

LEVI POMPERMAYER MACHADO

**Determinação dos metabolitos com atividade
antifúngica e cultivo em biorreatores para
obtenção de bioativos de *Ochtodes
secundiramea* e de linhagens pigmentares de
Hypnea musciformis (Rhodophyta)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2014

LEVI POMPERMAYER MACHADO

**Determinação dos metabolitos com atividade
antifúngica e cultivo em biorreatores para
obtenção de bioativos de *Ochtodes
secundiramea* e de linhagens pigmentares de
Hypnea musciformis (Rhodophyta)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. NAIR SUMIE YOKOYA

COORIENTADOR: PIO COLEPICOLO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Machado, Levi Pompermayer

M149d Determinação dos metabolitos com atividade antifúngica e cultivo em biorreatores para obtenção de bioativos de *Ochtodes secundiramea* e de linhagens pigmentares de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) / Levi Pompermayer Machado -- São Paulo, 2014.
203 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014
Bibliografia.

1. Algas. 2. Fungos fitopatogênicos . 3. Monoterpenos halogenados. I. Título

CDU: 582.26

“A cura para tudo é sempre água salgada:
o suor, as lágrimas ou o mar”

Isak Dinesen

Agradecimentos

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais e meu irmão por serem meus melhores amigos além de serem as pessoas mais sábias e companheiras que forneceram todo o suporte para que eu fosse chegar ao presente momento, mesmo com tantas peculiaridades e dores de cabeça que proporcionei. Amor e admiração infinitos.

Dra. Nair Sumie Yokoya, minha orientadora, que aceitou o desafio de me supervisionar em uma tese com temas diversos à sua linha de pesquisa, agradeço toda dedicação e atenção tanto nos âmbitos acadêmicos e pessoais. Serei sempre grato.

Ao Dr. Pio Colepicolo Neto que me recebeu em seu laboratório e com a sua colaboração possibilitou a realização desse trabalho.

Dra. Luciana Retz de Carvalho que com toda sua dedicação e carinho foi mais que uma colaboradora deste projeto, abrindo as portas do seu laboratório para desenvolvimento da minha pesquisa e por dedicar muito do seu tempo para me capacitar para realização desta tese.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, especialmente as doutoras. Andréa Tucci, Mutue Fujji, Celia Sant'anna e Silvia Pitta pela constante atenção.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Ficologia pela convivência agradável, inúmeras conversas e boas risadas: João, Guilherme, Watson, Edna, Camila, Kléber, Fernanda, Luanda, Mayra, Ana Livia, Cecília, Jonatas Martinez e Cezar Pasqualeti.

Um agradecimento especial ao amigo das diversas moradias Guilherme Scotta, espero nunca mais passemos por tantos despejos, um baita abraço.

Aos diversos amigos (Day, Majoi, Thiara, Gisele, Simone's, Pedro, Michel, Talita Amador e inúmeros outros que se listar fica maior que a tese) e Sra. Dinorah que tive o prazer de conhecer nas diversas estadias no "aloja" do Instituto de Botânica.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ficologia Neide Pozo Rios de Souza, Neuzete Martins Oliveira, Elizete Mitico Mitsugui, José Domingos e Waldilene Maria pelo profissionalismo, simpatia e amizade.

A Dra. Maria Cláudia Marx Young do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pela agradável companhia e por toda colaboração que permitiu a realização dos ensaios antifúngicos.

A Dra. Daniela Milstein pela imensa amizade e todo entusiasmo nas inúmeras conversas nos mais diversos assuntos.

Aos amigos do Pio's lab Erika Stein, Cintia Simas, Helena Villela, Eliezer Stefanello, Cicero Alves, Luiza Grecco, Aline Martins, Angela Tonon, Ednailson Pereira, Dina Castelo e aos colaboradores diretos Daniel Andregretti e Leonardo Zambotti, obrigado por tornarem a vida científica algo muito dinâmico e agradável.

Agradeço aos meus grandes amigos (Beto, Cris, Grazi, Mau, Marcão, Lê, Jú, Flávia, Rodrigo, Mar Franz, Daniel Chile, Duda, Guima, Genim, PC, Indio, Leoni, Will e o fundador Edu Lobo) que fazem parte da família do surf bate-volta SP, que realmente me adotaram nesta cidade e foram determinantes para que eu conseguisse agüentar a distância do mar. Obrigado irmãos e essa história não acaba aqui.

Aos amigos eternos de Vitória que independente de quanto tempo em tenha ficado longe, estão sempre lá prontamente me esperando

A Laís Caneva pela companhia sempre constante e mais que especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela excepcional infra-estrutura e oportunidade de aprendizado e ampliação de conhecimentos.

À Capes pela bolsa concedida durante todo o período do Doutorado.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Siglas Abreviaturas e Símbolos..... | I |
| Lista de figuras..... | III |
| Lista de tabelas..... | IX |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Diversidade química das macroalgas marinhas..... | 1 |
| 1.2. Principais classes de metabolitos das macroalgas marinhas: funções ecológicas e potencial biotecnológico..... | 3 |
| 1.2.1. Aplicação das macroalgas na agricultura..... | 14 |
| 1.2.1.1. Aplicação como fertilizante ou estimulante de crescimento..... | 15 |
| 1.2.1.2. Aplicação como indutor de resistência a patógenos ou ao estresse causado por fatores ambientais..... | 16 |
| 1.2.1.3. Aplicação como inibidor de fitopatógenos..... | 16 |
| 1.2.1.4. Controle da antracnose do período pós-colheita do mamão..... | 17 |
| 1.2.2. Cultivo de algas em biorreatores..... | 19 |
| 1.3. Espécies de macroalgas selecionadas..... | 20 |
| 2. JUSTIFICATIVAS..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 4.1. Organismos estudados..... | 25 |
| 4.1.1. Macroalgas..... | 25 |
| 4.1.1.1. Linhagens pigmentares de <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V.Lamouroux..... | 25 |
| 4.1.1.2. Coleta e obtenção das culturas de <i>Ochtodes secundiramea</i> (Montagne) M.A.Howe..... | 26 |
| 4.1.1.3. Testes para o isolamento e crescimento de segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> | 30 |
| 4.1.2. Fungos fitopatogênicos..... | 32 |
| 4.2. Cultivo das macroalgas em biorreatores..... | 33 |
| 4.2.1. Efeito do enriquecimento com CO ₂ nas linhagens pigmentares de <i>H. musciformis</i> | 35 |
| 4.2.2. Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo de <i>O. secundiramea</i> | 40 |
| 4.3. Extração, fracionamento e determinação dos compostos bioativos..... | 49 |
| 4.3.1. Obtenção dos extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> e <i>O. secundiramea</i> | 50 |
| 4.3.2. Ensaio antifúngico..... | 53 |
| 4.3.2.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antifúngica pelo método de bioautografia..... | 54 |
| 4.3.3. Fracionamento guiado dos compostos com atividade antifúngica por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)..... | 55 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.3.4. | Purificação e caracterização dos metabolitos dos extratos e frações bioativas das macroalgas | 56 |
| 4.3.4.1. | Tratamentos realizados para os extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> | 56 |
| 4.3.4.2. | Tratamentos realizados para o extrato de <i>O. secundiramea</i> | 58 |
| 4.3.5. | Efeitos da aplicação do extrato e fração bioativa de <i>O. secundiramea</i> no controle da antracnose do mamão: testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 60 |
| 4.3.5.1. | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) <i>in vitro</i> para o fungo <i>C. gloeosporioides</i> | 60 |
| 4.3.5.2. | Avaliação da aplicação <i>in vivo</i> do extrato e da fração de <i>O. secundiramea</i> na forma de biofilme em frutos de mamão | 62 |
| 4.4. | Análises estatísticas dos dados..... | 67 |
| 5. | RESULTADOS | 67 |
| 5.1. | Obtenção e manutenção das culturas de <i>Ochtodes secundiramea</i> (Montagne) M.A.Howe .. | 67 |
| 5.1.1. | Testes para isolamento e crescimento de segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> | 69 |
| 5.2. | Experimentos em biorreatores | 74 |
| 5.2.1. | Efeito do enriquecimento com CO ₂ no cultivo das linhagens pigmentares de <i>H. musciformis</i> | 74 |
| 5.2.2. | Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo de <i>O. secundiramea</i> | 76 |
| 5.3. | Extração, fracionamento e determinação dos compostos bioativos..... | 80 |
| 5.3.1. | Obtenção dos extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> e <i>O. secundiramea</i> | 80 |
| 5.3.2. | Ensaio antifúngico | 82 |
| 5.3.2.1. | Avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antifúngica pelo método de bioautografia..... | 82 |
| 5.3.3. | Fracionamento guiado dos compostos com atividade antifúngica por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) | 88 |
| 5.3.4. | Isolamento e caracterização dos metabolitos dos extratos e frações bioativas das macroalgas | 90 |
| 5.3.4.1. | Tratamentos realizados para os extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> | 90 |
| 5.3.4.2. | Tratamentos realizados para os extratos <i>O. secundiramea</i> | 96 |
| 5.3.5. | Efeitos da aplicação do extrato e FB _{CCD} de <i>O. secundiramea</i> no controle da antracnose do mamão <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 110 |
| 5.3.5.1. | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) <i>in vitro</i> para o fungo <i>C. gloeosporioides</i> | 110 |
| 5.3.5.2. | Avaliação da aplicação <i>in vivo</i> do extrato e da fração de <i>O. secundiramea</i> na forma de biofilme em frutos de mamão..... | 111 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 115 |
| 6.1. | Linhagens de <i>Hypnea musciformis</i> | 115 |
| 6.1.1. | Efeito do enriquecimento com CO ₂ | 115 |
| 6.1.2. | Avaliação do efeito do enriquecimento com CO ₂ em cultivos nos biorreatores no perfil em CG/EM dos compostos com potencial antifúngico..... | 117 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 6.2. | <i>Ochtodes secundiramea</i> | 119 |
| 6.2.1. | Isolamento e crescimento em segmentos apicais..... | 120 |
| 6.2.2. | Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo | 122 |
| 6.2.3. | Análises químicas e de atividade antifúngica | 125 |
| 6.2.4. | Efeitos da aplicação do extrato e fração no controle da antracnose do mamão <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 130 |
| 6.2.4.1. | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) <i>in vitro</i> para o fungo <i>C. gloeosporioides</i> | 130 |
| 6.2.4.2. | Avaliação da aplicação <i>in vivo</i> do extrato da fração na forma de biofilme de amido em frutos de mamão..... | 131 |
| 7. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 134 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 138 |
| | RESUMO | 159 |
| | ABSTRACT | 162 |
| | ANEXOS..... | 165 |
| | Anexo A - Fragmentos de massa da análise CLAE/EM de alta resolução observado nas FB _{CCD} das linhagens de <i>Hypnea musciformis</i> | 165 |
| | Anexo B - Fragmentos de massa de CG/EM observados para <i>Ochtodes secundiramea</i> | 166 |
| | Anexo C - Espectros de RMN (¹ H e ¹³ C) da sub-fração OC II de <i>Ochtodes secundiramea</i> | 167 |
| | Anexo D - Espectros de RMN (¹ H e ¹³ C) da sub-fração OC III de <i>Ochtodes secundiramea</i> | 168 |
| | Anexo E - Espectros de RMN (¹ H) das sub-frações OC II2 e OC II3 de <i>Ochtodes secundiramea</i> | 169 |
| | Anexo F - Mapa de correlação COSY obtido para as sub-frações, do extrato de <i>Ochtodes secundiramea</i> , OC II e OC III juntamente com o esperado para os monoterpenos C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ Cl ₂ e C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl obtidos “NMR Predict” | 170 |
| | Anexo G - Artigo publicado “Comparative chemical analysis and antifungal activity of <i>Ochtodes secundiramea</i> (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods” Journal of Applied Phycology - 2014..... | 171 |
| | Anexo H - Artigo publicado “Chemical analysis and toxicity of seaweed extract with inhibitory activity against tropical fruits anthracnose fungi.” Journal of the Science of Food and Agriculture - 2013..... | 179 |

