UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ALINE PATERNOSTRO MARTINS

Avaliação do Potencial Biotecnológico de Macroalgas Marinhas

Versão corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 18/02/2013

ALINE PATERNOSTRO MARTINS

Avaliação do Potencial Biotecnológico de Macroalgas Marinhas

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

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Co-orientadora: Profa. Dra. Nair Sumie Yokoya

São Paulo 2013

Aos meus pais, Rosa e Eliezer, minha irmã, Graziela, e meus avós, José e Zelinda (*in memorian*), com muito amor.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que possibilitaram a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Aos meus pais, Rosa e Eliezer, pelo amor e incentivo que recebi durante toda vida e que, mesmo com todas as dificuldades, sempre se esforçaram para me educar. Obrigada por compreenderem os meus períodos de ausência;

À minha irmã, Graziela Paternostro Martins, pelo torcida de sempre e pelo grande amor que tem por mim;

Ao meu tio Francisco, pelo apoio que sempre dá a minha carreira e a minha tia Marli e minha prima Talita, pelo imenso carinho;

Ao meu querido orientador, Dr. Pio Colepicolo, pela orientação e pela assistência que me deu durante todo o doutorado. Obrigada por ter me recebido tão bem, por ter acreditado em mim e por todos os ensinamentos, oportunidades, atenção, carinho e conselhos;

À minha querida co-orientadora, Dra. Nair Sumie Yokoya, por tudo o que me ensinou ao longo desses 11 anos de convivência, com enorme dedicação e paciência. Obrigada pelas oportunidades e bons conselhos;

À CAPES pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de doutorado;

À Profa. Mariana Cabral de Oliveira e a Amanda, pela análise da sequência de DNA das amostras de *Dictyota*;

À Profa. Dra. Eliane Marinho-Soriano, pela alegria com que sempre nos recebeu em Natal e pelo apoio com as coletas realizadas em Rio do Fogo, RN.

À Profa. Dra. Estela Maria Plastino e à Marcella Araújo do Amaral Carneiro, pela companhia e pela ajuda na coleta realizada em Rio do Fogo, RN;

Ao Prof. Dr. Andres Mansilla, pela alegria e carinho com que sempre nos recebeu em Punta Arenas, Chile. Muito obrigada por todas as oportunidades; A todos os professores e funcionários do Instituto de Química, pelo auxílio para a execução desse trabalho;

Aos funcionários da pós-graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, pela atenção, ótimo atendimento e paciência;

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e maravilhosa convivência ao longo desses anos: Angela, Cícero, Cíntia, Diego, Diogo, Dina, Ed, Eliezer, Erechim, Erika, Fabi, Helena, João, Leo, Lú, Luiz, Renato, Sandrinha e Tati. Gostaria de agradecer em especial ao Ed, Leo e Sandrinha por terem sempre apoiado o meu trabalho e me ajudado quando precisei;

A todos os colegas da pós-graduação, em especial aos amigos Valquíria, Juliana, Valdir, Guilherme, Pererê, Gabi, Carlos Henrique, Carol, Thiago, Thiberio, Vinícius, Thaísa, Augusto e Alê. Obrigada pelo convívio, conversas, festas e tudo mais;

A todos os "amigos antárticos" que nos ajudaram nas coletas na Antártica, sempre com muita alegria. Não vou citar nomes, pois foram muitas as amizades realizadas. Obrigada pelo maravilhoso convívio durante a nossa estadia na EACF;

A todos os professores, funcionários e alunos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, por sempre me receberem tão bem, em especial ao Zé Domingos e à Val, por me auxiliarem na execução dos experimentos e ao Jonatas e ao Levi, por toda a ajuda ao longo do meu doutorado;

Às Profas. Mutuê T. Fujji, Diclá Pupo e Silvia Pita pela grandiosa ajuda na identificação das algas;

Ao meu grande e querido amigo Lagosta. Muito obrigada pelas sugestões e discussões sobre o experimento de captação de CO₂ e pela enorme ajuda com as análises e cálculos das formas de DIC. Obrigada também pela valiosa amizade, conversas, risadas, e tudo mais;

Ao Prof. Ernani Pinto e a todos os integrantes do seu laboratório, em especial a Fabi, Felipe e Vanessa, pelas discussões e apoio nos momentos de dúvida em relação às análises cromatográficas; Aos meus queridos amigos Carol, Flávio, Paulet, Mari, Luís, Daniella, Deborah, Marina, Suzana, Simone e Verônica pela valiosíssima amizade e apoio constante;

À Érika, Karla, Lú e Helena pelo convívio, amizade e companhia.

MUITO OBRIGADA!!!

(...) a natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Esta é uma das lições mais

duras que os humanos têm de aprender.

Richard Dawkins

RESUMO

Martins, A.P. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Macroalgas Marinhas.** 2013. 188p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, foi estudado o potencial biotecnológico, com ênfase na produção de biodiesel, de 25 espécies de macroalgas marinhas pertencentes às divisões Rhodophyta, Chlorophyta e Heterokontophyta coletadas no litoral brasileiro, avaliando-se a sua composição bioquímica e a sua taxa de fotossíntese. Também foram realizados estudos com 6 espécies de macroalgas coletadas na Baía do Almirantado, na Península Antártica, para comparar os resultados apresentados por esses organismos, que habitam um ambiente de condições extremas e adversas. Para a análise bioquímica, foram quantificados os pigmentos (clorofila a, para todos os grupos de macroalgas, e ficobiliproteínas -aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina-, para as algas vermelhas), as proteínas e carboidratos solúveis totais e os lipídeos totais e ácidos graxos. As espécies Dictyota menstrualis e Ulva lactuca apresentaram os maiores valores de fotossíntese máxima. Foram observadas diferenças no conteúdo de clorofila a entre as espécies de macroalgas estudadas, sendo que os valores variaram de 0.20 ± 0.01 mg/g massa seca (Gigartina skottsbergii) a $6,82 \pm 0,46$ mg/g massa seca (Spatoglossum schroederi). Também houve grande variação no conteúdo de lipídeos, carboidratos e proteínas, sendo que os maiores valores foram encontrados em D. menstrualis (98,8 \pm 4,9 mg/g massa seca de lipídeos), Gracilaria mammillaris, Laurencia dendroidea e Plocamium cartilagineum (742,0 ± 31,9, $675,3 \pm 11,0 = 660,2 \pm 27,2 \text{ mg/g}$ massa seca de carboidratos, respectivamente) e Palmaria decipiens e Aglaothamnion uruguayense (21.7 ± 1.7 e 18.0 ± 0.4 mg/g massa seca de proteínas, respectivamente). Houve grande variação na concentração e no perfil de ácidos graxos das espécies estudadas, sendo que D. menstrualis e S. schroederi foram as espécies que apresentaram os maiores valores. Além disso, D. menstrualis exibiu a maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados. A partir dos resultados obtidos com as algas coletadas em campo, concluímos que D. menstrualis foi a espécie que apresentou as melhores características para ser utilizada como fonte para produção de biodiesel, devido a sua alta taxa fotossintetizante, alto teor de lipídeos e ácidos graxos e alto teor de ácidos graxos monoinsaturados. Dessa forma, D. menstrualis foi utilizada na segunda etapa do trabalho, sendo estabelecido o seu cultivo em laboratório, com uma taxa de crescimento (TC) de 11,1 % d⁻¹. Foram realizados experimentos para avaliar os efeitos do aumento da concentração de

dióxido de carbono (CO₂), em condições de limitação e saturação de nitrogênio (na forma de nitrato, NO₃), sobre a TC, a fotossíntese, a atividade das enzimas nitrato redutase (NR), Anidrase Carbonica (AC) e Rubisco e sobre a composição bioquímica de D. menstrualis cultivada em biorreatores e sobre a captação do CO2 por D. menstrualis cultivada em laboratório. A TC, o conteúdo de proteínas e de N total no tecido de D. menstrualis foram maiores nos tratamentos contendo NO₃, independente da adição de CO₂. Entretanto, houve um aumento nos valores de fotossíntese máxima, na atividade da Rubisco e NR, e no teor de carboidratos e lipídeos totais quando D. menstrualis foi cultivada em meio com adição de CO₂, com saturação de NO₃⁻. Houve pouca variação na atividade da AC entre os diferentes tratamentos testados. O perfil de ácidos graxos de D. menstrualis cultivada nos biorreatores foi caracterizado por um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, com destaque para os omegas-3. Não houve diferença significativa na taxa de remoção de CO₂ entre os tratamentos com e sem adição NO₃⁻. A remoção de CO₂ nos meios com e sem adição de CO₂ foi alta, variando de 71,5% a 34,8%, respectivamente. Os resultados evidenciam que quando essa espécie foi cultivada em biorreatores, houve um aumento no seu teor de ácidos graxos poliinsaturados e ω -3, o que a torna mais interessante para ser utilizada como nutracêutico do que como matéria-prima para a produção de biodiesel. Apesar disso, a sua aplicação como fonte de biodiesel não deve ser desconsiderada, uma vez que alterações nas condições de cultivo acarretam em modificações no perfil de ácidos graxos. Com base nos resultados obtidos, as perspectivas para a produção de biodiesel a partir de macroalgas marinhas deverão contemplar estudos para encontrar as melhores condições de cultivo para que ocorra o aumento na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados.

Palavras-chave: Biodiesel, algas marinhas, cultivo, biorreator, CO2 e nitrogênio

ABSTRACT

Martins, A.P. **Evaluation on Biotehcnological Potential of Marine Macroalgae Biotechnological Potential.** 2013. 188p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The biotehenological potential, with biodiesel producing emphasis, on 25 species of marine benthic algae from the phylum Rhodophyta, Chlorophyta and Heterokontophyta collected along the Brazilian coast, were evaluated assessing their biochemical composition and their photosynthetic rate. Studies have also been performed with 6 seaweed species collected in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula, to compare the results presented by these organisms inhabiting an environment of extreme and adverse conditions. For biochemical analysis, pigments (chlorophyll a, for all groups of macroalgae, and phycobiliproteins, allophycocyanin, phycocyanin and phycoerythrin, for the red algae), total soluble protein, total soluble carbohydrates and total lipids and fatty acids were quantified. The species Dictyota menstrualis and Ulva lactuca showed the highest values of maximum photosynthesis. There were differences in chlorophyll a content between the seaweeds studied, and the values ranged from 0.20 ± 0.01 mg / g dry mass (*Gigartina skottsbergii*) to 6.82 ± 0.46 mg / g dry weight (*Spatoglossum schroederi*). There was also wide variation in the content of lipids, carbohydrates and proteins, and the highest values were found in the species Dictyota menstrualis (98.8 ± 4.9 mg / g dry weight of lipids), Gracilaria mammillaris, Laurencia dendroidea and Plocamium cartilagineum (742, 0 ± 31.9 , 675.3 ± 11.0 and $660.2 \pm 27.2 \text{ mg} / \text{g}$ dry weight of carbohydrates, respectively) and *Palmaria decipiens* and Aglaothamnion uruguayense (21.7 \pm 1.7 and 18.0 \pm 0, 4 mg / g dry weight of proteins, respectively). There was a wide variation on fatty acids contents and profile of the species studied; D. menstrualis and Spatoglossum schroederi showed the highest lipids values. In addition, D. menstrualis exhibited the highest proportion of monounsaturated fatty acids. From the results obtained with algae collected in the field, D. menstrualis is the species with the best characteristics to be used as a source for biodiesel production due to their high photosynthetic rate, high content of lipids and fatty acids and a high content of monounsaturated fatty acids. Thus, D. menstrualis was used in the second stage of this study, being established it's cultivation in the laboratory, with a growth rate (GR) of 11.1% d⁻¹. Experiments to evaluate the effect of increasing carbon dioxide (CO₂) concentration, under nitrogen (NO₃⁻) limiting and saturation conditions, on the GR, photosynthesis, the activity of

nitrate reductase (NR), carbonic anhydrase (CA) and Rubisco and on the biochemical composition of *D. menstrualis* grown in bioreactors and on the CO_2 capture by *D*. menstrualis grown in the laboratory were performed. The GR, protein content and N content in the tissue of *D. menstrualis* were higher in treatments containing NO₃, regardless of the addition of CO₂. However, there was an increase in the values of maximum photosynthesis, of Rubisco and NR activity, and of total soluble carbohydrates and total lipids when D. menstrualis was grown in medium with addition of CO2, with NO3⁻ saturation. There was little variation in the AC activity among different treatments. The fatty acid profile of D. menstrualis cultivated in bioreactors was characterized by a high content of polyunsaturated fatty acids, especially the omegas-3. There was no significant difference in the rate of CO₂ removal between treatments with and without NO3. CO2 removal in medium with and without addition of CO₂ was high, ranging from 71.5% to 34.8%, respectively. The results show that when this species was cultivated in bioreactors, there was an increase in its content of polyunsaturated fatty acids and ω -3, which makes it interesting for use as a nutraceutical than as raw material for biodiesel production. Nevertheless, its application as a source of biodiesel can not be disregarded, since changes in culture conditions lead to changes in fatty acid profile. Based on these results, the prospects for the production of biodiesel from marine macroalgae should include studies to find the best growing conditions to occur the increase in the monounsaturated fatty acids biosynthesis.

Keywords: Biodiesel, seaweed, cultivation, bioreactor, CO₂ and nitrogen

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AC	Anidrase Carbônica
AFC	Aloficocianina
Alfa	Eficiência Fotossintetizante
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
At	Alcalinidade Total
Beta	Fotoinibição
BSA	Bovine Serum Albumin
BHT	Butil-Hidróxi-Tolueno
Ci	Carbono Inorgânico
Curvas FI	Curvas de Fotossíntese X Irradiância
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
DIC	Carbono Inorgânico Dissolvido
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons
ETRmax	Fotossíntese máxima
FAME	Fatty Acids Methyl Esters
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
Fm	Fluorescência Máxima de uma Planta Aclimatada ao Escuro
Fm'	Fluorescência Máxima de uma Planta Aclimatada à Luz
F ₀	Fluorescência Basal de uma Planta Aclimatada ao Escuro
Ft	Fluorescência Basal de uma Planta Aclimatada à Luz
GEE	Gases do Efeito Estufa
iK	Irradiância de Saturação
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto
NED	N-(1-Naftil) Etilendiamina Diidrocloreto
NPQ	Dissipação Não-Fotoquímica

Nitrato redutase
Pulso de Amplitude Modulada
Peso Fresco
Pulso de Luz Saturante
Fotossistema I
Fotossistema II
Atividade Enzimática Relativa
Rendimento Quântico Efetivo
Rendimento Quântico Potencial
Taxa de Crescimento
Unidade Prática de Salinidade
Solução de enriquecimento de von Stosch
Solução de enriquecimento de von Stosch, na concentração de 50%

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletadas na costa brasileira 47
Tabela 2. Espécies de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletadas na Baía do
Almirantado, localizada na Ilha Rei George, Península Antártica
Tabela 3. Composição química da solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970),
com modificações segundo Yokoya (1996) 66
Tabela 4. Concentração de nutrientes e parâmetros abióticos acompanhados durante o
experimento realizado com Dictyota menstrualis cultivada em biorreatores, com e sem
adição de nitrato e com e sem adição de CO2. Os valores correspondem a média \pm o
desvio padrão (n=3)
Tabela 5. Concentração inicial de CO _{2,} após aeração com ou sem CO ₂ , na água do mar com e
sem adição de nitrato. Os valores correspondem a média ± desvio padrão (n=6)
Tabela 6. Parâmetros fotossintetizantes (rendimento quântico efetivo - RQE, fotossíntese
máxima – ETRmax, eficiência fotossintetizante – alfa e parâmetro de saturação – Ik) de
representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e
antártico. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3)
Tabela 7. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados
(mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas
coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio
padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são
significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de
Student-Newman-Keuls
Tabela 8. Conteúdo de ácidos graxos saturados (mg / g massa seca) de representantes de
rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os
valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies
com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de
comparação múltipla de Student-Newman-Keuls
Tabela 9. Conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados (mg / g massa seca) de representantes
de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os
valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies
com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de
comparação múltipla de Student-Newman-Keuls 102

- Tabela 13. Parâmetros fotossintetizantes (rendimento quântico efetivo RQE, fotossíntese máxima ETRmax, eficiência fotossintetizante alfa e parâmetro de saturação Ik) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.
- **Tabela 14.** Rendimento quântico potencial (RQP) inicial e final e % de recuperação do RQPobtidos com a curva de indução escuro/luz e recuperação de *Dictyota menstrualis*cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valorescorrespondem a média ± o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas sãosignificativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla deStudent-Newman-Keuls.115
- **Tabela 15.** Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo,

Tabela 16. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (mg / g massa seca) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. 128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do sistema carbonato em ambiente marinho (Amancio, 2007, adaptado de
Kleypas & Langdon, 2002)
Figura 2. Variação da concentração das diferentes formas do carbono inorgânico dissolvido
na água do mar em função do pH (Amancio, 2007, adaptado de Raven, 2005) 37
Figura 3. O processo da fotossíntese converte a luz em energia química e é a chave para a
produção de biocombustíveis (Schenk et al. 2008)
Figura 4. A. Praia de Fortaleza, uma das áreas de coleta em Ubatuba, SP. A. Aspecto geral
dos substratos rochosos; B. Aspecto de uma população de Caulerpa racemosa
(Forsskål) J.Agardh (Ulvophyceae, Chlorophyta)
Figura 5. Aspecto geral da área de coleta de algas marinhas em Rio do Fogo, RN 46
Figura 6. Aspecto geral de uma das áreas de coleta na Baía do Almirantado, Ilha Rei George,
Antártica
Figura 7. Aspecto geral das espécies da ordem Ceramiales estudadas no presente trabalho. A.
Acanthopfora spicifera; B. Aglaothamnion uruguayense; C. Bryocladia thyrsigera; D.
Bryothamnion seaforthii; E. Laurencia dendroidea; F. Palisada flagellifera
Figura 8. Aspecto geral de algumas espécies das ordens Bonnemaisoniales, Halymeniales,
Nemaliales, Gracilariales e Gigartinales estudadas no presente trabalho. A.
Asparagopsis taxiformis; B. Cryptonemia crenulata; C. Dichotomaria marginata; D.
Gracilaria cervicornis; E. Hypnea musciformis; F. Solieria filiformis
Figura 9. Aspecto geral das espécies das ordens Bryopsidales, Siphonocladales,
Cladophorales e Ulvales estudadas no presente trabalho. A. Caulerpa racemosa; B.
Cladophoropsis membranacea; C. Rhizoclonium africanum; D. Ulva lactuca
Figura 10. Aspecto geral de algumas espécies das ordens Dictyotales e Fucales estudadas no
presente trabalho. A. Dictyopteris deliculata; B. Dictyota menstrualis; C. Lobophora
variegata; D. Padina gymnospora; E. Spatoglossum schroederi; F. Sargassum
<i>cymosum</i>
Figura 11. Aspecto geral das espécies coletadas na Antártica estudadas no presente trabalho.
A. Gigartina skottsbergii; B. Palmaria decipiens; C. Plocamium cartilagineum; D.
Ascoseira mirabilis; E. Desmarestia anceps; F. Himantothallus grandifolius
Figura 12. Dinâmica da medição da fluorescência da clorofila a do fotossistema II,
modificado de Heinz Walz GmbH (1998) 56

- Figura 20. Conteúdo de clorofila a (Cla) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo RN e Antártica. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.
- **Figura 21.** Variação do conteúdo de clorofila *a* (Cl*a*) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Ubatuba-SP, Rio do Fogo RN e Antártica). Os valores representam a média ± o desvio padrão

- Figura 26. Variação do conteúdo de lipídeos totais (A), carboidratos solúveis totais (B) e proteínas solúveis totais (C) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Ubatuba-SP, Rio do Fogo RN e Antártica). Os valores representam a média ± o desvio padrão incluindo todas as espécies de cada filo. Filos com letras distintas são significativamente diferentes entre

- Figura 28. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletadas em Ubatuba-SP, Rio do Fogo RN e Antártica. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). 94
- Figura 29. Diagrama de dispersão com valores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados
 (A), poliinsaturados e saturados (B) e poliinsaturados e monoinsaturados (C) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo RN e Antártica.

- Figura 34. Taxas de crescimento (A) e curvas de fotossíntese-irradiância baseadas na fluorescência da clorofila *a* (B) de *Dictyota menstrualis* cultivada em laboratório em água do mar com e sem a adição da solução de enriquecimento de von Stosch, a 50% (VSES/2). Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

- Figura 37. Curvas de indução escuro/luz e período de recuperação do rendimento quântico das algas aclimatadas ao escuro de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de nitrato e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

- Figura 43. Conteúdo de N (A) e C (B) e razão C:N (C) no talo de Dictyota menstrualis cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

- Figura 48. Conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados octadecatetraenóico (C18:4 Δ 6, 9, 12, 15), eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5, 8, 11, 14) e eicosapentaenoico (C20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17) (A) e conteúdo total de ω-3 e ω-6 (B) de *Dictyota menstrualis* cultivada em

- Figura 50. Cromatograma do padrão de ácidos graxos metilados (Supelco 37) injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B. Detalhe dos picos 16 e 17. 150

Figura 67. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Solieria filiformis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.... 167

Figura 68. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Caulerpa racemosa* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

- Figura 71. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Ulva lactuca* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos...... 171
- Figura 72. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de Ascoseira mirabilis injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

- Figura 80. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de Sargassum stenophyllum injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

- Figura 81. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de Spatoglossum schroederi injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

SUMÁRIO
1. INTRODUÇÃO
1.1. Bioenergia
1.2. Importância e utilização das macroalgas marinhas
1.3. Utilização das macroalgas para a produção de biocombustível, nutracêuticos e co-
produtos
1.4. Influência dos fatores ambientais sobre o metabolismo e a fisiologia das algas
1.5. Costa brasileira e antártica
1.6. Exploração e cultivo de algas marinhas da costa brasileira
1.7. Justificativa
2. OBJETIVOS
3. MATERIAIS E MÉTODOS
3.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas
brasileiras e antárticas
Coleta
Variáveis analisadas55
Fotossíntese
Pigmentos
Proteínas solúveis totais60
Carboidratos solúveis totais61
Lipídeos totais61
Ácidos graxos
3.2. Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de Dictyota menstrualis (Hoyt)
Schnetter, Hörning & Weber-Peukert (Phaeophyceae) cultivada em laboratório
Espécie selecionada e utilizada no estudo63
Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas em laboratório64
3.3. Efeitos do aumento do CO2, em condições de saturação e limitação de nitrogênio,
sobre o metabolismo e a composição bioquímica de D. menstrualis cultivada em
biorreatores
Variáveis analisadas70
Crescimento70
Fotossíntese71
Nitrato redutase (NR)71

Anidrase Carbônica (AC)72
<i>Rubisco</i>
Pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, lipídeos totais e
ácidos graxos74
Conteúdo de C e N74
Conteúdo de manitol74
3.4. Efeitos do aumento do CO ₂ , em condições de saturação e limitação de nitrogênio,
sobre a captação de CO ₂ por <i>D. menstrualis</i> cultivada em laboratório
3.5. Análises estatísticas
4. RESULTADOS
4.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas
procedentes do Brasil e Antártica
4.2 Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de Dictyota menstrualis (Hoyt)
Schnetter, Hörning & Weber-Peukert cultivada em laboratório 110
4.3. Efeitos do aumento do CO ₂ em condições de saturação e limitação de nitrogênio sobre
o metabolismo e a composição bioquímica de Dictyota menstrualis cultivada em
biorreatores e sobre a captação do CO2 por D. menstrualis cultivada em laboratório 112
5. DISCUSSÃO
5.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas
brasileiras e antárticas
5.2 Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de Dictyota menstrualis (Hoyt)
Schnetter, Hörning & Weber-Peukert cultivada em laboratório 136
5.3. Efeitos do aumento do CO ₂ , em condições de saturação e limitação de nitrogênio,
sobre o metabolismo e a composição bioquímica de D. menstrualis cultivada em
biorreatores e sobre a captação do CO ₂ por <i>D. menstrualis</i> cultivada em laboratório
6. CONCLUSÕES
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 144
APÊNDICE I
APÊNDICE II
ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioenergia

As demandas de energia e de serviços associados crescem a cada ano, uma vez que são imprescindíveis para o desenvolvimento social e econômico da Humanidade. O uso global de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás) aumentou desde meados do século 20 até ser a principal fonte de energia, o que ocasionou uma rápida progressão nas emissões de dióxido de carbono (CO_2) e nas concentrações atmosféricas dos gases do efeito estufa (GEE), os quais, por sua vez, são responsáveis pela maior parte da elevação nas temperaturas médias globais. As emissões destes gases continuam a crescer e, até o final de 2010, as concentrações de CO_2 aumentaram para mais de 390 ppm, 39% acima do níveis existentes no período pré-industrial (Edenhofer *et al.*, 2012). As mudanças climáticas globais, por sua vez, têm um impacto significativo sobre as populações de animais e plantas (Root *et al.*, 2003).

A realização de medidas que reduzam as emissões de GEE a partir do sistema de geração de energia é de extrema importância. Algumas opções são a substituição dos combustíveis fósseis pela utilização de energia renovável bem como o captura e armazenamento do carbono (Edenhofer *et al.*, 2012). As possíveis fontes de energia renovável que o IPCC destaca são: a bioenergia, a energia solar, geotérmica e hidrelétrica. A bioenergia pode ser produzida a partir de uma variedade de fontes de biomassa, incluindo florestas, resíduos agrícolas e da pecuária, entre outros, e, atualmente, é a maior fonte de energia renovável. Através de uma variedade de processos, estas matérias-primas podem ser utilizadas para a produção de eletricidade ou de calor ou podem ser usadas para gerar os biocombustíveis gasosos ou líquidos (Edenhofer *et al.*, 2012).

O uso de biocombustíveis é visto como uma alternativa para a crise ambiental e o futuro energético do planeta, tendo enorme importância no mercado mundial. Entretanto, é importante ressaltar questões como: i. a possível relação entre o aumento dos preços dos gêneros alimentícios e a produção de biocombustíveis, que nos últimos anos, estariam por trás do surgimento de uma crise alimentar; ii. grande parte dos plantios destinados à produção de biocombustíveis usa sistemas monocultores, bem como insumos agrícolas artificiais (agrotóxicos e produtos químicos); iii. a disponibilidade de água e terras cultiváveis no planeta (Miranda & Carmo, 2009).

No Brasil, cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos já são renováveis. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados são o etanol, proveniente da canade-açúcar, e o biodiesel, produzido a partir do óleo de soja (80%), seguido da gordura bovina (10%) (ANP, 2012). A área cultivada com cana-de-açúcar colhida na safra 2011/2012 e destinada à atividade sucroalcooleira foi estimada em 8.368,4 mil hectares (Conab, 2011). Para a obtenção de biodiesel, a estimativa de quantidade de área plantada que seria necessária para suprir o B5 (5% de Biodiesel e 95% de Óleo Diesel Convencional) é de 2916 mil hectares, sendo que será obrigatório o uso dessa mistura em território nacional a partir de 2013, pela lei 11.097/2005 (Foschiera, 2008).

Assim, fica evidenciado o interesse pela busca de recursos alternativos para a produção de biocombustível, em que não seja necessária a utilização de terras agrícolas bem como de água doce para a obtenção da matéria-prima desejada, destacando-se a implementação de tecnologias que utilizem a biomassa aquática. O uso de biomassa algácea como fonte de energia é interessante devido a sua alta taxa fotossintetizante em comparação com as plantas terrestres e a possibilidade de cultivo em diferentes condições e em águas marinhas (Aresta *et al.*, 2005), evitando a utilização de terras aráveis.

1.2. Importância e utilização das macroalgas marinhas

As macroalgas marinhas constituem um grupo muito diversificado de organismos multicelulares, pertencentes aos filos Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Heterokontophyta (algas pardas). Os representantes desses filos, além de possuírem elevada diversidade morfológica, apresentam diferenças em relação ao conteúdo pigmentar, aos produtos de reserva e aos componentes da parede celular, entre outros (van den Hoek *et al.*, 1995).

As algas são importantes componentes autotróficos em muitos ecossistemas costeiros e estuarinos, desempenhando um papel relevante nas transformações energéticas e na reciclagem de nutrientes dos ambientes em que habitam (Hanisak, 1983), uma vez que participam da assimilação do carbono e do nitrogênio e da liberação de O₂. Por possuírem essas características, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a capacidade desses organismos em remover determinados nutrientes e poluentes dissolvidos na água do mar e os resultados mostram que existe um potencial significativo para a utilização das algas para a remediação de CO₂, nitrato, nitrito, amônio, fosfato, entre outros (Chung *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2008).

As algas também produzem inúmeros compostos de interesse econômico e são utilizadas pelo homem há séculos, para as mais diferentes finalidades, sendo que a sua utilização global na indústria move bilhões de dólares.

A aplicabilidade dos compostos químicos isolados das diferentes classes de algas é muito ampla, e a pesquisa na área de bioprodutos tem emergido desde a década de 1970. Diversos metabólitos de algas foram identificados com diferentes atividades farmacológicas, como os carotenóides e os aminoácidos do tipo micosporinas, que atuam como compostos fotoprotetores, e os compostos halogenados (terpenos, fenóis, ácidos graxos e hidrocarbonetos halogenados voláteis), que podem apresentar atividades bactericidas e antitumorais e, ainda, serem utilizados na prevenção de doenças cardiovasculares, como ocorre com o ácido graxo poliinsaturado eicosapentenóico (Cardozo *et al.*, 2006).

Atualmente, outro setor que tem demonstrado interesse na utilização de compostos oriundos de algas é o de produção de biocombustível.

1.3. Utilização das macroalgas para a produção de biocombustível, nutracêuticos e coprodutos

O biodiesel é uma alternativa renovável ao petrodiesel e é produzido principalmente a partir de óleos extraídos de vegetais oleaginosos. Durante a síntese do biodiesel, são necessários dois passos, a extração dos triacilgliceróis a partir da matéria-prima e a transesterificação para gerar os ésteres metílicos de ácidos graxos (Chisti, 2007).

A maioria dos estudos sobre a produção de biodiesel de algas tem como objeto de trabalho as microalgas, por serem organismos ricos em óleos, cujo conteúdo varia entre 20% e 50% do peso seco (Chisti, 2007). Entretanto, o seu cultivo tem um custo e uma complexidade maior do que o das macroalgas marinhas, que já são cultivadas no mar em alguns países, como a China, que apresenta um rendimento anual de 5 milhões de toneladas (massa fresca), sendo que a maior parte do cultivo destina-se à produção de Kombu, a partir da macroalga *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders (Phaeophyceae) (McHugh, 2003). Embora a maioria das macroalgas marinhas apresente quantidades menores de óleos, existem espécies com alta produtividade, como *Dictyota acutiloba* J.Agardh e *Dictyota sandvicensis* Sonder in Kützing (Phaeophyceae), que apresentam 16% e 20% do peso seco de lipídeos, respectivamente (McDermid & Stuercke, 2003), o que evidencia a possibilidade de sua utilização para a produção de compostos a base de óleo.

