíveis carotenoides responsáveis pela atividade antioxidante.

Assim, os procedimentos e análises foram os mesmos daqueles descritos no item 2.2.3 do Capítulo II (extratos tamponado-metanólico e extrato metanólico). Foram utilizados como padrões de carotenoides o β -caroteno (Sigma-Aldrich, EUA) e a xantofila luteína (CaroteNature, Suíça).

5.2.4. Quantificação de MAAs

A extração dos MAAs foi realizada a partir de amostras de 200 mg MF (n = 5), trituradas em nitrogênio líquido e extraído em 3 mL de metanol 20% durante 2 h a 45 °C. Após realizar o processo de extração por três vezes, o material foi reunido, centrifugado e o sobrenadante liofilizado. O extrato liofilizado foi ressuspendido em metanol 20% na concentração de 5 mg.mL⁻¹, analisado mediante a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE 1260; Agilent Technologies, EUA), utilizando uma coluna de fase normal (Zorbax RX-SIL C18, Agilent Technologies, EUA; 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), seguindo o método de Torres *et al.* (2018) com modificações. O gradiente da fase móvel constituiu-se de

acetonitrila:acetato de amônio (1:1) (A) e acetonitrila:acetato de amônio (9:1) (B), com a seguinte programação: 60% B por 20 min com fluxo de 0,3 mL.min⁻¹; 60% B por 4 min e 42% B por 4 min; com fluxo de 1 mL.min⁻¹; temperatura da coluna ajustada a 30 °C; e volume de injeção de 25 μ L. Os cromatogramas foram processados em λ = 330 nm. A identificação dos MAAs foi feita através da comparação com amostra de *Gracilaria caudata* Agardh, cujos MAAs já foram isoladas e identificados por ressonância magnética nuclear (RMN ¹³C e ¹H) e espectrometria de massas (Torres 2017). A quantificação foi feita com curva de calibração de Porphyra-334 (1,5 - 360 μ g.mL⁻¹; y = 208,94x; R² = 0,9987). As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do IB-USP em colaboração com a Dra. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos.

5.2.5. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados com cinco repetições. Os dados de atividades antioxidantes e teor de MAAs foram analisados por ANOVA unifatorial, prévia avaliação de normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade com o teste de Bartlett, utilizando o programa Statistica v. 12 (p < 0.05). Tendo diferenças significativas verificadas, foi aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls.

5.3. Resultados

5.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de *P. spiralis* sob diferentes temperaturas foi avaliada mediante cinco diferentes ensaios e em cinco concentrações de extrato (Fig. 5.1). Para todos os ensaios antioxidantes, a atividade mostrou uma resposta dose-dependente, exceto para o ensaio quelante de metais. A atividade antioxidante mediante o ensaio de sequestro do radical DPPH (Fig. 5.1A) apresentou níveis acima de 50% na concentração de 20 mg.mL⁻¹ em todos os tratamentos. De forma semelhante, para todos os tratamentos, a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS (Fig. 5.1B) mostrou uma porcentagem acima de 50% na concentração de extrato algáceo de 8 mg.mL⁻¹. A ação quelante (Fig. 5.1C) dos extratos algáceos em todos os tratamentos foram menores que 50%. A Figura 5.1D apresenta as respostas antioxidantes mediante o ensaio de redução do ferro, sendo que a concentração de extrato algáceo de 20 mg.mL⁻¹ teve porcentagem antioxidante próximo de 80%. A porcentagem de atividade redutora, mensurada pelo método do Folin-Ciocalteu (Fig. 5.1E), concentrações de extrato algáceo de 16 mg.mL⁻¹ tiveram valores acima de 80% para todos os tratamentos.

Os valores de EC50 para cada tratamento nos diferentes ensaios antioxidantes é apresentada na Tabela 5.2. No ensaio de DPPH, os índices de EC50 tiveram diferenças significativas entre os tratamentos, variando de 12,68 \pm 1,66 mg.mL⁻¹ MF em 15 °C até 17,30 \pm 1,70 mg.mL⁻¹ MF em 30 °C. Para o ensaio ABTS, os índices de EC50 não mostraram diferenças

significativas, ressaltando que o EC50 do controle foi de 7,55 \pm 0,45 mg.mL⁻¹ MF. Os valores obtidos no ensaio de quelante de metais foram menores do que 50%, portanto, não foram calculados os índices de EC50. Para o ensaio de FRAP, os extratos algáceo do Inicial e sob 15 e 20 °C mostraram os menores valores de EC50, em torno de 6-7 mg.mL⁻¹, diferente do tratamento de 25 e 30 °C que tiveram valores EC50 acima de 9 mg.mL⁻¹. No ensaio do Folin-Ciocalteu para substâncias fenólicas, não se apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de 15 a 30 °C.



Figura 5.1. Atividade antioxidante de *Pyropia spiralis* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento expresso em porcentagem de atividade antioxidante (eixo Y da esquerda) e equivalente ao ácido gálico (μ g.mL⁻¹) (eixo Y da direita) nos ensaios de: (A) atividade sequestradora do radical DPPH, (B) atividade de captura do radical ABTS, (C) atividade de quelante de metais, (D) atividade de redução de ferro, FRAP e (E) substâncias fenólicas e capacidade redutora pelo Folin-Ciocalteu. Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Tabela 5.2. Valores de EC50 para os ensaios de atividade antioxidante de *Pyropia spiralis* nas diferentes condições de temperatura após sete dias de experimento. O valor do EC50 para o padrão ácido gálico também foi calculado. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5) e as letras, representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0,05), considerando o mesmo tipo de ensaio.

Temperatura (°C)	EC50 (mg.mL ⁻¹)								
	DPPH	ABTS	Quelante de metais	FRAP	Fenólicos				
Inicial	$15,99 \pm 1,32$ bc	$8,28 \pm 0,44$ a	n.d.	$7,\!48 \pm 0,\!86$ b	7,77 ± 1,33 a				
15	$12,68 \pm 1,66$ d	$6,44 \pm 0,48$ b	n.d.	$6,63 \pm 0,51$ b	$8,06 \pm 0,87$ a				
20	$19,45 \pm 0,76$ a	$7,06 \pm 1,11$ ab	n.d.	$6{,}05\pm0{,}52~b$	$7,60 \pm 0,13$ a				
25	$14,28 \pm 1,03 \text{ cd}$	$7,55 \pm 0,45$ ab	n.d.	$9,86 \pm 0,84$ a	7,56 ± 1,21 a				
30	$17,30 \pm 1,70$ ab	8,00 \pm 0,57 ab	n.d.	9,95 ± 1,06 a	$9,15 \pm 0,45$ a				
Ácido gálico	0,00155	0,00099	0,00619	0,00145	0,00591				

n.d. As porcentagens de atividade foram menores que 50%, portanto, não foi possível calcular o EC50.

Na Tabela 5.3, indicam-se os índices de capacidade antioxidante total (ICAT) para cada ensaio antioxidante e para cada temperatura. Os índices apresentaram valores semelhantes entre os tratamentos, sendo o maior ICAT para o tratamento Inicial, seguido de 15 °C > 20 °C > 25 °C > 30 °C. Em termos dos valores de ICAT considerando a comparação entre os ensaios antioxidantes, o ensaio de ABTS foi mais sensível na estimativa da ação antioxidante, seguido por DPPH > FRAP > fenólicos > quelante de metais.

Tabela 5.3. Índices antioxidantes para cada ensaio antioxidante de amostras de *Pyropia spiralis* nas diferentes temperaturas. O ICAT foi estimado como a somatória dos índices para cada temperatura e como a somatória dos índices para cada ensaio.