Siglas Abreviaturas e Símbolos

BDA - Meio a base de Batata, Dextrose e Ágar

BSA - *Bovine Serum Albumin*

BrPO - Enzima Bromoperoxidase

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CG/EM - Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

CL - Cromatografia Líquida em Coluna

CLAE/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Cloramina T - Sal de sódio de N-cloro-4-tolueno, sulfonamida

CO₂ - Dióxido de Carbono

DCM - Diclorometano

FB_{CCD} - Fração Bioativa da Cromatografia em Camada Delgada

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

LD - Limite de Detecção

MA - Linhagem Marrom (Fenótipo Selvagem) de *Hypnea musciformis*

MCD - 1,1-dimetil-4-cloro-3,3-ciclohexanodiona (monoclorodimedone)

MCD-Br - 1,1-dimetil-4-bromo, cloro-3,3-ciclohexanodiona (monoclorodimedone)

MeOH - Metanol

MSI - Molécula Sililada identificada

O₂ - Oxigênio

OC - *Ochtodes secundiramea*

PES - Solução de Nutrientes de Provasoli

PES/2 - Solução de Nutrientes de Provasoli, na Concentração de 50%

Rf - Fator de Retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

T_R - Tempo de Retenção

ups - Unidade Prática de Salinidade

VC - Linhagem Verde Clara (Fenótipo Deficiente em Ficoeritrina) de *Hypnea musciformis*

VSES - Solução de Nutrientes de von Stosch

VSES - Solução de Nutrientes de von Stosch, na Concentração de 50%

(v/v) - Relação Volume/Volume

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Exposição das macroalgas a fatores abióticos, A – quantidade e qualidade da luz (http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/rhodo/hypnea_musciformis.htm) acessado 05/2013; B - variação diária de maré (arquivo pessoal - Ponta do Seixas - PB) e C - exposição ao dessecação que causa alterações de pH, temperatura, salinidade e nutrientes (http://european-marine-life.org/52/photo-dilsea-carnosa-jcj11.php) acessado 07/2012..... | 1 |
| Figura 2 - Exposição das macroalgas a fatores bióticos, A - <i>Acrochaetium</i> sp. epifitando uma <i>Gracilaria</i> sp., B - pressão de herbivoria sobre a comunidade das macroalgas (http://www.tamar.org.br/interna.php?cod=116) acessado 05/2014 e C - Competição interespecífica (http://www.seymouraquariums.com/adding_fish_saltwater2.htm) acessado em 06/2013. | 2 |
| Figura 3 - Vias de síntese das principais classes de metabolitos primários e secundários em plantas (Maschek & Baker, 2008, modificado)..... | 4 |
| Figura 4 - Estruturas químicas de heterosídeos presentes nas algas vermelhas. | 6 |
| Figura 5 - Estruturas químicas dos polissacarídeos encontrados em Rhodophyta, a - Ágar; b - Carragenana..... | 7 |
| Figura 6 - Principais tipos de terpenos verificados em macroalgas. | 8 |
| Figura 7 - Exemplos de ácidos graxos comuns às macroalgas..... | 9 |
| Figura 8 - Principais compostos derivados da via do chiquimato. | 10 |
| Figura 9 - Metabolitos nitrogenados isolados de macroalgas..... | 11 |
| Figura 10 - Compostos halogenados de diferentes classes de metabolitos. | 14 |
| Figura 11 - Fruto de mamão apresentando a necrose típica da antracnose pós-colheita..... | 18 |
| Figura 12 - Segmento apical de <i>O. secundiramea</i> após duas semanas de cultivo em laboratório em meio VSES/2, de 24 ± 2 °C, irradiância de 10 ± 5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 14:10 h luz:escuro (L:E). Apresentando as algas epífitas: 1 - <i>Acrochaetium</i> sp., 2 - <i>Erythrotrichia</i> sp., 3 - <i>Ulva</i> sp., 4 - <i>Sahlingia</i> sp e 5 - biomassa crescida de <i>O. secundiramea</i> | 29 |
| Figura 13 - Matrizes dos fungos utilizados nos experimentos de bioatividade A - <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , B - <i>Colletotrichum lagenarium</i> e C - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 32 |
| Figura 14 - Conídios do fungo <i>Colletotrichum lagenarium</i> (A) e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (B) analisados em câmara de Neubauer. Escala = 0,02 mm..... | 33 |
| Figura 15 - Estrutura do modelo TE-BIT-E3 (TECNAL [®]), A – Sistema de aquisição dos dados; B – Sistema de controle; C – Compressor para injeção de ar no sistema; D – Estrutura para filtragem e umidificação do ar; E – Sistema dos vasos de cultura, as macroalgas e os sensores. | 35 |
| Figura 16 - Médias diárias das concentrações de CO ₂ e O ₂ dissolvido (mg.L ⁻¹) e os valores de pH e temperatura (°C) nos biorreatores com as culturas das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H. musciformis</i> ao longo 21 dias de cultivo em resposta as condições controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min ⁻¹ de CO ₂). Barras indicam desvio padrão das medições diárias (registradas a cada 4 minutos) ao longo dos 21 dias de experimento..... | 36 |
| Figura 17 - Curva padrão da absorbância para diferentes concentrações de (albumina sérica bovina) com a equação para determinação das proteínas solúveis totais no talo das algas..... | 39 |
| Figura 18- Curva padrão da absorbância para diferentes concentrações de glicose com a equação para determinação dos açúcares solúveis totais no talo das algas..... | 40 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 - Médias diárias das concentrações de CO ₂ e O ₂ dissolvido (mg.L ⁻¹) e os valores de pH e temperatura (°C) nos biorreatores com as culturas de <i>O. secundiramea</i> ao longo 21 dias de cultivo em resposta as condições controle (50 mg.L ⁻¹) e o tratamento (250 mg.L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L ⁻¹) de KBr. Barras indicam desvio padrão das medições diárias (registradas a cada 4 minutos) ao longo dos 21 dias de experimento. | 42 |
| Figura 20- Curva padrão da absorvância para diferentes concentrações de KBr com a equação para determinação de bromo no meio de cultura e no talo de <i>O. secundiramea</i> | 43 |
| Figura 21 - Concentração de bromo (mg.L ⁻¹) no meio de cultura durante 21 dias, sem a presença de <i>O. secundiramea</i> nos frascos, mantidos nas seguintes condições: irradiância de 60 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3)..... | 44 |
| Figura 22- Esquema da bromação do MCD na forma enólica em meio contendo BrPO (bromoperoxidase) e H ₂ O ₂ . Ocorrendo a quebra dupla ligação gerando o MCD-Br com redução da absorvância a 290 nm. | 46 |
| Figura 23- Fluxograma de obtenção dos extratos e atividades desenvolvidas para cada cultivo das linhagens de <i>H. musciformis</i> | 51 |
| Figura 24 - Fluxograma de obtenção dos extratos e atividades desenvolvidas para cada coleta e cultivo de <i>O. secundiramea</i> | 52 |
| Figura 25 - Fluxograma dos tratamentos da biomassa das algas para obtenção dos extratos. Para a espécie <i>O. secundiramea</i> e as linhagens de <i>H. musciformis</i> foram realizados a extração a partir da biomassa fresca (T1), liofilizada (T2) e seca a 50 °C (T3)..... | 53 |
| Figura 26 - Placa de microtitulação tipo ELISA de 96 poços contendo meio BDA e o extrato de <i>O. secundiramea</i> nas concentrações de 150, 100, 50, 25, 15, 10, 5 e 0 (apenas o solvente DCM) μg.mL ⁻¹ | 61 |
| Figura 27 - Aspecto dos frutos antes da aplicação do biofilme de amido (T0)..... | 64 |
| Figura 28 - Aspecto dos frutos, durante a simulação do período de prateleira 64 | 64 |
| Figura 29 - Texturômetro TA-XT2 utilizado para a determinação da firmeza da polpa e resistência da casca dos frutos de mamão em resposta a aplicação de biofilme enriquecido com extrato e FB _{CCD} de <i>O. secundiramea</i> | 66 |
| Figura 30 - Gametófito feminino de <i>O. secundiramea</i> com cistocarpos (A). Carpósporos liberados após 24 h (B). | 67 |
| Figura 31 - Germinação dos esporos da alga vermelha <i>Acrochaetium infestans</i> apresentando o padrão de germinação do tipo Nematium, após 48 h. | 68 |
| Figura 32 - Plântulas eretas com 4 dias (A), formação de monosporângios após 6 dias (B), estabelecimento de cultura de <i>Acrochaetium infestans</i> em laboratório obtidas a partir da germinação de esporos (C)..... | 68 |
| Figura 33 - Taxa de crescimento dos segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> em resposta a diferentes concentrações de nutrientes após 21 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 15 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 69 |
| Figura 34 - Taxa de crescimento (%.d ⁻¹) dos segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> em porcentagem de biomassa por dia em respostas a diferentes níveis de irradiância após 21 dias cultivadas nas seguintes condições: meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo | |

| | |
|--|----|
| 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância..... | 70 |
| Figura 35 - Segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> em resposta a diferentes níveis de irradiância. Algas do lado esquerdo ilustram a condição inicial e no lado direito correspondem a algas após 21 dias de cultivo nas seguintes condições: meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E)..... | 71 |
| Figura 36 - Taxa de crescimento dos segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> em porcentagem de biomassa por dia em respostas a aeração com 0,5 L.min ⁻¹ de ar úmido e o controle com cultura estagnada após 21 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 30 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 72 |
| Figura 37 - Segmentos apicais de <i>O. secundiramea</i> cultivados de forma estagnada e sob aeração com 0,5 L.min ⁻¹ de ar úmido, algas do lado esquerdo ilustram a condição inicial e no lado direito após 21 dias de cultivo irradiância nas seguintes condições: irradiância de 30 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E)..... | 72 |
| Figura 38 - Desenvolvimento da cultura de <i>O. secundiramea</i> , realizada com 30 μmol fótons m ² .s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). A - Aspecto geral de <i>O. secundiramea</i> após a coleta; B. Segmento apical inicial com 2 cm; C. Segmentos apicais com 4 semanas, com setas indicam os epífitas macroalgas, 1 - <i>Acrochaetium</i> sp., 2 - <i>Erythrotrichia</i> sp., 3 - <i>Ulva</i> sp., D - Formação de ápices de <i>O. secundiramea</i> após 5 semanas, E - Ápices seccionados, F - desenvolvimento dos ápices após 6 semanas; G - Cultura de <i>O. secundiramea</i> estabelecida após 8 semanas..... | 73 |
| Figura 39 - Taxa de crescimento das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H. musciformis</i> após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min ⁻¹ de CO ₂) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 74 |
| Figura 40 - Curva de crescimento por aumento da biomassa fresca em (%) das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H. musciformis</i> após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min ⁻¹ de CO ₂) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 75 |
| Figura 41 - Concentração de média pigmento, proteínas e açúcares totais (mg.g ⁻¹) nos talos das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H. musciformis</i> após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min ⁻¹ de CO ₂) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 76 |
| Figura 42 - Taxa de crescimento (%.d ⁻¹) e curva de crescimento por incremento da biomassa fresca em (%) de <i>O. secundiramea</i> após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L ⁻¹) e ao tratamento (250 mg.L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L ⁻¹) de KBr, cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹ , meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). | 77 |

- Figura 43 - Taxa de crescimento (%.d⁻¹) e curva de crescimento por aumento da biomassa fresca (%) de *O. secundiramea* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr), cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹, /2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância. 78
- Figura 44 - Concentração de bromo (mg.L⁻¹) no meio de cultura após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr, cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹, meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). 79
- Figura 45 - Concentração de bromo (mg.g⁻¹) nos talos de *O. secundiramea* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância. 79
- Figura 46 - Atividade específica da enzima bromoperoxidase em unidades de enzima (U.mg⁻¹), onde unidade definida pela conversão de 1 micromol de MCD a MCD-Br por minuto em ph 6,4 a 25 °C) e concentração da enzima (μg.g⁻¹), ambos por grama de massa seca da alga. Após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr. Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância. 80
- Figura 47 - Bioautografia realizada com 500 μg dos extratos das linhagens de *Hypnea musciformis* contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel. 1- extrato da linhagem MA extração com biomassa fresca; 2 - extrato da linhagem MA extração com biomassa liofilizada; 3 - extrato da linhagem MA extração com biomassa seca; 4 - extrato da linhagem VC, extração com biomassa fresca; 5 - extrato da linhagem VC, extração com biomassa liofilizada; 6 - extrato da linhagem VC extração com biomassa seca. Os extratos foram eluídos com os solvente DCM:MeOH (95:5 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel..... 82
- Figura 48 - Bioautografia realizada com 100 μg dos extratos da alga *Ochtodes secundiramea* contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel. 1 - extrato da alga coletada em 2010 (SP401694), extração com biomassa fresca; 2 - extrato da alga coletada em 2011 (SP401695), extração com biomassa fresca; 3 - extrato da coletada em 2011, extração com biomassa liofilizada e 4 - extrato da alga coletada em 2011, extração com biomassa seca. Os extratos foram eluídos com os solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel..... 84
- Figura 49 - Bioautografia qualitativa realizada com 100 μg dos extratos de *Ochtodes secundiramea* e 500 μg das linhagens de *Hypnea musciformis*, provenientes dos cultivos em biorreatores, contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum* em CCD de sílica gel. 1 - extrato de *O. secundiramea* proveniente do controle (algas cultivada a 50 mg.L⁻¹ de bromo); 2 - extrato de *O. secundiramea* proveniente de tratamento (algas cultivada a 250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹ de bromo); 3 - extrato da linhagem marrom proveniente do controle (algas cultivada a 0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 4 - extrato da linhagem marrom proveniente do tratamento (algas cultivada a 5,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 5 - extrato da linhagem verde clara proveniente do controle (algas cultivada a 0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 6 - extrato da linhagem verde clara proveniente do tratamento (algas cultivada a 5,5 mg.L⁻¹ de CO₂). ... 85