Além disso, as macroalgas marinhas possuem outras características que as tornam promissoras para a produção de biocombustível: i. crescimento rápido, com produção de grandes quantidades de biomassa. Esse rendimento elevado se dá pelo fato de que esses organismos requerem menos energia para a produção de tecido de suporte do que as plantas terrestres e devido a capacidade de assimilar os nutrientes por toda a superfície do talo (Adams *et al.*, 2009); ii. possibilidade de cultivo no mar e do cultivo integrado com outros organismos (Hayashi *et al.*, 2008); iii. o resíduo de algas oleaginosas gerado após a extração do óleo, rico em carboidratos e proteínas, pode ser usado para a obtenção de açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol ou ser transformado em muitos produtos, tais como alimentos, rações, fertilizantes, pigmentos, entre outros (van Iersel & Flammini, 2010).

O conhecimento do perfil dos ácidos graxos das macroalgas marinhas é de extrema importância para determinar se o óleo obtido é adequado para ser usado como fonte de biodiesel, uma vez que irá influenciar nas suas propriedades como número de cetano, índice de iodo, estabilidade oxidativa e ponto de obstrução de filtro a frio, sendo que o óleo rico em ácidos graxos monoinsaturados possui as melhores características (Ramos *et al.*, 2009).

O número de espécies de macroalgas marinhas com o perfil de ácidos graxos elucidado é baixo, sendo que a maioria dos estudos se detém na composição química bruta (% de lipídeos, carboidratos, proteínas, etc.), tendo como objetivo conhecer o perfil nutricional para o uso em aquicultura ou para o consumo humano (Gosch *et al.*, 2012).

No Brasil, poucos trabalhos foram publicados dentro desse contexto até a presente data, gerando o conhecimento do perfil de ácidos graxos de aproximadamente 20 espécies de macroalgas marinhas (Gressler *et al.*, 2010; Gressler *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). Esse número é muito baixo, quando comparado ao número de táxons encontrados na costa brasileira (643 táxons de macroalgas marinhas, sendo 388 pertencentes à Rhodophyta, 88 à Pheaophyceae e

167 à Ulvophyceae) (Oliveira *et al.*, 1999), e essa informação é extremamente importante para a seleção de espécies de macroalgas marinhas com potencial para a produção de biodiesel, o que irá contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do nosso país.

A quantidade e a qualidade dos ácidos graxos variam entre os diferentes grupos e espécies de macroalgas (Gosch *et al.*, 2012). Essa diversidade proporciona um potencial para identificar novas espécies com o conteúdo de óleo elevado e com um perfil adequado para a sua utilização como fonte de biodiesel. Além disso, espécies que não possuírem um perfil bom para o biodiesel, podem ser aproveitadas para outras finalidades como, por exemplo, para a alimentação rica em nutracêuticos, que são alimentos, ou parte de alimentos, que proporcionam benefícios à saúde, como a prevenção e tratamento de doenças (Moraes & Colla, 2006).

Em relação à nutracêutica, destacam-se os ácidos graxos linoléico (ω -6) e linolênico (ω -3), que são nutrientes essenciais por não serem sintetizados pelos mamíferos (Patarra, 2008). Esses ácidos graxos são precursores dos ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), importantes para manter as membranas íntegras e fluidas, e para a síntese de eicosanóides (Moreira *et al.*, 2002).

Uma vez que os eicosanóides oriundos do AA têm efeitos opostos dos oriundos do EPA, a alimentação humana deve conter uma relação ω -6 / ω -3 ao redor de 5:1, pois um aumento na ingestão de ω -6 ocasiona um estado fisiológico protrombótico, proconstritivo e proinflamatório. Apesar disso, a relação ω -6 / ω -3 proveniente da ingestão de ácidos graxos pela população de diversos países está entre 10:1 a 20:1 (Pararra, 2008). Isso acontece porque o ω -6 está presente em óleos vegetais, leite, ovos e carnes, enquanto as principais fontes de ω -3 são as algas e os peixes.

Além do que já foi exposto, os ácidos graxos ω -3 também atuam na prevenção e na modulação de doenças coronárias, de doenças inflamatórias e da hipertensão, entre outras (Pararra, 2008).

Ao estudar uma macroalga para avaliar seu potencial como fonte de biodiesel e/ou nutracêutico, além da quantidade e qualidade dos ácidos graxos, devem ser observadas outras características como: fotossíntese e crescimento, pois além de ter alto teor de lipídeos e um perfil adequado de ácidos graxos, o organismo deve apresentar um bom desenvolvimento e crescimento; e avaliação do seu conteúdo de proteínas, pigmentos e carboidratos, uma vez que a biomassa restante pode ser utilizada para a síntese de co-produtos, como alimentos, rações, fertilizantes, pigmentos, entre outros, agregando valor econômico à espécie (van Iersel & Flammini, 2010).

1.4. Influência dos fatores ambientais sobre o metabolismo e a fisiologia das algas

As macroalgas dependem do carbono inorgânico (Ci) para realizar a fotossíntese e para o seu crescimento. O Ci está disponível na água do mar em três formas: CO_2 dissolvido, bicarbonato e íons carbonatos, sendo que essas espécies fazem parte do sistema carbonato e as suas concentrações variam em função, principalmente, da alcalinidade e do pH do meio (figuras 1 e 2). O CO_2 dissolvido reage com a água, formando o ácido carbônico, que rapidamente se dissocia dando origem aos íons bicarbonato e hidrogênio. O íon bicarbonato, por sua vez, dissocia-se formando os íons carbonato e hidrogênio. Devido à alta alcalinidade da água do mar, a forma dominante de Ci é o bicarbonato, que ocorre na concentração de aproximadamente 12 μ M (Zou & Gao, 2010; Stumm & Morgan, 1996; Kleypas & Langdon, 2002).


Figura 1. Esquema do sistema carbonato em ambiente marinho (Amancio, 2007, adaptado de Kleypas & Langdon, 2002).



Figura 2. Variação da concentração das diferentes formas do carbono inorgânico dissolvido na água do mar em função do pH (Amancio, 2007, adaptado de Raven, 2005).

A fotossíntese corresponde à primeira etapa da conversão da luz a energia química, sendo o processo central na produção dos compostos requeridos para a síntese de biocombustível: prótons e elétrons (para bio-hidrogênio), açúcares e amido (para bioetanol), óleos (para biodiesel) e biomassa (para biometano) (Schenk *et al.*, 2008) (figura 3).

O NADPH e ATP, sintetizados na fase fotoquímica da fotossíntese, são utilizados no ciclo de Calvin e outras rotas metabólicas para produzir as biomoléculas precursoras dos biocombustíveis (Schenk *et al.*, 2008). O ciclo de Calvin faz parte da fase química da fotossíntese, onde o Ci será assimilado pela Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase

(Rubisco), principal enzima responsável pela conversão do carbono inorgânico a orgânico, e que requer o CO₂ como substrato (Taiz & Zeiger, 2004).



Figura 3. O processo da fotossíntese converte a luz em energia química e é a chave para a produção de biocombustíveis (Schenk *et al.* 2008).

Como o HCO_3^- é a forma mais abundante na água do mar, as algas marinhas devem utilizá-lo ativamente, o que pode ser feito de duas maneiras: i. captação ativa do HCO_3^- para dentro da célula por um transportador específico, onde o converte a CO_2 pela ação da enzima anidrase carbônica; e ii. conversão do HCO_3^- a CO_2^- na superfície do talo pela ação da anidrase carbônica extracelular (Lobban & Harrison, 1994). O carbono fixado fornecerá os esqueletos de carbono necessários para a síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos.

A luz, a temperatura, a salinidade e a disponibilidade de nutrientes e de CO_2 na água do mar têm efeitos sobre a fotossíntese e sobre outras rotas metabólicas, influenciando diretamente a biossíntese dos metabólitos das algas. Assim, a alteração de alguns fatores ambientais permite manipular as vias metabólicas, redirecionando a função celular para a síntese dos produtos de interesse (Rosenberg *et al.*, 2008). Com o aumento da concentração de CO_2 , algumas algas apresentaram um aumento no conteúdo de carboidratos, uma diminuição no conteúdo de proteínas (Mercado *et al.*,1999) e um aumento na quantidade total de ácidos graxos e no conteúdo do ácido oléico (Tsuzuki *et al.* 1990). O aumento da salinidade, temperatura ou irradiância também ocasionou um incremento no teor de carboidratos (Hellebust, 1976; Perfeto *et al.*, 2004).

Outro mecanismo natural pelo qual as algas podem alterar o metabolismo de lipídeos é a resposta ao estresse por falta de nitrogênio. No ambiente marinho, o nitrogênio é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento das algas marinhas bentônicas (Lobban & Harrison, 1994) e é encontrado nas formas de nitrato, nitrito, amônio, dinitrogênio e nitrogênio orgânico dissolvido (Tyrrel, 1999). Dentre essas formas, o nitrato é a mais abundante e, ao ser captado pela célula, é reduzido à nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase, e este à amônia, que é incorporada às moléculas orgânicas. (DeBoer, 1981; Lea, 1993; Lobban & Harrison, 1994). Embora a deficiência desse nutriente iniba o ciclo celular e a produção de quase todos os componentes celulares, a taxa de síntese de lipídeos permanece alta, o que leva a um acúmulo de óleos em células desnutridas (Rosenberg *et al.* 2008).

Dentro desse contexto, o estudo do metabolismo das algas é uma ferramenta de trabalho interessante, pois permite identificar parte dos metabólitos produzidos por esses organismos e acompanhar a alteração das suas vias metabólicas frente a modificação de um determinado fator ambiental. A manipulação de fatores abióticos é uma importante técnica para o melhoramento quantitativo e qualitativo na produção do composto de interesse.

1.5. Costa brasileira e antártica

A costa brasileira engloba quatro zonas climáticas, denominadas zona equatorial, zona nordeste-oriental, zona sudeste e zona sul (Oliveira *et al.*, 1999). Dentre essas regiões, a nordeste-

oriental, com limites entre a costa oeste do Ceará e norte do Rio de Janeiro, contém a flora marinha mais diversificada do país, seguida da zona Sudeste. Essas zonas são caracterizadas por águas oligotróficas e abundância de substratos duros propícios ao crescimento de algas bentônicas (Oliveira *et al.*, 1999).

Já o ambiente natural das algas antárticas é caracterizado por condições abióticas extremas, com uma forte sazonalidade de luz e temperaturas baixas constantes. Por exemplo, em latitudes mais baixas, como na Ilha Rei George (62°S), o período de dia varia entre 20 h no verão e 5h no inverno (Wiencke & Bishof, 2012). Podem também ocorrer variações da temperatura nas regiões do meso e supralitoral, onde já foram observadas temperaturas de 14° C em poças de maré durante o verão, sendo que no inverno a temperatura pode chegar a - 27° C (Wiencke & Bishof, 2012). Em relação aos nutrientes, os níveis de nitrato e fosfato são altos, ao longo de todo o ano, no Oceano Antártico (Wiencke & Bishof, 2012).

O continente Antártico está sofrendo alterações ambientais ocasionadas pelas mudanças climáticas globais e pelas atividades antrópicas (Wiencke, 2011). O conhecimento da sua biodiversidade e da ecofisiologia e composição bioquímica das macroalgas presentes nessa região é muito relevante para o seu manejo, uma vez que esses organismos têm importante papel nas teias alimentares bentônicas tanto das águas rasas como profundas, fornecendo alimento e proteção para um grande número de invertebrados e peixes (Wiencke & Bishof, 2012).

Além disso, por habitarem um ambiente extremo e muito diferente da costa brasileira, o estudo da fotossíntese e da composição bioquímica dessas algas, bem como a comparação com as algas que ocorrem no Brasil, é muito interessante.

1.6. Exploração e cultivo de algas marinhas da costa brasileira

No Brasil, o principal uso das algas marinhas se refere à extração dos ficocolóides de algas vermelhas, sendo que espécies de *Gracilaria* e *Hypnea* (para a extração de ágar e carragenana, respectivamente) têm sido exploradas na costa nordeste do país há décadas, o que tem prejudicado e esgotado os bancos naturais dessas espécies (Furtado, 2004).

A crescente demanda pela matéria algácea para utilização em diversos setores produtivos, como as indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos tem causado um empobrecimento dos bancos naturais, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas de cultivo para a obtenção da matéria-prima desejada, sem a explotação direta dos bancos naturais das algas (van Iersel & Flaminni, 2010).

As algas requerem para o seu crescimento luz, CO_2 e nutrientes dissolvidos (N, P, metais traços e vitaminas) (Rorrer & Cheney, 2004). Os sistemas de cultivo devem simular as condições ambientais de modo a permitir o crescimento e o desenvolvimento das algas marinhas.

As macroalgas marinhas podem ser cultivadas em tanques e no mar, ou em sistemas fechados (em laboratório e em biorreatores). O cultivo em áreas abertas é mais apropriado para a obtenção de grande biomassa, sendo que a escolha do local de cultivo é fundamental e depende da espécie que será cultivada. O cultivo em laboratório e em biorreatores são os sistemas mais adequados para a obtenção do crescimento em condições de iluminação, trocas gasosas, nutrientes e temperaturas controladas (Rorrer & Cheney, 2004), sendo interessantes para a escala experimental, uma vez que possibilitam total controle dos parâmetros ambientais.

1.7. Justificativa

O conhecimento das características ecofisiológicas e bioquímicas das macroalgas marinhas gera um maior entendimento da sua importância ecológica e econômica. Além disso, o estudo do potencial de uma macroalga marinha que ocorre na costa brasileira para a produção de biodiesel, bem como a avaliação dos efeitos de alguns fatores ambientais sobre a fisiologia, o metabolismo e a síntese dos compostos de interesse dessa espécie são de extrema importância tanto para o desenvolvimento econômico do Brasil, propiciando a utilização sustentável dos recursos marinhos do país, como para a contribuição científica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente estudo foram: i. contribuir para o conhecimento sobre o desempenho fotossintetizante e a composição bioquímica de macroalgas marinhas que ocorrem no litoral brasileiro e antártico, dando ênfase ao conteúdo de ácidos graxos; ii. selecionar uma espécie de macroalga marinha da costa brasileira com potencial para a produção de biodiesel; iii. estabelecer o cultivo em laboratório da espécie selecionada ; iv. avaliar os efeitos de alguns fatores ambientais sobre o metabolismo e a composição bioquímica da macroalga marinha selecionada.

Para alcançar esses objetivos, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

1. Coleta de macroalgas marinhas na costa brasileira e na região antártica;

 Avaliação da fotossíntese de alguns representantes de algas vermelhas, verdes e pardas, no local de coleta;

3. Avaliação do conteúdo de pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, lipídeos totais e da composição e do teor de ácidos graxos das macroalgas marinhas coletadas;

4. Escolha da espécie com melhor perfil para a produção de biodiesel e cultivo em laboratório avaliando-se o seu crescimento e desempenho fotossintetizante;

5. Análise dos efeitos do aumento do CO_2 , em condições de saturação e limitação de nitrogênio, sobre a espécie selecionada cultivada em biorreatores, avaliando-se os seguintes processos:

• Taxa de crescimento e fotossíntese;

• Assimilação de CO₂ e nitrogênio: foi avaliada pela atividade das enzimas pertencentes ao metabolismo do carbono (anidrase carbônica e rubisco) e do nitrogênio (nitrato redutase);

• Armazenamento interno de compostos: avaliado pela quantificação de pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, composição monossacarídica, conteúdo de lipídeos totais, composição de ácidos graxos e conteúdo de C e N;

6. Avaliação da captação de CO₂ pela espécie selecionada cultivada em laboratório.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas brasileiras e antárticas

Coleta

As espécies de macroalgas brasileiras utilizadas no presente estudo foram coletadas na Praia da Fortaleza, Praia Dura e Praia Brava no município de Ubatuba (SP) e em Rio do Fogo (RN), Brasil (figuras 4 e 5). As espécies antárticas foram coletadas na Baía do Almirantado, localizada na Ilha Rei George, Península Antártica (figura 6).

As coletas foram realizadas durante o período de maré-baixa, selecionando-se os representantes de rodófitas, clorófitas e feófitas (tabelas 1 e 2 e figuras 7 a 11). Os espécimes foram limpos com a retirada dos organismos epifíticos e lavagens com água do mar. Eles foram identificados de acordo com a sua morfologia e foi utilizado o sistema de classificação proposto por Wynne (2005). Alguns exemplares de cada espécie foram fixados em formol (4% em água do mar) para a confecção das exsicatas, e foram depositados no Herbário do Instituto de Botânica, São Paulo. O restante do material foi congelado à -20°C para a quantificação do conteúdo pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, lipídeos totais e ácidos graxos.



Figura 4. A. Praia de Fortaleza, uma das áreas de coleta em Ubatuba, SP. A. Aspecto geral dos substratos rochosos; B. Aspecto de uma população de *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J.Agardh (Ulvophyceae, Chlorophyta).



Figura 5. Aspecto geral da área de coleta de algas marinhas em Rio do Fogo, RN.



Figura 6. Aspecto geral de uma das áreas de coleta na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.

ESPÉCIE	Local de coleta	Nº de depósito
		em Herbário
RHODOPHYTA		
Ceramiales		
Acanthophora spicifera (M.Vahl) Børgesen	Praia da Fortaleza, SP 23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	SP 427971
<i>Aglaothamnion uruguayense</i> (W.R. Taylor) Aponte, D.L. Ballantine & J.N.Norris	Praia Brava da Fortaleza, SP 23°52'15.6"S e 45°16'63.5"W	SP 427972
Bryocladia thyrsigera (J.Agardh) F.Schmitz	Praia Brava da Fortaleza, SP 23°52'15.6"S e 45°16'63.5"W	SP 427973
Bryothamnion seaforthii (Turner) Kützing	Praia Dura, SP 23°50'15.6"S e 45°17'40.5"W	SP 427974
Laurencia dendroidea J.Agardh	Rio do Fogo, RN 5° 27'79.9''S e 35° 37'56'W	SP 427961
Palisada flagellifera (J. Agardh) K.W.Nam	Praia Dura, SP 23°50'15.6"S e 45°17'40.5"W	SP 427970
Bonnemaisoniales		
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevisan de Saint-Léon	Praia Dura, SP 23°50'15.6"S e 45°17'40.5"W	SP 427975
Halymeniales		
Cryptonemia crenulata (J.Agardh) J.Agardh	Rio do Fogo, RN 5º 27'79.9''S e 35º 37'56'W	SP 427962
Nemaliales		
<i>Dichotomaria marginata</i> (J.Ellis & Solander) Lamarck	Praia da Fortaleza, SP 23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	SP 427976
Gracilariales		
Gracilaria birdiae Plastino & E.C.Oliveira	Rio do Fogo, RN 5º 27'79.9''S e 35º 37'56'W	
Gracilaria cervicornis (Turner) J.Agardh	Rio do Fogo, RN 5° 27'79.9"S e 35° 37'56'W	SP 427963
Gracilaria mammillaris (Montagne) M.A.Howe	Rio do Fogo, RN 5° 27'79.9"S e 35° 37'56'W	SP 427964
Gigartinales		
Hypnea musciformis (Wulfen) J.V.Lamouroux	Praia Brava da Fortaleza, SP 23°52'15.6"S e 45°16'63.5"W	SP 427377
Solieria filiformis (Kützing) P.W.Gabrielson	Rio do Fogo, RN 5° 27'79.9"S e 35° 37'56'W	SP 427965

Tabela 1. Espécies de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletadas na costa brasileira.

Talela 1. Continuação

/		
ESPÉCIE	Local de coleta	Nº de depósito em Herbário
СНЬОВОРНУТА		
Bryopsidales		
Caulerpa racemosa (Forsskål) J.Agardh	Praia da Fortaleza, SP 23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	SP 427977
Siphonocladales		
Cladophoropsis membranacea (Hofman Bang ex	Praia da Fortaleza, SP	SP 427978
C.Agardh) Børgesen	23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	
Cladophorales		
Rhizoclonium africanum Kützing	Mangue da Praia Dura, SP 23°50'15.6"S e 45°17'40.5" W	SP 427966
Ulvales		
Ulva lactuca Linnaeus	Praia Dura, SP	SP 427379
	23°50'15.6"S e 45°17'40.5"W	
HETEROKONTOPHYTA		
Dictvotales		
Dictyopteris delicatula J.V.Lamouroux	Praia da Fortaleza, SP 23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	SP 427979
Dictyota menstrualis (Hoyt) Schnetter,	Rio do Fogo, RN	SP 427967
Hörning & Weber-Peukert	5° 27'79.9"S e 35° 37'56'W	
Lobophora variegata (J.V.Lamouroux)	Rio do Fogo, RN	
Womersley ex E.C.Oliveira	5° 27'79.9"S e 35° 37'56'W	
Padina gymnospora (Kützing) Sonder	Rio do Fogo, RN 5º 27'79.9"S e 35º 37'56'W	SP 427968
Spatoglossum schroederi (C.Agardh) Kützing	Rio do Fogo, RN 5º 27'79.9"S e 35º 37'56'W	SP 427969
Fucales		
Sargassum cymosum C.Agardh	Praia da Fortaleza, SP 23°53'15.6"S e 45°16'35.6"W	SP 427378
Sargassum stenophyllum Martius	Praia Brava da Fortaleza, SP 23°52'15.6"S e 45°16'63.5"W	SP 427980









Fonte: Cristina Nassar

Fonte: Cristina Nassar



Figura 7. Aspecto geral das espécies da ordem Ceramiales estudadas no presente trabalho. A. *Acanthopfora spicifera*; B. *Aglaothamnion uruguayense*; C. *Bryocladia thyrsigera*; D. *Bryothamnion seaforthii*; E. *Laurencia dendroidea*; F. *Palisada flagellifera*.



Figura 8. Aspecto geral de algumas espécies das ordens Bonnemaisoniales, Halymeniales, Nemaliales, Gracilariales e Gigartinales estudadas no presente trabalho. A. *Asparagopsis taxiformis*; B. *Cryptonemia crenulata*; C. *Dichotomaria marginata*; D. *Gracilaria cervicornis*; E. *Hypnea musciformis*; F. *Solieria filiformis*.



Figura 9. Aspecto geral das espécies das ordens Bryopsidales, Siphonocladales, Cladophorales e Ulvales estudadas no presente trabalho. A. *Caulerpa racemosa*; B. *Cladophoropsis membranacea*; C. *Rhizoclonium africanum*; D. *Ulva lactuca*.



Figura 10. Aspecto geral de algumas espécies das ordens Dictyotales e Fucales estudadas no presente trabalho. A. *Dictyopteris deliculata*; B. *Dictyota menstrualis*; C. *Lobophora variegata*; D. *Padina gymnospora*; E. *Spatoglossum schroederi*; F. *Sargassum cymosum*.

ESPÉCIE	Local de coleta	Nº de depósito em Herbário
RHODOPHYTA		
Gigartinales		
Gigartina skottsbergii Setchell & N.L.Gardner	Arctowski 62°09'54.9''S e 58° 8'23.7''W	SP 401727
Palmariales		
Palmaria decipiens (Reinsch) R.W.Ricker	Escurra 62°09'07.8''S e 58°32'29.0''W	SP 401731
Plocamiales		
Plocamium cartilagineum (Linnaeus) P.S.Dixon	Punta Plaza 62°05'26.0S e 58°24'26.5''W	SP 401726
HETEROKONTOPHYTA		
Ascoseirales		
Ascoseira mirabilis Skottsberg	Arctowski 62°09'54.9''S e 58° 8'23.7''W	SP 427970
Desmarestiales		
Desmarestia anceps Montagne	Punta Plaza 62°05'26.0S e 58°24'26.5''W	
Himantothallus grandifolius (A.Gepp & E.S.Gepp) Zinov	Arctowski 62°09'54.9''S e 58° 8'23.7''W	SP 427962

Tabela 2. Espécies de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletadas na Baía do Almirantado,localizada na Ilha Rei George, Península Antártica.



Figura 11. Aspecto geral das espécies coletadas na Antártica estudadas no presente trabalho. A. *Gigartina skottsbergii*; B. *Palmaria decipiens*; C. *Plocamium cartilagineum*; D. *Ascoseira mirabilis*; E. *Desmarestia anceps*; F. *Himantothallus grandifolius*.

Variáveis analisadas

Fotossíntese

A taxa fotossintetizante de alguns representantes de algas vermelhas, verdes e pardas foi avaliada pela análise da fluorescência da clorofila *a* do fotossistema II, segundo a metodologia descrita por Necchi (2004) e Necchi & Alves (2005). A fluorescência da clorofila foi medida usando um fluorômetro subaquático com pulso de amplitude modulada (PAM) (Diving-PAM, Walz, Effeltrich, Germany).

A energia luminosa que é absorvida pela clorofila *a* pode seguir por três caminhos diferentes: i. ser utilizada para o a processo fotossintetizante através da transferência de elétrons entre o fotossistema II e fotossistema I (dissipação fotoquímica); ii. ser dissipada na forma de calor (dissipação não-fotoquímica); iii. ser re-emitida como luz, processo chamado de fluorescência. Esses três processos ocorrem em competição de modo que o aumento na eficiência de um deles causará um decréscimo no rendimento dos outros dois (Maxwell & Johnson, 2000).

O rendimento da fluorescência pode ser quantificado expondo a alga a uma luz de comprimento de onda conhecido e definido (luz de excitação) e medindo a quantidade de luz reemitida em comprimentos de ondas maiores. Com os sistemas que usam pulsos de amplitudes moduladas (PAM), a fonte de luz usada para excitar e medir a fluorescência é modulada (ligada e desligada em alta frequência) e o detector detecta apenas a fluorescência que foi excitada por esta luz de medição (com a mesma frequência da luz de excitação) (Maxwell & Johnson, 2000; Heinz Walz GmbH, 1998).

A aplicação de um pulso de luz saturante (PS) de alta intensidade e curta duração ocasiona o fechamento de todos os centros de reação do fotossistema II e suprime a zero a dissipação da energia luminosa pela via fotoquímica. Assim, durante o PS o rendimento da fluorescência atinge o valor que seria alcançado na ausência de dissipação fotoquímica, a fluorescência máxima (Fm'). Diferente da fotoquímica, não é possível inibir totalmente a dissipação não-fotoquímica por calor. Entretanto, quando se faz a aclimatação da planta ao escuro, não há perda por calor e pode-se obter a fluorescência máxima (Fm) de uma planta aclimatada ao escuro. Assim, em uma planta sob iluminação, a Fm' é menor, devido a dissipação não-fotoquímica por calor. Além disso, quando a planta está sob iluminação, há um aumento no valor da fluorescência basal (Ft), pois no momento da medida parte dos centros de reação está aberta (oxidada) e parte está fechada. Quando se faz aclimatação ao escuro, obtém-se o menor valor da fluorescência basal, o F_0 , uma vez que todos os centros de reação estão abertos (figura 12) (Maxwell & Johnson, 2000; Heinz Walz GmbH, 1998).

Assim, a medida é iniciada quando a luz de medição é ligada, dando o valor da fluorescência mínima, F_0 ou Ft, se a planta estiver aclimatada ao escuro ou claro, respectivamente. Em seguida é aplicado o PS e obtém-se a fluorescência máxima, Fm ou Fm⁻, se a planta estiver aclimatada ao escuro ou claro, respectivamente (figura 12).



Figura 12. Dinâmica da medição da fluorescência da clorofila a do fotossistema II, modificado de Heinz Walz GmbH (1998).

Com os resultados obtidos na análise da fluorescência da clorofila *a*, podem-se obter os seguintes parâmetros fotoquímicos (a e b) e não-fotoquímicos (c):

a. Rendimento quântico efetivo (RQE):

O RQE é um dos parâmetros mais estudados e mede a proporção de luz absorvida pela clorofila *a* associada ao PSII que é usada na fotoquímica. Uma vez que não há adaptação da planta ao escuro, é possível obter a performance fotossintetizante real que a planta apresenta no momento da medida. Este parâmetro é dado pela relação $\Delta F/Fm'$, onde $\Delta F = Fm' - Ft$. O RQE pode ser utilizado para calcular a taxa de transporte de elétrons (ETR), através da equação $\Delta F/Fm'$ x PAR x coeficiente de absorção x 0,5, onde: PAR é a radiação fotossinteticamente ativa (µmol fótons m⁻² s⁻¹); Coeficiente de absorção é a % de quanta absorvida pela planta; 0,5 = fator que explica a divisão de energia entre PSII e PSI (Maxwell & Johnson, 2000; Heinz Walz GmbH, 1998).

b. Rendimento quântico potencial (RQP):

A eficiência quântica máxima do PSII pode ser observada após a adaptação da planta ao escuro, quando todos os centros de reação estão abertos (todos os aceptores primários estão oxidados) e a dissipação por calor é mínima. Mudanças em seus valores (diminuição) são resultados da dissipação da energia por calor e por efeitos da fotoinibição. Seus valores são obtidos pela equação Fv/Fm (Maxwell & Johnson, 2000; Heinz Walz GmbH, 1998).

c. NPQ (dissipação não-fotoquímica)

O NPQ está linearmente relacionado à dissipação por calor e é calculado através da equação $\Delta F (Fm - Fm') / Fm'$. Os valores de NPQ medem mudanças na eficiência da dissipação do excesso de energia por calor, relativo ao estado de uma planta adaptada ao escuro. Esse

parâmetro pode ser associado aos processos de fotoproteção e fotoinibição (Maxwell & Johnson, 2000; Heinz Walz GmbH, 1998).

No equipamento Diving-PAM existe uma função que permite a realização de medidas de curvas de luz (curvas de fotossíntese x irradiância ou curvas FI), em que as amostras são submetidas a 8 irradiâncias crescentes, por períodos que variam de 15 s a 3 min, e o RQE e a ETR são coletados em cada ponto de luz. Os dados obtidos dessa análise fornecem informações de como a planta consegue aclimatar o aparato fotossintetizante às rápidas mudanças na intensidade luminosa. (Heinz Walz GmbH, 1998).

Além disso, a análise da curva de luz fornece informações sobre os seguintes parâmetros: eficiência fotossintetizante (alfa), irradiância de saturação (ik), fotossíntese máxima (ETRmax) e fotoinibição (beta).

O desempenho fotossintetizante foi avaliado "in vivo" para alguns representantes de cada filo, incluindo as ordens que foram mais representativas (*A. spicifera, D. marginata, G. skottsbergii, G. cervicornis, H. musciformis, P. decipiens, P. cartilagineum, C. racemosa, C. membranacea, U. lactuca, A. mirabilis, D. anceps, D. menstrualis, H. grandifolius, P. gymnospora, S. cymosum*). Segmentos do talo de cada espécie estudada (n=3) foram colocados diretamente sobre a extremidade da fibra óptica utilizando um adaptador (figura 13 A e B). As análises foram realizadas em campo, no mesmo local da coleta.



Figura 13. Medição da fotossíntese de macroalgas marinhas com o equipamento Diving-PAM. A. Visão geral. B. Detalhe do adaptador utilizado para colocar os talos das macroalgas sobre a fibra óptica.

Para cada amostra, os dois parâmetros principais foram determinados: o RQE e a taxa de transporte de elétrons relativa (rETR), onde rETR é Δ F/Fm' x PAR x 0,5.