Temperatura	Índice	Índice	Índice Quelante	Índice	Índice	ICAT para a
(°C)	DPPH	ABTS	de metais	FRAP	Folin	temperatura
Inicial	91,90	92,77	100	83,67	100	93,67
15	100	99,58	71,06	100	86,64	91,45
20	82,63	100	42,95	98,59	83,29	81,49
25	98,57	90,27	53,40	69,40	77,70	77,87
30	79,14	90,55	50,33	74,21	64,66	71,78
ICAT para o	90,45	94,63	63,55	85,17	82,46	
ensaio						

5.3.2. Caracterização de carotenoides totais

Cabe lembrar que as amostras do experimento destinadas para esta análise tiveram seus pigmentos degradados, portanto, a caracterização e quantificação de carotenoides na espécie foram realizadas com material de campo. A Figura 5.2 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE para amostras de campo de *P. spiralis* e o controle (25 °C). A Tabela 5.4 mostra a identificação de todos os picos presentes nos cromatogramas e as respectivas absorções máximas a 450 nm.

A amostra controle apresentou apenas presença de luteína (tR 6,73 min) e derivado clorofílico 2 (tR 19,25 min) (Fig. 5.2A; Tabela 5.4). A ausência de clorofila *a* na amostra controle (tR 11,22 min) evidencia a degradação dos pigmentos. Os extratos tamponadometanólico (Fig. 5.2B) e metanólico (Fig. 5.2C) apresentaram composição semelhante nos cromatogramas, com os picos correspondendo a luteína (tR 6,73 min), clorofila *a* (tR 17,22 min) e β -caroteno (tR 34,66 min) (Tabela 5.4). Esses extratos apresentaram também derivados de clorofila (tR 19,25 min e 28,44 min). A quantificação dos carotenoides de ambos os extratos foi calculada como porcentagem, considerando a somatória total como 100% de carotenoides (Tabela 5.5). Além disso, a tabela mostra uma compilação de composição e quantificação de carotenoides de algumas espécies de algas vermelhas que se caracterizam por apresentar α -caroteno, β -caroteno, anteraxantina, astaxantina, auroxantina, β -Cryptoxantina, luteína, neoxantina, nostoxantina, violaxantina, xantina e zeaxantina.



Figura 5.2. Cromatogramas obtidos por CLAE de carotenoides e outros pigmentos processados em λ = 450 nm de *Pyropia spiralis* de (A) amostra controle (25 °C), (B) amostra de campo - extrato tamponado-metanólico e (C) amostra de campo - extrato metanólico.

Tabela 5.4. Composição de carotenoides e outros pigmentos de *Pyropia spiralis* identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos ($\lambda = 450$ nm) para amostras controle, extrato tamponado-metanólico e extrato metanólico. tR = tempo de retenção e λ máx = comprimento de onda máximo.

tR (min)		λmáx	x (nm)		Identificação	Controle	Extrato tamponado- metanólico	Extrato metanólico
6,73	268	422	444	472	Luteína	Х	Х	Х
17,22	262	382	416	434	Clorofila a		Х	Х
19,25	262	338	384	432	Derivado clorofílico 1			Х
28,44	276	324	504	536	Derivado clorofílico 2	Х	Х	
34,66	270	428	452	480	β-caroteno		Х	Х

	a-caroteno	β-Caroteno	Anteraxantina	Astaxantina	Auroxantina	-Cryptoxantina	Luteina	Neoxantina	Nostoxantina	Violaxantina	Xantina	Zeaxantina	
Espécie						đ							Referência
Bangia atropurpurea Agardh	2,2	4,0					73,5				20,3		Schubert <i>et al.</i> (2006)
Chondrus crispus Stackh	18,8	23,3	0,4				54,0					3,5	Esteban <i>et al.</i> (2009)
<i>Chondria</i> sp.		33,3			6,1	16,2	28,8		15,6				Czeczuga & Taylor (1987)
Gastroclonium ovatum Papenfuss	19,8	26,7					46,0					7,5	Esteban <i>et al.</i> (2009)
<i>Gracilariopsis gracilis</i> Steentoft, Irvine & Farnham		6,2		6,1		10,2			0,7		76,8		Schubert et al. (2006)
Gelidium robustum Hollenberg & Abbott	0,5	0,2					89,5				9,8		Schubert et al. (2006)
Melanthalia abscissa Hooker & Harvey	25,4	12,4				22,1	19,1	21,0					Czeczuga & Taylor (1987)
Palmaria palmata	20,3	16,0					63,7						Esteban et al. (2009)
Porphyra columbina Montagne	17,2	25,0					7,7				50,1		Czeczuga & Taylor (1987)
Porphyridium cruentum Nägeli		2,6									97,4		Schubert et al. (2006)
Porphyra linearis	1,8	34,9	1,8				43,9					17,6	Esteban et al. (2009)
Porphyra suborbiculata Kjellman							65,5				34,5		Schubert et al. (2006)
Porphyra thuretii Setchell & Dawson							76,1				23,9		Schubert et al. (2006)
<i>Pterocladiella capillacea</i> Santelices & Hommersand	3,5	2,6					89,7				4,2		Schubert et al. (2006)
Pyropia spiralis													Dresente estudo
(extrato tamponado-metanólico)		9,5					90,5						I resente estudo
Pyropia spiralis													Proconto octudo
(extrato metanólico)		14,2					85,5						i resente estudo
Vidalia colensor Agardh		27,9	11,8		3,9	9,2	9,8		37,4				Czeczuga & Taylor (1987)

Tabela 5.5. Perfil quantitativo (%) de carotenoides identificados nos extratos de *Pyropia spiralis* e em algumas espécies de algas vermelhas.

5.3.3. Quantificação de MAAs

A identificação de MAAs nas amostras de *P. spiralis* foi realizada utilizando *G. caudata* como padrão, uma vez que esta alga possui diversos MAAs já identificados por LC-MS (Torres, 2017). Os MAAs presentes em *G. caudata* foram porphyra+chinorina, patilina e palitinol (Fig. 5.3A; Tabela 5.6), e em *P. spiralis* foram identificados os MAAs: porphyra+chinorina e patilina (Fig. 5.3B; Tabela 5.6). Os cromatogramas dos tratamentos de temperatura apresentaram a mesma composição, portanto, é apresentado apenas o cromatograma do tratamento controle (Fig. 5.3B). Adicionalmente, houve substâncias que não foram identificadas com absorção máxima em 270 nm em *G. caudata* (Fig. 5.3A), e em 334 nm em *P. spiralis* (Fig. 5.3B; Tabela 5.6).



Figura 5.3. Cromatograma processados em λ = 330 nm de (A) *Gracilaria caudata* e (B) *Pyropia spiralis* do tratamento de 25 °C. n.i. substância não identificada.

tD (min)	ΜΔΔα	Comprimento	Espectro UV-
t K (IIIII)	MAAS	de onda (nm)	visível
12,5	n.i-334	334	250 300 350 400 Comprimento de onda (nm)
17,5	Porphyra-334	334	250 300 350 400 Comprimento de onda (nm)
17,6	Chinorina-334	334	250 300 350 400 Comprimento de onda (nm)
26,2	Palitina	320	250 300 350 400 Comprimento de onda (nm)

Tabela 5.6. Composição de MAAs de *Pyropia spiralis* identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos ($\lambda = 330$ nm) nas diferentes temperaturas. tR = tempo de retenção.

Na Tabela 5.7 são indicadas as bandas de absorção máxima dos MAAs reportadas em na literatura para espécies marinhas, com destaque do MAA de algas vermelhas.