| | |
|--|----|
| Figura 50 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i> em CCD de sílica gel para o extrato de <i>Ochtodes secundiramea</i> (SP401694), nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg..... | 86 |
| Figura 51 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i> em CCD de sílica gel para o extrato de <i>O. secundiramea</i> (SP401695) nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 µg obtidos a partir de diferentes métodos de processamento da biomassa: alga fresca (1), liofilizada (2) e seca (3). | 86 |
| Figura 52 - Determinação do limite de detecção da atividade por bioautografia com o fungo <i>C. sphaerospermum</i> em CCD de sílica gel para os extratos das linhagens <i>Hypnea musciformis</i> nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 10 µg obtidos a partir de diferentes métodos de processamento da biomassa: alga fresca (1), liofilizada (2) e seca (3). | 87 |
| Figura 53 - Limite de detecção da atividade antifúngica contra o fungo <i>Cladosporium sphaerospermum</i> dos extratos de <i>Ochtodes secundiramea</i> e das linhagens de <i>Hypnea musciformis</i> , provenientes dos cultivos em biorreatores, em CCD de sílica gel. 1 - extrato de <i>O. secundiramea</i> proveniente do controle (cultivada a 50 mg.L ⁻¹ de bromo); 2 - extrato de <i>O. secundiramea</i> proveniente do tratamento (cultivada a 250 mg.L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L ⁻¹ de bromo); 3 - extrato da linhagem marrom proveniente do controle (cultivada a 0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂); 4 - extrato da linhagem marrom proveniente do tratamento (cultivada a 5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂); 5 - extrato da linhagem verde clara proveniente do controle (cultivada a 0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂); 6 - extrato da linhagem verde clara proveniente do tratamento (cultivada a 5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂). | 88 |
| Figura 54 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i> em CCD de sílica gel para a fração bioativa do extrato de <i>Ochtodes secundiramea</i> (SP401694), nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg..... | 89 |
| Figura 55 - Cromatogramas em CG/EM dos extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> , cultivadas em biorreatores, em resposta aos diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca)..... | 90 |
| Figura 56 - Cromatograma em CG/EM do extrato sililados das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H.musciformis</i> cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂) e tratamento (5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂). | 92 |
| Figura 57 - Cromatograma em CLAE/EM da FB _{CCD} (Rf - 0,7, 0,4 e 0,1) das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H.musciformis</i> cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂); e tratamento (5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂). | 94 |
| Figura 58 - Derivatização com <i>p</i> - hidroxibenzaldeído do extrato orgânico de <i>O. secundiramea</i> em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), apresentando manchas com as cores azul rosa e roxa. | 96 |
| Figura 59 - Derivatização com <i>p</i> - hidroxibenzaldeído das frações provenientes de LC em coluna de sephadex (I) da FB _{CCD} do extrato de <i>O. secundiramea</i> em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), revelando as frações com as cores azul rosa e roxa. | 97 |
| Figura 60 - Derivatização com <i>p</i> - hidroxibenzaldeído das frações provenientes de LC em coluna de sílica (II) da FB _{CCD} do extrato de <i>O. secundiramea</i> em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254) (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), revelando as frações com as cores rosa e roxa. | 98 |
| Figura 61 - Determinação da CIM por bioautografia com os fungos <i>C. sphaerospermum</i> , em CCD de sílica gel (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), para as sub-frações OC I, OC II 1, OC II 2 OC II 3 | |

| | |
|--|-----|
| provenientes de CL da fração bioativa CCD de <i>O. secundiramea</i> nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg..... | 99 |
| Figura 62 - Cromatograma em CG/EM do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694). | 100 |
| Figura 63 - Cromatograma em CG/EM do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2011 (SP401695) em resposta aos diferentes métodos de processamento da biomassa (F - fresca; L - liofilizada e S - seca)..... | 102 |
| Figura 64 - Cromatograma em CG/EM da fração FB _{CCD} obtida pela cromatografia preparativa de 250 mg do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694)..... | 103 |
| Figura 65 - Cromatograma em CG/EM das sub-frações OC II, OC III, OC II2 e OC II3 obtidas em cromatografia líquida em coluna de sephadex (I) e sílica gel (II) da FB _{CCD} do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694). | 105 |
| Figura 66 - Cromatograma dos extratos de <i>Ochtodes secundiramea</i> provenientes dos cultivos em biorreator nas condições de controle (cultivada a 50 mg.L ⁻¹ de bromo) e tratamento (cultivada a 250 mg.L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L ⁻¹ de bromo)..... | 109 |
| Figura 67 - Placa de microtitulação tipo ELISA de 96 poços contendo meio BDA e o extrato de <i>O. secundiramea</i> nas concentrações de 150, 100, 50, 25, 15, 10, 5 e 0 (apenas o solvente DCM) µg.mL ⁻¹ | 111 |
| Figura 68 - Avaliação dos parâmetros de qualidade do período de prateleira (durante 0, 3 e 6 dias) em frutos de mamão em resposta a aplicação de biofilme de amido contendo extrato e FB _{CCD} de <i>O. secundiramea</i> (SP401694). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância. | 113 |
| Figura 69 - Avaliação visual dos frutos ao terceiro e sexto dias na simulação do período de prateleira em resposta a aplicação de biofilme de amido contendo extrato e FB _{CCD} de <i>O. secundiramea</i> (SP401694)..... | 114 |
| Figura 70 - Fruto de mamão (condição controle) apresentando marcas típicas da antracnose com mais de 2 cm de diâmetro, caracterizado como nota 3 na escala de índice de doença. | 115 |

Lista de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Composição química da solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996)..... | 27 |
| Tabela 2 - Equações utilizadas para quantificar as concentrações de ficobiliproteínas e clorofila a (em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) segundo Kursar et al (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975), respectivamente..... | 38 |
| Tabela 3 - Rendimento da obtenção dos extratos em (%) relativa a quantidade de extrato obtida pela biomassa de alga utilizada (g). Dados referentes a extratos provenientes de biomassa submetida a diferentes métodos de processamento e da biomassa produzida após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle e tratamento em <i>Ochtodes secundiramea</i> e nas linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>Hypnea musciformis</i> . Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância. | 81 |
| Tabela 4 - Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antifúngico contra os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i> determinadas pelo teste de bioautografia de 500 μg dos extratos das linhagens de <i>Hypnea musciformis</i> provenientes de diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca). Os extratos foram eluídos com a mistura de solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel..... | 83 |
| Tabela 5 - Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antifúngico contra os fungos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i> determinadas pelo teste de bioautografia de 100 μg do extrato de <i>Ochtodes secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694) e coletada em 2011 (SP401695) para a qual foram testados diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca). Os extratos foram eluídos com os solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel. | 84 |
| Tabela 6 - Quantidade de fração (mg) e rendimento (%) obtidos para fracionamento guiado para cada Rf das manchas com atividade antifúngica em CCD preparativa para 20 mg dos extratos das linhagens de <i>H. musciformis</i> cultivadas em biorreatores. | 89 |
| Tabela 7 - Tempo de retenção (RT), área (%), molécula sililada identificada (MSI) índices de Kovats da literatura e o observado (IK_{Lit} e IK_{Obs}), fragmentos de massa e metabolito correspondente na base de dados NIST do picos observados na análise em CG/EM do extrato sililados das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>Hypnea musciformis</i> cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2), e tratamento (5,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2)..... | 93 |
| Tabela 8 - Tempo de retenção (RT), área (%), íon molecular e principais fragmentos de massa correspondente cada pico observado no cromatograma da análise em CLAE/EM das FB_{CCD} 0,7, 0,4 e 0,1 das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de <i>H. musciformis</i> cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2); e tratamento (5,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CO_2). | 95 |
| Tabela 9 - Dados referentes a cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694)..... | 100 |
| Tabela 10 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM dos extratos de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2011 (SP401695) proveniente de biomassa submetida a diferentes métodos de processamento. | 103 |
| Tabela 11 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM da FB_{CCD} do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694)..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 12 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM nas sub-frações da FB _{CCD} do extrato de <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694). | 106 |
| Tabela 13 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM dos extratos de <i>O. secundiramea</i> provenientes dos cultivos em biorreator nas condições de controle (cultivada a 50 mg.L ⁻¹ de bromo) e tratamento (cultivada a 250 mg.L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L ⁻¹ de bromo). | 110 |
| Tabela 14 - Dados comparativos de deslocamento (δ ppm) em RMN ¹³ C e ¹ H na análise de RMN do Ochtodeno (monoterpeno tetrahalogenado) em CDCl ₃ isolado de <i>O. secundiramea</i> (McConnel & Fenical, 1978) e os resultados verificados para a subfração OC II (presente estudo), juntamente com a estrutura proposta para molécula com base na bibliografia. | 128 |
| Tabela 15 - Dados comparativos de deslocamento (δ ppm) em RMN ¹³ C e ¹ H na análise de RMN do 1-2 Dibromo-9 cloro, metileno-10 metil, ohtodeno (monoterpeno trihalogenado) em CDCl ₃ isolado de <i>O. secundiramea</i> (Coll & Wright, 1987) e os resultados verificados para a subfração OC III (presente estudo), juntamente com a estrutura proposta para molécula com base na bibliografia | 129 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diversidade química das macroalgas marinhas

As macroalgas da divisão Rhodophyta são predominantemente marinhas com poucos representantes de água doce, sendo mais abundantes em ambientes costeiros tropicais, e compõem o grupo com maior diversidade de espécies e hábitos entre as macroalgas (Van de Hoek, 1995).

Os ambientes marinhos são extremamente dinâmicos, com alterações diárias de marés, influência de ondas, influência de chuvas e predominância de correntes marinhas específicas nas diferentes estações do ano. Essas variáveis expõem a comunidade de macroalgas marinhas bentônicas a condições extremas em relação à disponibilidade de nutrientes, pH, salinidade, temperatura, potencial hídrico, intensidade luminosa e radiação ultra-violeta (figura 1) (Lobban & Harrison, 2004).



Figura 1 - Exposição das macroalgas a fatores abióticos, A – quantidade e qualidade da luz (http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/rhodo/hypnea_musciformis.htm) acessado 05/2013; B - variação diária de maré (arquivo pessoal - Ponta do Seixas - PB) e C - exposição ao dessecação que causa alterações de pH, temperatura, salinidade e nutrientes (<http://european-marine-life.org/52/photo-dilsea-carnososa-jcjl1.php>) acessado 07/2012.

O dinamismo e a complexidade do ambiente marinho se refletem ainda nas interações bióticas (figura 2). As macroalgas representam um elo fundamental na estrutura das

comunidades marinhas, mantendo relações de competição intra e interespecíficas, epifitismo, herbivoria e parasitismo (Lobban & Harrison, 2004).