Foram realizadas curvas de fotossíntese versus irradiância (Curvas FI) com base nos valores de rETR obtidos em 8 níveis crescentes de irradiância, pelo período de 15s. Os parâmetros derivados da curva FI (alfa, ik e ETRmax) foram calculados pela equação de Platt *et al.* (1980):

$$ETR_{max} = ETR_{s} \left[\left(\alpha + \beta \right) \right] \left[\beta / (\alpha + \beta) \right] \right]^{\beta / \alpha}$$

Preparação das amostras para as análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, as amostras congeladas das macroalgas coletadas em campo foram maceradas em nitrogênio líquido, liofilizadas e mantidas no escuro, a -80 °C, até o momento das análises. Todas as análises foram realizadas com três repetições.

Pigmentos

- Clorofila *a*:

O macerado liofilizado (50 mg) foi suspendo em 1,6 mL de acetona 90% até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi centrifugada a 12000 g (4 °C, durante 15 min) e o sobrenadante, contendo a clorofila, foi transferido para tubos de ensaio, vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro.

A determinação da concentração da clorofila *a* foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Jeffrey & Humphrey (1975).

- Ficobiliproteínas:

O macerado liofilizado (27 mg) foi suspenso em 1,5 mL de tampão de extração (0,1 M de tampão fosfato, pH 6,5 e temperatura de 4 °C). A solução foi centrifugada a 12000 g (4 °C, durante 20 min) e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, retirado e mantido no escuro em tubos de ensaios vedados, até a leitura em espectrofotômetro.

A determinação da concentração de aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Kursar *et al.* (1983).

Proteínas solúveis totais

O macerado liofilizado (100 mg) foi suspenso em 1,5 mL de tampão de extração (0,2 M de tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA e 1 mM DTT) e o extrato bruto foi centrifugado a 12000 g (4 °C, durante 20 min). A concentração das proteínas solúveis totais foi determinada por espectrofotometria a 595 nm, após a adição de solução para ensaio protéico da Bio-Rad, segundo o método de Bradford (1976).

A quantificação das proteínas solúveis totais foi feita a partir da equação da reta gerada a partir da curva de calibração realizada com albumina sérica bovina (BSA).

Carboidratos solúveis totais

O macerado liofilizado (15 mg) foi suspenso em 1 mL de etanol 70%, até a obtenção de um homogeneizado. A solução foi incubada em banho-maria por 3h a 70 °C e, em seguida, centrifugada a 5000 g durante 5 minutos (Karsten *et al.* 1999). A concentração de carboidratos solúveis totais foi determinada por espectrofotometria a 490 nm, após a adição de ácido sulfúrico e fenol (5%), segundo o método colorimétrico do ácido fenol sulfúrico (Dubois *et al.* 1956).

A quantificação dos carboidratos solúveis totais foi feita a partir da equação da reta gerada a partir da curva de calibração realizada com glicose.

Lipídeos totais

Foram testados três métodos para a extração dos lipídeos totais em três espécies de macroalgas marinhas (anexo I). Com base nos resultados obtidos, o método descrito abaixo foi o escolhido para ser utilizado no presente trabalho.

Os lipídeos foram extraídos usando o método descrito por Bligh & Dyer (1959). O macerado liofilizado (330 mg) foi suspenso em tampão PBS e, em seguida, adicionou-se 125 μ L da solução contendo o padrão interno, composto por 5 mg/mL de tritridecanoína em hexano (C13:0, T3882 Sigma), e 12,5 mL de clorofórmio, metanol e água, na proporção de 2:2:1. A mistura foi centrifugada e a fase clorofórmica foi transferida para outro frasco e seca sob atmosfera de N₂ (g). O conteúdo total de lipídeos foi determinado gravimetricamente e o resíduo de gordura foi transmetilado para a avaliação do conteúdo de ácidos graxos.

Ácidos graxos

- Metilação:

Foram testados dois métodos para a transesterificação dos ácidos graxos em três espécies de macroalgas marinhas (anexo I). Com base nos resultados obtidos, o método descrito abaixo foi o escolhido para ser utilizado no presente trabalho.

A reação de metilação dos ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; fatty acid methyl ester) foi feita dissolvendo-se o extrato seco de lipídeos em 500 μL de 5% de HCl em metanol e a mistura foi incubada por 2h a 100 °C. Após o término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 1,25 mL de água e extraiu-se os FAME com 1,25 mL de hexano.

- Análise cromatográfica:

Os FAME foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), em coluna capilar de sílica fundida (VF-Wax, com dimensões de 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura do filme, Agilent). A temperatura de injeção foi de 220 °C, volume de 1 μ L, no modo Split. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, e a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial de 60 °C, com aumento de 5 °C por min, até 260 °C, mantidos por 10 min.

- Identificação de picos e cálculos:

O padrão utilizado para a identificação dos picos foi o Supelco 37 (47885-U, figura 50 do apêndice I). Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e/ou por comparação de seus espectros de massa com espectros da biblioteca (NIST). FAME que não constavam no padrão e que apresentaram índice de similaridade abaixo de 90% não foram considerados.

A quantificação da maioria dos FAME foi feita com a equação da reta da curva padrão do respectivo FAME do padrão Supelco 37. Para os FAME que não constavam no padrão supelco, a quantificação foi feita considerando a concentração do padrão interno (C13:0), uma vez que área do pico é proporcional a concentração de FAME.

3.2. Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörning & Weber-Peukert (Phaeophyceae) cultivada em laboratório

Espécie selecionada e utilizada no estudo

A continuação do estudo foi realizada com *D. menstrualis*. Esta espécie geralmente habita a região do mesolitoral e tem ampla distribuição ao longo do litoral brasileiro, sendo encontrada desde o litoral do RS até o MA (Nunes, 2001). *D. menstrualis* tem sua importância atribuída à produção de diterpenóides, moléculas com potencial bioativo, com atividade anti-HIV (Pereira et al., 2004) e contra o vírus da Herpes Simplex tipo-1 (Abrantes et al., 2010).

A espécie foi coletada em Rio do Fogo, RN, e transportada ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, IQ/USP, onde foi isolada e propagada em laboratório. O cultivo dessa espécie está sendo mantido no Laboratório de Culturas de Algas e Cianobactérias "Marilza Cordeiro Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP (figura 14).



Figura 14. Aspecto geral de um tetrasporófito de *Dictyota menstrualis* (Phaeophyceae, Heterokontophyta) cultivada em laboratório.

Isolamento e manutenção das culturas unialgáceas em laboratório

Logo que chegaram do campo, as plantas foram lavadas com água do mar esterilizada para retirada das impurezas e epibiontes. Com o auxílio do microscópio estereoscópico, foram selecionados os ápices mais saudáveis e menos epifitados. Esses ápices foram mantidos em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch (tabela 3), com a concentração reduzida a 25%. Foi também adicionado GeO₂ (1 mg.L⁻¹) para evitar a contaminação por diatomáceas. A troca de meio foi feita semanalmente e, a cada troca de meio, os ápices foram lavados por 30 s com água do mar acrescida de detergente (4 mL.L⁻¹ de água do mar) e apenas os ápices mais saudáveis e menos epifitados continuaram a ser cultivados.

A água do mar utilizada no cultivo das algas foi coletada no CEBIMAR, em São Sebastião, SP. Essa água foi esterilizada por filtragem em membrana Millipore AP 20 e autoclavada a 121 °C, por 30 min.

Após o isolamento, as culturas unialgáceas foram mantidas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch (Tabela 1), na concentração de 50% (referido com a abreviatura VSES/2). A troca do meio de cultura foi feita semanalmente e foram utilizados Erlenmeyers (500 mL), contendo 350 mL de meio.

As culturas unialgáceas foram mantidas em sala de cultivo, nas seguintes condições: temperatura média de 24 \pm 2 °C, fotoperíodo de 14 h, salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo "luz do dia", dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Foram avaliadas a taxa de crescimento e a taxa de fotossíntese de *D. menstrualis* cultivada por 30 dias em água do mar com e sem a adição de VSES/2. Para cada tratamento, foram utilizados 6 segmentos apicais de 2 cm de comprimento. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas e a troca do meio foi realizada semanalmente.

A taxa de crescimento (TC) foi avaliada semanalmente por meio de medidas da massa fresca e calculada utilizando-se a fórmula: TC = (ln Massa final – ln Massa inicial)/(Tempo final – Tempo inicial).

Os parâmetros fotossintetizantes foram determinados como descrito no item 3.1.

Componentes	Concentração para 1 L de meio
NaNO ₃	0,50 mM
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	30 µM
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 μΜ
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 μM
Tiamina.HCl	0,59 μM*
Biotina	4,10 nM*
Cianocobalamina	1 nM*

Tabela 3. Composição química da solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996).

* Concentração equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970).

3.3. Efeitos do aumento do CO₂, em condições de saturação e limitação de nitrogênio, sobre o metabolismo e a composição bioquímica de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores

Esta etapa do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Culturas de Algas e Cianobactérias "Marilza Cordeiro Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

Os experimentos foram realizados em um sistema de biorreatores (modelo TE-BIT-E3, Tecnal, Brasil) composto por seis vasos de reação (volume de 2,5 L) com tampa de inox com entradas para sensores de temperatura (Tecnal), pH (Metter Toledo), oxigênio (Metter Toledo), CO₂ (Metter Toledo) e com borbulhador de ar em aço inox sintetizado. Os vasos de reação estavam conectados a um sistema de controle e de aquisição de dados (Tecbio-soft, Tecnal) de temperatura, pH, oxigênio e CO₂ dissolvidos do meio de cultura. Os biorreatores e os sensores foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 60 min antes do início dos experimentos.

O experimento foi realizado utilizando água do mar esterilizada enriquecida com a solução de VSES/2, com e sem adição de nitrato (NO_3^-) , na proporção de 400 mg de biomassa para 1,6 L de meio. Os dois tratamentos (com e sem NO_3^-) foram aerados com e sem adição de CO_2 . Também foram realizados dois tratamentos (com e sem NO_3^-) sem aeração e adição de CO_2 . Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas. O meio foi trocado semanalmente e o experimento teve duração de 2 semanas.

A aeração e a injeção de CO_2 foram constantes durante todo o período experimental, sendo que o ar e o CO_2 foram injetados por entradas diferentes. Tanto o ar, proveniente do sistema de aeração módulo Tec-Bio-A (Tecnal), como o CO_2 , proveniente de um cilindro, foram filtrados e depois umedecidos. A saída do ar e de CO_2 para os vasos dos biorreatores foi feita por um manifold com 6 saídas e a regulagem do fluxo de ar de cada saída foi feita com um rotâmetro.

Um sensor de pH, temperatura, O_2 e CO_2 dissolvido foi acoplado a um dos vasos e esses parâmetros foram acompanhados durante todo o período experimental (figuras 15 e 16). A medida desses parâmetros foi realizada em todas as amostras (tabela 4).

A concentração das formas do carbono inorgânico dissolvido (DIC) (tabela 4) foi estimada a partir do pH e da alcalinidade total (*At*) do meio utilizando a equação descrita por Dickson *et al.* (2007). Os cálculos para foram feitos com auxílio do pacote seacarb (Lavigne *et al.* 2008), com a

colaboração do MSc. Carlos Eduardo Amâncio

Umidificador e Manifold para injeção de ar







Figura 16. Aspecto geral do experimento com Dictyota menstrualis cultivada em biorreatores.

Tratamentos testados Sem Aeração Sem Aeração Aeração+CO₂ Aeração +CO₂ Aeração Aeração +N-N+N– N +N-N(+N) (-N) (Ar+N) (Ar-N) (CO_2+N) (CO_2-N) $[NO_3^-];$ 250 250 250 --------μΜ [CO₂]; $0,008\pm0,0$ $0,005\pm0,0$ $0,007\pm0,0$ 0,005±0,0 $0,44\pm0,0$ $0,44\pm0,0$ mМ HCO₃; $1,7\pm0,07$ $1,5\pm0,01$ $1,5\pm0,03$ $1,6\pm0,02$ $2,2\pm0,00$ $2,3\pm0,01$ mМ $[O_2];$ 9,4±0,4 $10,8\pm0,6$ $7,7\pm0,1$ $7,5\pm0,2$ 7,6±0,1 $7,7\pm0,2$ mg/L pН 8,2±0,1 8,3±0,0 8,3±0,1 8,2±0,1 6,6±0,1 6,5±0,2 Temperatura; $25,8\pm0,7$ $25,8\pm0,7$ $25,8\pm0,7$ $25,8\pm0,7$ 25,8±0,7 $25,8\pm0,7$ °C

Tabela 4. Concentração de nutrientes e parâmetros abióticos acompanhados durante o experimento realizado com *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores, com e sem adição de nitrato e com e sem adição de CO_2 . Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Ao final do período de cultivo, as macroalgas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

Variáveis analisadas

Crescimento

A TC foi avaliada como descrito no item 3.2.

Fotossíntese

A fotossíntese foi analisada como descrito no item 3.1. Entretanto, além das curvas FI, foram analisadas curvas de indução escuro/luz (Curva de Kautsky), seguida de uma curva de recuperação. Nessa análise, as amostras aclimatadas ao escuro por 30 min são submetidas a um pulso de saturação, para obter o valor de RQP e, em seguida, a luz actínica é ligada e são aplicados 13 pulsos adicionais, a intervalos de 15 s, para determinar o RQE (Curva de Kautsky). Após o desligamento da luz actínica, são dados 6 pulsos saturantes adicionais, em intervalos de 10 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min e 10 min (Curva de Recuperação). A curva de Kautsky fornece informações sobre as enzimas do ciclo de Calvin, que são ativadas durante os primeiros minutos de iluminação, enquanto durante a curva de recuperação são obtidas informações de reações de pós-iluminação, como a extinção da fotoinibição.

Nitrato redutase (NR)

A biomassa fresca (200 mg) foi macerada em nitrogênio líquido e suspensa em 1,15 mL de tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1mM DTT e BSA 0,3% w/v). A solução foi centrifugada a 12000 g (4 °C, durante 15 min). O sobrenadante foi dessalinizado por colunas comerciais de 5 mL com matriz de sephadex G-25 superfina que fornece uma massa de corte de 5000 Da, garantindo a separação da proteína do nitrato.

Para a determinação da atividade da NR, o extrato bruto (150 μl) foi pré-incubado em uma mistura de reação (0,2 M de tampão fosfato, pH 8,0, 6 mM KNO₃ e 0,5 mM MgSO₄), por 10 min. A mistura foi incubada por um tempo adicional de 30 min após a adição de 40 μM NADH para iniciar a reação. Os controles foram feitos sem a adição de NADH ou sem a adição de NO₃. A reação foi interrompida adicionando 1,4 mM de ZnSO₄ e etanol 43% v/v. A solução foi centrifugada a 12000 g (20 °C, durante 10 min). A concentração de NO₂ foi determinada por espectrofotometria a 543 nm após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM n-(1-naftil) etilendiamina diidrocloreto (NED).

O conteúdo de NO₂ produzido foi transformado em atividade da NR por massa fresca considerando que 1 unidade da NR (U) corresponde a 1 µmol de NO₂ produzido por minuto (Chapman & Harrison, 1988).

A quantificação do NO₂ foi feita utilizando a equação da reta gerada a partir da curva de calibração realizada com NO₂. Para obtenção da atividade especifica da NR, fez-se a razão da concentração de NO₂ pelo tempo e pela concentração de proteínas totais obtida por uma curva padrão de proteínas totais feita pela detecção de BSA através do método de coomasie blue (Bradford, 1976).

Anidrase Carbônica (AC)

A atividade da AC foi analisada utilizando o método de Haglund *et al.* (1992). A extração foi realizada através da maceração das amostras em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em um tampão de extração (50 mM Tris(hidroximetil)aminometano, 5 mM EDTA, 25 mM ácido ascórbico e pH 8,5) na proporção de 100 mg de biomassa fresca por 2 mL de tampão e as amostras foram mantidas no gelo até o momento das análises.

O ensaio da atividade enzimática foi realizado adicionando-se 1 mL de água Milli-Q saturada em CO₂ e mediu-se o tempo de caída do pH de 7,9 a 7,3. As amostras, mesmo durante o ensaio, sempre foram mantidas no gelo. O tempo de decaimento do pH, após a adição de 1 mL de água Milli-Q saturada em CO₂, foi também avaliado no controle, composto por 2 mL de tampão, sem extrato de alga.
A atividade relativa da AC, denominada como REA (relative enzymatic activity), foi calculada através da fórmula:

 $[(t_0/t_c) -1]/PF$, onde t_0 é o tempo de redução do pH dentro do limite estabelecido no controle; tc é o tempo de redução do pH na amostra com a alga; PF é o peso fresco (g).

Rubisco

A determinação da atividade inicial da Rubisco foi feita utilizando o método de Gerard & Driscoll (1996) modificado por Wang *et al.* (2011). A extração foi realizada através da maceração das amostras em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em um tampão de extração (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA, 5mM de glutationa reduzida e pH 7,6) na proporção de 0,2 g de biomassa fresca por 500 μL de tampão. A solução foi centrifugada a 2000 g (4 °C, durante 2 min) e o sobrenadante retirado e mantido no gelo por 30 min, para a ativação da enzima.

A mistura de reação foi composta por tampão de reação (0,1 M Tris-HCl, 12 mM MgCl₂, 0,4 mM EDTA e pH 7,8) e 0,01 mM NaHCO₃, 0,34 mM NADH, 3,44 mM ATP, 3,44 mM de creatina fosfato, 5 unidades de creatina fosfoquinase, 5 unidades de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase / fosfoglicerato quinase e 100 µL de extrato bruto. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de ribulose-1,5-bisfosfato. A oxidação do NADH foi acompanhada pela diminuição da absorbância a 340 nm. A oxidação espontânea do NADH foi estimada por alguns minutos antes do início da reação e subtraída da atividade da Rubisco medida. A atividade da Rubisco foi relacionada à concentração de proteínas e calculada como descrito por Wang *et al.* (2011).

Pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, lipídeos totais e ácidos graxos

Para a medida desses compostos, seguiu-se a metodologia descrita no item 3.1, com exceção da reação de metilação dos ácidos graxos, que foi realizada como descrito abaixo.

A reação de metilação dos ácidos graxos a FAME foi feita dissolvendo-se o extrato seco de lipídeos em 1 mL de BF_3 (7% em metanol) e 0,5 mL de tolueno e aquecendo-se a 100 °C por 45 min. Após o término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 mL de água e extraiu-se os FAME com 1 mL de hexano.

Conteúdo de C e N

A análise elementar para quantificar o teor de C e N no tecido algáceo foi realizada utilizando o equipamento CHN 2400 Perkin-Elmer, pela Central Analítica do Instituto de Química da USP.

Conteúdo de manitol

- Extração e hidrólise:

Os polissacarídeos foram extraídos e hidrolisados usando o método descrito por Kim *et al.* (2011). O macerado liofilizado (250 mg) foi suspenso em 2,5 mL de 0,1N HCl e mantido a 121 °C por 15 min. Para a hidrólise enzimática, o pH do hidrolisado filtrado foi ajustado para 5,5 e, em seguida, adicionou-se a enzima Celluclast® 1.5 (C2730 Sigma), na proporção de 0,01 g por g de massa seca. Para a reação de sacarificação, o hidrolisado foi mantido a 50 °C, em um shaker rotatório, a 150 rpm, por 24 h.

As amostras foram secas sob atmosfera de N_2 (g) para a derivatização dos açúcares a acetatos de alditóis, após a adição do padrão interno (20 µg mio-inositol).

- Redução dos monossacarídeos a alditóis:

Para a redução dos monossacarídeos a alditóis, o resíduo seco contendo os monossacarídeos foi dissolvido em 100 μ l de água Milli-Q e, em seguida, adicionou-se 20 μ l de 15 M amônia e 1 mL de 0,5 M boroidreto de sódio dissolvido em DMSO. As amostras foram vortexadas e incubadas por 90 min a 40 °C. O excesso de boroidreto de sódio foi destruído adicionando-se 100 μ l de ácido acético glacial. Antes da reação de acetilação, as amostras foram secas sob atmosfera de N₂ (g) e lavadas, por três vezes, com 250 μ l de 5% de ácido acético em metanol (Melton & Smith, 2001; Oxley *et al.*, 2004).

- Acetilação dos alditóis:

Para a acetilação dos alditóis, foi adicionado 250 μl de anidrido acético às amostras secas. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 5 min e incubadas por 2,5 h a 100 °C. O excesso de anidrido acético foi destruído adicionando 2 mL de água à amostra. Os acetatos de alditóis foram extraídos com 500 μl de diclorometano (Oxley *et al.*, 2004).

- Análise cromatográfica:

Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), em coluna capilar DB-23 (com dimensões de 30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura do filme, Agilent). A temperatura de injeção foi de 240 °C, volume de 1 μ L, no modo Split. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, e a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial de 170 °C mantida por 2 min, com aumento de 3 °C por min, até 240 °C, mantidos por 10 min.

- Identificação de picos e cálculos:

Os acetatos de alditóis foram identificados por comparação de seus espectros de massa com espectros da biblioteca (NIST). A quantificação foi feita considerando a concentração do padrão interno (mio-inositol), uma vez que área do pico é proporcional a concentração do acetato de alditol.

3.4. Efeitos do aumento do CO₂, em condições de saturação e limitação de nitrogênio, sobre a captação de CO₂ por *D. menstrualis* cultivada em laboratório

O experimento foi realizado utilizando água do mar esterilizada enriquecida com VSES/2, com e sem adição de NO_3^- . Os dois tratamentos foram aerados com e sem CO_2 (tabela 5). Foram utilizados Erlenmeyes de 250 mL, mantendo-se a proporção de 150 mg de biomassa por 150 mL de meio de cultura. O experimento teve a duração de uma semana e os dados de pH, alcalinidade, concentração de O_2 e temperatura, necessários para o cálculo das formas de DIC foram coletados nos tempo inicial (logo após a injeção de ar e/ou CO_2), 1 h, 24 h e após uma semana do início.

Para cada tratamento, testado com 3 repetições simultâneas, foram feitos controles sem alga, onde a medição dos dados necessários para o cálculo das formas de DIC foi realizada no mesmo momento das amostras contendo a alga, para acompanhar se haveria variação na concentração de CO₂, ao longo do tempo.

A aeração e injeção de CO_2 de cada frasco foram realizadas com a bomba de ar e o cilindro de CO_2 utilizados nos experimentos com os biorreatores. O fluxo de ar e de CO_2 foi regulado pelo manifold e a injeção no meio foi feita com uma pipeta pasteur, adicionada a outra extremidade da mangueira acoplada a saída do manifold. Todos os frascos foram aerados com o mesmo fluxo de ar e pelo mesmo tempo. O fluxo de entrada de CO_2 foi ajustado para 20 mL/ min e todos os frascos foram aerados por 1 min. Após a aeração os frascos foram completamente vedados até o momento das análises.

	Tratamentos								
	Ar+N	Ar-N	CO ₂ +N	CO ₂ -N					
[CO ₂] (mM)	0,01±0,00	0,01±0,00	0,48±0,01	0,48±0,01					

Tabela 5. Concentração inicial de CO_{2} , após aeração com ou sem CO_{2} , na água do mar com e sem adição de nitrato. Os valores correspondem a média \pm desvio padrão (n=6).

A porcentagem de remoção de CO_2 (%) foi calculada baseando-se na seguinte fórmula: 100 x {([inicial]-[final])[inicial]⁻¹}, onde [inicial] = [CO₂] no tempo zero e [final] = [CO₂] após X dias de incubação.

3.5. Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%, utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar as diferenças entre as espécies que ocorrem no litoral do Brasil para escolher uma espécie com potencial para a produção de biodiesel, além de fazer a comparação dessas espécies com as procedentes da Antártica. Entretanto, como foram realizadas coletas em duas localidades diferentes no Brasil, Ubatuba – SP e Rio do Fogo – RN, realizamos, para cada variável analisada, a média dos resultados das rodófitas, clorófitas e heterocontófitas provenientes de cada localidade, para avaliar as diferenças entre cada grupo de macroalga e entre as diferentes localidades.

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas procedentes do Brasil e Antártica

Foram determinados o conteúdo de pigmentos, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais, lipídeos totais e a composição de ácidos graxos de 25 espécies de macroalgas coletadas no litoral brasileiro (Ubatuba, SP e Rio do Fogo, RN) e de 6 espécies coletadas na Baía do Almirantado, localizada na Ilha Rei George, Península Antártica. Dentre as espécies coletadas na Antártica, não constam representantes de clorófitas, uma vez que a biomassa coletada de *Monostroma hariotii* Gain, macroalga verde encontrada em maior quantidade, não foi suficiente para a realização das extrações dos compostos citados acima. O desempenho fotossintetizante foi avaliado para alguns representantes de cada filo, incluindo as ordens mais representativas.

A taxa fotossintetizante dos espécimes coletados na costa brasileira foi avaliada, uma vez que é um importante parâmetro a ser analisado durante a seleção da espécie que foi objeto do presente estudo, pois ela deve conter, além de um alto teor de ácidos graxos, uma alta taxa de crescimento e de produtividade primária, características importantes para a produção do metabólito de interesse. Esse parâmetro foi também estudado para as macroalgas marinhas provenientes da Antártica, tanto para comparar com os resultados apresentados pelos espécimes da costa brasileira, como para avaliar as condições fisiológicas desses organismos que habitam esse ambiente de condições tão extremas e adversas.

As curvas FI das macroalgas estudadas mostram que as espécies procedentes do Brasil que apresentaram maior desempenho fotossintetizante, dentro de cada grupo, foram *Acantophora spicifera*, *Ulva lactuca* e *Dictyota menstrualis*. Para as algas provenientes da Antártica, foram *Gigartina skottsbergii*, *Plocamium cartilagineum* e *Ascoseira mirabilis* (figuras 17 e 18).



Figura 17. Curvas de fotossíntese-irradiância baseadas na fluorescência da clorofila *a* de representantes de rodófitas (**A**), clorófitas (**B**) e heterocontófitas (**C**) coletados no litoral brasileiro. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).



Figura 18. Curvas de fotossíntese-irradiância baseadas na fluorescência da clorofila *a* de representantes de rodófitas (**A**) e heterocontófitas (**B**) coletados na Antártica. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Houve diferença significativa nos resultados apresentados pelas diferentes espécies, sendo que *Ulva lactuca* e *Dictyota menstrualis* apresentaram os maiores valores de ETRmax $(303,6\pm39,1 e 269,5\pm318, respectivamente)$ e Ik $(930,5\pm48,7 e 685,1\pm117,1, respectivamente)$. Os menores valores desses dois parâmetros ocorreram em *Palmaria decipiens* $(3,0 \pm 0,5$ para ETRmax e 18,6 ± 2,9 para Ik) (tabela 6). Os maiores valores de RQE e alfa ocorreram nas heterocontófitas *Padina gymnospora* e *Ascoseira mirabilis*, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros fotossintetizantes (rendimento quântico efetivo – RQE, fotossíntese máxima – ETRmax, eficiência fotossintetizante – alfa e parâmetro de saturação – Ik) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

	Espécie	RQE	ETRmax	Alfa	Ik
	A. spicifera	$0,\!688 \pm 0,\!0^{\mathrm{ab}}$	$32,2 \pm 6,9^{bc}$	$0,3 \pm 0,0^{b}$	$114,7 \pm 29,0^{de}$
	D. marginata	$0{,}606\pm0{,}0^{bc}$	$21{,}5\pm1{,}8^{\rm c}$	$0,2\pm0,0^{bc}$	$116,6 \pm 23,9^{de}$
Rodófitas	G. skottsbergii	$0{,}615\pm0{,}0^{bc}$	$6,5 \pm 1,0^{e}$	$0,3\pm0,0^{bc}$	$25,1 \pm 1,4^{\text{g}}$
	G. cervicornis	$0,533 \pm 0,0^{\mathrm{c}}$	$8,4 \pm 1,6^{de}$	$0,2\pm0,0^{bcd}$	$47,1 \pm 2,4^{ef}$
	H. musciformis	$0{,}566\pm0{,}0^{\mathrm{c}}$	$21,2 \pm 4,9^{c}$	$0,2\pm0,0^{bc}$	$102,9\pm2,9^{\text{de}}$
	P. decipiens	$0{,}505\pm0{,}0^{\mathrm{c}}$	$\textbf{3,0} \pm \textbf{0,5}^{\mathrm{f}}$	$0,2\pm0,0^{cd}$	$18,6 \pm 2,9^{\text{ g}}$
	P. cartilagineum	$0{,}607\pm0{,}0^{bc}$	$\textbf{7,8} \pm \textbf{0,3}^{de}$	$0,2\pm0,0^{d}$	$52,0 \pm 2,2^{e}$
	C. racemosa	$0,626 \pm 0,1^{\rm bc}$	$40,0 \pm 5,1^{\text{bc}}$	$0,4 \pm 0,0^{a}$	$112,5 \pm 16,9^{de}$
Clorófitas	C. membranacea	$0{,}705\pm0{,}0^{ab}$	$73,7\pm3,7^{ab}$	$0,2\pm0,0^{bcd}$	$349,5\pm80,3^{c}$
	U. lactuca	$0,718\pm0,1$ ^{ab}	$303,6 \pm 39,1^{a}$	$0{,}25\pm0{,}1^{b}$	$930{,}5\pm48{,}7^{a}$
	A. mirabilis	$0,695 \pm 0,1^{ab}$	$15,7 \pm 1,1^{c}$	$0,5 \pm 0,1^{a}$	$34,0 \pm 3,4^{\rm f}$
	D. anceps	$0{,}726\pm0{,}0^{ab}$	$10,1 \pm 1,1^{d}$	$0,3\pm0,0^{\rm bc}$	$41,5 \pm 8,3^{e}$
Heterocontófitas	D. menstrualis	$0{,}761\pm0{,}0^{a}$	$269,5\pm31,8^{\mathrm{a}}$	$0,4\pm0,0^{a}$	$685,1 \pm 117,1$ ^b
	H. grandifolius	$0{,}664\pm0{,}0^{bc}$	$5,4 \pm 1,0^{e}$	$0,4\pm0,0^{a}$	14,7 \pm 3,1 ^h
	P. gymnospora	$0,777 \pm 0,0^{a}$	$76,7 \pm 10,3^{ab}$	$0,4\pm0,0^{a}$	$183,9\pm22,1^{cd}$
	S. cymosum	$0{,}710\pm0{,}1^{ab}$	$69,6\pm5,0^{ab}$	$0,4\pm0,0^{a}$	$195,0 \pm 24,9^{cd}$

Ao comparar o rendimento quântico efetivo (RQE) e os parâmetros derivados das curvas FI (fotossíntese máxima - ETRmax, eficiência fotossintetizante - alfa e irradiância de saturação -Ik) entre os diferentes filos de macroalgas, observou-se que as heterocontófitas apresentaram maior RQE e alfa do que as clorófitas e rodófitas, tanto para as algas coletadas no Brasil quanto para as coletadas na Antártica (figura 19). As heterocontófitas e clorófitas procedentes do Brasil também apresentaram maior ETRmax e Ik do que as rodófitas provenientes do mesmo local, sendo que não houve diferença significativa desse último parâmetro entre os dois grupos de macroalgas coletados na Antártica (figura 19).

Ao observar os resultados apresentados por cada filo de macroalga, comparando-se o local de coleta, verificou-se que as rodófitas e heterocontófitas coletadas no Brasil exibiram maior ETR max e Ik do que as algas do mesmo grupo provenientes da Antártica. O RQE das heterocontófitas brasileiras também foi significativamente maior do que o das antárticas (figura 19).