Aminoácido tipo-micosporina	Comprimento de onda (nm)	Referência	Alga vermelha	Referência
Ácido palitênico	337	Whitehead et al. (2001)		
Asterina	330	Whitehead et al. (2001)	Porphyra leucosticta	Korbee (2005)
			Gracilaria tenuistipitata Chang & Xia	Cardozo (2007)
			Palmaria palmata	Yuan et al. (2009)
			<i>Gracilaria birdiae</i> Plastino & Oliveira	Cardozo et al. (2011)
			Porphyra sp.	Hartmann et al. (2015)
			Gracilaria dominguensis Sonder	Torres (2017)
Chinorina	333	Cardozo (2007)	Porphyra leucosticta	Korbee (2005)
			Porphyra umbilicalis	Volkstmann & Gorbushina (2006)
			Gracilaria tenuistipitata	Cardozo (2007)
			Palmaria palmata	Yuan et al. (2009)
			Gracilaria birdiae	Cardozo et al. (2011)
			Porphyra sp.	Hartmann et al. (2015)
			Porphyra umbilicalis	Volkstmann & Gorbushina (2006)
Chinorina-pentosa	332	Nazifi et al. (2015)		
Micosporina-glicina	310	Cardozo (2007)		
Micosporina-glicina-valina	330	Karentz et al. (1991)		
Micosporina-serina	310	Arpin et al. (1979)	Porphyra sp.	Hartmann et al. (2015)
Paliteno	360	Cardozo (2007)	Palmaria decipiens Gracilaria tenuistipitata	Conde <i>et al.</i> (2003) Cardozo (2007)

Tabela 5.7. Bandas de absorção máxima dos aminoácidos tipo-micosporinas e compilação de estudos reportados em espécies de nas algas vermelhas.

Commuação da Tabela 5.7.				
Palitina	320	Cardozo (2007)	Porphyra leucosticta	Korbee (2005)
			Palmaria decipiens	Conde <i>et al.</i> (2003)
			Porphyra umbilicalis	Volkstmann & Gorbushina (2006)
			Palmaria palmata	Yuan et al. (2009)
			Gracilaria birdiae	Cardozo et al. (2011)
			Porphyra sp.	Hartmann et al. (2015)
			Gracilaria dominguensis	Torres (2017)
Palitina-serina	320	Teai et al. (1997)		
Palitinol	332	Cardozo (2007)	Gracilaria tenuistipitata	Cardozo (2007)
			Gracilaria birdiae	Cardozo et al. (2011)
			Gracilaria dominguensis	Torres (2017)
Porphyra	334	Cardozo (2007)	Porphyra leucosticta	Korbee (2005)
			Porphyra umbilicalis	Volkstmann & Gorbushina (2006)
			Gracilaria tenuistipitata	Cardozo (2007)
			Gracilaria birdiae	Cardozo et al. (2011)
			Porphyra sp.	Hartmann et al. (2015)
			Gracilaria dominguensis	Torres (2017)
Porphyra-334-hexosida	334	Nazifi et al. (2015)		
Usujireno	357	Cardozo (2007)	Palmaria decipiens	Conde <i>et al.</i> (2003)
			Palmaria palmata	Yuan et al. (2009)

Os MAAs n.i.-334, porphyra+chinorina-334 e palitina, identificados em *P. spiralis*, foram quantificados em equivalente de Porphyra-334 e comparados entre os tratamentos (Fig. 5.4). O MAA n.i.-334 foi a substância mais abundante sob qualquer um dos tratamentos, tendo a maior quantidade no tratamento de 15 °C ($35,33 \pm 3,62$ mg porphyra- $334.g^{-1}$ extrato) e menor concentração sob 30 °C ($9,89 \pm 1,71$ mg porphyra- $334.g^{-1}$ extrato). Houve diminuição do teor de MAAs (Fig. 5.4), na substância n.i-334, porphyra+chinorina e palitina, à medida em que aumenta a temperatura.



Figura 5.4. Aminoácidos tipo-micosporinas de *Pyropia spiralis* após sete dias sob as diferentes temperaturas. Os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5). As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

5.4. Discussão

Espécies de *Porphyra/Pyropia* habitam a zona do mediolitoral superior e apresentam diversos mecanismos antioxidantes frente ao estresse oxidativo que são estimulados por diversos fatores bióticos e abióticos, como o estresse térmico. No presente estudo, *P. spiralis* apresentou como sistema de defesa antioxidante, mecanismos associados principalmente com o sequestro de radicais evidenciados pelos ensaios de DPPH e ABTS. Foi necessaria menor concentração no ensaio ABTS para atingir porcentagens acima de 50%, como evidenciado com o EC50 nos 25 °C (1,73 ± 0,45 mg.mL⁻¹ MS após utilizar o fator de conversão em 7,55 ± 0,45 mg.mL⁻¹ MF), do que no ensaio DPPH (3,28 ± 1,03 mg.mL⁻¹ MS após utilizar o fator de conversão em 14,28 ± 1,03 mg.mL⁻¹ MF). O ensaio ABTS permite detectar a ação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, diferente do ensaio DPPH que possui maior afinidade por substâncias apolares (Floegel *et al.*,2011). Tanto no ensaio DPPH quanto no ensaio ABTS, *P. spiralis* mostrou atividade antioxidante de sequestro de radicais semelhante ao reportado na literatura comparando com outros extratos metanólicos de espécies de algas vermelhas, tais como, *Hypnea musciformis* (Gigartinales), *H. valentiae* Montagne (Gigartinales) e *Jania rubens* Lamouroux (Corallinales), com valores de EC50 próximos de 4 mg.mL⁻¹ MS (Chakraborty *et*

al., 2015). O estudo de Chakraborty *et al.* (2015) indica que a alta atividade de sequestro de radicais ABTS analisadas nas algas vermelhas *Hypnea* sp. e *J. rubens* pode se dever à presença de carotenoides ou outros pigmentos com cadeias longas de hidrocarbono e substâncias aminadas (Chew *et al.*, 2008). No presente estudo, o potencial antioxidante analisado com ABTS pode estar relacionado pela ação de MAAs bem como com funções protetoras dos carotenoides. Alvarez-Gómez *et al.* (2016) correlacionaram a capacidade antioxidante no ensaio ABTS de *P. umbilicalis* com MAAs tais como Porphyra-334, chinorina e substâncias fenólicas.

No ensaio FRAP foi observado que nas temperaturas de 15 e 20 °C nas menores concentrações de extrato atingiram porcentagens acima de 50%, diferente do controle e do tratamento a 30 °C, nos quais os percentuais de ação antioxidante foram menores. Nesse ensaio podem estar envolvidas substâncias fenólicas da classe dos flavonoides, ao invés dos carotenoides que não possuem capacidade de redução férrica (Pulido *et al.*, 2000). Farvin & Jacobsen (2013) reportaram no extrato etanólico de *P. purpurea* Agardh, coletada na zona temperada norte, um EC50 de 1,08 mg.mL⁻¹ MS, o qual foi semelhante ao valor de EC50 da espécie de estudo nos tratamentos de 15 e 20°C, que foi em torno de 1,5 mg.mL⁻¹ MS. A atividade de quelação de ferro pode estar relacionada com substâncias polares, tais como os carboidratos ou fibras do tipo carragenana ou ágar (Farvin & Jacobsen, 2013).

Em relação à capacidade antioxidante analisada no ensaio do Folin-Ciocalteu de *P. spiralis*, não houve alterações com as temperaturas. De forma semelhante, o estudo de Pereira *et al.* (2018) comparando amostras do ambiente (19 °C) com amostras aclimatadas em laboratório (24 °C) em *P. acanthophora*, também não reportaram diferenças significativas entre o teor de fenólicos totais. Nesse estudo, foi detetado maior conteúdo de flavonoides nas amostras do ambiente o qual pode estar relacionado como mecanismo de proteção.