Figura 2 - Exposição das macroalgas a fatores bióticos, A - *Acrochaetium* sp. epifitando uma *Gracilaria* sp., B - pressão de herbivoria sobre a comunidade das macroalgas (<http://www.tamar.org.br/interna.php?cod=116>) acessado 05/2014 e C - Competição interespecífica (http://www.seymouraquariums.com/adding_fish_saltwater2.htm) acessado em 06/2013.

Diversos modelos ou teorias foram elaborados e testados na tentativa de explicar o padrão de variação e abundância dos metabolitos, buscando fundamentos nas relações ecológicas, nos mecanismos fisiológicos ou ainda em razões evolutivas para explicar esta variabilidade (Lerdau & Coley, 2008, Cronin, 2001).

- *Modelo de defesa ótimo* - Metabolitos concentrados de acordo com a importância da estrutura ou tecido, para o organismo;
- *Balanço crescimento/diferenciação* - Similar ao modelo anterior, no qual é inferido que regiões, do talo, diferenciadas exigem mais defesas químicas do que as de crescimento;
- *Balanço carbono/nutrientes* - A limitação de nutrientes proporciona a existência de excedente de carbono, que é convertido para vias de metabolismo secundário;
- *Estresse ambiental* - Nessas condições a alga responde com manutenção do metabolismo básico, reduzindo dessa forma a diversidade química;

- *Disponibilidade de recursos* - Oposto ao anterior, afirmando que em ambientes com poucos recursos promovem aumento nos metabolitos de defesa, visto que a limitação dos recursos faz com que perda de partes da alga não seja prontamente recuperada.

1.2. Principais classes de metabolitos das macroalgas marinhas: funções ecológicas e potencial biotecnológico

A sobrevivência e o sucesso reprodutivo dos seres vivos estão relacionados a adaptações ao ambiente, que abrangem as suas características físicas e bioquímicas, como mudanças estruturais e produção de substâncias químicas que podem ser oriundas do metabolismo primário ou secundário (Pianka 1999).

Em geral, as vias metabólicas das algas (figura 3) são semelhantes às observadas nos vegetais terrestres, sendo compostas pela síntese de ácidos nucléicos, carboidratos, polissacarídeos e proteínas no metabolismo primário, e as vias dos isoprenóides, acetogeninas e chiquimato no metabolismo secundário (Paul & Puglisi, 2004).

Em paralelo, estudos demonstram a existência de diferentes vias metabólicas para as algas em relação a plantas terrestres e outros organismos. Estas diferenças são reflexos de características evolutivas, fator que propicia a existência de compostos diferenciados em macroalgas (Miller et al., 2012).

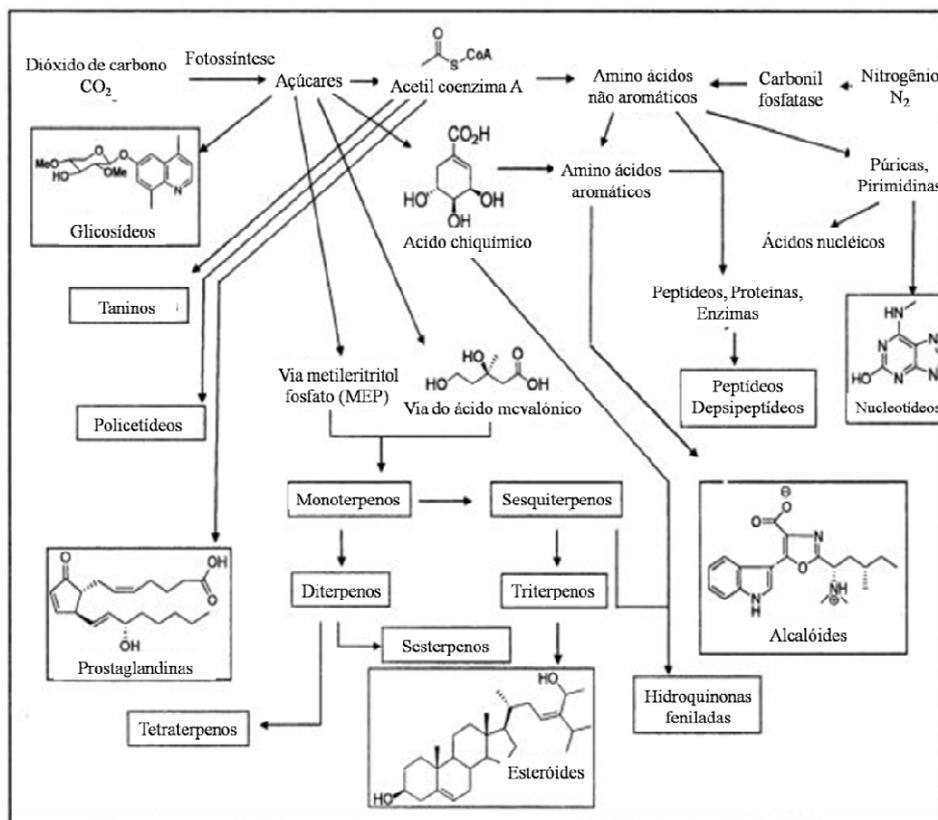


Figura 3 - Vias de síntese das principais classes de metabolitos primários e secundários em plantas (Maschek & Baker, 2008, modificado).

A comunidade das macroalgas responde a essa complexa interação de fatores com a produção de metabolitos primários, que compreendem grandes moléculas, por exemplo, polissacarídeos, proteínas e lipídeos e também metabolitos classificados como secundários, por apresentarem funcionalidade menos explícita e não estarem diretamente envolvidos na estruturação e manutenção de condições vitais. No entanto, os metabolitos secundários podem ser essenciais por proporcionarem respostas às extremas condições ambientais (Hay, 2009, Maschek & Baker, 2008, Harper et. al., 2001).

Além disso, o ambiente marinho apresenta ainda algumas especificidades em sua composição química, produzindo reflexos significativos na ecofisiologia da macroalgas. Dentre esses fatores destaca-se a disponibilidade de íons sulfato, o cloreto, o brometo e o iodeto, em concentrações de 885, 19000, 65, e 0,06 mg.L⁻¹, respectivamente (Carvalho &

Roque, 2000). Para sobreviver em um ambiente tão competitivo as macroalgas produzem um nível significativo de estruturas químicas por meio de variadas vias metabólicas. Estes compostos apresentam funções biológicas e ecológicas (Misurcová, 2011), que podem estar associadas a potenciais aplicações biotecnológicas (Cardozo et al., 2007).

Desde a década de 1970 as investigações bioquímicas se concentraram em três áreas de pesquisa: toxinas, produtos naturais e ecologia química. Os estudos com metabolitos derivados de organismos marinhos resultaram no isolamento de 15.000 compostos inéditos com inúmeras aplicações (Cardozo et al., 2007).

A pesquisa com produtos naturais continua atrativa, mesmo após o desenvolvimento da aplicação de processos de síntese orgânica, pois proporcionam a descoberta de novos esqueletos carbônicos e grupos funcionais pouco comuns (Silva, 2009).

A diversidade de classes dos metabolitos produzidos por macroalgas, que apresentam funções ecológicas ou para o equilíbrio ecofisiológico podem adicionalmente possuir potencial aplicação em indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e na agricultura (Smit, 2004; Cardozo et al. 2007; Craigie, 2011). Este potencial é associado às atividades antibacteriana (Lima-Filho et al., 2002), antifúngica (Machado et al., 2011), antiviral (Mendes et al., 2012), anti-helmíntica (Davyt et al., 1998) e apresentar ação citotóxica contra organismos marinhos (Lulhier et al., 2006) e contra células tumorais (Fuller et al., 1992).

Classe dos carboidratos

As rodofíceas marinhas possuem os carboidratos como principais produtos metabólicos. Esses organismos produzem todos os monossacarídeos derivados de aldose (5 carbonos) ou cetose (6 carbonos) comumente encontrados em vegetais superiores.

Como compostos de reserva as macroalgas vermelhas apresentam os heterosídeos (figura 4) formados a partir de galactose e glicerol [α -D galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol], denominado de floridosídeo, e seus isômeros de posição D-isofloridosídeo e L-isofloridosídeo. Também pode ser encontrado o heterosídeo formado por manose e ácido glicérico [α -D manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato], denominado digeneasídeo (Carvalho & Roque, 2004).

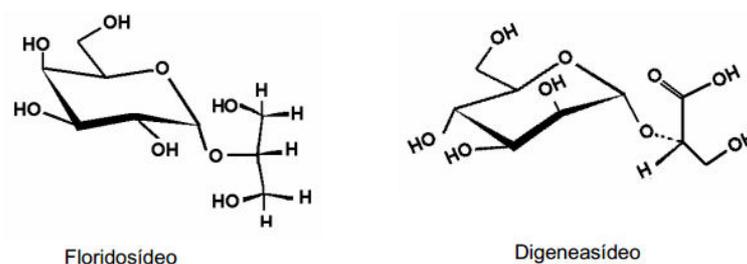


Figura 4 - Estruturas químicas de heterosídeos presentes nas algas vermelhas.

Estes açúcares podem estar ainda associados a outras moléculas formando o grupo dos compostos glicosilados, que atuam com juntamente a membrana plasmática regulando a fluidez, permeabilidade bem como atuando na forma de receptores ou sinalizadores enzimáticos (Lobban & Harrison, 2004, Kavganko & Kashkan, 1999).