Figura 19. Variação do rendimento quântico efetivo (RQE) e dos parâmetros derivados das curvas FI (fotossíntese máxima - ETRmax, eficiência fotossintetizante - alfa e irradiância de saturação - Ik) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Brasil e Antártica). Os valores representam a média \pm o desvio padrão incluindo todas as espécies de cada filo. Filos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados no Brasil; letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados na Antártica; * indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as rodófitas; • indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as heterocontófitas.

Houve diferença significativa no conteúdo de clorofila *a* entre as espécies de macroalgas estudadas, sendo que os valores variaram de $0,20 \pm 0,01$ mg/g massa seca (*Gigartina skottsbergii*) a $6,82 \pm 0,46$ mg/g massa seca (*Spatoglossum schroederi*). O conteúdo de clorofila *a* foi também maior nas espécies *Dictyota mentrualis* e *Padina gymnospora*, e menor nas espécies *Asparagopsis taxiformis* e *Cryptonemia crenulata* (figura 20).



Figura 20. Conteúdo de clorofila *a* (Cl*a*) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

As heterocontófitas coletadas em Ubatuba-SP, Rio do Fogo-RN e na Antártica apresentaram maior conteúdo de Cl*a* do que as rodófitas provenientes do mesmo local (figura 21). O mesmo foi observado para as clorófitas, coletadas apenas em Ubatuba-SP. Em relação ao local de coleta, houve diferença significativa no conteúdo de Cl*a* das heterocontófitas, que foi maior nos representantes desse grupo coletados em Rio do Fogo – RN, sendo que não houve diferença nos resultados obtidos com as heterocontófitas coletadas em Ubatuba – SP e na Antártica (figura 21).



Figura 21. Variação do conteúdo de clorofila *a* (Cl*a*) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica). Os valores representam a média \pm o desvio padrão incluindo todas as espécies de cada filo. Filos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Ubatuba – SP; letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Rio do Fogo – RN; letras minúsculas em itálico indicam diferenças significativas entre os filos coletados na Antártica; * indica diferenças significativas entre os filos coletados na Antártica; * indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as heterocontófitas.

O conteúdo de AFC foi maior nas espécies Acantophora spicifera, Aglaothamnion uruguayense, Bryothamnion seaforthii, Gigartina skottsbergii, Laurencia dendroidea, Palmaria decipiens e Plocamium cartilagineum. A concentração desse pigmento foi menor nas espécies Asparagopsis taxiformis, Bryocladia thyrsigera, Dichotomaria marginata, Gracilaria birdiae e Gracilaria cervicornis, não sendo detectado em Cryptonemia crenulata (figura 22). Aglaothamnion uruguayense, Gigartina skottsbergii, Palmaria decipiens e Plocamium cartilagineum também apresentaram maior concentração de FC e FE. Asparagopsis taxiformis foi a espécie que apresentou menor conteúdo de FE (figura 22).



Figura 22. Conteúdo de aloficocianina (**AFC**), ficocianina (**FC**) e ficoeritrina (**FE**) de representantes de rodófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Acantophora spicifera;
 Aglaothamnion uruguayense;
 Asparagopsis taxiformis;
 Bryocladia thyrsigera;
 Bryothamnion seaforthii;
 Cryptonemia crenulata;
 Dichotomaria marginata;
 Gigartina skottsbergii
 Gracilaria birdiae;
 Gracilaria cervicornis;
 Gracilaria mammillaris;
 Hypnea musciformis;
 Laurencia dendroidea;
 Palisada flagellifera;
 Palmaria decipiens;
 Plocamium cartilagineum;
 Solieria filiformis.

O conteúdo das ficobiliproteínas (AFC, FC e FE) foi maior nas rodófitas provenientes da Antártica. Não houve diferença significativa na concentração desses pigmentos nas rodófitas coletadas em Ubatuba – SP e Rio do Fogo – RN (figura 23).



Figura 23. Variação do conteúdo de ficobiliproteínas (aloficocianina – AFC, ficocianina – FC e ficoeritrina – FE) nas rodófitas provenientes de diferentes locais (Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica). Os valores representam a média \pm o desvio padrão incluindo todas as espécies de rodófitas. Letras minúsculas indicam diferenças significativas no conteúdo de AFC entre as rodófitas coletadas em diferentes locais; letras maiúsculas indicam diferenças significativas no conteúdo de FC entre as rodófitas coletadas em diferentes locais; letras maiúsculas indicam diferenças significativas em itálico indicam diferenças significativas no conteúdo de FE entre as rodófitas coletadas em diferentes locais; letras maiúsculas em diferentes locais; letras maiúsculas em diferentes locais; letras maiúsculas em diferentes locais; letras minúsculas em itálico indicam diferenças significativas no conteúdo de FE entre as rodófitas coletadas em diferentes locais.

As análises bioquímicas de 31 espécies de macroalgas revelaram uma distribuição distinta na sua composição. Houve grande variação no conteúdo de lipídeos totais, carboidratos solúveis totais e proteínas solúveis totais entre as diferentes espécies estudadas (figuras 24 e 25). *Dictyota menstrualis* apresentou o maior conteúdo de lipídeos totais (98,8 ± 4,9 mg/ g massa seca), enquanto *Gracilaria cervicornis* apresentou o menor valor (10,0 ± 1,0 mg/ g massa seca). Em relação aos carboidratos solúveis totais, os maiores valores foram encontrados nas rodófitas *Gracilaria mammillaris, Laurencia dendroidea* e *Plocamium cartilagineum* (742,0 ± 31,9, 675,3 ± 11,0 e 660,2 ± 27,2 mg/ g massa seca, respectivamente) e o menor valor na heterocontófita *Sargassum stenophyllum* (129,3 ± 5,7 mg/ g massa seca). A maior concentração de proteínas solúveis totais ocorreu em *Palmaria decipiens* e *Aglaothamnion uruguayense* (21,7 ± 1,7 e 18,0 ± 0,4 mg/ g massa seca, respectivamente) e a menor nas espécies *Asparagopsis taxiformis, Caulerpa racemosa, Ascoseira mirabilis, Dictyopteris delicatula, Dictyota menstrualis, Lobophora variegata, Sargassum cymosum* e *Sargassum stenophyllum* (figura 24 A, B e C).

De um modo geral, as espécies que apresentaram maior concentração de lipídeos, como *Dictyota menstrualis* e *Spatoglossum schroederi*, exibiram menores valores de proteínas e carboidratos. O mesmo foi observado para *Palmaria decipiens*, que possui alta concentração de proteínas e baixa concentração de lipídeos e carboidratos. Entretanto, as espécies *Aglaothamnion uruguayense* e *Plocamium cartilagineum* apresentaram altos valores de proteínas e carboidratos e de lipídeos e carboidratos, respectivamente (figura 25 A, B e C).



Figura 24. Conteúdo de lipídeos totais (A), carboidratos solúveis totais (B) e proteínas solúveis totais (C) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.
1. Acantophora spicifera; 2. Aglaothamnion uruguayense; 3. Asparagopsis taxiformis; 4. Bryocladia thyrsigera; 5. Bryothamnion seaforthii; 6. Cryptonemia crenulata; 7. Dichotomaria marginata; 8. Gigartina skottsbergii 9. Gracilaria birdiae; 10. Gracilaria cervicornis; 11. Gracilaria mammillaris; 12. Hypnea musciformis; 13. Laurencia dendroidea; 14. Palisada flagellifera; 15. Palmaria decipiens; 16. Plocamium cartilagineum; 17. Solieria filiformis; 18. Caulerpa racemosa; 19. Cladophoropsis membranacea; 20. Rhizoclonium africanum; 21. Ulva lactuca; 22. Ascoseira mirabilis; 23. Desmarestia anceps; 24. Dictyopteris deliculata; 25. Dictyota menstrualis; 26. Himantothallus grandifolius; 27. Lobophora variegata; 28. Padina gymnospora; 29. Sargassum cymosum; 30. Sargassum stenophyllum; 31. Spatoglossum schroederi.



Figura 25. Diagrama de dispersão com valores de lipídeos totais e carboidratos solúveis totais (**A**), lipídeos totais e proteínas solúveis totais (**B**) e proteínas solúveis totais e carboidratos solúveis totais (**C**) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica.

Houve diferença significativa entre os filos estudados apenas para as macroalgas coletadas em Rio do Fogo – RN, sendo que as heterocontófitas apresentaram valores mais elevados de lipídeos do que as rodófitas (figura 26 A). Ao comparar o local de coleta, pode-se observar que as rodófitas procedentes da Antártica possuem maior teor de lipídeos do que as rodófitas encontradas em Rio do Fogo – RN, sendo que não houve diferença significativa entre as rodófitas coletadas em Rio do Fogo – RN e Ubatuba – SP (figura 26 A).

As rodófitas provenientes de Ubatuba – SP e Rio do Fogo – RN apresentaram maior conteúdo de carboidratos solúveis totais e proteínas solúveis totais do que as heterocontófitas procedentes do mesmo local (figura 26 B e C), sendo que não houve diferença significativa entre os filos coletados na Antártica. Em relação ao local de coleta, as heterocontófitas coletadas na Antártica apresentaram maior concentração desses compostos do que as algas procedentes do Brasil e não houve diferença significativa entre as algas de Ubatuba – SP e Rio do Fogo – RN (figura 26 B e C).



Figura 26. Variação do conteúdo de lipídeos totais (**A**), carboidratos solúveis totais (**B**) e proteínas solúveis totais (**C**) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica). Os valores representam a média \pm o desvio padrão incluindo todas as espécies de cada filo. Filos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Ubatuba – SP; letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Rio do Fogo – RN; * indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as rodófitas; • indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as heterocontófitas.

Ao comparar o teor de carboidratos, lipídeos e proteínas de cada filo, observa-se que todos os grupos de macroalgas estudados apresentam maior porcentagem de carboidratos (figura 27). Entretanto, as algas pardas destacam-se também pelo elevado teor de lipídeos, que pode chegar a aproximadamente 20% do peso seco. Os níveis protéicos são baixos nas algas estudadas, quando comparados aos teores de carboidratos e lipídeos. Entretanto, as rodófitas procedentes da Antártica têm um teor de proteínas maior do que o dos os outros grupos.



Figura 27. Percentual de lipídeos, proteínas e carboidratos nas rodófitas (1), clorófitas (2) e heterocontófitas (3) coletadas no litoral brasileiro e na Antártica.

O conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados variou entre as espécies estudadas, sendo maior em *Spatoglossum schroederi* e *Dictyota menstrualis*. As espécies que apresentaram menor concentração desses compostos foram *Gracilaria cervicornis* e *Hypnea musciformis*, entre outras (figura 28 e tabela 7). *Spatoglossum schroederi* se destaca das demais espécies por apresentar altos valores de todos os tipos de ácidos graxos (figura 29 A, B e C). Já *Dictyota menstrualis* destaca-se pelo seu alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados, mas apresenta uma concentração de ácidos graxos saturados e poliinsaturados semelhante à das outras espécies, embora seja significativamente maior (figura 29 A, B e C).



Figura 28. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletadas em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).



Figura 29. Diagrama de dispersão com valores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (A), poliinsaturados e saturados (B) e poliinsaturados e monoinsaturados (C) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica.
1. Acantophora spicifera; 2. Aglaothamnion uruguayense; 3. Asparagopsis taxiformis; 4. Bryocladia thyrsigera; 5. Bryothamnion seaforthii; 6. Cryptonemia crenulata; 7. Dichotomaria marginata; 8. Gigartina skottsbergii 9. Gracilaria birdiae; 10. Gracilaria cervicornis; 11. Gracilaria mammillaris; 12. Hypnea musciformis; 13. Laurencia dendroidea; 14. Palisada flagellifera; 15. Palmaria decipiens; 16. Plocamium cartilagineum; 17. Solieria filiformis; 18. Caulerpa racemosa; 19. Cladophoropsis membranacea; 20. Rhizoclonium africanum; 21. Ulva lactuca; 22. Ascoseira mirabilis; 23. Desmarestia anceps; 24. Dictyopteris deliculata; 25. Dictyota menstrualis; 26. Himantothallus grandifolius; 27. Lobophora variegata; 28. Padina gymnospora; 29. Sargassum cymosum; 30. Sargassum stenophyllum; 31. Spatoglossum schroederi.

Tabela 7. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Farrácias	Ácidos	Ácidos graxos	Ácidos graxos	Ácidos graxos
Especies	graxos totais	saturados	monoinsaturados	poliinsaturados
Acantophora spicifera	$6,60\pm0,74^{\text{defgh}}$	$3,82\pm0,47^{de}$	1,03±0,09 ^{fghijk}	1,75±0,31 ^{def}
Aglaothamnion uruguayense	$5,24{\pm}0,74$ ^{ghi}	3,11±0,26 ^{efghi}	$1,52\pm0,67^{cdefg}$	$0,61{\pm}0,05^{\rm hij}$
Asparagopsis taxiformis	$7,01\pm0,62^{defg}$	$4,97\pm0,34^{bc}$	$1,26\pm0,13^{\text{defghij}}$	$0,77{\pm}0,14^{\text{ghij}}$
Bryocladia thyrsigera	$3,96\pm0,40^{ijk}$	$2,36\pm0,26^{\text{ghijk}}$	$0,63\pm0,06^{\text{hijk}}$	$0,98{\pm}0,09^{\text{efghij}}$
Bryothamnion seaforthii	$3,55\pm0,20^{ijk}$	$2,05\pm0,22^{\text{hijk}}$	$0,49\pm0,10^{\mathrm{jk}}$	$1,01{\pm}0,05^{\text{efghij}}$
Cryptonemia crenulata	$3,54{\pm}0,12^{ijk}$	$2,73\pm0,08^{efghijk}$	$0,53{\pm}0,03^{ijk}$	0,28±0,02 ^j
Dichotomaria marginata	$4,97{\pm}1,09^{\text{ghij}}$	$3,70\pm0,56^{def}$	$1,04{\pm}0,52^{\text{fghijk}}$	0,30±0,03 ^j
Gigartina skottsbergii	3,90±0,95 ^{ijk}	$1,91{\pm}0,42^{ijk}$	$0,28\pm0,00^{k}$	1,71±0,53 ^{def}
Gracilaria birdiae	$3,73\pm0,30^{ijk}$	$2,57{\pm}0,21^{\text{fghijk}}$	$0,46\pm0,04^{jk}$	$0,71\pm0,06^{\text{hij}}$
Gracilaria cervicornis	$2,07\pm0,26^{k}$	$1,61\pm0,19^{k}$	$0,27\pm0,02^{k}$	$0,19{\pm}0,05^{j}$
Gracilaria mammillaris	$4,25\pm0,50^{\text{hijk}}$	3,05±0,35 ^{efghi}	$0,49\pm0,06^{\mathrm{jk}}$	$0,71{\pm}0,08^{ m hij}$
Hypnea musciformis	$2,64\pm0,10^{jk}$	1,80±0,16 ^{jk}	0,43±0,10 ^{jk}	$0,41\pm0,03^{ij}$
Laurencia dendroidea	$6,09 \pm 1,00^{efghi}$	$3,32\pm0,47^{defg}$	$0,83{\pm}0,20^{\text{ghijk}}$	$1,94\pm0,38^{d}$
Palisada flagellifera	$4,59{\pm}0,50^{\text{ghij}}$	$2,53\pm0,18^{\text{fghijk}}$	$0,72\pm0,25^{jk}$	$1,53{\pm}0,14^{\text{defghi}}$
Palmaria decipiens	$5,54{\pm}0,08^{\text{ fghi}}$	$2,78\pm0,38^{\text{efghij}}$	$1,12\pm0,19^{\text{efghijk}}$	$1,63\pm0,19^{defg}$
Plocamium cartilagineum	$5,09{\pm}0,20^{ m ghi}$	$2,95{\pm}0,07^{\text{efghij}}$	0,43±0,01 ^{jk}	$1,71\pm0,15^{\text{def}}$
Solieria filiformis	$5,09\pm0,50^{\mathrm{fghi}}$	$2,90\pm0,22^{\text{efghij}}$	$1,10\pm0,09^{\text{efghijk}}$	$1,81\pm0,25^{\text{de}}$
Caulerpa racemosa	$10,08\pm0,10^{\circ}$	$5,38\pm0,53^{b}$	$1,87\pm0,27^{cdef}$	2,84±0,41 °
Cladophoropsis membranacea	$5,46\pm0,03^{\text{fghi}}$	3,04±0,13 ^{efghi}	$1,44\pm0,07^{\text{defgh}}$	$0,98{\pm}0,05^{\mathrm{efghij}}$
Rhizoclonium africanum	$8,18{\pm}0,50^{\text{de}}$	$4,19\pm0,27^{cd}$	$2,25\pm0,15^{\circ}$	$1,73\pm0,09^{\text{def}}$
Ulva lactuca	$5,07\pm0,30^{ghi}$	$2,67\pm0,11^{efghijk}$	$1,58\pm0,25^{cdefg}$	$0,65{\pm}0,07^{\text{hij}}$
Ascoseira mirabilis	$7,12\pm1,20^{\text{defg}}$	$3,90\pm0,29^{de}$	$1,77\pm0,45^{cdef}$	$1,46\pm0,42^{\text{defgh}}$
Desmarestia anceps	$7,09\pm0,50^{defg}$	2,95±0,13 ^{efghij}	$1,17\pm0,04^{efghij}$	3,37±0,33°
Dictyopteris deliculata	$7,79\pm0,40^{\text{def}}$	4,88±0,24 ^{bc}	$2,01\pm0,11^{cd}$	0,90±0,04 ^{efghij}
Dictyota menstrualis	$13,83\pm1,20^{b}$	5,13±0,45 ^b	$4,67\pm0,41^{b}$	4,03±0,36 ^b
Himantothallus grandifolius	$6,63\pm0,60^{\text{defgh}}$	$2,73\pm0,11^{efghijk}$	$1,19\pm0,06^{\text{defghij}}$	2,71±0,38 °
Lobophora variegata	$5,20\pm0,30^{ghi}$	$3,25\pm0,15^{defgh}$	$1,12\pm0,08^{\text{efghijk}}$	$0,82{\pm}0,08$ fghij
Padina gymnospora	$8,80{\pm}1,30^{cd}$	4,17±0,59 ^{cd}	1,91±0,33 ^{cde}	2,72±0,40 [°]
Sargassum cymosum	$5,12\pm1,20^{ghi}$	$2,87\pm0,80^{\text{efghij}}$	$1,26\pm0,26^{\text{defghij}}$	$0,99 \pm 0,20^{\text{efghij}}$
Sargassum stenophyllum	$5,44{\pm}0,40^{\text{fghi}}$	3,06±0,25 ^{efghi}	1,35±0,21 ^{defghi}	$1,04{\pm}0,10^{\text{efghij}}$
Spatoglossum schroederi	$22,79\pm1,60^{a}$	9,41±0,46 ^a	5,70±0,41 ^a	$7,68\pm0,71^{a}$

Em relação aos diferentes grupos de macroalgas, observou-se que as clorófitas coletadas em Ubatuba – SP apresentaram maior teor de ácidos graxos totais e monoinsaturados do que as rodófitas procedentes do mesmo local (figura 30 A e C). As heterocontófitas, coletadas em Fogo – RN e na Antártica, também apresentaram maior conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados do que as rodófitas provenientes dos mesmos locais (figura 30 A, B, C e D). Ao comparar os diferentes locais de coleta, observou-se um maior teor de ácidos graxos totais, saturados e poliinsaturados nas macroalgas provenientes de Rio do Fogo – SP. As rodófitas antárticas também apresentaram mais ácidos graxos poliinsaturados do que as brasileiras (figura 30 A, B, C e D).



Figura 30. Variação do conteúdo de ácidos graxos totais (**A**), saturados (**B**), monoinsaturados (**C**) e poli-insaturados (**D**) entre os três filos de macroalgas estudados (rodófitas, clorófitas e heterocontófitas) e entre os locais de coleta (Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica). Os valores representam a média \pm o desvio padrão incluindo todas as espécies de cada filo. Filos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Rio do Fogo – RN; letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os filos coletados em Rio do Fogo – RN; letras minúsculas em itálico indicam diferenças significativas entre os filos coletados na Antártica; * indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as rodófitas; indica diferenças significativas entre os locais de coleta, para as heterocontófitas.

Para todas as espécies estudadas, o acido hexadecanóico (C16:0) foi o ácido graxo saturado majoritário, seguido do ácido tetradecanóico (C14:0). As espécies que apresentaram maior concentração dos ácidos hexadecanóico e tetradecanóico foram, respectivamente, *Spatoglossum schroederi* e *Caulerpa racemosa* e *Spatoglossum schroederi* e *Dictyopteris deliculata*. O ácidos pentadecanóico (C15:0), heptadecanóico (C17:0) e octadecanóico (C18:0) ocorreram em baixas concentrações, sendo que apenas o C18:0 foi quantificado em todas as espécies (figura 31 e tabela 8). Os ácidos dodecanóico (C12:0), eicosanóico (C20:0), docosanóico (C22:0) e tetracosanóico (C24:0) tiveram baixa representatividade entre os organismos estudados (tabela 8).





Tabela 8. Conteúdo de ácidos graxos saturados (mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Espécies	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0
Acantophora spicifera		$0,50\pm0,08^{\text{fghi}}$	$0,07{\pm}0,01^{cde}$	3,00±0,38 ^{cde}	0,05 ^{bc}	$0,20\pm0,03^{def}$			
Aglaothamnion uruguayense		$0,29\pm0,03^{jklm}$	$0,06^{def}$	$2,54\pm0,20^{efgh}$	0,05 ^{bc}	$0,17{\pm}0,03^{\text{def}}$			
Asparagopsis taxiformis	$0,07{\pm}0,00^{a}$	$1,01\pm0,11^{d}$	0,06 ^{ef}	$3,55\pm0,38^{\circ}$	0,05 ^{bc}	$0,23{\pm}0,05^{\text{def}}$			
Bryocladia thyrsigera		$0,40\pm0,05^{\text{ghijk}}$	$0,05^{f}$	$1,65\pm0,17^{ijklm}$	0,05 ^{bc}	$0,20{\pm}0,04^{def}$			
Bryothamnion seaforthii		0,13±0,01 ^m	$0,05^{f}$	$1,67{\pm}0,14^{ijklm}$	0,05 ^{bc}	$0,17{\pm}0,05^{\text{def}}$			
Cryptonemia crenulata		$0,17\pm0,02^{lm}$	0,08 ^c	$2,36\pm0,11^{efghi}$		0,13 ^f			
Dichotomaria marginata		$0,12\pm0,01^{m}$	$0,05^{f}$	$2,94{\pm}0,45^{def}$		$0,14\pm0,03^{ef}$		$0,15\pm0,02^{a}$	$0,31\pm0,05^{a}$
Gigartina skottsbergii		$0,19\pm0,10^{klm}$	$0,05^{f}$	$1,27\pm0,41^{m}$	0,05°	$0,35\pm0,01^{bcd}$			
Gracilaria birdiae		$0,23\pm0,02^{klm}$		2,21±0,23 ^{ghij}		$0,13\pm0,01^{f}$			
Gracilaria cervicornis		$0,19\pm0,02^{klm}$		$1,31{\pm}0,17^{lm}$		0,11 ^f			
Gracilaria mammillaris		$0,38\pm0,04^{\text{hijkl}}$	$0,05^{f}$	$2,39{\pm}0,28^{efghi}$	0,05 ^{bc}	$0,18{\pm}0,04^{\text{def}}$			
Hypnea musciformis		$0,35\pm0,04^{ijklm}$	$0,05^{f}$	$1,27\pm0,12^{m}$		$0,14\pm0,03^{ef}$			
Laurencia dendroidea		0,73±0,13 ^e	$0,08\pm0,01^{\circ}$	$2,36\pm0,33^{efghi}$		0,14±0,01 ^{ef}			
Palisada flagellifera		$0,45\pm0,05^{ghij}$	$0,05^{f}$	$1,82\pm0,16^{hijklm}$	0,05 ^{bc}	$0,16\pm0,03^{ef}$			
Palmaria decipiens		0,89 ^d		$1,47\pm0,21^{klm}$	0,05 ^{bc}	$0,41{\pm}0,03^{b}$			
Plocamium cartilagineum	$0,13\pm0,04^{a}$	$0,54{\pm}0,01^{\text{efghi}}$	0,06 ^{ef}	$1,69{\pm}0,03^{ijklm}$		$0,45{\pm}0,05^{b}$		$0,08\pm0,01^{b}$	
Solieria filiformis		$0,20\pm0,01^{klm}$	$0,05^{f}$	$2,51\pm0,24^{efgh}$		$0,15\pm0,01^{ef}$			
Caulerpa racemosa		$0,17{\pm}0,03^{\text{lm}}$		$4,15\pm0,20^{b}$		$0,16\pm0,04^{ef}$			$0,33\pm0,06^{a}$
Cladophoropsis membranacea		$0,68{\pm}0,05^{\rm ef}$	$0,05^{f}$	$2,14{\pm}0,10^{\text{ghijk}}$	0,05 ^{bc}	$0,16\pm0,03^{ef}$			
Rhizoclonium africanum		$0,98{\pm}0,07^{d}$	0,05 ^f	2,77±0,19 ^{defg}	0,05 ^{bc}	0,15 ^{ef}			0,20±0,01 ^b
Ulva lactuca		$0,16\pm0,04^{lm}$		2,22±0,07 ^{ghij}		$0,17\pm0,04^{ef}$		0,12 ^b	

Tabela 8 – Continuação

Espécies	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0
Ascoseira mirabilis		$1,08\pm0,10^{d}$	0,07 ^{cde}	$2,02\pm0,04^{\text{ghijkl}}$	$0,07\pm0,01^{a}$	0,66±0,29 ^a			
Desmarestia anceps		$1,01\pm0,06^{d}$	$0,05^{f}$	$1,58\pm0,18^{jklm}$	0,05 ^{bc}	0,38±0,03 ^{bc}			
Dictyopteris deliculata		$1,81\pm0,09^{b}$	$0,11\pm0,01^{b}$	$2{,}56{\pm}0{,}15^{efgh}$	0,05 ^{bc}	$0,21\pm0,03^{def}$	0,13 ^b		
Dictyota menstrualis		1,36±0,16 ^c	$0,11\pm0,01^{b}$	3,26±0,34 ^{cd}		$0,25\pm0,03^{cdef}$			0,15 ^b
Himantothallus grandifolius		0,71 ^{ef}	0,06 ^{def}	$1,47\pm0,10^{klm}$	0,05 ^{bc}	$0,43{\pm}0,04^{b}$			
Lobophora variegata		$0,91{\pm}0,05^{d}$	0,06 ^{def}	$2,02\pm0,09^{\text{ghijkl}}$	0,05°	$0,14\pm0,03^{ef}$	0,10 ^c		
Padina gymnospora		$0,67{\pm}0,04^{ef}$	0,07 ^{cd}	3,23±0,14 ^{cd}	0,05 [°]	$0,23\pm0,04^{def}$			
Sargassum cymosum		$0,61{\pm}0,10^{efg}$	$0,06\pm0,01^{def}$	$2,49\pm0,35^{efgh}$	0,05 ^{bc}	$0,13\pm0,03^{ef}$			
Sargassum stenophyllum		$0,56\pm0,06^{efgh}$	0,06 ^{def}	$2,\!26\!\pm\!0,\!18^{\mathrm{fghij}}$	0,05 ^{bc}	$0,15{\pm}0,03^{ef}$			
Spatoglossum schroederi		2,70±0,12 ^a	0,13±0,01 ^a	5,73±0,34 ^a	0,06 ^b	0,33±0,03 ^{bcde}	0,22±0,01 ^a	0,10 ^b	0,17 ^b

Observação: Os cromatogramas do perfil de ácidos graxos metilados de cada espécie estão no apêndice I.

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, para a maioria das espécies estudadas, o ácido graxo octadecenóico (C18:1 Δ 9) foi o ácido majoritário, seguido do ácido hexadecenóico (C16:1 Δ 9). Entretanto, para as espécies *Solieria filiformis* e *Dictyota menstrualis*, o ácido C16:1 Δ 9 foi o ácido graxo monoinsaturado mais abundante, e para a espécie *Ulva lactuca* foi o ácido ocatadecenóico (C18:1 Δ 11) (figura 32, tabela 9). Os ácidos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não ocorreram em todos os organismos estudados, embora tenham tido uma boa representatividade, sendo que o mesmo não ocorreu com os ácidos C20:1 Δ 11, C22:1 Δ 13 e C14:1 Δ 15 (tabela 9).

As espécies que apresentaram maior concentração do ácido C18:1 Δ 9 foram *Spatoglossum schroederi* e *Dictyota menstrualis*, sendo que esta última também apresentou o maior conteúdo de C16:1 Δ 9. As clorófitas foram as algas que apresentaram os maiores valores do ácido C18:1 Δ 11 (tabela 9).