No presente estudo foi observado um decréscimo do valor antioxidante conforme aumenta a temperatura, devido possivelmente ao fato de várias substâncias redutoras como os fenólicos serão liberadas na água como foi encontrado em *Rhodomela larix* Agardh que teve exsudação de lanosol (bromofenol) em altas temperaturas (Phillips & Towers, 1982). Assim, em *P. spiralis* pode ter tido ocorrido a liberação de substâncias fenólicas da classe bromofenol. No entanto, a pesquisa de Uribe *et al.* (2018) com *P. orbicularis* submetido à secagem a vácuo em diferentes temperaturas de processamento, reportaram que nas altas temperaturas a capacidade antioxidante estava associada com os maiores teores de fenólicos totais, carotenóides e ficobiliproteínas como a ficoeritrina e ficocianina.

O potencial antioxidante analisados nos extratos metanólicos de *P. spiralis* reportou valores semelhantes na faixa de temperatura de 15 a 30 °C. Houve maior ICAT em 15 °C e, conconmitantemente, foi o tratamento com o menor EC50 no ensaio ABTS e, maior quantidade de MAAs. A atividade antioxidante em espécies de *Porphyra/Pyropia* tem sido atribuída aos MAAs extraídos com solventes aquosos (Korbee, 2005; Volkmann & Gorbushina, 2006;

Hartmann *et al.*, 2015; Briani *et al.*, 2018). O estudo de Briani *et al.* (2018) analisou diferentes espécies de algas vermelhas ao longo da costa do Brasil coletadas no verão de 2015 e reportaram para *P. acanthophora* a presença de porphyra-334, chinorina e palitina, que foi a mesma composição da espécie de estudo.

Em *P. spiralis* foi detectada uma substancia nomeada "micosporina n.i-334" devido à absorção máxima ocorrer em 334 nm, a qual não foi constatada na literatura, existindo a possibilidade de ser uma nova micosporina para *Pyropia*, assim como também podendo estar ligada a outra classe química como açúcares, como por exemplo porphyra-334-hexosida ou chinorina-pentosa (Nazifi *et al.*, 2015). Embora tenham sido investidos aproximadamente seis meses para a separação e identificação de MAAs, são necessárias análises futuras, variando o fluxo, o pH dos solventes, entre outros. Adicionalmente, poderiam se analisar mediante outras técnicas como a espectrometria de massas ou estudos de ressonância magnética nuclear para a elucidação desta molécula.

Pyropia spiralis apresentou diminuição de MAAs em altas temperaturas (30 °C), igualmente aos estudos com outros fatores abióticos como a radiação solar ou na limitação de nitrogênio. É importante destacar que tem sido estudada a estabilidade dos MAAs em extratos purificados frente a variações de temperatura, como por exemplo a porphyra-334 que não teve mudanças em 50, 70 e 100 °C após 6 horas de exposição. Existem estudos em espécies de corais, *Lobophytum compactum* e *Sinularia flexibilis* da Grande Barreira de Corais, que apresentaram correlação positiva entre a concentração de MAAs quando exposta à radiação UV e em aumento da temperatura (32 °C) (Oren & Gunde-Cimerman, 2007). Porém, para *P. spiralis* a alta temperatura e a diminuição de nutrientes no meio após sete dias do período experimental podem ter interferido na síntese de moléculas nitrogenadas como aminoácidos, proteínas, entre outras. Em contraste, aos 15 e 20 °C, comparado com os 25 °C, houve acréscimo do conteúdo de MAAs, gerando indícios sobre a resposta frente a ambientes frios. Acredita-se que as MAAs podem agir como osmoprotetores sob baixas temperaturas (Chrapusta *et al.*, 2017).

Adicionalmente às substâncias polares como carboidratos e substâncias fenólicas, a maceração com metanol pode extrair substâncias lipofílicas tais como pigmentos, vitaminas e esterois (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). No presente estudo, embora não tenha sido possível identificar os carotenoides em resposta à temperatura, devido à degradação causada por processos oxidativos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004), foi possível caracterizar o perfil dos carotenoides nas amostras provenientes de campo, detectando-se a luteína como principal carotenoide para a espécie de estudo, a qual corrobora com a composição reportada para o gênero e ordem Bangiales (Schubert *et al.*, 2006). No entanto, comparando com a literatura, *P. spiralis* reportou alta porcentagem de luteína, podendo estar relacionada com características genéticas e condições ambientais da espécie.

Como conclusão, é possível determinar que a atividade antioxidante em *P. spiralis* teve maior destaque com a atividade sequestradora de radicais, e em relação às flutuações de temperatura, essa atividade foi descrescendo conforme aumenta a temperatura. Foi evidenciado em baixas temperaturas, um maior conteúdo dos MAAs, os quais podem estar envolvidos com mecanismos de proteção. O acúmulo de MAAs sob certas condições ambientais e laboratoriais pode-se tornar fonte antioxidante e alternativa em processos de congelamento nas indústrias alimentícias e cosméticas.

Referências bibliográficas

- Alvarez-Gómez, F., Korbee, N. & Figueroa, F. (2016). Análisis de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en extractos macroalgales y liquénicos mediante la aplicación de diferentes solventes y métodos de evaluación. Ciencias Marinas. 42: 271-288.
- Arpin, N., Curt, R. & Favre-Bonvin, J. (1979). Mycosporines: review and new data concerning their structure. R. Mycol. 43: 247-257.
- Brawley, S., Blouin, N. *et al.* (2016). Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae, Rhodophyta). Proc. Natl. Acad. Sci. 1-10.
- Briani, B., Sissini, M., Lucena L., Batista, M., Costa, I., Nunes, J., Schmitz, C., Ramlov, F., Maraschin, M., Korbee, N., Rörig, L., Horta, P., Figueroa, F. & Barufi, J. (2018). The influence of environmental features in the content of mycosporine-like amino acids in red marine algae along the Brazilian coast. J. Phycol. doi: 10.1111/jpy.12640.
- Cao, J., Wang, J., Wang, S. & Xu, X. (2016). *Porphyra* Species: A Mini-Review of Its Pharmacological and Nutritional Properties. J. Med. Food. 19: 111-119.
- Cardozo, K., Marques, L., Carvalho, V., Carignan, M., Pinto, E., Marinho-Soriano, E. & Colepicolo, P. (2011). Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. Rev. Bras. Farmacogn. 21: 202-208.
- Cardozo, K. (2007). Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 173p.
- Chakraborty, K; Joseph, D & Praveen, K. (2015). Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. J. Food. Sci. Technol. 52: 1924-1935.
- Chew, Y., Lim, Y., Omar, M. & Khoo, K. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. Food. Sci. Technol. 41:1067-1072.
- Chrapusta, E., Kaminski, A., Duchnik, K., Bober, B., Adamski, M. & Bialczyk, J. (2017). Mycosporine-like amino acids: potential health and beauty ingredients. Mar. Drugs. 15: 326-355.
- Czeczuga, B. & Taylor, F. (1987). Carotenoid content in some species of the brown and red algae from the coastal area of New Zealand. Biochem. Syst. Ecol. 15: 5-8.
- Das, K & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci.
- Esteban, R., Martínez, B., Fernández-Marín, B., Becerril, J., García-Plazaola, J. (2009). Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. Euro. J. Phycol. 44: 221-230.