A presença de polissacarídeos sulfatados é outra diferença bioquímica entre macroalgas e outros vegetais. Esse grupo de moléculas é formado por unidades de 3,6-anidrogactose e de grupos sulfato. Essa estrutura dá origem a carragenana e ágar (figura 5) localizados na matriz extracelular das algas, fornecendo resistência mecânica ao talo e proteção contra herbívoros e patógenos (Bixler & Porse, 2010, Cardozo et al., 2007).

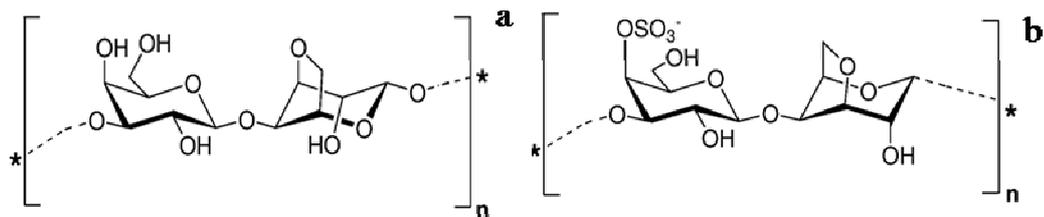


Figura 5 - Estruturas químicas dos polissacarídeos encontrados em Rhodophyta, a - Ágar; b - Carragenana.

Atualmente destaca-se o elevado interesse nos carboidratos de macroalgas devido ao potencial de gelificação, propriedades emulsificantes e estabilizantes promoveu a intensa investigação quanto à exploração dessas substâncias fazendo desta classe de metabolitos a mais estudada dentre as verificados nas macroalgas (Cardozo et al., 2007). Adicionalmente, para estas substâncias, são descritas os potenciais: antioxidante, antiviral, antitumoral e anticoagulante (Mayer & Hamann, 2004, Smit, 2004, Mayer & Lehmann, 2001).

Classe dos Terpenóides

A origem dos metabolitos desta classe ocorre por duas diferentes vias (1) via do mevalonato e (2) via do metileritriol fosfato. Em (1) a união de moléculas de acetil-coenzima A formam o ácido mevalônico que por ação de enzimas é convertido a isopentenil - difosfato (IPP), molécula de 5 carbonos precursora dos monoterpênos. Na via (2) a combinação de uma molécula de piruvato e uma de gliceraldeído - fosfato resultam no metileritriol fosfato, que por perda das hidroxilas se converte ao IPP descrito na via anterior (Mann, 1994).

A biossíntese, encadeamento do IPP e posteriores formações de compostos cíclicos e adição de grupos funcionais por ações enzimáticas, promovem extrema diversidade estrutural para esta classe de metabolitos. Os terpenos (figura 6) são classificados de acordo com o

número de unidades de IPP, variando do monoterpeno (C₁₀) correspondente a duas unidades de IPP aos tetraterpenos (C₄₀) com 8 unidades de IPP (Teixeira, 2013).

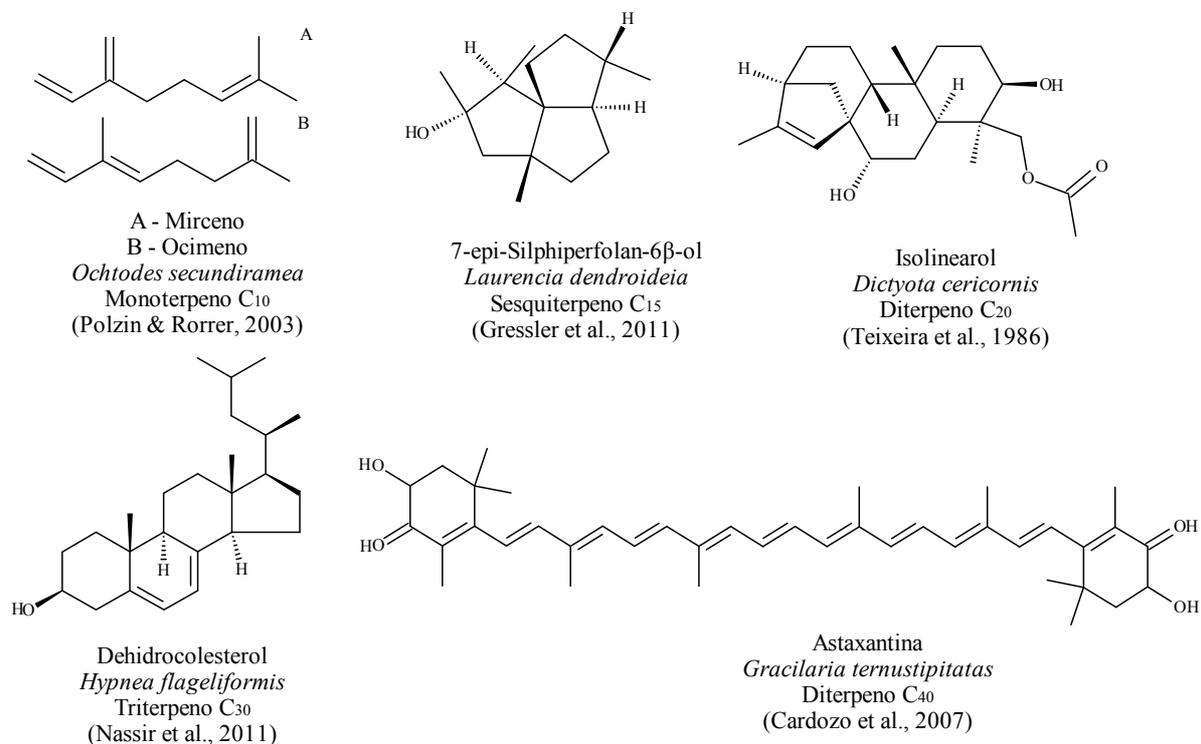


Figura 6 - Principais tipos de terpenos verificados em macroalgas.

Os terpenos, em alguns gêneros de macroalgas, podem representar 50% do peso seco (Teixeira et al. 1991). Esta classe de moléculas é acumulada pelas algas devido as funções defensivas (Paul, et al. 1987), hormonal (Stirk et al. 2003), fotoprotetora, antioxidante (Cardozo et al. 2007), anti-epifitismo e anti-incrustante (Gama et al., 2014).

As inúmeras funções biológicas refletem na possibilidade da aplicação dos terpenos como bioativos. Para esta classe foi determinada ação inibitória sobre bactérias, fungos e vírus (Teixeira, 2013) e suas funções antioxidantes e bioestimulantes apresentam potencial para aplicação como produtos naturais na agricultura e medicina (Khan et al., 2009, Cardozo et al., 2007, Smit, 2004).

Classe dos ácidos graxos

A síntese desses metabolitos é baseada na condensação de moléculas de acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. Esses precursores são combinados pela ação da enzima síntase dos ácidos graxos. A posterior ação das enzimas do tipo descarboxilase e desidrogenase promovem a elongação das moléculas e formação das insaturações (Dijkstra et al. 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados (figura 7) correspondem uma das principais classes de moléculas desempenham funções no metabolismo celular e do tecido, incluindo a regulação da fluidez da membrana, transporte de elétrons e de oxigênio, bem como adaptação térmica ao ambiente, ocorrendo em diversas espécies de macroalgas (Cardozo et al., 2007).

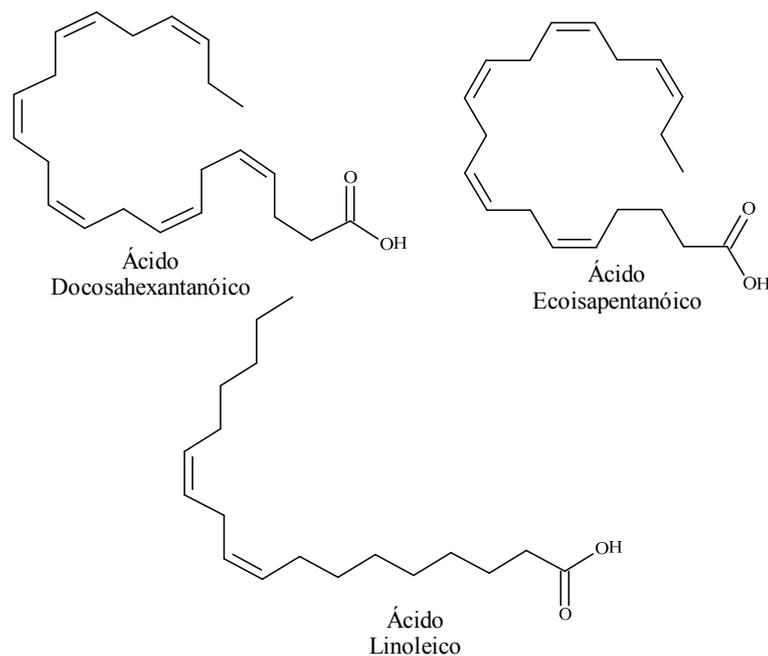


Figura 7 - Exemplos de ácidos graxos comuns às macroalgas.

O aumento da ocorrência de doenças coronárias e casos de hipertensão vêm promovendo o crescente interesse nesta classe de moléculas que possuem potencial de

modulação destes problemas. Neste aspecto as macroalgas se destacam por constituírem uma das principais fontes destes metabolitos (Martins, 2013).