Figura 32. Conteúdo dos ácidos graxos monoinsaturados hexadecenóico (C16:1 Δ 9) e octadecenóico (C18:1 Δ 9 e C18:1 Δ 11) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Tabela 9. Conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados (mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Espécies	C16:1 Δ7	C16:1 Δ 9	С18:1Δ9*	C18:1 Δ 9+	С18:1Δ11	C20:1 Δ11	C22:1Δ13	C24:1Δ15
Acantophora spicifera	$0,04{\pm}0,02^{\mathrm{fgh}}$	$0,10\pm0,01^{e}$	$0,61{\pm}0,10^{\text{fghi}}$		$0,17\pm0,01^{def}$			
Aglaothamnion uruguayense	$0,07\pm0,01^{defg}$	$0,20\pm0,02^{e}$	$0,41{\pm}0,04^{\text{fghij}}$		0,36±0,03 [°]			
Asparagopsis taxiformis	$0,13\pm0,02^{\circ}$	$0,28\pm0,03^{e}$	$0,56\pm0,06^{\mathrm{fghij}}$		0,29±0,03 ^{cd}			
Bryocladia thyrsigera		$0,24\pm0,03^{e}$	$0,32{\pm}0,04^{hij}$		0,03 ^{ef}			
Bryothamnion seaforthii	0,01 ^h	$0,14\pm0,01^{e}$	$0,18{\pm}0,01^{j}$		$0,08\pm0,01^{ef}$			
Cryptonemia crenulata	0,02 ^h	$0,13\pm0,01^{e}$	$0,28{\pm}0,02^{\rm hij}$		$0,10\pm0,01^{ef}$			
Dichotomaria marginata	$0,04{\pm}0,01^{\mathrm{fgh}}$	$0,10\pm0,01^{e}$	$0,37{\pm}0,07^{\rm hij}$		$0,10\pm0,01^{ef}$			$0,10{\pm}0,01^{b}$
Gigartina skottsbergii		0,06 ^e	0,22 ^{ij}		$0,23\pm0,01^{cde}$			
Gracilaria birdiae		0,06 ^e	$0,27{\pm}0,03^{ij}$		$0,13\pm0,02^{def}$			
Gracilaria cervicornis		0,06 ^e	$0,19{\pm}0,02^{j}$		0,02 ^{ef}			
Gracilaria mammillaris	0,01 ^h	0,06 ^e	$0,37{\pm}0,04^{\rm hij}$		$0,06\pm0,02^{\rm ef}$			
Hypnea musciformis	$0,02{\pm}0,01^{\rm h}$	$0,08\pm0,01^{e}$	$0,21{\pm}0,02^{ij}$		$0,05\pm0,01^{ef}$			
Laurencia dendroidea	$0,03{\pm}0,02^{\text{gh}}$	$0,16\pm0,03^{e}$	$0,50{\pm}0,08^{\rm ghij}$		$0,06\pm0,02^{\rm ef}$			
Palisada flagellifera	0,01 ^h	$0,09{\pm}0,01^{e}$	$0,34{\pm}0,03^{hij}$		$0,08\pm0,01^{ef}$	$0,08^{b}$		
Palmaria decipiens		$0,31\pm0,08^{e}$	$0,41{\pm}0,07^{\text{ghij}}$		$0,10\pm0,02^{\rm ef}$	$0,11\pm0,02^{ab}$		$0,20\pm0,04^{a}$
Plocamium cartilagineum		0,19 ^e	$0,16{\pm}0,01^{j}$		0,08 ^{ef}			
Solieria filiformis	0,03 ^{gh}	$0,85{\pm}0,08^{\circ}$	$0,15^{j}$		0,07 ^{ef}			
Caulerpa racemosa	0,11 ^{cd}	$0,29{\pm}0,08^{\rm e}$	$0,41{\pm}0,07^{\text{ghij}}$		$0,94{\pm}0,37^{a}$			
Cladophoropsis membranácea	$0,05\pm0,01^{efgh}$	0,11 ^e	$0,\!48{\pm}0,\!03^{\text{ghij}}$		$0,81{\pm}0,05^{ab}$			
Rhizoclonium africanum	$0,10\pm0,01^{cde}$	$0,22\pm0,01^{e}$	$0,78\pm0,04^{efg}$		$0,91{\pm}0,07^{ab}$	$0,13\pm0,01^{a}$		0,12 ^b
Ulva lactuca		$0,67\pm0,37^{d}$	0,15 ^j		$0,76{\pm}0,06^{\rm b}$			
Ascoseira mirabilis		$0,07{\pm}0,01^{e}$	$1,70\pm0,54^{\circ}$					
Desmarestia anceps		$0,14\pm0,02^{e}$	$1,02\pm0,04^{de}$		$0,01^{f}$			
Dictyopteris deliculata	$0,14\pm0,01^{c}$	$0,16\pm0,01^{e}$	$1,59{\pm}0,09^{\circ}$		$0,12\pm0,03^{def}$			
Dictyota menstrualis	$0,19{\pm}0,03^{b}$	$2,17\pm0,23^{a}$	$1,96{\pm}0,20^{b}$	0,11	$0,25\pm0,03^{cde}$			
Himantothallus grandifolius	$0,06^{efgh}$	$0,24{\pm}0,03^{e}$	$0,89{\pm}0,04^{\text{def}}$					
Lobophora variegata		0,08 ^e	$1,04{\pm}0,07^{de}$					

Tabela 9 – Continuação

Espécies	C16:1∆7	C16:1 A 9	C18:1Δ9*	C18:1 Δ9 +	C18:1Δ11	C20:1 Δ11	C22:1Δ13	C24:1Δ15
Padina gymnospora	$0,11\pm0,02^{cd}$	$0,55{\pm}0,08^{d}$	$1,19\pm0,22^{d}$		$0,07{\pm}0,01^{\rm ef}$			
Sargassum cymosum	$0,20{\pm}0,05^{\rm b}$	$0,25\pm0,07^{e}$	$0,76\pm0,13^{efg}$		0,05 ^{ef}	$0,10{\pm}0,01^{b}$	$0,07{\pm}0,01$	
Sargassum stenophyllum	$0,08{\pm}0,02^{\text{def}}$	$0,26\pm0,02^{e}$	$0,\!68{\pm}0,\!06^{\mathrm{fgh}}$		$0,06\pm0,01^{ef}$	$0,13\pm0,01^{a}$		
Spatoglossum schroederi	$0,36\pm0,02^{a}$	$1,34{\pm}0,11^{b}$	$3,93{\pm}0,28^{a}$		$0,08{\pm}0,01^{\rm ef}$			

Observação: Os cromatogramas do perfil de ácidos graxos metilados de cada espécie estão no apêndice I.

Houve grande variação na qualidade e quantidade dos ácidos graxos poliinsaturados entre as diferentes espécies estudadas. O único ácido graxo poliinsaturado presente em todas as espécies foi o ácido octadecadienóico (C18:2 Δ 9,12), sendo que a sua concentração foi maior em *Rhizoclonium africanum*. A maioria das espécies apresentou como ácido graxo poliinsaturado majoritário ou o ácido eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5,8,11,14) ou o ácido eicosapentaenóico (C20:5 Δ 5,8,11,14,17). Os ácidos C18:2 Δ 9,12 e C18:3 Δ 9,12,15 foram majoritários para as espécies *Rhizoclonium africanum* e *Caulerpa racemosa*, respectivamente. A concentração do ácido C20:4 Δ 5,8,11,14 foi maior em *Spatoglossum schroederi* enquanto a do ácido C20:5 Δ 5,8,11,14, 17 foi maior nas espécies *Laurencia dendroidea, Palmaria decipiens, Solieria filiformis* e *Desmarestia anceps* (figura 33 A, tabelas 10 e 11).

Os ácidos C16:2 Δ 7,10, C20:2 Δ 8,11, C22:5 Δ 7,10,13,16,19 e C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19 foram encontrados apenas nas espécies *Caulerpa racemosa*, *Dictyota menstrualis*, *Himantothallus grandifolius* e *Bryocladia thyrsigera*, respectivamente. Os ácidos C16:2 Δ 9,12, C18:2 Δ 6,9, C20:2 Δ 11,14, C20:3 Δ 5,8,11, C20:3 Δ 8,11,14 e C22:4 Δ 7,10,13,16 também foram pouco representativos (tabelas 10 e 11).

Spatoglossum schroederi, Desmarestia anceps e Palmaria decipiens foram as espécies que apresentaram maior concentração de ω -3, enquanto as espécies Spatoglossum schroederi, Rhizoclonium africanum, Desmarestia anceps, Dictyota menstrualis, Himantothallus grandifolius e Padina gymnospora apresentaram maior concentração de ω -6. A maior razão de ω -6/ ω -3 ocorreu em Dictyopteris deliculata, Lobophora variegata e Sargassum cymosum, sendo que os menores valores ocorreram em Aglaothamnion sp., Dichotomaria marginata, Palmaria decipiens, Plocamium cartilagineum e Ulva lactuca (figura 33 B, tabela 11).



Espécies

Figura 33. Conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados octadecadienóico (C18:2 Δ 9,12), octadecatrienóico (C18:3 Δ 9,12,15), eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5,8,11,14) e eicosapentaenóico (C20:5 Δ 5,8,11,14, 17) (A) e ω -3 e ω -6 (B) de representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas coletados em Ubatuba-SP, Rio do Fogo - RN e Antártica. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Tabela 10. Conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados (de C16:2 Δ 7,10 até C20:3 Δ 5,8,11) (mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

	C16:2	C16:2	C18:2	C18:2	C18:3	C18:3	C20:2	C20:2	C20:3
Especies	Δ7,10	Δ9,12	Δ6,9	Δ 9,12	Δ6,9,12	Δ9,12,15	Δ8,11	Δ11,14	Δ5,8,11
Acantophora spicifera				$0,11\pm0,02^{h}$		$0,09\pm0,01^{d}$			
Aglaothamnion uruguayense				$0,\!08{\pm}0,\!01^{ m h}$		0,07 ^d			
Asparagopsis taxiformis		$0,05{\pm}0,01^{a}$		$0,\!08{\pm}0,\!01^{ m h}$	0,06 ^e				
Bryocladia thyrsigera				$0,10\pm0,01^{h}$		$0,10\pm0,01^{d}$			
Bryothamnion seaforthii				$0,17{\pm}0,01^{\text{fgh}}$	0,07 ^e				
Cryptonemia crenulata				$0,07^{h}$					
Dichotomaria marginata				$0,07{\pm}0,01^{ m h}$					
Gigartina skottsbergii				$0,09{\pm}0,03^{\rm h}$	$0,08^{e}$			$0,08^{b}$	
Gracilaria birdiae				$0,07^{h}$					
Gracilaria cervicornis				$0,06^{h}$					
Gracilaria mammillaris				$0,07^{h}$					
Hypnea musciformis				$0,07^{h}$					
Laurencia dendroidea				$0,12\pm0,02^{\text{gh}}$					
Palisada flagellifera				$0,09{\pm}0,01^{ m h}$					
Palmaria decipiens				$0,11\pm0,02^{h}$		0,06 ^d			
Plocamium cartilagineum				0,10 ^h		0,08 ^d			
Solieria filiformis		$0,02^{b}$		$0,08^{\rm h}$	$0,07^{e}$				
Caulerpa racemosa	0,22±0,01			$0,81\pm0,15^{\circ}$		$1,21\pm0,36^{a}$			
Cladophoropsis membranácea				$0,47\pm0,03^{d}$	$0,16\pm0,01^{d}$				
Rhizoclonium africanum				$1,35\pm0,07^{a}$				$0,08^{b}$	
Ulva lactuca				$0,22\pm0,03^{efgh}$		$0,35\pm0,05^{bcd}$			
Ascoseira mirabilis				0,25±0,09 ^{efg}	$0,06^{e}$	$0,20\pm0,09^{d}$			
Desmarestia anceps				0,44 ^d	$0,09\pm0,02^{e}$	$0,58{\pm}0,08^{\rm b}$			

Tabela 10 – Continuação

Espécies	C16:2	C16:2	C18:2	C18:2	C18:3	C18:3	C20:2	C20:2	C20:3
Especies	Δ7,10	Δ9,12	Δ6,9	Δ 9,12	Δ6,9,12	Δ9,12,15	Δ8,11	Δ11,14	Δ5,8,11
Dictyopteris deliculata				$0,19\pm0,01^{efgh}$		0,10 ^d			
Dictyota menstrualis				$0,30\pm0,03^{ef}$	$0,33{\pm}0,03^{b}$	$0,38\pm0,04^{bc}$	0,15±0,03		$1,00\pm0,12^{a}$
Himantothallus grandifolius				$0,31\pm0,04^{e}$					
Lobophora variegata			0,03 ^b	$0,15{\pm}0,02^{\rm gh}$	$0,11\pm0,02^{e}$				
Padina gymnospora		0,02 ^b		$0,79\pm0,12^{c}$	$0,28\pm0,04^{c}$	$0,58{\pm}0,08^{b}$			
Sargassum cymosum				$0,19{\pm}0,06^{efgh}$		$0,15\pm0,04^{d}$			
Sargassum stenophyllum				$0,20\pm0,02^{efgh}$		$0,16\pm0,02^{cd}$			
Spatoglossum schroederi			$0,13\pm0,01^{a}$	$1,23\pm0,10^{b}$	$0,45\pm0,04^{a}$	$1,19\pm0,12^{a}$		$0,11\pm0,01^{a}$	$0,06\pm0,01^{b}$

Observação: Os cromatogramas do perfil de ácidos graxos metilados de cada espécie estão no apêndice I.

Tabela 11. Conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados (de C10:3 $\Delta 8,11,14$ até a razão ω -6/ ω -3) (mg / g massa seca) de representantes de rodófitas, clorófitas e heterocontófitas coletados no litoral brasileiro e antártico. Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Especies			C20.5	C22:4	C22:5	C22:0		. (@-6/ @- 3
$\Delta 8,$	11,14	Δ5,8,11,14	Δ5,8,11,14,17	Δ7,10,13,16	Δ7,10,13,16,19	Δ4,7,10,13,16,19	0-3	@-6	@-6/ @-3
A. spicifera 0,07	±0,01 ^c	0,53±0,09 ^{efg}	$0,99 \pm 0,16^{bc}$				$1,05\pm0,20^{cdef}$	0,71±0,12 ^{cd}	0,68±0,02 ^{efgh}
A. uruguayense		$0,14{\pm}0,01^{hi}$	0,33±0,03 ^{efg}				$0,40\pm0,03^{hij}$	$0,22\pm0,02^{cd}$	$0,54{\pm}0,02^{ghi}$
A. taxiformis 0,	,07 ^c	$0,16\pm0,02^{hi}$	0,39±0,05 ^{efg}				$0,39{\pm}0,05^{\rm hij}$	0,33±0,08 ^{cd}	$0,83\pm0,12^{\text{efh}}$
B. thyrsigera		$0,54{\pm}0,07^{efg}$	0,13±0,01 ^g			$0,09{\pm}0,01$	$0,32{\pm}0,02^{ij}$	$0,64{\pm}0,08^{cd}$	1,97±0,18 °
B. seaforthii	(0,30±0,01 ^{efghi}	$0,47\pm0,02^{efg}$				$0,54{\pm}0,03^{\text{fghij}}$	0,47±0,03 ^{cd}	0,87 ^{efgh}
C. crenulata		$0,22\pm0,02^{\text{fghi}}$						$0,28\pm0,02^{cd}$	
D. marginata			$0,16\pm0,03^{g}$				$0,16\pm0,03^{j}$	$0,07\pm0,01^{\text{ d}}$	$0,41{\pm}0,04^{\rm hi}$
G. skottsbergii		$0,57{\pm}0,25^{def}$	$0,90\pm0,38^{bcd}$				$0,90\pm0,31^{cdefgh}$	$0,81\pm0,22^{cd}$	$0,94{\pm}0,08^{efg}$
G. birdiae 0,	,07 ^c	$0,57{\pm}0,06^{def}$						$0,71\pm0,06^{cd}$	
G. cervicornis		$0,15\pm0,02^{hi}$						0,19±0,05 ^{cd}	
G. mammillaris 0,07	$\pm 0,01^{c}$	$0,57{\pm}0,07^{def}$						$0,71\pm0,08^{cd}$	
H. musciformis		0,08 ⁱ	$0,20{\pm}0,02^{fg}$				$0,20\pm0,02^{ij}$	$0,14\pm0,01^{cd}$	$0,70\pm0,05^{efgh}$
L. dendroidea		$0,60{\pm}0,11^{de}$	1,22±0,25 ^{ab}				$1,22\pm0,25^{cd}$	0,72±0,13 ^{cd}	$0,59{\pm}0,02^{\text{fgh}}$
P. flagellifera		$0,61{\pm}0,07^{de}$	$0,63{\pm}0,06^{de}$				$0,83\pm0,03^{efghij}$	$0,70\pm0,08^{cd}$	0,94±0,02 ^e
P. decipiens		$0,07{\pm}0,01^{i}$	1,39±0,20 ^a				$1,46\pm0,17^{bc}$	$0,18\pm0,02^{cd}$	$0,12^{i}$
P. cartilagineum -		$0,50{\pm}0,07^{efg}$	$1,03\pm0,12^{bc}$				$1,11\pm0,10^{cde}$	$0,60\pm0,06^{cd}$	$0,53^{\text{ghi}}$
S. filiformis 0,07	±0,01 ^c	$0,48\pm0,07^{efgh}$	1,09±0,17 ^{ab}				$1,09\pm0,17^{cdef}$	$0,70\pm0,08^{cd}$	0,64±0,03 ^{efgh}
C. racemosa		$0,16{\pm}0,03^{hi}$	$0,34{\pm}0,07^{efg}$				1,30±0,51 ^{cd}	1,06±0,28 °	0,86±0,12 ^{efgh}
C. membranácea -	($0,37{\pm}0,02^{\text{efghi}}$						$0,99 \pm 0,05^{cd}$	
R. africanum		0,21±0,01 ^{ghi}		$0,09{\pm}0,01^{b}$				1,73±0,09 ^b	
U. lactuca			$0,08\pm0,01^{g}$				$0,43{\pm}0,05^{\text{ghij}}$	0,22±0,03 ^{cd}	0,51 ^{ghi}
A. mirabilis		$0,54{\pm}0,20^{efg}$	$0,40\pm0,14^{efg}$				$0,60\pm0,19^{\text{eghijf}}$	0,86±0,23 ^{cd}	$1,46\pm0,07^{d}$
D. anceps		1,22±0,17 ^b	1,18±0,27 ^{ab}				$1,76\pm0,32^{b}$	1,89±0,38 ^b	1,07±0,04 ef
D. deliculata 0,	,11 ^b ($0,37{\pm}0,02^{\text{efghi}}$	0,14 ^g				$0,23\pm0,01^{ij}$	0,67±0,03 ^{cd}	2,91±0,06 ^a
D. menstrualis		1,06±0,10 ^{bc}	$0,57{\pm}0,06^{\rm ef}$	$0,25\pm0,04^{a}$			$0,\!95{\pm}0,\!08^{cdefg}$	1,93±0,17 ^b	2,04±0,01 °
Tabela 11 – Continuação

Espécies	C20:3 Δ8,11,14	C20:4 Δ5,8,11,14	C20:5 Δ5,8 C22:4 Δ7,	8,11,14,17 10,13,16	C22:5 Δ7,10,13,16,19	C22:6 Δ4,7,10,13,16,19	ω-3	ω-6	ω-6/ ω-3
H. grandifolius		1,16±0,20 ^b	0,70±0,10 ^{cde}	0,23±0,05 ^a	0,31±0,08		1,01±0,14 ^{cdef}	1,71±0,24 ^b	1,70±0,01 ^{cd}
L. variegata		0,28±0,03 ^{efghi}	$0,21\pm0,04^{fg}$				$0,21\pm0,04^{ij}$	0,54±0,07 ^{cd}	2,57±0,13 ^{ab}
P. gymnospora		$0,86\pm0,15^{cd}$	$0,19{\pm}0,02^{\rm fg}$				$0,77{\pm}0,10^{\text{defghi}}$	1,93±0,30 ^b	$2,51\pm0,10^{b}$
S. cymosum	$0,07^{c}$	$0,47{\pm}0,08^{efgh}$	$0,14{\pm}0,02^{g}$				$0,28{\pm}0,07^{ij}$	0,71±0,13 ^{cd}	2,62±0,34 ^{ab}
S. stenophyllum	$0,07\pm0,01^{\circ}$	$0,43{\pm}0,04^{efgh}$	$0,17{\pm}0,02^{\rm fg}$				$0,33{\pm}0,03^{ij}$	0,68±0,05 ^{cd}	2,05±0,07 °
S. schroederi	$0,50{\pm}0,04^{a}$	3,03±0,29 ^a	$0,98{\pm}0,10^{bc}$				2,17±0,22 ^a	3,53±1,22 ^a	1,66±0,59 ^{cd}

Observação: Os cromatogramas do perfil de ácidos graxos metilados de cada espécie estão no apêndice I.

4.2 Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörning & Weber-Peukert cultivada em laboratório

Com os resultados obtidos no item 4.1, foi possível selecionar a espécie com as melhores características para a produção de biodiesel. A espécie escolhida foi *D. menstrualis*, pois ela apresentou alto desempenho fotossintetizante e elevado conteúdo de lipídeos, ácidos graxos totais e monoinsaturados.

Após a escolha da espécie, foi feito o estabelecimento do seu cultivo em laboratório, avaliando-se a TC e a taxa de fotossíntese. Além disso, foi também avaliada a presença e ausência de VSES/2 na água do mar.

A espécie apresentou alta TC e alta taxa de fotossíntese quando cultivada em laboratório. A presença de VSES/2 na água do mar teve efeitos positivos tanto sobre a TC como sobre a ETRmax e Ik. Não houve diferença significativa na eficiência fotossintetizante (figura 34 A e B e tabela 12).



Figura 34. Taxas de crescimento (A) e curvas de fotossíntese-irradiância baseadas na fluorescência da clorofila *a* (B) de *Dictyota menstrualis* cultivada em laboratório em água do mar com e sem a adição da solução de enriquecimento de von Stosch, a 50% (VSES/2). Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tabela 12. Taxa de crescimento (% d⁻¹) e parâmetros fotossintetizantes (fotossíntese máxima – ETRmax, eficiência fotossintetizante – alfa e parâmetro de saturação – Ik) de *Dictyota menstrualis* cultivada em laboratório em água do mar com e sem a adição da solução de enriquecimento de von Stosch, a 50% (VSES/2). Os valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tratamento	TC	ETRmax	Alfa	Ik
VSES/2	$11,1\pm 0,6$	$17,6 \pm 1,2^{a}$	$0,5 \pm 0,0$	$35,7 \pm 2,4^{a}$
Sem VSES	$6,9{\pm}0,6$	$10,2\pm0,8^{\rm b}$	$0,5 \pm 0,1$	$21,8\pm0,9^{\mathrm{b}}$

4.3. Efeitos do aumento do CO₂ em condições de saturação e limitação de nitrogênio sobre o metabolismo e a composição bioquímica de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores e sobre a captação do CO₂ por *D. menstrualis* cultivada em laboratório

Foram realizados experimentos para verificar os efeitos do aumento da concentração de CO_2 em condições de saturação e limitação de nitrogênio no desenvolvimento de *D. menstrualis,* avaliando-se a influência desses fatores sobre a TC, fotossíntese, NR (enzima responsável pela assimilação do NO_3^-), AC (enzima responsável pela conversão do HCO_3^- a CO_2), Rubisco (enzima responsável pela assimilação do CO_2) e composição bioquímica de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores.

A TC de *D. menstrualis* variou entre os diferentes tratamentos, sendo maior nos tratamentos com adição de NO_3^- . Entre os tratamentos com adição de NO_3^- , a maior TC ocorreu quando houve aeração, independente da adição de CO_2 (figura 35).



Figura 35. Taxa de crescimento de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de nitrato e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Em relação aos parâmetros fotossintetizantes, houve grande variação nos resultados de ETRmax e Ik entre os diferentes tratamentos testados, sendo que os maiores valores ocorreram quando *D. mestrualis* foi cultivada em água do mar contendo adição de CO_2 e de NO_3^- (figura 36 e tabela 13). Já o RQE foi maior nos espécimes cultivados em todos os tratamentos contendo NO_3^- e o alfa foi maior nos tratamentos com adição de NO_3^- , mas sem adição de CO_2 (tabela 13).



Figura 36. Curvas de fotossíntese-irradiância baseadas na fluorescência da clorofila *a* de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de nitrato e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Tabela 13. Parâmetros fotossintetizantes (rendimento quântico efetivo – RQE, fotossíntese máxima – ETRmax, eficiência fotossintetizante – alfa e parâmetro de saturação – Ik) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tratamentos	RQE	ETRmax	Alfa	Ik
+N	$0,759 \pm 0,0^{a}$	$33,1 \pm 1,8^{b}$	$0,5 \pm 0,0^{a}$	$70,8 \pm 0,9^{b}$
-N	$0{,}621\pm0{,}0^{\mathrm{b}}$	$28,0 \pm 3,3^{\circ}$	$0,4\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$74,8\pm6,4^{\rm \ b}$
Ar+N	$0,\!781 \pm 0,\!0^{a}$	$20,8\pm0,7^{d}$	$0,5\pm0,0^{\mathrm{a}}$	$43,3 \pm 1,5^{c}$
Ar-N	$0,603 \pm 0,0^{c}$	$11,1 \pm 1,6^{e}$	$0,4\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$31,7 \pm 5,1^{c}$
CO_2+N	$0,747 \pm 0,0^{a}$	$58,9\pm3,1^a$	$0,4\pm0,0^{\mathrm{b}}$	$160,8 \pm 21,7^{\rm a}$
CO ₂ -N	$0,\!668\pm 0,\!0^{\mathrm{b}}$	$18,4 \pm 3,3^{d}$	$0,3\pm0,0^{b}$	$55,9\pm9,2^{bc}$

As curvas de indução luz/escuro (Kautsky) e recuperação para o RQP revelaram características semelhantes entre os organismos cultivados nos diferentes tratamentos, sendo que os maiores valores de RQP ocorreram nas algas cultivadas com adição de NO_3^- (figura 37). Os valores iniciais e finais do RQP evidenciam uma alta capacidade de recuperação, exceto para os espécimes cultivados em meio aerado sem adição de CO_2 e NO_3^- , que apresentaram uma recuperação de aproximadamente 71% (figura 37 e tabela 14).



Figura 37. Curvas de indução escuro/luz e período de recuperação do rendimento quântico das algas aclimatadas ao escuro de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de nitrato e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Momento em que a luz actínica foi ligada – 696 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹.

Momento em que a luz actínica foi desligada.

Tabela 14. Rendimento quântico potencial (RQP) inicial e final e % de recuperação do RQP obtidos com a curva de indução escuro/luz e recuperação de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tratamentos	RQP inicial	RQP final	% de
		_	recuperação
+N	$0,727 \pm 0,0^{a}$	$0,664 \pm 0,0^{b}$	$91,3 \pm 1,2^{a}$
-N	$0,\!477 \pm 0,\!0^{\rm c}$	$0,\!412\pm0,\!0^{\rm d}$	$83,5\pm1,5^{\rm a}$
Ar+N	$0,768 \pm 0,0^{a}$	$0{,}724\pm0{,}0^{a}$	$94,\!4\pm3,\!2^{a}$
Ar-N	$0{,}596\pm0{,}0^{b}$	$0{,}420\pm0{,}0^{d}$	$71,1\pm8,5^{\mathrm{b}}$
CO ₂ +N	$0,734 \pm 0,0^{a}$	$0{,}674\pm0{,}0^{\mathrm{b}}$	$91{,}9\pm3{,}0^{\mathrm{a}}$
CO ₂ -N	$0{,}623\pm0{,}0^{\text{b}}$	$0{,}582\pm0{,}0^{c}$	$93{,}4\pm2{,}8^{a}$

D. menstrualis cultivada no tratamento com adição de CO_2 e NO_3^- teve a maior ETR, sendo que esta teve um aumento gradativo e, a partir de aproximadamente 1 minuto de iluminação, seus valores se tornaram constantes. Este aumento gradativo nos valores de ETR também foi observado para a alga cultivada sem aeração e com NO_3^- . O mesmo não foi observado para os demais tratamentos, uma vez que não houve diferença significativa nos valores de ETR de *D. menstrualis* entre os primeiros e últimos períodos de iluminação (figura 38).



Figura 38. Taxa de transporte de elétrons (ETR) apresentada por *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar durante as curvas de indução escuro/luz e período de recuperação do rendimento quântico das algas previamente aclimatadas ao escuro. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Momento em que a luz actínica foi ligada – 696 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Momento em que a luz actínica foi desligada. Em todos os tratamentos testados, houve um aumento no NPQ com o aumento do tempo de exposição à luz. Os espécimes cultivados em meio aerado, sem adição de CO_2 e NO_3^- , apresentaram os maiores valores de NPQ. Com o término do período de exposição à luz, houve uma tendência ao decréscimo dos valores de NPQ, exceto para os organismos cultivados nos tratamentos sem adição de CO_2 e NO_3^- (figura 39).



Figura 39. Dissipação não-fotoquímica (NPQ) apresentada por *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar durante as curvas de indução escuro/luz e período de recuperação do rendimento quântico das algas previamente aclimatadas ao escuro. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Momento em que a luz actínica foi ligada – 696 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹. Momento em que a luz actínica foi desligada. Em relação as atividades enzimáticas, tanto para a NR quanto para a Rubisco, os maiores valores de atividade ocorreram no tratamento com adição de NO_3^- e CO_2 . Não foi possível detectar a atividade enzimática da NR e Rubisco das amostras de *D. menstrualis* cultivadas em meio sem adição de NO_3^- pelos métodos utilizados (figura 40 A e B).

A atividade da AC foi mensurada apenas para as amostras dos tratamentos +N, -N, Ar+N e CO₂+N. Como os tratamentos Ar-N e CO₂-N correspondem aos meios sem adição NO₃⁻, havia menos biomassa congelada do que os outros tratamentos para as análises bioquímicas e, dessa forma, não houve biomassa disponível para esse ensaio. Houve pouca variação na atividade da AC entre os tratamentos estudados, sendo que a atividade enzimática foi maior nos espécimes cultivados em meio com adição de NO₃⁻ (figura 40 C).



Figura 40. Atividade das enzimas NR (**A**), Rubisco (**B**) e AC (**C**) de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Houve variação no conteúdo de clorofila *a* entre os diferentes tratamentos testados, sendo que a concentração foi maior nos meios contendo NO_3^- e no meio contendo adição de CO_2 sem NO_3^- (figura 41 A). O conteúdo de lipídeos totais foi maior nos tratamentos contendo adição de CO_2 , com e sem adição de NO_3^- , e no tratamento sem aeração, mais NO_3^- (figura 41 B). Já o conteúdo de carboidratos solúveis totais foi maior no tratamento com adição de CO_2 e nitrato, enquanto o conteúdo de proteínas solúveis totais foi maior em todos os tratamentos com adição de NO_3^- (figura 41 C e D).



Figura 41. Conteúdo de clorofila *a* (**A**), lipídeos totais (**B**), carboidratos solúveis totais (**C**) e proteínas solúveis totais (**D**) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

De modo geral, quando *D. menstrualis* foi cultivada com adição de NO_3^- e CO_2 , obteve-se os maiores valores de lipídeos, proteínas e carboidratos. Entretanto, quando foi cultivada no tratamento com adição CO_2 , mas sem NO_3^- , os valores de lipídeos continuaram altos, mas o conteúdo de proteínas e carboidratos foi menor (figura 42).



Figura 42. Diagrama de dispersão com valores de lipídeos totais e carboidratos solúveis totais (A), lipídeos totais e proteínas solúveis totais (B) e proteínas solúveis totais e carboidratos solúveis totais (C) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de nitrato e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média (n=3). Tratamentos: 1. +N; 2. -N; 3. Ar+N; 4. Ar-N; 5. CO₂+N; 6. CO₂-N.

O conteúdo de manitol também foi quantificado, apenas nos tratamentos com NO_3^- e com aeração (com e sem CO_2), pois já não havia muita biomassa disponível e havia o interesse em saber se o aumento do CO_2 influenciaria na concentração desse composto, uma vez que influenciou no conteúdo de carboidratos solúveis totais. Houve diferença significativa na concentração de manitol no tratamento com (30,0 ± 1,8 mg/ g massa seca) e sem adição de CO_2 (18,4 ± 3,0 mg/ g massa seca).

O conteúdo de N total do tecido algáceo variou entre os diferentes tratamentos, sendo maior no meio sem aeração com adição de NO_3^- e menor nos meios sem NO_3^- e com aeração (figura 43 A). O conteúdo de C total também variou, embora essa variação tenha sido menor. Os maiores valores de C no tecido algáceo ocorreram quando os espécimes foram cultivados em meio sem NO_3^- , com ou sem adição de CO_2 (figura 43 B). Houve grande variação na relação entre C e N, também sendo maior nos tratamentos sem adição de NO_3^- , com ou sem adição de CO_2 (figura 43 C).



Figura 43. Conteúdo de N (**A**) e C (**B**) e razão C:N (**C**) no talo de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

O conteúdo de ácidos graxos totais variou entre os diferentes tratamentos testados, sendo maior em todos os tratamentos contendo NO_3^- (cerca de 40%). A presença de NO_3^- também

estimulou a síntese de ácidos graxos poliinsaturados em aproximadamente duas vezes. Por outro lado, não houve diferença significativa na concentração de ácidos graxos saturados entre os diferentes tratamentos. Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, a menor concentração ocorreu quando *D. menstrualis* foi cultivada sem aeração e sem NO₃⁻, sendo que não houve diferença significativa entre os demais tratamentos (figura 44 e tabela 15).