- Farvin, K. & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. Food. Chem. 138: 1670-1681.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. & Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich. J. Food. Anal. 24: 1043-1048.
- Frazer, A., Brown, M. & Bannister, P. (1988). The frost resistance of some littoral and sublittoral alga from southern New Zealand. Bot. Mar. 31: 461-464.
- Gómez, I. & Huovinen, P. (2011). Morpho-functional patterns and zonation of South Chilean seaweeds: the importance of photosynthetic and bio-optical traits. Mar. Ecol. Prog. Ser. 422: 77-91.
- Green, L & Neefus, C. (2014). The effects of short- and long-term freezing on *Porphyra umbilicalis* Kützing (Bangiales, Rhodophyta) blade viability. doi:10.1016/j.jembe.2014.10.001.
- Harb, T., Nardelly, A. & Chow, F. (2018). Physiological responses of *Pterocladiella capillacea* (Rhodophyta, Gelidiales) under two light intensities. Photosynthetica. 56: 1-14.
- Hartmann, A., Becker, K., Remias, D. & Ganzera, M. (2015). Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and novel MAA from the red alga *Catenella repens*. Mar. Drugs. 13: 6291-6305.
- Henry, L; Catignani, G. & Schwartz, S. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and All-trans β-Carotene. J. Am. Oil. Chem. Soc. 75:823-829.
- Hou, H., He, W., Li, H. & Tong, S. (2008). Effects of high temperature stress on growth and physiology of conchocelis of *Porphyra yezoensis*. J. Liaoning. Norm. U. 31: 487-490.
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T. y Wiencke, C. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. Mar. Ecol. Prog. Ser. 211:117-29.
- Huovinen, P., Gómez, I., Figueroa, F., Ulloa, N., Morales, V. & Lovengreen, C. (2004). Ultraviolet absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. Bot. Mar. 47:21–29.
- Isaka, S., Cho, K., Nakazono, S., Abu, R., Ueno, M., Kim, D. & Oda, T. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). Inter. J. Biol. MacroMol. 74: 68-75.
- Jahns, P. & Holzwarth, A. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta. 1817: 182-193.
- Karentz, D., Euen, M., Land, F., & Dunlap, W. (1991). Survey of mycosporin-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. Mar. Biol. 108: 157-166.

- Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F. L. Flores-Moya, A. & Wiencke, C. (1998). An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. Bot. Mar. 41: 443-53.
- Korbee, N. (2003). Fotorregulación y efecto del nitrógeno inorgánico en la acumulación de aminoácidos tipo micosporina en algas rojas. Tesis de Doctorado. 295 p.
- Korbee, N. Huovinen, P., Figueroa, F., Aguilera, J. & Karsten, U. (2005). Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). Mar. Biol. 146: 645-654.
- Leite, B. & Nicholson, R. (1992) Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Exp. Mycol. 16: 76-86.
- Litchman, E., Neale, P. & Banaszak, A. (2002). Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. Limnol. Oceanogr. 47: 86-94.
- Luo, Q., Zhenggang, Z., Zhujun, Z., Rui, Y, Qian, F, Chen, F & Yan, X. (2014). Different responses to heat shock stress revealed heteromorphic adaptation strategy of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). Plos. 9: 1-12.
- Lynch, D. & Thompson, G. (1984). Chloroplast phospholipid molecular species alterations during low temperature acclimation in *Dunnaliella*. Plant. Physiol. 74: 198-203.
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I. & Heredia, F. (2004), Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch. Latinoam. Nutr. 54: 149-154.
- Nakayama, K., Tamura, Y., Kikuzaki, H. & Nakatani, N. (1999). Antioxidant Effect of the Constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 649-653.
- Nazifi, E., Wada, N., Asano, T., Nishiuchi, T., Iwamuro, Y., Chinaka, S., Matsugo, S. & Sakamoto, T. (2015). Characterization of the chemical diversity of glycosylated mycosporine-like amino acids in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Photochem. Photobiol. B. 142: 154-168.
- Oren, A. & Gunde-Cimerman, N. (2007). Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? Microbiol. Lett. 269: 1-10.
- Osuna-Ruiz, I., López-Saiz, C., Burgos-Hernández, A., Velázquez, C., Nieves-Soto, M. & Hurtado-Oliva, M. (2016). Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico, Pharma. Biol. 54: 2196-2210.
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. Br. Phycol. J. 14: 103-117.
- Pereira, D., Filipin, E., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z. & Simioni, C. (2018). Pyropia acanthophora var. brasiliensis E. C. Oliveira and Coll (Rhodophyta: Bangiales) cultivated in seawater under laboratory conditions favors the production of economically important secondary metabolites. Braz. J. Biol. 9: 85-93.

- Phillips, D. & Towers, G. (1982). Chemical ecology of red algal bromophenols. ii. Exudation of bromophenols by *Rhodomela larix* (turner) C. Agardh.J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 58: 295-302.
- Pittet, J., Bouillant, M., Bernillon, J., Arpin, N. & Favre-Bonvin, J. (1983). The presence of reduced-glutamine mycosporines, new molecules, in several Deuteromycetes. Tetrahedron. Lett. 24: 65-68.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem. 48:396-402.
- Santos, M., Colepicolo, P., Pupo, D., Fujoo, M., Pereira, C. & Mesko, M. (2017). Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. J. App. Phycol. 1:1-9.
- Schubert, N., Garcia-Mendoza, E. & Pacheco-Ruiz, I. (2006). Carotenoid composition of marine algae. J. Phycol. 42: 1208-1216.
- Tala, F & Chow, F. (2014). Ecophysiological characteristics of *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta): seasonal and latitudinal variations in Chile. Aquatic Botany, 43p.
- Teai, T., Raharivelomanana, P., Bianchini, J., Faure, R., Martin, P. & Cambon, A. (1997) Structure of two new iminomycosporines isolated from *Pocillopora eydouxi*. Tetrahedron. Lett. 38: 5799-5800.
- Torres, P., Santos, J., Chow, F., Pena, M., & dos Santos, D. (2018). Comparative analysis of in vitro antioxidant capacities of mycosporine-like amino acids (MAAs). Algal. Res. 34: 57-67.
- Torres, P. (2017). Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de *Gracilaria* de importância econômica. Dissertação de doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo. 288p.
- Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Heredia, V., Pastén, A. & Scala, K. (2018). An edible red seaweed (*Pyropia orbicularis*): influence of vacuum drying on physicochemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity, and pigments. J. Appl. Phycol. 30: 673-683.
- Volkmann, M. & Gorbushina. (2006). Abroadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like aminoacids of terrestrial, marine and freshwater origin. Microbiol. Lett. 255: 286-295.
- Whitehead, K.; Hedges, J.I. (2001) Photodegradation and photosensitization of mycosporinelike amino acids. J. Photochem. Photobiol. B. 80:115-121.
- Young, H. & Patterson, V. (1982). A UV-protective compound from *Glomerella cingulata*. A mycosporine. Phytochem. 21: 1075-1077.
- Yuan, Y., Westcott, N., Hu, C. & Kitts, D. (2009). Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. Food. Chem. 12: 321-328.

- Zhang, Q, Yu, P, Li, Z, Zhang, H, Xu, Z. & Li, P. (2003). Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. J. Appl. Phycol. 15: 305-310.
- Zhang, Y., Xie, C., Chen, C., Ji, D. & Zhou, W. (2011). Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses. J. Fish. China. 35: 379-386.

Considerações finais

Consideraçõs finais

Os ajustes fisiológicos e químicos das macroalgas marinhas *Sargassum stenophyllum* e *Pyropia spiralis*, permitiram suportarem as flutuações de temperatura, evidenciando-se diferenças com dependência da posição no litoral e não dá morfologia. Adicionalmente, com esta pesquisa, pode se contribuir aos estudos de manejo, explotação sustentável e predições frente ao aquecimento global no marco das mudanças climáticas.