Classe dos metabolitos derivados da via do chiquimato

Esta via abrange a síntese da maior parte das substâncias aromáticas de macroalgas, incluindo os fenóis, hidroquinonas, flavonóides e cumarinas (Knaggs, 2003) bem como os aminoácidos tipo micosporinas (Cardozo, et al., 2007) (figura 8).

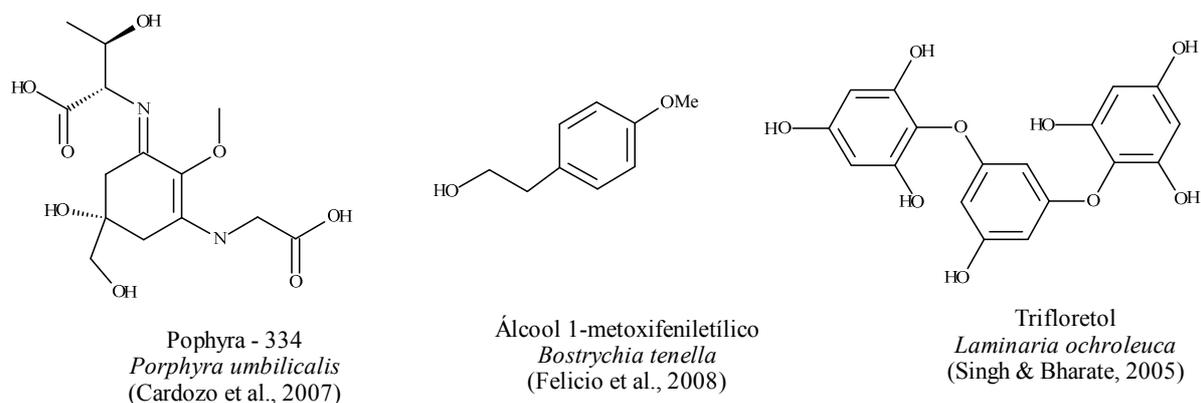


Figura 8 - Principais compostos derivados da via do chiquimato.

Esse grupo de compostos possui diversificada função ecológica, destacando-se a proteção às plantas macroalgas contra a ação de herbívoros, fungos, vírus e bactérias, e ainda tem a função de inibir o crescimento de outras algas competidoras (Raffaelli & Hawkins, 1996).

A proteção contra radiação UV é uma importante função dessa classe de metabolitos realizada principalmente pelas micosporinas, que atuam absorvendo radiação no comprimento de onda de 310 e 360 nm (Nakamura *et al.* 1982), sendo um fator extremamente importante

para as macroalgas que ficam expostas a elevadas intensidades luminosas em períodos de maré baixa, no ambiente costeiro

Enquanto na classe das substâncias da via do chiquimato se destacam as micosporinas que, atualmente, estão sendo adicionadas a protetores solares devido ao potencial de absorção da luz nos comprimentos de onda correspondentes ao ultravioleta (Prieur et al. 2003).

Classe dos derivados da via dos aminoácidos

Os metabolitos dessa via incluem simples aminoácidos, alcalóides e polipeptídeos. Nas algas, simples reações de oxidação e rearranjos moleculares dão origem aos 20 aminoácidos essenciais (Maschek & Baker, 2008).

Os alcalóides podem apresentar diferentes origens, mas no geral consistem em compostos contendo nitrogênio dividido em três grupos: os alcalóides verdadeiros, que possuem anel heterocíclico (figura 9), com um átomo de nitrogênio e sua biossíntese se dão através de um aminoácido; protoalcalóides, que apresentam um átomo de nitrogênio que se origina de um aminoácido; e os pseudoalcalóides são derivados de terpenos ou esteróides (Somei & Yamada, 2003).

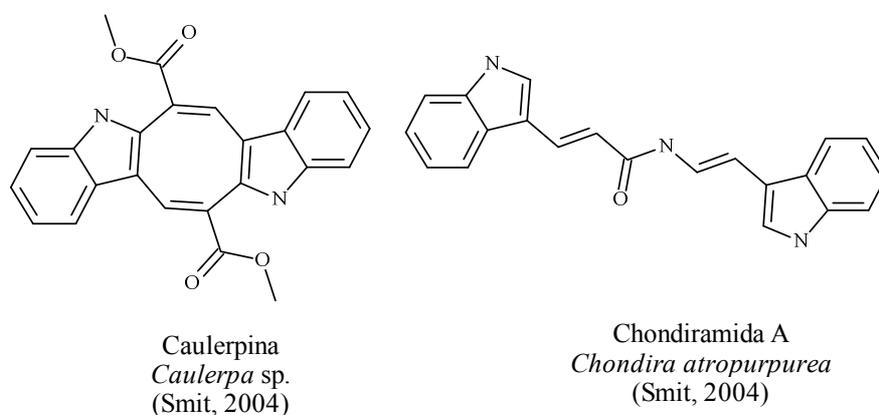


Figura 9 - Metabolitos nitrogenados isolados de macroalgas.

Os polipeptídeos são macromoléculas sintetizadas pelas enzimas multifuncionais chamadas de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e policetídeo sintase. Essa classe de compostos apresenta elevada diversidade estrutural e possuindo a função ecológica de combate a possíveis patógenos (Challis & Naismith, 2004).

Em macroalgas, é relativamente baixa a quantidade de metabolitos contendo nitrogênio, uma vez que esse nutriente é considerado limitante para o crescimento e desenvolvimento das algas, e estas acumulam esse nutriente na forma de pigmentos acessórios e proteínas (Carvalho & Roque, 2000).

As macroalgas, apesar de representarem importante fonte de aminoácidos naturais, ainda são subaproveitadas para aplicação na culinária e preparação de suplementos alimentares ou rações (Gressler et al., 2010). Os alcalóides de macroalgas, mesmo sendo relativamente raros, possuem potencial bioativo importante, como exemplo da Chondramida (figura 9) com atividade contra células tumorais (Smit, 2004).

Classe das proteínas e lectinas

As macroalgas representam um dos principais produtores de proteínas no ambiente marinho (Gressler, et al., 2010). As proteínas são biomoléculas de elevada massa molecular, sintetizadas por meio da condensação de aminoácidos, formando ligações peptídicas, que apresentam as mais diversificadas funções no metabolismo, entre elas principalmente a estrutural, hormonal, defesa, energética, enzimáticas e de sinalização celular (Taiz & Zeiger, 2002).

As algas também produzem uma classe de glicoproteína denominada lectina, que possuem papel fundamental na defesa e sobrevivência do organismo, que diferem das demais lectinas vegetais por apresentarem baixa massa molecular (5 KDa e 50 aminoácidos de

comprimento) e não dependem de cátions divalentes para manutenção da sua estrutura espacial (Selitrennikoff, 2001).

As macroalgas além de produzirem grande quantidade de proteínas, com potencial de aplicação na indústria nutracêutica (Cardozo et al, 2007) produzem diversos tipos de lectinas, que são moléculas promissoras na área biotecnológica e diferem das de plantas superiores por apresentarem características ubíquas como baixo peso molecular tornando-se menos antigênicas sendo uma importante ferramenta biológica; apresentam especificidade por polissacarídeos complexos e não necessitam de metais para manutenção de sua atividade biológica (Melo et al., 2004).

Classe dos compostos halogenados

As algas diferem das plantas terrestres principalmente por incorporarem íons halogênicos, bromo, cloro e iodo nos seus metabolitos, devido à elevada disponibilidade destes compostos no ambiente marinho, que possuem função importante no controle de patógenos, epífitas e competidores (Hay & Fenical, 1988).

As rodófitas são responsáveis por 93% de todos os compostos halogenados conhecidos, sendo que nas algas verdes e pardas a porcentagem desses compostos é reduzida 6% e 0,7%, respectivamente (Oliveira, 2009).

O processo de halogenação de diferentes classes de metabolitos é catalisado por uma classe de enzimas do tipo haloperoxidase vanádio dependente (Carter-Franklin & Butler, 2004). Essa enzima dependente atua seqüestrando as espécies reativas de oxigênio, gerados em situações de estresse ambiental e as utiliza juntamente com ânions de bromo, cloro ou iodo que são reduzidos e incorporados nas diferentes classes de metabolitos biossintetizadas, e citadas previamente, pelas macroalgas (Dring, 2006) (figura 10).