Figura 44. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de *D*. *menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

Tabela 15. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, espécies com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tratamantas	Ácidos graxos	Ácidos graxos	Ácidos graxos	Ácidos graxos poliinsaturados	
Tratamentos	totais	saturados	monoinsaturados		
+N	17,43±1,17 ^a	6,07±0,53	$3,22\pm0,25^{a}$	$8,14{\pm}0,40^{a}$	
-N	11,09±0,93 ^b	5,09±0,34	$2,29\pm0,20^{b}$	3,71±0,39 ^b	
Ar+N	$18,86{\pm}1,60^{a}$	6,56±0,55	$3,52\pm0,35^{a}$	$8,78{\pm}0,70^{a}$	
Ar-N	12,95±0,89 ^b	5,92±0,30	$2,95{\pm}0,19^{ab}$	$4,08\pm0,40^{b}$	
CO ₂ +N	$16,18\pm1,44^{a}$	6,00±0,62	$2,75\pm0,23^{ab}$	7,43±0,65 ^a	
CO ₂ -N	13,70±1,03 ^b	5,84±0,44	$2,89{\pm}0,25^{ab}$	4,97±0,51 ^b	

Observação: Os cromatogramas do perfil de ácidos graxos metilados de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar estão no apêndice II.



Figura 45. Diagrama de dispersão com valores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (A), poliinsaturados e saturados (B) e poliinsaturados e monoinsaturados (C) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média (n=3). Tratamentos: 1. +N; 2. -N; 3. Ar+N; 4. Ar-N; 5. CO₂+N; 6. CO₂-N.

Em relação aos ácidos graxos saturados, o acido hexadecanóico (C16:0) foi o ácido graxo majoritário em todos os tratamentos estudados. Entretanto, houve uma variação em relação ao ácido tetradecanóico (C14:0) e octadecanóico (C18:0). Enquanto o conteúdo de C14:0 foi maior do que o de C18:0 nos tratamentos com adição de NO_3^- e sem adição de CO_2 , ocorreu o contrário nos tratamentos sem NO_3^- e CO_2 . Essa diferença ocorreu devido ao C14:0, pois enquanto o conteúdo desse ácido graxo variou entre os diferentes tratamentos, a concentração do C18:0 e dos demais ácidos graxos saturados manteve-se constante (figura 46 e tabela 16).



Figura 46. Conteúdo dos ácidos graxos saturados tetradecanóico (C14:0), hexadecanóico (C16:0) e octadecanóico (C18:0) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, enquanto a concentração do ácido C16:1 Δ 9 foi maior nos tratamentos com adição de NO₃⁻ e sem CO₂, a concentração do C18:1 Δ 9 foi maior nos tratamentos com aeração, sem CO₂, com e sem adição de NO₃⁻ e no tratamento com adição de CO₂ e sem NO₃⁻ (figura 47 e tabela 16).



Figura 47. Conteúdo dos ácidos graxos monoinsaturados hexadecenóico (C16:1 Δ 9) e octadecenóico (C18:1 Δ 9) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

O ácido graxo poliinsaturado majoritário foi o octadecatetraenóico (C18:4 Δ 6, 9,12,15), seguido do ácido eicosatetraenóico (C20:4 Δ 8, 11, 14 17). O único ácido graxo poliinsaturado cuja concentração não variou entre os tratamentos testados foi o C20:5 Δ 5, 8, 11, 14 17. Houve grande variação no conteúdo dos demais ácidos graxos poliinsaturados, sendo que, de modo geral, a concentração foi maior nos tratamentos contendo adição de NO₃⁻ (figura 48 A e tabela 16).

O conteúdo de ω -3 foi maior do que o de ω -6 em todos os tratamentos testados. Houve uma variação na concentração desses ácidos graxos, que foi maior nos tratamentos com NO₃⁻ (figura 48 B e tabela 16).



Figura 48. Conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados octadecatetraenóico (C18:4 Δ 6, 9, 12, 15), eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5, 8, 11, 14) e eicosapentaenoico (C20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17) (A) e conteúdo total de ω -3 e ω -6 (B) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO₃⁻ e CO₂ à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3).

Tabela 16. Conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (mg / g massa seca) de *Dictyota menstrualis* cultivada em biorreatores com e sem adição de NO_3^- e CO_2 à água do mar. Valores correspondem a média ± o desvio padrão (n=3). Para cada ácido graxo, tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

		+N	-N	Ar+N	Ar-N	CO ₂ +N	CO ₂ -N
Saturados	C14	1,37±0,09 ^b	$0,76\pm0,08^{c}$	$1,62\pm0,18^{a}$	$0,98\pm0,08^{\rm bc}$	$1,25\pm0,15^{b}$	$0,97\pm0,09^{bc}$
	C15	$0,15\pm0,02$	$0,17{\pm}0,00$	$0,18\pm0,01$	$0,19\pm0,01$	$0,15\pm0,01$	$0,20\pm0,05$
	C16	3,50±0,33	3,20±0,21	$3,68\pm0,40$	3,69±0,16	$3,35\pm0,37$	$3,57\pm0,22$
	C18	$1,05\pm0,11$	$0,96\pm0,06$	$1,08\pm0,08$	$1,05\pm0,06$	$1,24\pm0,19$	$1,10\pm0,09$
Monoinsaturados	C16:1 Δ 9	$1,51\pm0,11^{ab}$	$0,83{\pm}0,07^{d}$	$1,69\pm0,14^{a}$	$0,99 \pm 0,08^{\circ}$	$1,37\pm0,13^{b}$	$1,13\pm0,12^{cd}$
	C18:1 Δ 9	$1,05\pm0,11^{c}$	$1,46\pm0,12^{b}$	$1,83\pm0,30^{ab}$	$1,96\pm0,11^{a}$	1,39±0,11 ^b	$1,77\pm0,13^{ab}$
Poliinsaturados	С18:2 Δ9,12	$0,33\pm0,02^{ab}$	$0,22\pm0,01^{c}$	$0,38\pm0,04^{a}$	$0,24\pm0,01^{c}$	$0,30\pm0,01^{b}$	0,23±0,01 ^c
	C18:3 Δ 6,9,12	$0,37{\pm}0,01^{a}$		0,37±0,02 ^a		$0,30{\pm}0,01^{b}$	$0,24\pm0,02^{c}$
	C18:3 Δ 9,12,15	$0,51{\pm}0,02^{a}$	$0,27{\pm}0,01^{b}$	$0,60{\pm}0,05^{a}$	$0,29{\pm}0,03^{\rm b}$	$0,50{\pm}0,04^{a}$	$0,36{\pm}0,07^{b}$
	C18:4 Δ 6, 9,12,15	$3,81\pm0,19^{ab}$	$1,14\pm0,16^{c}$	$4,14\pm0,42^{a}$	$1,13\pm0,18^{c}$	$3,42\pm0,34^{b}$	$1,79\pm0,26^{c}$
	C20:3 Δ 5, 8, 11	$0,80{\pm}0,03^{a}$	$0,46{\pm}0,06^{b}$	$0,70{\pm}0,07^{a}$	$0,43{\pm}0,04^{\rm b}$	$0,56{\pm}0,06^{\rm b}$	$0,\!49{\pm}0,\!07^{\mathrm{b}}$
	C20:4 Δ 5, 8, 11, 14	$1,19\pm0,10^{a}$	$0,71{\pm}0,07^{b}$	$1,25\pm0,09^{a}$	$0,79{\pm}0,05^{ m b}$	$1,12\pm0,11^{a}$	$0,89{\pm}0,11^{b}$
	C20:4 Δ 8, 11, 14, 17	$0,39{\pm}0,01^{ab}$	$0,29{\pm}0,15^{b}$	$0,51{\pm}0,07^{a}$	$0,54{\pm}0,06^{a}$	$0,41\pm0,03^{ab}$	$0,40{\pm}0,07^{ab}$
	C20:5 Δ 5, 8, 11, 14, 17	$0,73{\pm}0,05$	$0,62{\pm}0,04$	$0,83{\pm}0,07$	$0,65\pm0,04$	0,81±0,10	$0,73{\pm}0,06$
	ω-3	$5,44\pm0,34^{a}$	$2,32\pm0,32^{b}$	6.08 ± 0.88^{a}	$2,61\pm0,36^{b}$	$5,15\pm0,61^{a}$	$3,28\pm0,46^{b}$
	ω-6	$1,89{\pm}0,15^{a}$	$0,92{\pm}0,09^{b}$	$2,01\pm0,23^{a}$	$1,03{\pm}0,08^{\rm b}$	$1,72\pm0,16^{a}$	$1,20\pm0,20^{b}$
	Razão ω -6/ ω -3	$0,35\pm0,02$	$0,40\pm0,01$	0,33±0,01	$0,40\pm0,03$	0,33±0,03	$0,37{\pm}0,07$

Para avaliar a captação de CO_2 por *D. menstrualis*, estes espécimes foram cultivados em laboratório com água do mar esterilizada com adição de NO_3^- e CO_2 , e a concentração de CO_2 na água do mar foi avaliada no início e após 1 h, 24 h e 1 semana do início do experimento. Não houve diferença entre a concentração inicial de CO_2 e a concentração após 1 h, tanto dos frascos contendo as algas quanto dos controles sem alga. Após 24 h, houve uma diminuição na concentração de CO_2 no meio contendo as algas, sendo que a concentração de CO_2 no controle sem alga permaneceu igual à concentração inicial. Entretanto, após 1 semana, houve grande diminuição na concentração de CO_2 tanto dos frascos com alga como dos controles sem alga. Dessa forma, serão apresentados os resultados obtidos após 24 h de cultivo.

Não houve diferença significativa na taxa de remoção de CO_2 entre os tratamentos com e sem adição NO_3^- (figura 49). A remoção de CO_2 nos meios com e sem adição de CO_2 foi alta, variando de 71,5% (no tratamento sem adição de CO_2 e com NO_3^-) a 34,8% (tratamentos com adição de CO_2) (figura 49).



Figura 49. Concentrações iniciais e finais de CO_2 presentes na água do mar (mM) e concentração de CO_2 removida e porcentagens de remoção do CO_2 apresentadas por *Dictyota menstrualis* cultivada em água do mar com e sem adição de nitrato e CO_2 . Valores correspondem a média \pm o desvio padrão (n=3).

5. DISCUSSÃO

5.1. Desempenho fotossintetizante e composição bioquímica de macroalgas marinhas brasileiras e antárticas

Ao comparar o desempenho fotossintetizante apresentado pelos representantes de rodófitas, heterocontófitas e clorófitas do litoral brasileiro, observou-se que as rodófitas exibiram os menores valores de ETRmax e Ik. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que as rodófitas possuem a melhor adaptação cromática para fotossintetizar em baixas irradiâncias (Dring, 1981). Resultados semelhantes foram observados por Necchi (2004) que, ao estudar as características fotossintéticas de 33 espécies de macroalgas de ambientes lóticos, chegou a conclusão de que as rodófitas são mais adaptadas a baixas irradiâncias e possuem características de plantas de sombra. Entretanto, o mesmo não foi observado para as algas antárticas, uma vez que os valores de ETRmax e Ik apresentados pelas rodófitas e heterocontófitas foram muito parecidos. Além disso, esses valores foram mais baixos do que os apresentados pelos respectivos grupos brasileiros. Weykam et al. (1996), ao estudarem as características fotossintéticas de 36 espécies de macroalgas antárticas, observaram altos valores de alfa e baixos valores de Ik. Os autores sugerem que esses resultados indicam que esses organismos possuem baixo requerimento para a luz, um requisito importante para sobreviver nesse ambiente caracterizado por longos períodos de luz fraca.

As espécies *Dictyota menstrualis* e *Ulva lactuca* apresentaram os maiores valores de ETRmax e Ik. Esses resultados evidenciam a adaptação de *U. lactuca* às regiões com altas irradiâncias e sugerem que tal espécie possui mecanismos que permitem evitar os danos causados pela luz sobre o aparato fotossintetizante, o que explica a sua ocorrência na zona do supralitoral. Embora *D. menstrualis* seja uma espécie encontrada na zona do mesolitoral e infralitoral (Pereira

& Soares-Gomes, 2002), os resultados provenientes da curva FI mostram que a saturação da taxa de fotossíntese dessa alga é atingida em valores de irradiância maiores do que as outras espécies analisadas no presente estudo (exceto *Ulva*) e que esta espécie não apresentou fotoinibição. Resultados semelhantes foram observados para as espécies *Dictyota bartayresii* J.V.Lamouroux, *D. dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux, *D. divaricata* (J.Agardh) J.Agardh da Ilha Bermuda ocorrentes em profundidades entre 27–49 m, que apresentaram alta capacidade fotossintetizante e a saturação pela luz não foi evidenciada em valores de irradiância maiores de 300 µmol fótons $m^{-2} s^{-1}$ (Peckol & Ramus, 1992).

Ao comparar o conteúdo de Cla entre as diferentes divisões estudadas observou-se que as rodófitas apresentaram o menor conteúdo de cla. Dentre as heterocontófitas provenientes de diferentes locais, as de Rio do Fogo - RN foram as que apresentaram maior conteúdo desse pigmento, devido à elevada concentração encontrada nas espécies Spatoglossum schroederi, Dictyota mentrualis e Padina gymnospora. Weykam & Wiencke (1996) observaram que o aumento da taxa de fotossíntese de Palmaria decipiens resultou da maior concentração do conteúdo de Cla e ficobilinas. Resultado semelhante foi encontrado no nosso trabalho, uma vez que as rodófitas apresentaram menor desempenho fotossintetizante do que os outros grupos e D. menstrualis foi uma das espécies que apresentou os maiores valores de ETRmax e IK. Entretanto, essa relação não foi observada para *Ulva lactuca*, uma vez que ela apresentou os maiores valores de ETRmax e IK, mas apresentou valores baixos de Cla. Esta diferença no conteúdo de Cla entre D. menstrualis e U. lactuca pode estar relacionada ao habitat, uma vez que enquanto D. menstrualis é encontrada no infra e mesolitoral, U. lactuca é uma alga comumente encontrada na região do supralitoral e é conhecido que com o aumento da profundidade há um aumento na concentração de Cla e outros pigmentos acessórios (Ramus et al., 1976).

O conteúdo de ficobiliproteínas foi maior nas espécies antárticas, o que pode estar relacionado ao fato de que esses organismos vivem em um ambiente caracterizado por longos períodos de luz fraca, como já foi discutido anteriormente. Dentre as rodófitas brasileiras, destaca-se *Aglaothamnion uruguayense*, que apresentou os maiores valores de AFC, FC e FE, o que torna essa espécie interessante, uma vez que estudos demonstram que a FC é uma importante substância bioativa que inibe o crescimento de células cancerígenas (Zhang *et al.* 2001). Além disso, a FE pode ser utilizada como marcador fluorescente em análises por citometria de fluxo e em ensaios para avaliar o stress oxidativo (MuhL *et al.*, 2011; Cao & Prior, 1998). Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar o potencial de *A. uruguayense* para tal finalidade.

As rodófitas brasileiras apresentaram maior conteúdo de carboidratos solúveis totais e proteínas solúveis totais do que as heterocontófitas procedentes do mesmo local. O mesmo foi observado por McDermid & Stuercke (2003), que, ao estudar a composição nutricional de 22 espécies de macroalgas, constataram que *Halymenia formosa* Harvey ex Kützing e *Porphyra vietnamensis* T.Tanaka & Pham-Hoàng Ho foram as espécies com maior conteúdo protéico. Entretanto, esses autores verificaram que além das rodófitas, as clorófitas também apresentaram alto conteúdo de carboidratos solúveis totais, diferente dos nossos resultados. A espécie brasileira com maior conteúdo de proteínas foi *Aglaothamnion uruguayense*, o que agrega mais valor a essa espécie. As espécies que apresentaram o maior conteúdo de carboidratos foram *Bryothamnion seaforthii, Gracilaria mammillaris* e *Laurencia dendroidea*. Dentre essas três espécies, destaca-se *B. seaforthii,* uma vez que estudos tem demonstrado que frações de carboidratos extraídos dessa espécie apresentar atividade antinociceptiva (Vieira *et al.*, 2004).

O maior conteúdo de proteínas solúveis totais apresentado pelas heterocontófitas antárticas está de acordo com dados da literatura, uma vez que as macroalgas antárticas possuem alto teor

de N nos tecidos, consequência da alta disponibilidade desse nutriente no oceano antártico (Wiencke & Amsler, 2012), o que não ocorre no Brasil, uma vez que a costa brasileira é caracterizada por águas oligotróficas.

Houve grande variação no conteúdo de lipídeos totais, sendo que as heterocontófitas foram as macroalgas que apresentaram os maiores valores, destacando-se as espécies *Dictyota menstrualis* e *Spatoglossum schroederi*. McDermid & Stuercke (2003) e Gosch *et al.* (2012) também encontraram os maiores valores de lipídeos totais em espécies do gênero *Dictyota* e *Spatoglossum*.

As clorófitas coletadas em Ubatuba – SP apresentaram maior teor de ácidos graxos totais e monoinsaturados do que as rodófitas procedentes do mesmo local. Patarra (2008) também observou os maiores teores de ácidos graxos monoinsaturados nas espécies *Chaetomorpha pachynema* (Montagne) Kützing e *Codium elisabethae* O.C.Schmidt. As heterocontófitas, coletadas em Rio do Fogo – RN e na Antártica, também apresentaram maior conteúdo de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados do que as rodófitas provenientes dos mesmos locais. Resultados semelhantes foram encontrados por Gosch *et al.* (2012), uma vez que os maiores valores de ácidos graxos foram encontrados em representantes das algas pardas e verdes.

Ao comparar os diferentes locais de coleta, observou-se um maior teor de ácidos graxos totais, saturados e poliinsaturados nas macroalgas provenientes de Rio do Fogo – SP. Esses resultados são consequência do elevado conteúdo desses ácidos graxos nos representantes da ordem Dictyotales que foram coletados nesse local, uma vez que as espécies *Spatoglossum schroederi* e *Dictyota menstrualis* foram as que apresentaram maior conteúdo de ácidos graxos.

A espécie *Spatoglossum schroederi* destacou-se por apresentar altos valores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, sendo que os ácidos majoritários foram os

saturados, seguido dos poliinsaturados. *Dictyota menstrualis* apresentou valores parecidos de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, sendo que esta espécie foi que a exibiu a maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados. No trabalho realizado por Gosch *et al.* (2012), *S. schroederi* também foi a espécie com maior teor de ácidos graxos, sendo que os ácidos graxos saturados e poliinsaturados foram majoritários, com seus valores sendo muito próximos. O mesmo foi observado para *Dictyota bartayresii* e *D. dichotoma*, o que difere dos resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que *D. menstrualis* apresentou maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados do que as outras espécies.

Os ácidos graxos saturados foram majoritários para todas as espécies estudadas, exceto para *Desmarestia anceps* e *Himantothallus grandifolius*, que apresentaram maiores valores de ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, as rodófitas antárticas apresentaram mais ácidos graxos poliinsaturados do que as brasileiras. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura, uma vez que as algas polares são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, uma característica importante para a manutenção da fluidez e funcionalidade das membranas em baixas temperaturas (Becker *et al.*, 2010).

Para todas as espécies estudadas, o acido hexadecanóico (C16:0) foi o ácido graxo saturado majoritário. O mesmo foi observado por Gosch et al. (2012), Gressler et al. (2010), Gressler et al. (2011) e Guaratini (2008). Entretanto, Patarra (2008) observou que para a espécie *Chaetomorpha pachynema* o ácido saturado majoritário foi o tetradecanóico (C14:0).

Para a maioria das espécies estudadas, o ácido graxo octadecenóico (C18:1 Δ 9) foi o ácido graxo monoinsaturado majoritário. Gressler *et al.* (2010; 2011) observaram que o C18:1 Δ 9 foi o ácido monoinsaturado que ocorreu em maior concentração para todas as rodófitas estudadas. Entretanto, Guaratini (2008) e Patarra (2008) encontraram variações, uma vez que as espécies *Hypnea spinella* e *Chaetomorpha pachynema* apresentaram maior concentração dos ácidos hexadecenóico (C16:1 Δ 9) e pentadecenóico (C15:1 Δ 10), respectivamente. *Dictyota menstrualis* e *Solieria filiformis*, estudadas no presente trabalho, também apresentaram maior concentração do ácido C16:1 Δ 9, diferentemente do que foi observado por Gosch *et al.* (2012), uma vez que as espécies do gênero *Dictyota* estudadas por eles apresentaram maior teor de C18:1 Δ 9.

Em relação aos ácidos graxos poliinsaturados, ou o ácido eicosatetraenóico (C20:4 Δ 5,8,11,14) ou o ácido eicosapentaenóico (C20:5 Δ 5,8,11,14,17) foram os ácidos graxos majoritários. Essa variação também foi encontrada por Gressler (2010), Gosch *et al.* (2012) e Guaratini (2008).

Apesar de muitas macroalgas possuírem baixo teor de lipídeos, o seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados é alto quando comparado ao das plantas terrestres (Darcy-Vrillon, 1993). Além disso, esses organismos sintetizam ω -3 e ω -6, nutrientes essenciais para os mamíferos, e estudos sugerem que o aumento da quantidade de ω -3 na dieta é benéfico a saúde, sendo que alimentação humana deve conter uma relação ω -6/ ω -3 de, no máximo, 5:1 (Patarra, 2008). Dentre as espécies estudadas, o ω -3 não foi identificado apenas em *Cryptonemia crenulata, Gracilaria birdiae, G. cervicornis, G. mammillaris, Cladophoropsis membranacea* e *Rhizoclonium africanum.* Nas demais espécies, a relação ω -6/ ω -3 foi abaixo de 3:1, sendo que o valor mais alto ocorreu para *Dictyopteris deliculata* (2,91±0,06 mg/ g peso seco). Esse resultado evidencia o potencial desses organismos para serem explorados como nutracêuticos, uma vez que podem ser empregados para enriquecer o conteúdo de ω -3 na dieta humana.

A partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar a espécie com as melhores características para a produção de biodiesel. Os principais parâmetros observados para essa escolha foram a taxa de fotossíntese e o conteúdo de lipídeos e ácidos graxos, uma vez que o organismo utilizado para tal finalidade deve conter uma alta taxa de crescimento e de produtividade primária, ser rico em óleo e produzir um perfil adequado de ácidos graxos.

Dessa forma, a espécie escolhida foi *D. menstrualis*, pois além de altos valores de alfa e de ETR max, ela apresentou alto conteúdo de lipídeos e ácidos graxos, além de ter se destacado das demais espécies por exibir alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, característica importante para a obtenção de um biodiesel com maior estabilidade oxidativa e que não que precipite quando submetido a temperaturas menores (Serdari *et al.*, 1999).

Além da seleção de uma espécie de macroalga com potencial para a produção de biodiesel, esta etapa do projeto evidencia outras possíveis aplicações biotecnológicas desse grupo de organismos tão diversificado, mostrando a importância da existência de trabalhos na área para contribuir com o desenvolvimento biotecnológico do Brasil, a partir da utilização sustentável dos recursos marinhos.

5.2 Taxa de crescimento e desempenho fotossintetizante de *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörning & Weber-Peukert cultivada em laboratório

Após a escolha da espécie com potencial para a produção de biodiesel baseada nas suas características fotossintéticas e bioquímicas, foi realizado o estabelecimento do seu cultivo em laboratório avaliando-se o crescimento e a taxa de fotossíntese. Essa etapa é fundamental, uma vez que é muito importante que o produto de interesse seja obtido a partir da biomassa proveniente de sistemas de cultivo e não de populações naturais da espécie produtora.

Mendes *et al.* (2012), após otimizar as condições de temperatura, luz e nutrientes para o cultivo em água do mar sintética de *Gracilaria domingensis*, observou que a maior TC desse espécime foi de 6,4 % d⁻¹, valor próximo do obtido quando o cultivo foi realizado em água do mar enriquecida com a solução de von Stosch, que variou de 6,5 a 7 % d⁻¹. Para as linhagens marrom (selvagem) e verde-clara da rodófita *Hypnea musciformis*, a maior TC observada foi de aproximadamente 16% (Yokoya *et al.*, 2007). Comparando-se esses resultados com a TC de *D*.

menstrualis cultivada com VSES/2, que foi de 11,1 % d⁻¹, pode-se constatar que esse espécime apresentou uma alta TC quando cultivado em laboratório, uma vez que esse valor está próximo ou até maior de alguns valores apresentados na literatura para outras espécies de macroalgas (Cunha *et al.*, 1999).

D. menstrualis também teve um bom desempenho fotossintetizante quando cultivada em laboratório. Embora os valores de ETRmax e Ik tenham sido menores do que os valores obtidos com a espécie em campo, esses valores são similares ou maiores do que os encontrados para outras espécies de macroalgas cultivadas em laboratório (Yokoya *et al.*, 2007; Barufi, 2010).

5.3. Efeitos do aumento do CO₂, em condições de saturação e limitação de nitrogênio, sobre o metabolismo e a composição bioquímica de *D. menstrualis* cultivada em biorreatores e sobre a captação do CO₂ por *D. menstrualis* cultivada em laboratório

Apesar da concentração de CO₂ testada ter sido muito alta (44x maior do que a concentração dos tratamentos sem injeção de CO₂) e do pH ter baixado de aproximadamente 8,3 (nos tratamentos sem injeção de CO₂) para 6,5, não houve inibição da TC de *D. menstrualis* cultivada sob essas condições. Entretanto, a TC foi limitada pela ausência de NO₃⁻ no meio, sendo que nos tratamentos com NO₃⁻ ela variou de 14 a 16% d⁻¹. O mesmo não foi observado para *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta), *Lomentaria articulata* (Hudson) Lyngbye (Rhodophyta) e *Hizikia fusiforme* (Harv.) Okamura (Phaeophyceae), uma vez que o aumento da concentração de CO₂ ocasionou um aumento na TC (Gordillo *et al.*, 2001; Kubler *et al.*, 1999; Zou, 2005). Já para *Porphyra leucosticta* Thuret et Le Jolis (Rhodophyta), o aumento da concentração de CO₂ no ar de apenas 1% ocasionou o decréscimo da TC de 5,8 ± 1,39 (tratamento sem CO₂) para 0,91 ± 0,11 (tratamento com CO₂) (Mercado *et al.*, 1999).

O conteúdo de Cl*a* foi maior nos tratamentos com adição de NO_3^- . Entretanto, quando foi adicionado CO_2 no meio, a concentração de Cl*a* de *D. menstrualis* cultivada com limitação de NO_3^- foi igual a todos os tratamentos com saturação de NO_3^- , o que evidencia que a resposta dessa macroalga, para este parâmetro, ao stress causado pela limitação de NO_3^- foi alterada em função do aumento da concentração de CO_2 .

Apesar do aumento de CO₂ não ter causado efeitos sobre a TC, houve um grande aumento nos valores de ETRmax e Ik quando *D. menstrualis* foi cultivada em meio com adição de CO₂, saturado em NO₃⁻. O mesmo não foi observado por Zou (2005), uma vez que não houve diferença significativa nos valores de ETRmax de *H. fusiforme* cultivada em tratamentos com e sem enriquecimento com CO₂. Entretanto, o Ik foi menor quando essa espécie foi cultivada com CO₂. Já para *P. leucosticta*, o aumento na concentração de CO₂ ocasionou um aumento no ETRmax (Mercado *et al.*, 1999).

Diferenças nos valores de ETRmax podem estar relacionadas com a concentração das unidades fotossintéticas e com seu tempo de turnover mínimo. O tempo de turnover do aparato fotossintetizante, por sua vez, muda como resultado de alterações na taxa de transporte de elétrons entre o fotossistema II e I (Mercado *et al.*, 1999). Dessa forma, os maiores valores de ETRmax e Ik indicam uma maior concentração e melhor funcionamento do aparato fotossintetizante de *D. menstrualis* cultivada com adição de CO_2 e NO_3^- , o que é evidenciado pela maior ETR apresentada tanto na curva FI como na de Kautsky. Além disso, tanto a ETR como o RQE dos espécimes cultivados nesse tratamento aumentaram rapidamente durante os primeiros minutos de iluminação da curva de Kautsky, o que indica a ativação das enzimas do Ciclo de Calvin e um aumento na fixação de CO_2 (Heinz Walz GmbH, 1998), processo que também foi evidenciado pela maior atividade da enzima Rubisco.

Entretanto, no tratamento com aeração, sem adição de CO_2 e NO_3^- , os valores de ETR da curva de Kautsky foram os mais baixos e os valores de NPQ foram os mais altos. Durante a adaptação ao escuro, as enzimas do Ciclo de Calvin são parcialmente inativadas. Essas enzimas são ativadas pela luz, durante os primeiros minutos de iluminação. Durante esse período, o O_2 e não CO_2 é o aceptor final de elétrons. O fluxo de elétrons dependente de O_2 e o fluxo cíclico de elétrons do fotossistema I criam um gradiente de prótons, o qual será utilizado para a síntese de ATP, que, por sua vez, será consumido quando o Ciclo de Calvin estiver ativo. Durante esse período, haverá um aumento no NPQ que irá declinar conforme o aumento da fixação de CO_2 e do consumo de ATP aumentar (Heinz Walz GmbH, 1998). Assim, os baixos valores de ETR e altos valores de NPQ evidenciam que durante os minutos de iluminação da curva de Kautsky, o ciclo de Calvin de *D. menstrualis*, cultivada com aeração, sem adição de CO_2 e NO_3^- , não estava totalmente ativo, o que pode ser consequência de um menor número de enzimas. Entretanto, não foi possível mensurar a atividade da Rubisco desse tratamento pelo método testado.

Assim como a Rubisco, a atividade da NR também foi maior no tratamento com adição de CO_2 e NO_3^- . Entretanto, houve pouca variação na atividade da AC entre os diferentes tratamentos avaliados. Resultados semelhantes foram observados por Zou (2005), uma vez que o aumento da concentração de CO_2 no meio ocasionou um aumento na captação de NO_3^- e na atividade da NR de *H. fusiforme*, indicando um aumento na assimilação de N. Apesar disso, o conteúdo de proteínas solúveis totais e de N total no tecido de *D. menstrualis* variou em função da presença/ausência de nitrato no meio e não da presença de CO_2 . O mesmo não foi observado por Mercado *et al.* (1999), uma vez que o aumento de CO_2 no meio ocasionou um decréscimo no conteúdo de proteínas solúveis totais de *P. leucosticta*. Também houve uma relação inversamente proporcional entre o conteúdo de N do tecido de *L. articulata* e a concentração de CO_2 no meio (Kubler *et al.*, 1999). Já para *Gracilaria lemaneiformis* (Bory) Weber-van Bosse (Rhodophyta),

não houve alteração no conteúdo de proteínas com a alteração da concentração de CO_2 no cultivo (Zou & Gao, 2009).