Estas macroalgas bentônicas de estudo provenientes do litoral Paulista do sudeste do Brasil, que habitam o mediolitoral, sendo do mediolitoral inferior a alga parda *S.stenophyllum* e do mediolitoral superior a alga vermelha *P. spiralis*, caracterizaram-se por apresentar em condições de laboratório uma faixa de tolerância nas temperaturas de 15 a 30 °C; e nos 35 °C, ou seja, dez graus a mais da temperatura controle (25 °C), foi possível evidenciar uma diminuição da taxa de crescimento e acréscimo na dissipação de energia não fotoquímica, encaminhando processos de sobrevivência.

Em condições de alta temperatura, aos 35 °C, houve necrose dos filoides de *Sargassum* e no talo da *Pyropia*, além que foi observado mudança de cor na água do mar, no qual pode ser atribuído à liberação de substâncias químicas como mecanismo de defesa, sendo principalmente os florotaninos na alga parda e provavelmente os bromofenóis na alga vermelha.

Com os mecanismos antioxidantes foi possível detetar que *Sargassum* é mais sensível que *Pyropia* frente às flutuações de temperatura. Foi observado um aumento de substâncias fenólicas em *Sargassum* conforme aumenta a temperatura, e um acréscimo de MAAs em *Pyropia* conforme diminui a temperatura.

Estas espécies apresentaram respostas diferenciadas em aminoácidos, carboidratos, fibras e minerais com potencial para futuros estudos na área nutricional, como por exemplo, um produto funcional a partir da *Pyropia* submetida aos 30 °C, o qual acrescenta o conteúdo de BCAAs.

O anterior pode se sintetizar no seguinte resumo gráfico:





A.1. Identificação taxonômica das espécies de estudo

A.1.1. Estudos morfológicos

De acordo com as análises morfológicas (Fig. A.1.1) foi identificada a alga parda *Sargassum stenophyllum* (Fig. A.1.1A-D) que apresenta um eixo principal de cujo ápice surge uma ramificação primária com filoides compridos de borde liso e ausência de criptosomas. Na Tabela A.1 estão as medições dos exemplares coletados na Praia de Cibratel e na Praia das Cigarras. Esta espécie tem tido alguns inconvenientes na identificação devido provavelmente à alta polimorfia. Mattio & Payri (2009) reconheceram o *Sargassum* como um gênero complexo de alta plasticidade morfológica intra-específica, o qual se encontra em reavaliação taxonômica.

A alga vermelha foi identificada como *Pyropia spiralis* (Fig. A.1E-G) devido à morfologia da margem lisa e ausência de monósporos. Estes exemplares tiveram diâmetro de $7,19 \pm 1,87$ cm.



Figura A.1.1. Habito geral de *S. stenophyllum* coletado na Praia (A) de Cibratel e (B) das Cigarras, com detalhamento dos (C) filoides com (D) ausência de criptostomas (seta). (E) Habito geral de *P. spiralis* com (F) margem lisa e dobrada em aumento 4X e (G) borde liso com presença de monósporos (seta) em aumento 10X. Escala de 1 cm.
		Praia de Cibratel	Praia das Cigarras
Talo	Altura	$14,20 \pm 1,99 \text{ cm}$	$21,66 \pm 1,91 \text{ cm}$
Filoides	Comprimento	$3,40 \pm 0,48 \text{ cm}$	$4,52 \pm 0,43 \text{ cm}$
	Largura	$0,30 \pm 0,08 \text{ cm}$	$0,41 \pm 0,07 \text{ cm}$
	Borde	Liso	Liso
Criptostomas	-	Pouco numerosos	Poucos numerosos

Tabela A.1.1. Características morfológicas de S. stenophyllum nos locais de coleta.

A.1.2. Estudos moleculares

As análises moleculares complementaram a delimitação do taxo. Porém, tem sido reportada a dificuldade na identificação molecular com espécies de *Sargassum* (Fig. A.1.2), já que tem sido evidenciado que no Brasil se encontra sob o mesmo agrupamento, sem esclarecer o epiteto. Já o epíteto específico da alga vermelha *Pyropia spiralis* foi corroborado com a sequencia JN222753.1 (Fig. A.1.3). A Tabela A.1.2 mostra os números de acesso e as sequências consenso das espécies de estudo.



Figura. A.1.2. Árvore de *Neighbour-Joining* para as sequências do marcador ITS-2 para *Sargassum*. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) estão representados nos ramos. GE: grupo externo; A-Rn: réplicas da coleta na Praia de Cibratel 1; B-Rn: réplicas da coleta na Praia de Cigarras. Sequências do *GenBank*; IBC: amostras brasileiras do Instituto de Biociências analisadas pela estudante Vitória Miranda; e BR: amostras brasileiras analisadas pela Dra. Donaji, supervisadas pela Dra. Mariana Oliveira.



Figura. A.1.3. Árvore de *Neighbour-Joining* para as sequencias do marcador COI-5P para *Pyropia*. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) estão representados nos ramos. GE: grupo externo; C-Rn: réplicas da coleta na Praia de Cibratel 1 e sequências do *GenBank*.

Espécie	Número de acesso	Sequência
		Consenso
Sargassum	MH422502	CGAAAACTCGCCCACAGCTTTGGGTTCGATCTCGACCTCAAGGC
stenophyllum		GGTGGAGCGGAATCTGAGTGTTCCGGGGAGCGGTAGTGTGGTGT
		GTATTTCTGTACATACTGCCTGTTCGTCCCCTGAGTCCACCCAAA
		CCTAGAGAGCTACCGATTGTCCGGACTTCTATTGTCTTTGCGGCG
		CTGGAGACAGGTCTACCTTGCGTCCTCCGGAAGATGCGTTGTTG
		ACCTCACCCCTCTCGCGGGGGGGGGGGGACACCGACAAGTCGCCGG
		GGATGTGCGCGGGTGACCTTGAGGCGTCGCTGGAGGCAAGTTCA
		CCTTGCGTCCTCCGGAGGATCCGTTGTTGACGGCGCCCCATATCA
		CGGGGCGGGGACACGACGGGTCGCCGGGGATGTGCGCGGGTGG
		TCTTGAGGCTTGGGACGGTAGGCAGTCTCGAGAGTGCCGGTGAG
S. stenophyllum	MH422503	CCCACAGCTTTGGGTTCGATCTCGACCTCAAGGCGGTGGAGCGG
		AATCTGAGTGTTCCGGGGAGCGGTAGTGTGGTGTGTGTATTTCTGTA
		CATACTGCCTGTTCGTCCCCTGAGTCCACCCAAACCTAGAGAGCT
		ACCGATTGTCCGGACTTCTATTGTCTTTGCGGCGCTGGAGACAGG
		TCTACCTTGCGTCCTCCGGAAGATGCGTTGTTGACCTCACCCCCT
		CTCGCGGGGCGGGGACACCGACAAGTCGCCGGGGATGTGCGCG
		GGTGACCTTGAGGCGTCGCTGGAGGCAAGTTCACCTTGCGTCCT
		CCGGAGGATCCGTTGTTGACGGCGCCCCATATCACGGGGCGGGG
		ACACGACGGGTCGCCGGGGATGTGCGCGGGTGGTCTTGAGGCTT
		GGGACGGTAGGCAGTCTCGAGAGTGCCGGTGAG

Tabela A.1.2. Sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Pvropia spiralis	MH422504	ACTTTGTATTTAATATTTGGAGCTTTTTTCTGGAATACTTGGCC
		ATGTGCGTCTGTGTTGATTAGAATAGAATTAGCACAACCAGG
		ATCAATTATTGTTAGGTAATCATCAAATATATAATGTACTTGT
		CAGAACATGCGTTTTTAATGATTTTTTTCATGGTTATGCCTGTA
		TAATTGGTGGATACGGTAACTGGTTTGTACCAATTATGATAGC
		GCGCCCGATATGGCATTTCCTCGTTTGAATAACATAAGCTTTT
		TTATTACCTCCATCATTGTGTCTTCTCTTAGGATCTACTATGAA
		AAGTTGGTGCTGGTACAGGTTGAACTTTGTATCCACCATTAAG
		CTATACAAAGTCATTCTGGGGGGGGGCTGTTGATCTTGCTATTTT
		GTTTACATTTGTCAGGTGCTTCTTCCATTTTAGGGGGCTATTAAT
		TATTACTACAATATTTAATATGCGCAATCCGGGACAAAGTAT
		ATCGTATACCTTTATTTGTTTGATCTATATTAATAACAGCTTTT
		ATTATTATTAG

A.2. Avaliação da estabilidade dos carotenoides nos extratos tamponados e metanólicos obtidos da extração de pigmentos fotossintetizantes.

Para avaliar o perfil de carotenoides das espécies de estudo (*S. stenophyllum* e *P. spiralis*) com os extratos tamponados e metanólicos das diferentes temperaturas obtidos da extração de pigmentos fotossintetizantes (descritos no item 1.2.3 do Capítulo I), foi utilizado o método descrito em Torres (2014), e comparado com o mesmo material do autor, ou seja, utilizando amostras de *Gracilariopsis tenuifrons* Fredericq & Hommersand extraída em metanol na proporção de 33 mg.mL⁻¹ MF (Torres, 2012), procedente do Banco de Germoplasma do Laboratório de Algas Marinhas "Edison José de Paula" do Instituto de Biociências da USP. Esse teste visou avaliar a estabilidade dos carotenoides dos extratos tamponados e metanólicos de *S. stenophyllum* e *P. spiralis*, visto que esses extratos foram armazenados a -80°C por dois anos.

Logo a comparação dos cromatogramas de *G. tenuifrons* com os extratos tamponados e metanólicos das diferentes temperaturas em *S. stenophyllum* e *P. spiralis*, foi observado que os cromatogramas das espécies de estudo não reportaram o pico referente à clorofila *a* (apresentado na Fig. 2.3 do Capítulo II e na Fig. 5.2 do Capítulo V), denotando possivelmente degradação nas amostras, além de reportar uma abundância menor de 50mAU. Portanto, não se estimou o perfil de carotenoides para cada tratamento. Porém, foi realizada uma caracterização do perfil de carotenoides com amostras provenientes de campo de *S. stenophyllum* e *P. spiralis*, assim como de *G. tenuifrons*, analisados mediante dois processos de extração (n = 3), sendo um primeiro grupo de amostras cuja maceração foi com tampão de fosfato de sódio, e após a centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em metanol, obtendo-se extrato tamponadometanólico; e um segundo grupo de amostras cuja maceração incluía somente metanol, denotando-se extrato metanólico (descrito no item 2.2.4 do Capítulo II).

A análise do perfil cromatográfico tanto no extrato tamponado-metanólico quanto no extrato metanólico de *G. tenuifrons* processado em $\lambda = 450$ nm (Fig. A.2.1), mostrou três picos nos tempos de retenção 6,95 min, 17,34 min e 34,77 min, identificados como luteína, clorofila *a* e β -caroteno, respectivamente. O perfil de caracterização dos carotenoides de *S. stenophyllum* e *P. spiralis*, foram apresentados no Capítulo II e Capítulo V, respectivamente. Dentre os cromatogramas foram detectados derivados de clorofila, provavelmente relacionado com as clorinas, as quais apresentam bandas de absorção máxima aos 350 a 450 nm (Uliana *et al.*, 2014).

Os carotenoides nos extratos tamponado-metanólicos e nos extratos metanólicos foram identificados mediante o uso de padrões de carotenoides, comparando os tempos de retenção e as bandas de absorção máxima na faixa ultravioleta e visível (Tabela A.2.1).



Figura A.2.1. Cromatogramas em $\lambda = 450$ nm de *Gracilariopsis tenuifrons* do (A) extrato tamponado-metanólico e (B) extrato metanólico.

Tabela A.2.1. Padrões de carotenoides suspendidos em metanol identificados por CLAE com detector por arranjo de diodos (λ máx = comprimento de onda) com os respectivos espectros UV-visível. tR = tempo de retenção. Os valores em cinza indicam a absorção na faixa UV.

tR (min)		λmáx	(nm)		Identificação	Espectro UV-visível
3,67	266	428	448	468	Fucoxantina	250 300 350 400 450 500 550 600 Comprimento de onda (nm)
3,89	266	414	436	466	Neoxantina	250 300 350 400 450 500 550 600 Comprimento de onda (am)
4,82	252	398	422	448	Violaxantina	250 300 350 400 450 500 550 600 Comprimento de onda (mm)
5,28	250			478	Astaxantina	250 300 350 400 450 500 550 600 Comprimento de onda (mn)
5,54	266	422	446	476	Anteroxantina	250 300 350 400 450 500 550 600 Comprimento de onda (nm)
6,73	268	422	444	472	Luteína	250 300 350 400 450 500 600 Comprimento de onda (nm)



Referencias (A.2)

- Torres, P. (2012). Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo. 104p.
- Torres, P., Chow, F., Furlan, C., Mandelli, F., Mercadante, A. & Santos, D. (2014). Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll a and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*. Zhang and Xia (Rhodophyta). Bra. J. Oceanogr. 62: 57-63.
- Uliana, M., Pires, L., Pratavieira, S., Brocksom, T., de Oliveira, K., Bagnato, V. & Kurachi, C. (2014). Photobiological characteristics of chlorophyll *a* derivatives as microbial PDT agentes. Photochem. Photobiol. Sci. 8: 1137-1145.

A.3. Teste de detecção de substâncias fenólicas.

Com o interesse de identificar as substâncias fenólicas devido à relação como defesa às variações dos fatores ambientais (Abdala-Diaz *et al.*, 2006), foram selecionados os extratos aquosos provenientes da extração de carboidratos solúveis totais (descrito no item 1.2.4 do Capítulo I), devido à semelhança com o método que extrai substâncias fenólicas de Machu *et al.* (2015), no qual analisaram espécies de algas pardas: *Laminaria japonica, Eisenia bicyclis* Setchell, *Sargassum fusiformis* e *Undaria pinnatifida*.

A Tabela A.3.1 mostra o método de extração de carboidratos proposto por Masuko *et al.* (2005), o qual apresenta parâmetros semelhantes ao método de extração de substâncias fenólicas por Masuko *et al.* (2005). Assim, para verificar a presença de substâncias fenólicas, as amostras aquosas provenientes da extração de carboidratos foram estudadas no espectro de absorção na faixa ultravioleta (200 a 400 nm) e na atividade antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (Pires *et al.*, 2017).

Tabela A.3.1. Comparação entre os métodos de extração para carboidratos (Masuko *et al.*, (2005) e substâncias fenólicas (Machu *et al.*, 2015).

	Métodos de extração		
	Masuko et al. (2005) *	Machu et al. (2015)	
Biomassa seca (mg)	14 mg	100 mg	
Volume (mL)	1	10	
Solvente	Água	Água	
Tempo (minutos)	180	10	
Temperatura (°C)	70	80	

*Método de extração utilizado no presente estudo.

Como resultado, as amostras nas diferentes condições de temperaturas apresentaram bandas de absorção nos 225 e 266 nm (Fig. A.3.1A), exceto nos 35 °C que teve deslocamento à esquerda. A literatura indica que aquela faixa de absorção pode se relacionar com as substâncias fenólicas, possivelmente aos florotaninos (Abdala-Díaz *et al.*, 2014). Adicionalmente, os resultados de Folin-Ciocalteu (Fig. A.3.1B) evidenciaram alta porcentagem, maior ao 60%, entre os tratamentos de 15 a 30 °C.