O conteúdo de carboidratos solúveis totais de *D. menstrualis* foi maior no tratamento com adição de CO_2 e NO_3^- . Mercado *et al.* (1999) também observou um aumento no conteúdo de carboidratos solúveis totais de *P. leucosticta* com o aumento de CO_2 no meio. Tem sido proposto que a limitação por N estimula a síntese de lipídeos pelas algas (Rosenberg *et al.* 2008). Entretanto, *D. menstrualis* apresentou o maior conteúdo de lipídeos totais no meio com saturação por NO_3^- , sendo que também houve estímulo do CO_2 . Para *G. lemaneiformis*, a resposta à deficiência ao N dependeu da concentração de CO_2 , sendo que em baixo CO_2 houve um aumento na síntese de lipídeos (Zou & Gao, 2009).

O conteúdo de ácidos graxos totais e poliinsaturados foi maior nos tratamentos com adição de NO_3^- , independente da concentração de CO_2 . Resultados similares foram encontrados por Hu & Gao (2006), uma vez que para *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyte) também houve aumento no conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em função da concentração de NO_3^- no meio. Diferente dos resultados do presente trabalho, Tsuzuki *et al.* (1990) observaram que a concentração de CO_2 afetou a composição dos ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Chlorophyta), sendo que o grau de insaturação desses ácidos foi maior nas células cultivadas com baixa concentração de CO_2 .

O perfil de ácidos graxos de *D. menstrualis* cultivada nos biorreatores foi caracterizado por um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, com destaque para os omegas-3. Esse resultado difere do obtido com o espécime coletado em campo, que se sobressaiu pelo seu alto teor em ácidos graxos monoinsaturados. Dessa forma, a biomassa de *D. menstrualis* proveniente do cultivo em laboratório se mostrou mais indicada para a utilização como nutracêutico do que para a aplicação como biodiesel. Entretanto, quando esse espécime foi cultivado sem adição de

nitrato, houve uma diminuição no teor de ácidos graxos poliinsaturados, sem alteração no conteúdo total de ácidos graxos monoinsaturados. Além disso, a alteração de determinados fatores abióticos pode aumentar o teor de ácidos graxos monoinsaturados. Por exemplo, Nagashima *et al.* (1995) observou que o aumento da temperatura de cultivo de 10 para 20 °C ocasionou uma diminuição no conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e um aumento no teor de ácidos graxos monoinsaturados de *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss. Dessa forma, a aplicação de *D. menstrualis* para a produção de biodiesel não está desconsiderada. Entretanto ainda são necessários estudos para encontrar a melhor condição para aumentar o teor de ácidos graxos monoinsaturados na espécie. Além disso, o conteúdo de manitol dessa espécie aumentou com o aumento da concentração de CO₂ no meio, o que indica que o resíduo gerado após a extração do óleo, pode ser usado para a obtenção de açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol. Contudo, estudos adicionais são necessários para maximizar a utilização de *D. menstrualis* para tal finalidade.

Não houve diferença significativa na taxa de remoção de CO_2 entre os tratamentos com e sem adição NO_3^- . Como esse parâmetro foi medido após 24h de cultivo, provavelmente durante esse período não houve degradação de grandes quantidades de proteínas no tratamento sem adição de NO_3^- , e a Rubisco estava ativa nos espécimes cultivados com e sem adição de NO_3^- . A remoção de CO_2 nos meios sem e com adição de CO_2 foi alta, variando de 71,5% a 34,8%, respectivamente. *Chlorella* sp. removeu 58% e 16% de CO_2 quando cultivada em meio com 2% e 15% desse elemento, respectivamente (Chiu *et al.*, 2007). Kaladharan *et al.* (2009) também observaram um decréscimo na % de remoção de CO_2 do meio para *Gracilaria corticata* (J.Agardh) J.Agardh (Rhodophyta), *Sargassum polycystum* C.Agardh (Phaeophyceae) e *Ulva lactuca* com o aumento da concentração do CO_2 testada (25 mg/L), as taxas de remoção foram,

respectivamente, 20, 40 e 60%. Esses resultados indicam a eficiência das algas marinhas em remover o excesso de CO_2 dissolvido na água do mar e que os valores apresentados por *D*. *menstrualis* estão próximos dos valores encontrados por outras espécies de algas.

6. CONCLUSÕES

As macroalgas constituem um grupo muito diversificado de organismos, apresentando diferenças no ciclo de vida, na forma do talo, no tamanho e na composição bioquímica, entre outras características. Ao avaliar a composição bioquímica de 25 espécies de macroalgas coletadas no litoral brasileiro e de 6 espécies coletadas na Antártica, pudemos constatar essa variedade bioquímica bem como observar algumas diferenças que esses organismos apresentam ocasionadas pela influência dos fatores abióticos, como a luz e a temperatura.

A diversidade bioquímica existente nesse grupo de organismos abre uma gama de possibilidades para a sua utilização para diferentes finalidades. A partir dos resultados desse trabalho, as seguintes espécies destacam-se para aplicação na indústria biotecnológica:

- Aglaothamnion uruguayense, devido aos altos valores de FC e FE, pigmentos com características bioativas e que podem ser utilizados como marcador fluorescente em análises por citometria de fluxo. Além disso, essa espécie apresentou alto teor de proteínas, o que evidencia sua possível utilização como suplemento alimentar;

- *Bryothamnion seaforthii, Gracilaria mammillaris* e *Laurencia dendroidea* apresentaram ao alto conteúdo de carboidratos e estudos demonstram que frações de carboidratos extraídos de diferentes espécies de macroalgas podem apresentar diferentes atividades biológicas. Dessa forma, essas espécies podem ser interessantes para serem estudadas para tal finalidade; - Spatoglossum schroederi e Dictyota menstrualis apresentaram os maiores valores de ácidos graxos totais, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, destacando-se pelo alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e ω -3 e pelo alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados, respectivamente. Esse resultado evidencia uma possível utilização de *S. schroederi* como nutracêutico e de *D. menstrualis* como fonte de biodiesel.

É importante ressaltar que os resultados apresentados nessa etapa do trabalho direcionam uma possível aplicação biotecnológica para as espécies que se destacaram, entretanto estudos adicionais devem ser realizados para tal finalidade. Além disso, uma atenção maior foi dada às espécies que apresentaram os maiores valores dos compostos avaliados, o que não descarta a importância e possível utilização para as mais variadas finalidades das demais espécies estudadas no presente trabalho.

Como já mencionado acima, a partir dos resultados obtidos com as algas coletadas em campo, concluímos que *D. menstrualis* foi a espécie que apresentou as melhores características para ser utilizada como fonte para produção de biodiesel, devido a sua alta taxa de fotossíntese, alto teor de lipídeos e ácidos graxos e alto teor de ácidos graxos monoinsaturados. Entretanto, quando esse espécime foi cultivado em biorreatores, houve um aumento no seu teor de ácidos graxos poliinsaturados e ω -3, o que a torna mais interessante para ser aproveitada como nutracêutico do que como matéria-prima para a produção de biodiesel. Apesar disso, a sua aplicação como fonte de biodiesel não deve ser desconsiderada, uma vez que alterações nas condições de cultivo acarretam em modificações no perfil de ácidos graxos. Com base nos resultados obtidos, as perspectivas para a produção de biodiesel a partir de macroalgas marinhas deverão contemplar estudos para encontrar as melhores condições de cultivo para que ocorra o aumento na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amancio, C.E. 2007. Precipitação de CaCO₃ em algas marinhas calcáreas e balanço de CO₂ atmosférico: os depósitos calcáreos marinhos podem atuar como reservas planetárias de carbono? Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 64 p.
- Adams, J.M.; Gallagher, J.A. & Donnison, I.S. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. App. Phycol.* 21:569-574.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. *Biocombustível*. Disponível em: < http://www.anp.gov.br/?id=470 > .
- Aresta, M.; Dibenedetto, A.; Carone, M.; Colonna, T. & Fragale, C. 2005. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. *Environ. Chem. Lett.* 3:136-139.
- Barufi, J.B. 2010. *Fotoproteção em* Gracilaria tenuistipitata (*Rhodophyta*): uma abordagem fisiológica e molecular. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 339 p.
- Becker, S.; Graeve, M. & Bischof, K. Photosynthesis and lipid composition of the Antarctic endemic rhodophyte *Palmaria decipiens*: effects of changing light and temperature levels. *Polar Biol.* 33:945-955.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cao, G. & Prior, R.L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 44: 1309-1315.
- Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcão, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P. & Pinto, E. 2006. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol.* 146:60-78.
- Chapman, D.J. & Harrison, P.J. 1988. Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. In: Lobban, C.S.; Chapman, D.J. & Kremer, B (eds.). *Experimental phycology. A laboratory manual*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 196-202.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotech. Adv. 25:294-306.
- Chiu, S.-Y.; Kao, C.-Y.; Chen, C.-H.; Kuan, T.-C.; Ong, S.-C. & Lin, C.-S. 2007. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Biores. Tech.* 99: 3389-3396.
- Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. 2011. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Conab. Brasília. 20 p.
- Chung, I.K.; Beardall, J.; Mehta, S.; Sahoo, D. & Stojkovic, S. 2011. Using marine macroalgae for carbon sequestration: a critical appraisal. *J. Appl. Phycol.* 23:877-886.
- Cunha, S.R.; Pazeto, F.D.; Crestani, D.E.V.; Lima, G.B.; Nascimento, J.; Sant'anna, F.; Manzoni, G.C.; Marenzi, A.W.C. & Mafra Jr.,L.L. 1999. Potencial de crescimento de macroalgas cultiváveis presentes na enseada de armação do itapocoroy (Penha, Sc): Avaliação preliminar. *Notas Téc. Facimar* 3: 17-25.
- Darcy-Vrillon, B. 1993. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Int. J. Food Sci.* Nutr. 44, 23-35.
- Deboer, J.A. 1981. Nutrients. *In:* Lobban, C.S. & Wynne, M.J. (eds.). *The Biology of Seaweeds*. Blackwell Scientific. Oxford. pp. 91-356.
- Dickson, A.G.; Sabine, C.L. & Christian, J.R. 2007. *Guide to best practices for ocean CO*₂ *measurements.* PICES Special Publication 3. 191 p. Disponível em <http://cdiac.ornl.gov/oceans/Handbook_2007.html>
- Dring, M.J. 1981. Chromatic adaptation of photosynthesis in benthic marine algae: an examination of its ecological significance using a theoretical model. *Limnol. Oceanogr.* 26: 271-284.
- Dubois, M.; Gilles, F.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Edenhofer, O.; Madruga, R.P.; Sokona, Y.; Seyboth, K.; Matschoss, P.; Kadner, S.; Zwichel, T.; Eickemeier, P.; Hansen, G.; Schlömer, S. & Von Stechow, C. 2012. *Renewable energy sources and climate change mitigation*. Special report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. Cambridge. 1076 p.
- Edwards, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions to Marine Science. University of Texas. Austin. 228 p.
- Ferreira, L.S.; Turatti, I.C.C.; Lopes, N.P., Guaratini, T.; Colepicolo, P.; Oliveira, E.C. & Garla, R.C. 2012. Apolar Compounds in Seaweeds from Fernando de Noronha Archipelago (Northeastern Coast of Brazil). *Int. J. Anal. Chem.*, publicado on line, doi:10.1155/2012/431954.
- Foschiera, I.P. 2008. *O programa nacional de produção e uso de biodiesel: impactos e perspectivas.* Monografia. Universidade Ferderal do Rio Grande do Sul. 73 p.
- Furtado, M.R. 2004. Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. *Química e Derivados* 430:1-4.
- Gerard, V.A. & Driscoll, T. 1996. A spectrophotometric assay for Rubisco activity: application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assays. J. Phycol. 32: 880-884.
- Gordillo, F.J.; Niell, F.X. & Figueroa, F.L. 2001. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta* 213: 64-70.
- Gosch, B.J.; Magnusson, M.; Paul, N.A. & Nys, R. 2012. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy* 4: 919-930.
- Guaratini, T. 2008. *Antioxidantes de macroalgas marinhas: caracterização química e atividade* in vitro. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 141 p.
- Gressler, V.; Yokoya, N.S.; Fujii, M.T.; Colepicolo, P.; Mancini-Filho, J.; Torres, R.P. & Pinto, E. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food. Chem.* 120: 585-590.

- Gressler, V.; Fujii, M.T.; Martins, A.P.; Colepicolo, P.; Mancini-Filho, J. & Pinto, E. 2011. Biochemical composition of two red seaweed species grown on the Brazilian coast. J. Sci. Food Agric. 91: 1687-1692.
- Haglund, K.; Bjork, M.; Ramazanov, Z.; Garcia-Reina, G. & Pedersén, M. 1992. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 187:275-281.
- Hanisak, M.D. 1983. The nitrogen relationships of marine macroalgae. *In*: Carpenter, E.J. & Capone, D.G. (eds). *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press. New York. pp. 699-730.
- Hayashi, L.; Yokoya, N.S.; Ostini, S.; Pereira, R.T.L.; Braga, E.S. & Oliveira, E.C. 2008. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture* 277:185-191.

Heins Walz GmbH. 1998. Underwater Fluorometer DIVING-PAM. Submersible Photosynthesis

Yield Analyzer. Handbook of Operation. Heins Walz GmbH. Germany. 116 p.

- Hellebust, J.A. 1976. Effect of salinity on photosynthesis and mannitol synthesis in the green flagellate Platymonas suecica. *Can. J. Bot.* 54:1735-1741.
- Hoek, C. van den; Mann, D.G.; Jahns, H.M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press. Cambridge. 723 p.
- Hu, H. & Gao, K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.* 28:987-992.
- Iersel, S. van & Flammini, A. 2010. Algae-based biofuels: applications and co-products. FAO Environmental and Natural Resources Management Working Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 117 p.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167:191-194.
- Kaladharan, P.; Veena, S. & Vivekanandan, E. 2009. Carbon sequestration by a few marine algae: observation and projection. *J. Mar. Biol. Ass. India* 51: 107-110.
- Karsten, U.; West, J.A.; Zuccarello, G.C.; Nixdorf, O.; Barrow, K.D. & King, R.J. 1999. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (Rhodophyta). J. Phycol. 35:967-976.
- Kim, N-J.; Li, H.; Jung, K.; Chang, H,N. & Lee, P.C. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Biores. Technol.* 102: 7466-7469.
- Kleypas, J.A. & Langdon, C. 2002. Overview of CO2-induced Changes in Seawater Chemistry. *Coral Reef Symp.* 2: 1085-1089.
- Kubler, J.E.; Johnston, A.M. & Raven, J.A. 1999. The effects of reduced and elevated CO₂ and O₂ on the seaweed *Lomentaria articulata*. Plant, Cell & Environment 22: 1303-1310.
- Kursar, T.A.; Van Der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Phisiol*. 73:353-360.

- Lavigne, H.; Proye, A. & Gattuso, J.-P. 2009. Seacarb: Calculates parameters of the seawater carbonate system. R package version 2.0.6. Disponível em http://www.obs-vlfr.fr/~gattuso/seacarb.php
- Lea, P.J. 1993. Nitrogen Metabolism. *In:* Lea, P.J. & Leegood, R.C. (eds.). *Plant biochemestry and molecular biology*. John Wiley & Sons. pp. 155-180.
- Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. Cambridge. 366 p.
- Maxwell, K. & Johnson, N. 2000. Chlorophyll Fluorescence A Pratical Guide. J. Exp. Bot. 354: 659-668.
- Mcdermid, K.J. & Stuercke, B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. J. *App. Phycol.* 15:513-524.
- McHugh, D. 2003. *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 105 p.
- Melton, L.D. & Smith, B.G. 2001. Determination of Neutral Sugars by Gas Chromatography of their Alditol Acetates. *In*: Boyle, A. & Harkins, E. (eds). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken. John Wiley & Sons. pp. E3.2.1–E3.2.13.
- Mendes, L.F.; Yokoya, N.S.; Martins, A.P.; Marinho-Soriano, E.; Colepicolo, P. & Vale, L.A.S. 2012. Influence of temperature, light and nutrients on the growth rates of the macroalga *Gracilaria domingensis* in synthetic seawater using experimental design. J. App. Phycol. 4: 1419-1426.
- Mercado, J.M.; Javier, F.; Gordillo, L.; Niell, F.X. & Figueroa, F.L. 1999. Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticte*. *J. App. Phycol.* 11:455-461.
- Miranda, H.P. & Carmo, G.E. 2009. Agro e biocombustíveis: o cenário no campo brasileiro e perspectivas futuras. In: A questão (da reforma) agrária na América Latina: balanço e perspectivas. IV Simpósio Internacional de Geografia Agrária. Niterói.
- Moraes, F.P. & Colla, L.M. 2006. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Ver. Eletr. Farm.* 3: 109-122.
- Mühl, D.; Woth, G.; Drenkovics, L.; Varga, A.; Ghosh, S.; Csontos, C.; Bogár, L.; Wéber, G. & Lantos, J. 2011. Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury. *Indian J. Med. Res.* 134: 69-78.
- Nagashima, H.; Matsumoto, G.I.; Ohtani, S. & Momose, H. 1995. Temperature acclimation and the fatty acid composition of an antarctic green alga *Chlorella*. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 8: 194-199.
- Necchi, O. Jr. 2004. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia* 525:139–155.
- Necchi, O. Jr. & Alves, A.H.S. 2005. Photosynthetic characteristics of the freshwater red alga *Batrachospermum delicatulum. Acta Bot. Bras.* 19:125–137.
- Nunes, J.M.C & Paula, E.J. 2001. O gênero *Dictyota* Lamouroux (Dictyotaceae –. Phaeophyta) no litoral do Estado da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Malacitana* 26: 5-18.

- Oliveira, E. C.; Horta, P.A.; Amancio, C. E. & Sant'Anna, C.L. 1999. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, explotação e conservação. Versão do texto sobre avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. Ministério do Meio Ambiente. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello. Campinas. 60 p.
- Oxley, D.; Currie, G. & Bacic, A. 2005. Analysis of Carbohydrate from Glycoproteins. *In:* Simpson, R.J. (ed). *Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. NewYork. pp 579-636.
- Patarra, A.R.F. 2008. *Pesquisa de ácidos gordos em macroalgas marinhas do litoral dos açores*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto. 75 p.
- Peckol, P. & Ramus, J. 1992. Photosynthetic performance of deep-water macroalgae (Phaeophyta, Dictyotales) off Bermuda. *Hydrobiologia* 231: 93-98
- Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. 2002. Biologia Marinha. Interciência. Rio de Janeiro. 382 p.
- Perfeto, P.N.M.; Dillenburg, L.R.; Almeida, T.L. & Schwarzbold, A. 2004. Efeitos da temperatura, intensidade luminosa e concentração de fósforo na composição química de Gelidium crinale (Turner) Lamouroux (Rhodophyta, Gelidiaceae). *Biociências* 12:3-10.
- Platt, T.; Gallegos, C.L. & Harrison, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38:687-701.
- Ramos, M.J.; Fernández, C.M.; Casas, A.; Rodríguez, L. & Pérez, A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* 100:261-268.
- Ramus, J.; Beale, S.I. & Mauzerall, D. 1976. Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of depth. Mar. Biol. 37: 231-238.
- Raven, J.; Caldeira, K.; Elderfield, H.; Hoegh-Guldberg, O.; Liss, P.; Riebesell, U.; Shepherd, J.; Turley, C. & Watson, A. 2005. *Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide*. Royal Society Policy Document. 68 p.
- Root, T.L.; Price, J.T.; Hall,K.R.; Schneider, S.H.; Rosenzweig, C. & Pounds, J.A. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421:57-60.
- Rosenberg, J.N.; Oyler, G.A.; Wilkinson, L. & Betenbaugh, M.J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:430-436.
- Rorrer, G.L. & Cheney, D. P. 2004. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering* 32:11-41.
- Schenk, P.M.; Thomas-Hall, S.R.; Stephens, E.; Marx, U.C.; Mussgnug, J.H.; Posten, C.; Kruse,
 O. & Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.* 1:20-43.
- Serdari, A.; Lois, E. & Stournas, S. 1999. Impact of esters of mono- and dicarboxilic acids on diesel fuel quality. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38:3543-3548.
- Stumm, W. & Morgan, J.J. 1996. Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. John Wiley & Sons. New York. 1022 p.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre. 848 p.

- Tsuzuki, M.; Ohnuma, E.; Sato, N.; Takaku, T. & Kawaguchi, A. 1990. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* 93:851-856.
- Tyrrell, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400: 525-531.
- Vieira, L.A.P.; Freitas, A.L.P.; Feitosa, J.P.A.; Silva, D.C. & Viana, G.S.B. 2004. The alga Bryothamnion seaforthii contains carbohydrates with antinociceptive activity. Brazil. J. Med. Biol. Res. 37: 1071-1079.
- Zhang, L.-X.; Cai, C.-E.; Guo, T.-T.; Gu, J.-W.; Xu, H.-L.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Liu, C.-C. & He P.-M. 2011. Anti-Cancer Effects Of Polysaccharide And Phycocyanin From *Porphyra Yezoensis. J. Mar. Sci. Tech.* 4: 377-382.
- Zou, D. 2005. Effects of elevated atmospheric CO2 on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta), *Aquaculture* 250: 726-735.
- Zou, D. & Gao, K. 2009. Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. *Phycologia* 48: 510-517.
- Zou, D. & Gao, K. 2010. Acquisition of inorganic carbon by *Endarachne binghamiae* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Eur. J. Phycol.* 45: 117-126.
- Yokoya, N.S. 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 202 p.
- Yokoya, N.S.; Necchi, O. Jr.; Martins, A.P.; Gonzalez, S.F. & Plastino, E.M. 2007 . Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). J. App. Phycol. 19: 197-205.
- Wang, C.; Fan, X.; Wang, G.; Niu, J. & Zhou, B. 2001. Differential Expression of Rubisco in Sporophytes and Gametophytes of Some Marine Macroalgae. *PLoS ONE*, publicado on line, doi:10.1371/journal.pone.0016351.
- Weykam, G. & Wiencke, C. 1996. Seasonal photosynthetic performance of the endemic Antarctic alga *Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker. *Polar biol*. 16: 357-361.

Weykam, G.; Gómez, I.; Wiencke, C.; Iken, K. & Klöser, H. 1996. Photosynthetic characteristics and C:N ratios of macroalgae from King George Island (Antarctica). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204: 1-22.

- Wiencke, C. 2011. *Biology of polar benthic algae*. Walter de Gryuter GmbH & Co. Berlim. 337 p.
- Wiencke, C. & Amsler, C.D. 2012. Seaweeds and their communities in Polar Regions. In: Wiencke, C. & Bishof, K. (eds.) Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization. Springer-Verlag. Berlim. pp. 265-291.
- Wiencke, C. & Bishof, K. 2012. Seaweed biology: novel insights into ecophysiology, ecology and utilization. Springer-Verlag. Berlim. 510 p.
- Wynne, M.J. 2005. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western *Atlantic: second revision.* Beihefte zur Nova Hedwigia. 152 p.



APÊNDICE I

Figura 50. Cromatograma do padrão de ácidos graxos metilados (Supelco 37) injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B. Detalhe dos picos 16 e 17.
Picos: 1. C6:0; 2. C8:0; 3. C10:0; 4. C11:0; 5. C12:0; 6. C13:0; 7. C14:0; 8. C14:1; 9. C15:0; 10. C15:1; 11. C16:0; 12. C16:1Δ9; 13. C17:0; 14. C17:1; 15. C18:0; 16. C18:1Δ9c; 17. C18:1Δ9t; 18. C18:2Δ9,12c; 19. C18:2Δ9,12t; 20. C18:3Δ6,9,12; 21. C18:3Δ9,12,15; 22. C20:0; 23. C20:1Δ11; 24. C20:2Δ11,14; 25. C20:3Δ8,11,14; 26. C21:0; 27. C20:4Δ5,8,11,14; 28. C20:3Δ11,14,17; 29. C20:5Δ5,8,11,14,17; 30. C22:0; 31. C22:1Δ13; 32. C22:2Δ13,16; 33. C23:0; 34. C24:0; 35. C22:6Δ4,7,10,13,16,19; 36. C24:1Δ15.



Figura 51. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Acantophora spicifera* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 52. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Aglaothamnion uruguayense* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 53. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Asparagopsis taxiformis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **5.** C12:0; **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11; **39.** C16:2 Δ 9,12. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C18:1 Δ 11 e C16:2 Δ 9,12 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 94%, respectivamente.



Figura 54. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Bryocladia thyrsigera* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **35.** C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19; **38.** C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identificados pela biblioteca NISTO8, com uma similaridade de 94%.



Figura 55. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Bryothamnion seaforthii* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: 6. C13:0; 7. C14:0; 9. C15:0; 11. C16:0; 12. C16:1 Δ 9; 13. C17:0; 15. C18:0; 16. C18:1 Δ 9c; 18. C18:2 Δ 9,12c; 21. C18:3 Δ 9,12,15; 27. C20:4 Δ 5,8,11,14; 29. C20:5 Δ 5,8,11,14,17; 38. C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 foi identificado pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 56. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Cryptonemia crenulata* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 57. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dichotomaria marginata* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **30.** C22:0; **34.** C24:0; **36.** C24:1 Δ 15; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 58. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Gigartina skottsbergii* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **24.** C20:2 Δ 11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **38.** C18:1 Δ 11. O ácidos graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 59. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Gracilaria birdiae* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.
Picos: 6. C13:0; 7. C14:0; 11. C16:0; 12. C16:1Δ9; 15. C18:0; 16. C18:1Δ9c; 18. C18:2Δ9,12c;
25. C20:3Δ8,11,14; 27. C20:4Δ5,8,11,14; 38. C18:1Δ11. O ácidos graxo C18:1Δ11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 60. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Gracilaria cervicornis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **38.** C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 61. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Gracilaria mammillaris* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 62. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Hypnea musciformis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 63. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Laurencia dendroidea* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 64. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Palisada flagellifera* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **23.** C20:1 Δ 11; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 65. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Palmaria decipiens* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.
Picos: 6. C13:0; 7. C14:0; 11. C16:0; 12. C16:1Δ9; 15. C18:0; 16. C18:1Δ9c; 18. C18:2Δ9,12c; 21. C18:3Δ9,12,15; 23. C20:1Δ11; 27. C20:4Δ5,8,11,14; 29. C20:5Δ5,8,11,14,17; 36. C24:1Δ15; 38. C18:1Δ11. O ácido graxo C18:1Δ11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 66. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Plocamium cartilagineum* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **5.** C12:0; **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **30.** C22:0; **38.** C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 67. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Solieria filiformis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11; **39.** C16:2 Δ 9,12. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C18:1 Δ 11 e C16:2 Δ 9,12 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 94%, respectivamente.



Figura 68. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Caulerpa racemosa* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **34.** C24:0; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11; **40.** C16:2 Δ 7,10. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C18:1 Δ 11 e C16:2 Δ 7,10 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 91%, respectivamente.



Figura 69. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Cladophoropsis membranacea* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 70. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Rhizoclonium africanum* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **23.** C20:1 Δ 11; **24.** C20:2 Δ 11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **34.** C24:0; **36.** C24:1 Δ 15; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11; **41.** C22:4 Δ 7,10,13,16. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C18:1 Δ 11 e C22:4 Δ 7,10,13,16 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 94%, respectivamente.



Figura 71. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Ulva lactuca* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **30.** C22:0; **38.** C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 72. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Ascoseira mirabilis* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1Δ9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1Δ9c; **18.** C18:2Δ9,12c; **21.** C18:3Δ9,12,15; **27.** C20:4Δ5,8,11,14; **29.** C20:5Δ5,8,11,14,17.



Figura 73. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Desmarestia anceps* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: 6. C13:0; 7. C14:0; 9. C15:0; 11. C16:0; 12. C16:1 Δ 9; 13. C17:0; 15. C18:0; 16. C18:1 Δ 9c; 18. C18:2 Δ 9,12c; 20. C18:3 Δ 6,9,12; 21. C18:3 Δ 9,12,15; 27. C20:4 Δ 5,8,11,14; 29. C20:5 Δ 5,8,11,14,17. 38. C18:1 Δ 11. O ácido graxo C18:1 Δ 11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.



Figura 74. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyopteris deliculata* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1Δ9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1Δ9c; **18.** C18:2Δ9,12c; **21.** C18:3Δ9,12,15; **22.** C20:0; **25.** C20:3Δ8,11,14; **27.** C20:4Δ5,8,11,14; **29.** C20:5Δ5,8,11,14,17. **38.** C18:1Δ11. O ácido graxo C18:1Δ11 não consta no padrão e foi identifico pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 94%.







Figura 76. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Himantothallus grandifolius* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **41.** C22:4 Δ 7,10,13,16; **44.** C22:5 Δ 7,10,13,16,19. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C22:4 Δ 7,10,13,16 e C22:5 Δ 7,10,13,16,19 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 94%, respectivamente.



Figura 77. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Lobophora variegata* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **22.** C20:0; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **45.** C18:2 Δ 6,9. O ácido graxos C18:2 Δ 6,9 não consta no padrão e foi identificado pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 93%.



Figura 78. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Padina gymnospora* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11; **39.** C16:2 Δ 9,12. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7, C18:1 Δ 11 e C16:2 Δ 9,12 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94 e 94%, respectivamente.



Figura 79. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Sargassum cymosum* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **23.** C20:1 Δ 11; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **31.** C22:1 Δ 13; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.



Figura 80. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Sargassum stenophyllum* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **23.** C20:1 Δ 11; **25.** C20:3 Δ 8,11,14; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **31.** C22:1 Δ 13; **37.** C16:1 Δ 7; **38.** C18:1 Δ 11. Os ácidos graxos C16:1 Δ 7 e C18:1 Δ 11 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90 e 94%, respectivamente.


Figura 81. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Spatoglossum schroederi* injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos. Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1Δ9; **13.** C17:0; **15.** C18:0; **16.** C18:1Δ9c; **18.** C18:2Δ9,12c; **20.** C18:3Δ6,9,12; **21.** C18:3Δ9,12,15; **22.** C20:0; **24.** C20:2Δ11,14; **25.** C20:3Δ8,11,14; **27.** C20:4Δ5,8,11,14; **29.** C20:5Δ5,8,11,14,17; **30.** C22:0; **34.** C24:0; **37.** C16:1Δ7; **38.** C18:1Δ11; **43.** C20:3Δ5,8,11; **45.** C18:2Δ6,9. Os ácidos graxos C16:1Δ7, C18:1Δ11, C20:3Δ5,8,11 e C18:2Δ6,9 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 90, 94, 95 e 93%, respectivamente.



APÊNDICE II

Figura 82. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento "+N") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.



Figura 83. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento "-N") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NISTO8, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.



Figura 84. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento "Ar+N") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.



Figura 85. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento "Ar-N") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NIST08, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.



Figura 86. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento " CO_2+N ") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NISTO8, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.



Figura 87. Cromatograma do perfil de ácidos graxos metilados de *Dictyota menstrualis* (cultivada em biorreatores – tratamento " CO_2 -N") injetados e analisados por CG-EM. A. Visão geral de todos os picos. B e C. Detalhe dos picos.

Picos: **6.** C13:0; **7.** C14:0; **9.** C15:0; **11.** C16:0; **12.** C16:1 Δ 9; **15.** C18:0; **16.** C18:1 Δ 9c; **18.** C18:2 Δ 9,12c; **20.** C18:3 Δ 6,9,12; **21.** C18:3 Δ 9,12,15; **27.** C20:4 Δ 5,8,11,14; **29.** C20:5 Δ 5,8,11,14,17; **43.** C20:3 Δ 5,8,11; **46.** C18:4 Δ 6,9,12,15; **47.** C20:4 Δ 8,11,14,17. Os ácidos graxos C20:3 Δ 5,8,11, C18:4 Δ 6,9,12,15 e C20:4 Δ 8,11,14,17 não constam no padrão e foram identificados pela biblioteca NISTO8, com uma similaridade de 95, 90 e 95%, respectivamente.

ANEXOS

ANEXO I

Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 22(4): 854-860, Jul./Aug. 2012

Article

Received 28 Nov 2011 Accepted 12 Jan 2012 Available online 21 Jun 2012

Keywords: seaweeds fatty acids extraction and transesterification methods

ISSN 0102-695X http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000088

Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species

Aline P. Martins,¹ Nair S. Yokoya,² Pio Colepicolo^{*,1}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil,

²Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, Brazil.

Abstract: Seaweeds are photosynthetic organisms important to their ecosystem and constitute a source of compounds with several different applications in the pharmaceutical, cosmetic and biotechnology industries, such as triacylglycerols, which can be converted to fatty acid methyl esters that make up biodiesel, an alternative source of fuel applied in economic important areas. This study evaluates the fatty acid profiles and concentrations of three Brazilian seaweed species, Hypnea musciformis (Wulfen) J.V. Lamouroux (Rhodophya), Sargassum cymosum C. Agardh (Heterokontophyta), and Ulva lactuca L. (Chlorophyta), comparing three extraction methods (Bligh & Dyer - B&D; AOAC Official Methods - AOM; and extraction with methanol and ultrasound - EMU) and two transesterification methods (7% BF₃ in methanol - BF₃; and 5% HCl in methanol - HCl). The fatty acid contents of the three species of seaweeds were significantly different when extracted and transesterified by the different methods. Moreover, the best method for one species was not the same for the other species. The best extraction and transesterification methods for H. musciformis, S. cymosum and U. lactuca were, respectively, AOM-HC1, B&D-BF3 and B&D-BF3/B&D-HC1. These results point to a matrix effect and the method used for the analysis of the fatty acid content of different organisms should be selected carefully.

Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 22(4): 854-860, Jul./Aug. 2012



Article

Received 28 Nov 2011 Accepted 12 Jan 2012 Available online 21 Jun 2012

Keywords: seaweeds fatty acids extraction and transesterification methods

ISSN 0102-695X http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000088

Introduction

Seaweeds are photosynthetic organisms important to their ecosystem since they release O_2 into seawater and contribute to carbon fixation and nutrient cycling. In addition, they provide food and shelter for many animals. These organisms constitute a source of compounds with several different applications that can be used in the food, pharmaceutical and biotechnology industries (Gressler et a., 2009; 2011; Cardozo et al., 2007; 2008).

Among the compounds synthesized by macroalgae, fatty acids are highlighted because of their importance to human health (Cardozo et al., 2007). Thus, omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) are essential nutrient precursors of a group of eicosanoids that regulate developmental and regulatory physiology. Furthermore, triacylglycerols can be converted to the fatty acid methyl esters present in biodiesel (Chisti, 2007).

Biodiesel is an alternative source of fuel produced from plant and animal oils (Marchetti et al.,

Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species

Aline P. Martins,¹ Nair S. Yokoya,² Pio Colepicolo^{*,1}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil,

²Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, Brazil.

Abstract: Seaweeds are photosynthetic organisms important to their ecosystem and constitute a source of compounds with several different applications in the pharmaceutical, cosmetic and biotechnology industries, such as triacylglycerols, which can be converted to fatty acid methyl esters that make up biodiesel, an alternative source of fuel applied in economic important areas. This study evaluates the fatty acid profiles and concentrations of three Brazilian seaweed species, Hypnea musciformis (Wulfen) J.V. Lamouroux (Rhodophya), Sargassum cymosum C. Agardh (Heterokontophyta), and Ulva lactuca L. (Chlorophyta), comparing three extraction methods (Bligh & Dyer - B&D; AOAC Official Methods - AOM; and extraction with methanol and ultrasound - EMU) and two transesterification methods (7% BF3 in methanol - BF3; and 5% HCl in methanol - HCl). The fatty acid contents of the three species of seaweeds were significantly different when extracted and transesterified by the different methods. Moreover, the best method for one species was not the same for the other species. The best extraction and transesterification methods for H. musciformis, S. cymosum and U. lactuca were, respectively, AOM-HCl, B&D-BF3 and B&D-BF3/B&D-HCl. These results point to a matrix effect and the method used for the analysis of the fatty acid content of different organisms should be selected carefully.

> 2007) and the use of algae for its production is of great interest due to their high photosynthetic rate compared to terrestrial plants and the possibility of cultivation in different conditions and in marine waters (Aresta et al., 2005), avoiding the use of arable land.

> During the production of biodiesel, two steps are necessary: i. extraction of triacylglycerols from the raw material; and ii. transesterification to produces fatty acid methyl esters (FAME) (Chisti, 2007). Lipids can be extracted using solvent extraction or other techniques such as supercritical fluid extraction and microwave extraction. For the synthesis of FAME, acidic or basic catalysis, as well as other methods, can be used (Carrapiso & Garcia, 2000). Kumari et al. (2011) tested the extraction methods of Bligh & Dyer (1959), Folch (1957) and Cequier-Sánchez (2008) in three species of macroalgae and noted that the macroalgal matrix, the extraction method, and the buffer all influenced the content of fatty acid recovered, which shows that the method used should be selected with caution.

> In Brazil, a country with a coastline of over 7000 km, the main raw material for biodiesel production

is soybean oil (80%), followed by bovine fat (10%). There is little information on the fatty acid composition of Brazilian species of marine benthic algae. This knowledge is very relevant, since the profile of fatty acids of raw materials influence biodiesel properties such as the cetane number, iodine value, cold filter plugging point, and oxidation stability (Ramos et al., 2009).

Considering the importance of a knowledge of the fatty acid composition of Brazilian seaweeds, as well as the choice of extraction and transesterification methods to be used, this study evaluates the fatty acid profile of three Brazilian seaweed species, comparing three methods of triacylglycerol extraction and two methods of transesterification to produces FAME.

Materials and Methods

Algal material

The study was conducted with *Hypnea* musciformis (Wulfen) J.V. Lamouroux (Rhodophya), Sargassum cymosum C. Agardh (Heterokontophyta) and Ulva lactuca L. (Chlorophyta), collected from the intertidal zone in Ubatuba, São Paulo State, Brazil. The specimens were cleaned by removing the epiphytic organisms and washing with seawater. Subsequently samples were frozen under liquid N_2 , lyophilized, ground to a powder with liquid nitrogen and stored at -80 °C in the dark. All analyses were performed with three replicates. Voucher specimens were deposited in the SP herbarium under the numbers SP 427377 (Hypnea musciformis), SP 427378 (Sargassum cymosum), and SP 427379 (Ulva lactuca).

Total lipid extraction

Three different methods for lipid extraction were tested:

1. Bligh & Dyer (1959) (B&D): the macerated lyophilized algae (0.33g dry mass) was suspended in PBS and 125 μ L of the C13:0 triacylglyceride standard (C13) solution (5 mg mL⁻¹ in hexane) and 12.5 ml of chloroform:methanol:water (2:2:1) were added. The mixture was centrifuged and the chloroform phase was transferred to another flask and dried under N₂(g).

2. AOAC Official Methods (2001) (AOM): to the macerated lyophilized algae (1 g dry mass) was added 0.5 mL of the C13:0 triacylglyceride standard solution (5 mg mL⁻¹ in hexane), 50 mg pyrogallic acid and 1 mL of ethanol. This material was suspended in 5 mL of 8.3 M HCl, mixed and maintained in a shaker at 80 °C for 40 min. After cooling, the samples were extracted with ethyl ether (12 mL) and petroleum ether (12 mL). The sample was centrifuged and the ether phase was transferred to another flask and dried under $N_{2}(g)$.

3. Extraction with methanol and ultrasound (EMU): the macerated lyophilized algae (0.5 g dry mass) was suspended in 5 mL of methanol and then 125 μ L of the triacylglyceride C13:0 standard solution (5 mg mL⁻¹ in hexane) was added. The sample was submitted to ultrasound for 15 min and then dried under N₂ (g).

Fatty acid transesterification

Two different methods for fatty acid transesterification were tested:

1. BF₃ in methanol (BF₃): the dry lipid extracts obtained by the B&D and AOM methods were dissolved in 1 mL of BF₃ (7% in methanol) and 0.5 mL of toluene and heated to 100 °C for 45 min. After the reaction, 2.5 mL of water was added at room temperature and the FAME extracted with 1 mL of hexane.

2. HCl in methanol (HCl): to the dry lipid extracts obtained by the B&D, AOM and EMU methods were added 500 μ L of 5% HCl in methanol and the mixture was incubated for 2 h at 100 °C. After the reaction, 1.25 mL of water was added at room temperature and the FAME extracted with 1.25 mL of hexane.

Chromatographic analysis

The FAME were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a 30 m fused silica capillary column (HP-5MS with 0.25 μ m film, Agilent). A sample (1 μ L) was injected at temperature of 220 °C and with split of 1:10. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ with the following temperature ramp: initial temperature of 60 °C with an increase of 5 °C per min up to 260 °C, which was maintained for 10 min. The reference used for FAMEs was the standard Supelco 37 Component FAME Mix.

Quantification

Quantification of each fatty acid methyl ester (FAME) was based on the standard curve made with Supelco 37 Component FAME Mix. C13 recovery was calculated as [(Cf•100)•Ci⁻¹], where Cf is the final concentration obtained from the standard curve and Ci is the C13 concentration added to the sample.

Data analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) of one factor, followed by the comparison test of Student-Newman-Keuls, considering a confidence level of 95%.

Results

Comparison of extraction and transesterification methods

There was significant difference in the C13 recovery between the different methods tested only for *Sargassum cymosum*, and it was higher in the B&D-BF₃ method. There was no significant difference in the recovery of C13 among species (Figure 1).



Figure 1. Recovery of the C13:0 triacylglyceride internal standard in extraction and transesterification by the different methods with *Hypnea musciformis, Sargassum cymosum* and *Ulva lactuca* collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil. The extraction_transesterification methods are: A. EMU-HCl; B. B&D-HCl; C. B&D-BF₃; D. AOM-HCl; E. AOM-BF₃. Each data point is the mean of three replicates and the bars are the standard deviation For each species, distinct letters indicate significant differences between the methods tested according to one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (*p*<0.05).

H. musciformis showed a higher saturated fatty acid content in the AOM-BF₃ and AOM-HCl methods (Table 1 A), which is a consequence of the highest concentrations of palmitic and myristic acid methyl esters when extracted and transesterified by these methods (Figure 2 A and B). The contents of monounsaturated fatty acid and of palmitoleic acid methyl ester also were higher in the AOM-HCl method (Table 1 A and Figure 2 B), while the content of oleic acid methyl ester was higher in the B&D-BF₃, AOM-HCl and AOM- BF₃ methods (Figure 2 B). The contents of polyunsaturated fatty acid, represented by arachidonic acid methyl ester, and of total fatty acid were higher in the AOM-HCl, and AOM- BF₃ methods (Table 1 A and Figure 2 B).

S. cymosum showed higher contents of saturated fatty acid and of myristic and palmitic acid methyl esters in the B&D-BF₃ method (Table 1 B and Figure 3 A and B). The contents of monounsaturated fatty acid and of oleic acid methyl ester were also higher in the

B&D-BF₃ method (Table 1 B and Figure 3 B), while the content of palmitoleic acid methyl ester was higher in the B&D-BF₃ and B&D-HCl methods (Figure 3 B). The contents of polyunsaturated and total fatty acid and of aracdonic and linoleic acid methyl esters were higher in the B&D-BF₃ method (Table 1 B and Figure 3 B).



Figure 2. Fatty acid methyl ester concentrations (mg g⁻¹ dry weight) of *Hypnea musciformis* collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil. The extraction- transesterification methods are: A. EMU-HCl; B. B&D-HCl; C. B&D-BF₃; D. AOM-HCl; E. AOM-BF₃. Each data point is the mean of three replicates and the bars are the standard deviation. For each fatty acid, distinct letters indicate significant differences between the methods tested according to one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (p<0.05).

There was no significant difference in saturated fatty acid and palmitic acid methyl ester contents among the different methods tested for *U. lactuca* (Table 1 C and Figure 4 A). The same was observed for the monounsaturated fatty acid and oleic acid methyl ester (Table 1 C and Figure 4 B). However, the content of palmitoleic acid methyl ester was higher when extracted with the B&D-BF₃ and B&D-HCl methods (Figure 4 B). The content of polyunsaturated acid was higher in the B&D-BF₃, B&D-HCl and AOM-HCl methods (Table 1 C). The content of linoleic acid methyl ester was higher when extracted with the B&D-BF₃ and B&D-HCl methods (Table 1 C). The content of linoleic acid methyl ester was higher when extracted with the B&D-BF₃ and B&D-HCl methods and the content of linolenic acid methyl ester was lower when extracted with the AOM- BF₃ method (Figure 4 B).

Table 1. Fatty acid concentrations (mg g⁻¹ dry weight) obtained by different extraction and transesterification methods for *Hypnea musciformis* (A), *Sargassum cymosum* (B) and *Ulva lactuca* (C) collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil.

	())	()	(-)			
	Fatty acid	EMU	B&D-HCl	B&D-BF ₃	AOM-HCl	AOM-BF ₃
А	Saturated	0.69 ± 0.36^{b}	1.71 ± 0.16^{b}	1.63 ± 0.44^{b}	3.93±0.73ª	3.94±0.05ª
	Monounsaturated	0.06 ± 0.01^{b}	$0.12{\pm}0.01^{b}$	$0.15{\pm}0.02^{b}$	$0.80{\pm}0.09^{a}$	$0.28{\pm}0.01^{b}$
	Polyunsaturated	n.d. ^c	$0.21{\pm}0.01^{b}$	$0.22{\pm}0.04^{b}$	$0.41{\pm}0.08^{a}$	0.40±0.01ª
	Total	0.72 ± 0.38^{b}	2.04±0.37 ^b	2.08 ± 0.27^{b}	$4.95{\pm}1.02^{a}$	4.62±0.06ª
В	Saturated	$0.82{\pm}0.27^{\circ}$	$2.32{\pm}1.00^{bc}$	3.85±0.24ª	$2.30{\pm}0.17^{b}$	1.50 ± 0.37^{bc}
	Monounsaturated	0.20±0.10°	0.87 ± 0.18^{b}	1.19±0.06 ^a	0.61 ± 0.05^{b}	0.33±0.15°
	Polyunsaturated	n.d. ^d	0.61 ± 0.10^{b}	$0.83{\pm}0.03^{a}$	$0.42 \pm 0.02^{\circ}$	$0.11{\pm}0.08^{d}$
	Total	1.01 ± 0.37^{d}	$3.80{\pm}1.26^{b}$	$5.87{\pm}0.32^{a}$	3.33 ± 0.24^{bc}	1.94±0.59 ^{cd}
С	Saturated	1.85±0.42ª	2.13±0.45ª	$2.49{\pm}0.19^{a}$	2.01±0.31ª	2.28±0.51ª
	Monounsaturated	0.52±0.11ª	$0.72{\pm}0.15^{a}$	$0.79{\pm}0.01^{a}$	$0.52{\pm}0.08^{a}$	$0.46{\pm}0.07^{a}$
	Polyunsaturated	$0.68{\pm}0.15^{b}$	$0.91{\pm}0.12^{ab}$	$1.09{\pm}0.01^{a}$	$0.83{\pm}0.09^{ab}$	0.27±0.03°
	Total	3.05±0.68ª	$3.76{\pm}0.71^{a}$	$4.37{\pm}0.19^{a}$	$3.36{\pm}0.47^{a}$	3.02±0.61ª

Each value is the mean±SD of three replicates. For each fatty acid (saturated, monounsaturated, polyunsaturated and total) distinct letters indicate significant differences between the different methods tested according to the one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (p < 0.05).



Figure 3. Fatty acid methyl ester concentrations (mg g⁻¹ dry weight) of *Sargassum cymosum* collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil. The extraction- transesterification methods are: A. EMU-HCl; B. B&D-HCl; C. B&D-BF₃; D. AOM-HCl; E. AOM-BF₃. Each data point is the mean of three replicates and the bars are the standard deviation. For each fatty acid, distinct letters indicate significant differences between the methods tested according to one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (p<0.05).



Figure 4. Fatty acid methyl ester concentrations (mg g⁻¹ dry weight) of *Ulva lactuca* collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil. The extraction- transesterification methods are: A. EMU-HCl; B. B&D-HCl; C. B&D-BF₃; D. AOM-HCl; E. AOM-BF₃. Each data point is the mean of three replicates and the bars are the standard deviation. For each fatty acid, distinct letters indicate significant differences between the methods tested according to one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (p<0.05).

Comparison between the species studied

The comparison between the species studied was made by choosing two extraction methods. For *Hypnea musciformis*, the best extraction method, which yielded the highest value of saturated, unsaturated and polyunsaturated fatty acids, was the AOM-HCl method. For *Sargassum cymosum* it was B&D-BF₃ and for *Ulva lactuca* the B&D-BF₃ and B&D-HCl methods. Thus, comparison of the fatty acid profile of these species was made considering the AOM-HCl and B&D-BF₃ methods.

In both methods tested, the three species showed higher concentrations of saturated fatty acids and palmitic acid was the major fatty acid (Figure 5 A and B). However, when comparing species, and when the extraction and transesterification were made using the B&D-BF₃ method, *S. cymosum* and *H. musciformis* showed the highest and lowest contents of this fatty acid, respectively. *S. cymosum* also showed higher concentrations of palmitoleic, oleic and arachidonic acid methyl esters when the B&D-BF₃ method was used (Figure 5 A).



Figure 5. Fatty acid methyl ester concentrations (mg g⁻¹ dry weight) of *Hypnea musciformis, Sargassum cymosum* and *Ulva lactuca* collected from Ubatuba, São Paulo, Brazil. A. B&D-BF₃ method; **B**. AOM-HCl method. Each data point is the mean of three replicates and the bars are the standard deviation. For each fatty acid, distinct letters indicate significant differences between species according to one-way ANOVA and to the comparison test of Student-Newman-Keuls (p<0.05).

However, when the AOM-HCl method was used, *H. musciformis* showed higher concentrations of palmitic, myristic and arachidonic acid methyl esters than the other species and significant differences between the species for palmitoleic and oleic acid methyl esters were not observed (Figure 5 B). Moreover, this species did not yield palmitoleic acid methyl ester when B&D-BF₃ method was used (Figure 5 A) and linoleic and linolenic acid methyl esters were not detected, independent of the method used.

Ulva lactuca was the only species in which linolenic acid methyl ester was detected.

Discussion

The present study showed significant differences in the observed fatty acid contents of three species of seaweeds, Hypnea musciformis, Sargassum cymosum and Ulva lactuca, when extracted and transesterified by different methods. Moreover, the best method for one species was not necessarily the best for the other species. The best extraction and transesterification methods for *H*. musciformis, S. cymosum and U. lactuca were, respectively, AOM-HCl, B&D-BF, and B&D-BF,/B&D-HCl. Similar results were observed by Kumari et al. (2011), where the content of total lipids and fatty acids of Ulva fasciata Delile, Gracilaria corticata (J. Agardh) J. Agardh and Sargassum tenerrimum J. Agardh varied with the extraction method tested and the best method differed for each species. These results may be due to the matrix effect, since these species differ in their content of carbohydrates and proteins, which can interact with triacylglycerides.

When comparing the fatty acid contents of the three species of seaweed studied using the AOM-HCl method, *H. musciformis* showed higher concentrations of palmitic, myristic and arachidonic acid methyl esters than the other species. Significant differences between the species for palmitoleic and oleic acid methyl esters were not observed. The same was not the case for the B&D-BF₃ method. These results highlight the matrix effect and show that different results are generated as a consequence of the method used, which can produce false results. If only the results generated by the AOM-HCl method were considered, H. musciformis would be the species that produces more palmitic acid methyl ester. However, if only the B&D-BF, method were considered, S. cymosum would be the species that produces more of this fatty acid. Thus, care must be taken in studies that compare the content of fatty acids from different algal species since differences in the results can be due to the matrix effect rather than to differences in intrinsic concentrations in the sample.

The three species studied showed higher concentrations of saturated fatty acids, and palmitic acid was the major fatty acid, which is in agreement with the findings for other red algae (Guaratini et al., 2007; Gressler et al., 2010; Gressler et al., 2011), green algae (Ortiz et al., 2006; Yaich et al., 2011) and brown algae (Khotimchenko, 1991; Noviendri et al., 2011).

S. cymosum had a higher content of monounsaturated than polyunsaturated fatty acids. Similar results were found for Ochtodes secundiramea (Montagne) M.A. Howe (Gressler et al., 2011) and U. lactuca (Yaich et al., 2011). However, the opposite was observed for U. lactuca (present study) and for species of red algae such as *Plocamium brasiliense* (Greville) M.A. Howe & W.R. Taylor (Gressler et al., 2011), Gracilaria domingensis (Kützing) Sonder ex Dickie, G. birdiae Plastino & E.C. Oliveira, Laurencia dendroidea J. Agardh (as L. filiformis (C.Agardh) Montagne), and Laurencia sp. (as L. intricata J.V. Lamouroux) (Gressler et al., 2010), brown algae such as Sargassum aquifolium (Turner) C. Agardh (as S. binderi Sonder ex J. Agardh) and S. ilicifolium (Turner) C.Agardh (as S. duplicatum (J. Agardh) J. Agardh) (Noviendri et al., 2011) and green algae such as Ulva pertusa Kjellman (Floreto et al., 1993). It is important to note that the fatty acid profile of many organisms can vary according to environmental changes. For example, Floreto et al. (1993) observed an increase in the composition of saturated fatty acids and a decrease in unsaturated fatty acids of U. pertusa collected from mid-spring to early summer (March-June).

The results of the fatty acid profiles suggest that *S. cymosum* is the most suitable species to be used for biodiesel production, since biodiesel with a higher monounsaturated fatty acid content has a greater oxidative stability and does not precipitate when subjected to lower temperatures (Serdari et al. 1999). However, further studies of the growth of this species, as well as the yield, are needed to evaluate the economic viability of production of the compounds of interest.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CAPES, CNPq, Ministério da Saúde, Ministério de Ciência e Tecnologia, NAP-USP de Biodiversidade Marinha and CNPq-INCT-Redoxoma.

References

- AOAC 2001, Official Method 996.06. Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatography method (approved 1996, revised 2001).
- Aresta M, Dibenedetto A, Carone M, Colonna T, Fragale C 2005. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO2 extraction and thermochemical

liquefaction. Environ Chem Lett 3: 136-139.

- Bligh EG, Dyer WJ 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol 146*: 60-78.
- Cardozo KHM, Vessecchi R, Carvalho VM, Pinto E, Gates PJ, Colepicolo P, Galembeck SE, Lopes NP 2008. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. *Int J Mass Spectrom 273*: 11-19.
- Carrapiso AI, García C 2000. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids* 35: 1167-1177.
- Cequier-Sànchez E, Rodriguez C, Ravelo AG, Zàrate R 2008. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J Agric Food Chem 56*: 4297-4303.
- Chisti Y 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25: 294-306.
- Floreto EAT, Hirata H, Ando S, Yamasaki S 1993. Fatty acid composition of Ulva pertusa Kjellman (Chlorophyta) and Gracilaria incurvata Okamura (Rhodophyta) in Japanese coastal waters. Bot Mar 36: 217-222.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Gressler V, Colepicolo P, Pinto E 2009. Useful strategies for algal volatile analysis. *Current Anal Chem* 5: 271-292.
- Gressler V, Yokoya NS, Fujii MT, Colepicolo P, Mancini-Filho J, Torres RP, Pinto E 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chem 120*: 585-590.
- Gressler V, Fujii MT, Martins AP, Colepicolo P, Mancini-Filho J, Pinto E 2011. Biochemical composition of two red seaweed species grown on the Brazilian coast. J Sci Food Agric 91: 1687-1692.
- Guaratini T, Lopes NP, Pinto E, Colepicolo P, Gates P 2007. Differential ionisation of natural antioxidant polyenes in ESI and NanoESI mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Sp 21*: 3842-3848.
- Khotimchenko SV 1991. Fatty acid composition of seven Sargassum species. Phytochemistry 30: 2639-2641.
- Kumari P, Reddy CRK, Jha B 2011. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal Biochem* 415: 134-144.
- Marchetti JM, Miguel VU, Errazu AF 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renew Sust Energy Rev 11*: 1300-1311.

- Noviendri D, Jaswir I, Salleh HM, Taher M, Miyashita K, Ramli N 2011. Fucoxanthin extraction and fatty acid analysis of *Sargassum binderi* and *S. duplicatum. J Medic Plant Res 11*: 2405-2412.
- Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernandez J, Bozzo C, Navarrete E, Osorio A, Rios A 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica. Food Chem 99*: 98-104.
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Biores Technol 100*: 261-268.

Serdari A, Lois E, Stournas S 1999. Impact of esters of mono-

and dicarboxilic acids on diesel fuel quality. *Ind Eng Chem Res* 38: 3543-3548.

Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H 2011. Chemical composition and functional properties of Ulva lactuca seaweed collected in Tunisia. Food Chem 128: 895-901.

*Correspondence

Pio Colepicolo

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil, piocolep@iq.usp.br Tel. +55 11 3091 9048

ANEXO II

SÚMULA CURRICULAR

Aline Paternostro Martins

1. Formação:

2007 - Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

2004 - Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Metodista de São Paulo.

2. Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios:

2004 - Prêmio Aylthon Brandão Joly (Primeiro lugar, categoria graduação), Sociedade Brasileira de Ficologia.

2003 - Prêmio Frederico Carlos Hoehne (Primeiro lugar, categoria graduação), Instituto de Botânica.

3. Publicações:

1. Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Colepicolo, P. 2012. Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species. Revista Brasileira de Farmacognosia 22: 854-860.

2. Mendes, L.F.; Yokoya, N.S.; Martins, A.P.; Marinho-Soriano, E.; Colepicolo, P.; Vale, L.A.S. 2012. Influence of temperature, light and nutrients on the growth rates of the macroalga *Gracilaria domingensis* in synthetic seawater using experimental design. Journal of Applied Phycology 24: 1-8.

3. Gressler, V.; Fujii, M.T.; Martins, A.P.; Colepicolo, P.; Mancini-Filho, J.; Pinto, E. 2011. Biochemical composition of two red seaweed species grown on the Brazilian coast. Journal of the Science of Food and Agriculture 91: 1687-1692.

4. Martins, A.P.; Necchi Junior, O.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. 2011. Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). Revista Brasileira de Farmacognosia 21: 340-348.

5. Martins, A.P.; Yokoya, N.S. 2010. Intraspecific variation in the colour morphs of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. Hoehnea 37: 599-6163.

6. Martins, A.P.; Chow, F.F.; Yokoya, N.S. 2009. Ensaio in vitro da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta).. Revista Brasileira de Botânica 32: 635-645.

7. Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Carvalho, M.A.M.; Plastino, E.M. 2007. Effects of kinetin and nitrogen on growth rates, pigment and protein contents in wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). Journal of Applied Phycology 20: 767-773.

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

4. Artigos submetidos e em fase de redação:

1. Martins, A.P.; Braga, E.S.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Seawater inorganic nutrients removal by colour strains of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rodophyta). Artigo submetido no periódico "Environmental and Experimental Botany".

2. Photosynthetic characteristics and pigment content of Brazilian seaweeds. Será submetido no periódico "Photosynthesis Research".

3. Photosynthetic characteristics and biochemical composition of Antarctic seaweeds. Será submetido no periódico "Photosynthesis Research".

4. Biochemical composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. Será submetido no periódico "Bioresource Technology".

5. Effects of elevated CO₂, under nitrogen limitation and saturation conditions, on growth, metabolism and biochemical composition of *Dictyota menstrualis* (Dictyotales, Heterokontophyta).

5. Financiamentos:

- 1. Bolsa IC CNPq (05/2002 à 12/2004)
- 2. Bolsa Mestrado FAPESP (08/2005 à 07/2007)
- 3. Bolsa Doutorado CAPES (08/2008 à 07/2012)

6. Outras Informações:

1. Foi monitora de duas disciplinas: Biologia Molecular para o curso de Medicina da USP; e Bioquímica para o curso de Educação Física da USP.

2. Ministrou o curso "Medidas de fotossíntese: teoria e prática na fisiologia de macroalgas" e o treinamento do medidor de fotossíntese subaquático Diving-Pam nas seguintes instituições e eventos:

Universidad de Magallanes – Chile – 2011;

Laboratório de Biogeoquímica do Instituto de Biologia da UFRJ – RJ – 2011;

III Workshop da redealgas: Biodiversidade, Aplicações Tecnológicas e Sustentabilidade - Paty do Alferes – RJ – 2011;

Disciplina "Biologia de algas marinhas bentônicas" do Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo – SP – 2010;

II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas – Ilhabela – SP – 2009;

Laboratório de Ficologia - Universidade Federal de Santa Catarina – 2008.

3. Participou da organização do "II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade", realizado em 2009.

4. Resumos publicados em anais de congressos nos últimos três anos:

Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Colepicolo, P. Nutritional composition and photosynthetic rate of seaweeds from Ubatuba cost, Brazil. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu - PR. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011.

Martins, A.P.; Braga, E. S.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Avaliação do potencial biofiltrante de variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta) na remoção de nutrientes inorgânicos. In: Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010, Paraty - RJ. XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010.

Martins, A.P ; Braga, E.S ; Necchi Jr., O.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Nitrogen metabolism in colour strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia. Livro de resumos do XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2009. Faria, A.V.F.; Fujii, M.T.; Martins, A.P.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Efeitos de fatores ambientais no desenvolvimento de *Laurencia catarinensis* (Ceramiales, Rhodophyta). In: II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela.

Sanches, P.F.; Farias, J.N.; Martins, A.P.; Almeida, J.V.; Lima, C.A.; Colepicolo, P.; Horta, P. Ecofisiologia do rodolito *Lithothamnion superpositum* (Corallinales, Rhodophyta) - Conhecimento necessário para sua utilização sustentável e conservação. In: II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela.

Souza, J.M.C.; Martins, A.P.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Influência da interação entre citocininas e irradiância nas respostas fisiológicas e bioquímicas de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales). In: II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. São Paulo, 2009.

Tesima, K.E.; Martins, A.P.; Colepicolo, P.; Yokoya, N.S. Efeitos da disponibilidade de nitrato e das citocininas no crescimento e na fotossíntese de *Hypnea spinella* (Gigartinales, Rhodophyta). In: II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. São Paulo, 2009.

Tonon, A.P.; Martins, A.P.; Yokoya, N.S.; Oliveira, M.C.; Colepicolo, P. Análise de efeitos causados pelos metais cobre e cádmio na macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata*. In: II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, 2009, Ilhabela. II Workshop em Novos Bioativos e Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. São Paulo, 2009.