Após a análise, evidenciando presença de substâncias fenólicas com os extratos aquosos das diferentes temperaturas, foram realizados testes com o método cromatográfico para a identificação das substancias fenólicas, alterando parâmetros na programação como a porcentagem dos solventes e condições do fluxo.



Figura A.3.1. (A) Espectro de absorção na região ultravioleta e (B) porcentagem da atividade antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu nos extratos provenientes da extração de carboidratos de *Sargassum stenophyllum* nas diferentes condições de temperaturas. Na parte B, os valores representam média \pm desvio padrão (n = 5); e as letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0.05).

Referencias (A.3)

- Abdala-Díaz, R., Cabello-Pasini, A., Márquez-Garrido, E. & Figueroa, F. (2014). Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. Ciencias Marinas. 40: 1-10.
- Machu, L., Misurcova, L., Varva, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J. & Jurikova, T. (2015). Phenolics content and antioxidant capacity in algal food products. Molecules. 20: 1118-1133.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimurac, S. & Leea, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. Anal Biochem. 339:69-72.
- Pires, J., Torres, P., Dos Santos, D. & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-70-0. 1-5.

Súmula curricular

Vanessa Urrea-Victoria Barranquilla (Colômbia), 6 de abril de 1990. E-mail: vaneuv@gmail.com

- Doutoranda em Ciências Biológicas (Botânica). Instituto de Biociências. Universidade São Paulo (São Paulo, Brasil).
- Graduação em Biologia. Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colômbia).
- Ensino médio em Agustiniano Ciudad Salitre (Bogotá, Colômbia).

Disciplinas cursadas no Doutorado Direto

- BIB5704-4/2. Atualização Ficológica. 11/03/2014 -12/06/2014. Créditos: 2. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- PST5883-1/1. Preparação pedagógica em psicologia social. 12/03/2014 22/04/2014. Créditos:2. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BIB5733-2/2. Tópicos em fitoquímica I. 12/03/2014 21/05/2014. Créditos: 2. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BIB5762-6/3. Métodos de análise de metabólitos secundários. 23/04/2014 03/06/2014.Créditos: 8. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BIB5744-2/1. Análise instrumental da fotossíntese: fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM). 26/05/2014 - 01/06/2014. Créditos: 2. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BIB5793-3/3. Atualização ficológica II. 12/08/2014 25/10/2014. Créditos: 2. Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BIO5787-4/1. Radicais livres em sistemas biológicos. 28/08/2014 30/10/2014. Créditos: 8.Frecuencia: 100. Conceito: A.
- BMF5872-1/1 Compostos bioativos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. 08/10/2014 - 04/11/2014. Créditos: 4. Frecuencia: 100. Conceito: A.

Monitorias

- Monitora bolsista da disciplina BIB 0124 Diversidade e evolução dos organismos fotossintetizantes para alunos do curso de graduação de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Estela Plastino. (2014)
- Monitora voluntária da excursão didática ao litoral de Itanhaém, no dia 20/06/2015 sobre Ambiente costeiro, macroalgas e herborização durante o Curso de extensão "A Botânica no cotidiano". Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Fungyi Chow. (2015)

Publicações

- Urrea-Victoria, V. & Pires, J. (2016). Algas marinhas como fonte de polissacarídeos: Ficocoloides. Capítulo dentre a apostilha do VI Botânica no Inverno.
- Urrea-Victoria, V., Pires, J. P., Torres, P.B., Santos, D. Y. A. C. & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. São Paulo: Instituto de Biociências. Disponível em: ISBN 978-85-85658-62-5.
- Bernardi, J., Vasconcelos, E., Urrea-Victoria, V., Bezerra, P., Reis, T., Cocentino, A., Navarro, D., Chow, F., Mallea, A & Fujii, M. (2018). Antioxidant activity of three seaweeds from tropical reefs of Brazil: potential sources for bioprospecting. Journal of Applied Phycology. 1-12.
- Urrea-Victoria, V., Nardelli, A., Floh, E. & Chow, F. (submetido à Journal of Applied Phycology). Short-term responses of *Sargassum stenophyllum* to temperature in laboratory conditions: photosynthesis and chemical composition.

Participação e/ou organização em eventos

- IV Botânica no Inverno. Ministrou a aula: Ficocoloides: polissacárideos das algas marinhas, suas aplicações e o cenário industrial atual. (2014). São Paulo (Brasil).
- IV Botânica no Inverno. Membro da comissão organizadora. (2014). São Paulo (Brasil).
- XVI International Congress of Photobiology. Apresentação de pôster intitulado "Effects of temperature on photosynthesis of *Sargassum* sp. (Fucales, Ochrophyta) estimated by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence. Urrea-Victoria, V., Souza, A., Chow, F., Plastino, E. & Barufi, J. (2014). Córdoba (Argentina).
- V workshop da RedeAlgas. Apresentação do poster intitulado: Photosynthetic performance and pigment composition of *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyceae) exposed to different temperatures. Urrea-Victoria, V. & Chow, F. (2015). Arraial do Cabo (Brasil).
- V workshop da RedeAlgas. Apresentação do poster intitulado: Assays of antioxidant potential as an outline for biotechnological applications of algae. Chow, F., Pires, J., Torres, T., Harb, T., Urrea-Victoria, V. & Santos, D. (2015). Arraial do Cabo (Brasil).
- IX Asia-Pacific conference on algal biotechnology: food, feel, fuel and beyond. Apresentação do poster intitulado: *Sargassum stenophyllum* as functional antioxidant source: thermal stress. Urrea-Victoria, V., Nardelli, A. & Chow, F. (2016). Bangkok (Tailândia).
- VI workshop da RedeAlgas. Apresentação oral: Chemical composition and functional properties of the Brazilian seaweeds *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Ochrophyta) and *Pyropia spiralis* (Bangiales, Rhodophyta): short-term temperature effect. Urrea-Victoria, V., Floh, E. & Chow, F. (2017). Arraial do Cabo (Brasil).
- VI workshop da RedeAlgas. Apresentação do poster: Atividade antioxidante de três macroalgas de recifes tropicais: potenciais fontes para prospecção. Vasconcelos, J., Vasconcelos, E.,

Urrea-Victoria, V., Bezerra, P., Concetino, A., Navarro, D., Chow, F. & Fujii, M. (2017). Arraial do Cabo (Brasil). Recebeu prêmio Yocie Yoneshigue Valentin.

Orientações e avaliações de trabalhos

- Orientação no projeto "Caracterizar aspectos fisiológicos de três espécies de macroalgas: Bostrychia sp. (Rhodophyta), Sargassum sp (Ochrophyta) e Ulva sp. (Chlorophyta) incluindo a pigmentação, estratégias de defesas antioxidantes e obter marcadores moleculares do tipo DNA barcode para essas espécies" em IV Botânica no Inverno. (2014). São Paulo (Brasil).
- Avaliador dos projetos na feria brasileira de ciências e engenharia (FEBRACE). (2015). São Paulo (Brasil).
- Avaliador dos trabalhos de iniciação científica do 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - Mostra de Destaques IC/IT. São Paulo, Brasil. (2015). São Paulo (Brasil).
- Avaliador dos projetos na feria brasileira de ciências e engenharia (FEBRACE). (2016). São Paulo (Brasil).
- Avaliador dos trabalhos de iniciação científica do 25º Simpósio internacional de iniciação científica e tecnológica da USP. (2017). São Paulo (Brasil).
- Avaliador dos projetos finalistas da mostra paulista de ciências e engenharia (MOP). São Paulo, Brasil. (2017). São Paulo (Brasil).