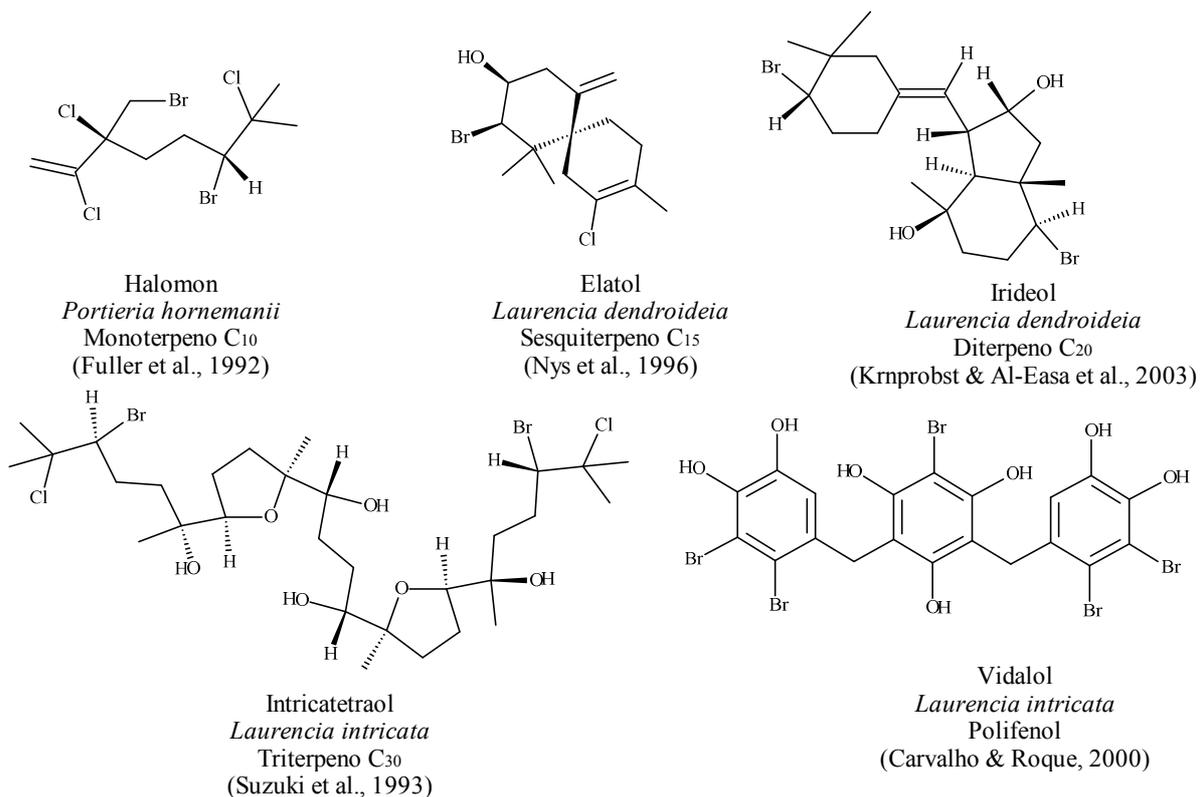


Figura 10 - Compostos halogenados de diferentes classes de metabolitos.

As substâncias desta classe apresentam, em geral, os mesmos potenciais bioativos que seus similares, enquanto incorporação dos ânions de bromo, cloro e iodo atua como fator de ampliação do potencial e da especificidade atividade dos compostos (Kornprobst & Al-Easa, 2003). Destaca-se o halmon, monoterpene penta-halogenado (figura 10), que apresenta citotoxicidade específica para células tumorais humanas (Fuller et al. 1992).

1.2.1. Aplicação das macroalgas na agricultura

O histórico mundial de utilização das macroalgas é principalmente relacionado com a coleta diretamente da natureza ou realização de cultivos *in situ* para obtenção de biomassa, visando aplicação na alimentação humana e extração de carragenas e ágar, que juntos correspondem a 90% do mercado dos derivados de macroalgas (McHugh, 2003).

Atualmente as pesquisas sobre a aplicação de extratos de macroalgas na agricultura se dividem em três grandes áreas: 1- fertilizante ou estimulante de crescimento e desenvolvimento; 2 - indutor de resistência a patógenos ou ao estresse causado por fatores ambientais; 3 - inibidor de patógenos.

1.2.1.1. Aplicação como fertilizante ou estimulante de crescimento

Os primeiros registros da aplicação de extratos das macroalgas como estimulante do crescimento de plantas na agricultura datam do século XIX, quando os relatos indicavam a utilização de macroalgas juntamente com estrume na adubação do solo, a preparação de extrato de macroalgas para aplicação na agricultura data da década de 1950 (Norrie & Hiltz, 1999).

Os efeitos estimulantes de substâncias provenientes de macroalgas estão muito bem caracterizados, com destaque para aplicação de extratos ricos em polissacarídeos (carragenas e ágar), hormônios (citocininas), esteróis, aminoácidos, vitaminas e ainda os macro e micronutrientes e elementos traços acumulados pelas macroalgas. A aplicação dos extratos possui a função de correção do solo, indução de divisão celular, aumento da concentração de pigmentos, taxa fotossintética e aumento do rendimento de floração e colheita (Khan et al., 2009, Verkleij, 1992).

O conhecimento acumulado em 50 anos de investigação dos efeitos estimulantes das substâncias de macroalgas proporcionou a superação das barreiras da ciência e, atualmente, são comercializados diversos produtos derivados de algas, especialmente dos gêneros das macroalgas *Ascophyllum*, *Ecklonia* e *Fucus*, na forma de extratos concentrados para aplicação direta na lavoura (Craigie, 2011, Khan et al., 2009).

1.2.1.2. Aplicação como indutor de resistência a patógenos ou ao estresse causado por fatores ambientais

A aplicação de macroalgas como indutor de resistências é área emergente no campo da biotecnologia marinha aplicada a ciências agrárias, que, diferentemente da aplicação para estimulante de crescimento na forma genérica de extratos concentrados, realiza a aplicação de substâncias purificadas como indutora de vias de defesa dos vegetais contra patógenos ou outras condições adversas (Stadnik & Paulert, 2008).

Em geral, as substâncias utilizadas como indutores de resistência não possuem efeito inibitório contra o crescimento de patógenos, no entanto, atuam no nível sistêmico, promovendo alterações na fisiologia da planta e na produção de metabolitos de defesa ou na mediação das relações entre patógeno e hospedeiro.

Pesquisas recentes indicam o elevado potencial de aplicação dos polissacarídeos, como as carragenanas, fucanas, laminaranas e ulvanas de macroalgas vermelhas, pardas e verdes como indutores de resistência, com capacidade de ativar vários mecanismos de defesa contra diversos patógenos de plantas (Stadnik & Freitas, 2014).

1.2.1.3. Aplicação como inibidor de fitopatógenos

A elevada atividade inibitória de extratos e substâncias de macroalgas contra fitopatógenos quando associados à agricultura (Arunkumar et al., 2010) representam um campo fértil para a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos bioativos.

Dentre os patógenos de lavouras, os fungos são organismos que se destacam, devido à incrível capacidade de colonização e crescimento, além de desenvolver rapidamente resistência à terapia antifúngica. Atualmente existe o agravante da escassez de produtos com baixa toxicidade no mercado, o que tem motivado a pesquisa de novos fármacos capazes de

combater de forma eficaz e segura estes patógenos (Arunkumar et al., 2010, Selitrennikoff, 2001).

A aplicação de extratos de macroalgas diretamente nas lavouras possui efeito comprovado como forma de controle da antracnose do feijoeiro, (*Colletotrichum lindemuthianum*) como indutor de resistência (Loffaguem et al., 2004).

Entretanto, a aplicação de metabolitos de macroalgas para indução de resistência ainda é limitada, dados os inúmeros patógenos que atacam a lavoura nas diferentes fases de cultivo (Kimati et al., 2005), como é o caso da antracnose da pós-colheita de mamão.

1.2.1.4. Controle da antracnose do período pós-colheita do mamão

O Brasil, em 2010, apresentou a segunda maior produção de mamão, com 18 milhões de toneladas colhidas e um valor de 53 milhões de dólares (FAO 2010). O País destaca-se também como grande exportador, principalmente para a Europa e para os Estados Unidos, respondendo pela metade de todo o mamão comercializado no mundo (Martins & Costa, 2003).

A antracnose (figura 11), causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, representa uma das principais doenças fúngicas que atacam diferentes lavouras, afetando tanto a planta quanto o fruto depois de colhido. No Brasil, as perdas geradas pelo fungo em lavouras tropicais representam em média 30% dos produtos comercializados, perdas que podem chegar a 100% na ausência de manejo adequado e em condições de umidade relativa do ar de 95% e 28°C (Lima Filho et al., 2003; Tavares & Souza, 2005).



Figura 11 - Fruto de mamão apresentando a necrose típica da antracnose pós-colheita.

A escassez no mercado de produtos eficientes no controle da antracnose, e que apresentem baixa toxicidade (Tavarez & Souza, 2005), fazem da pesquisa de substâncias antifúngicas para os fungos *Colletorichum* uma prioridade da investigação de bioativos.

No caso da antracnose da pós-colheita do mamão a tecnologia da aplicação de biofilmes de polímeros naturais não tóxicos têm se firmado como uma nova categoria de materiais de alto potencial para formação de coberturas protetoras comestíveis sobre frutos e hortaliças. Esta é uma tecnologia emergente, em constante desenvolvimento, e de particular importância para as áreas de conservação pós-colheita de frutos tropicais e principalmente para o aumento de vida de produtos minimamente processados (Assis et al., 2009).

A aplicação de biofilmes em frutos representa um campo promissor de pesquisa ao qual podem ser aplicadas as substâncias das macroalgas. Dentre eles é possível citar o desenvolvimento de biofilmes com base em polissacarídeos de macroalgas (Shit & Shah et al., 2014), aplicação de substâncias que apresentem o efeito de redução do metabolismo do fruto, promovendo maior tempo de vida (Jacomino et al., 2002) ou que atuem inibindo o desenvolvimento de fitopatógenos (Garcia et al., 2008).

1.2.2. Cultivo de algas em biorreatores

As algas, dentre os organismos marinhos, constituem um grupo promissor para fornecer novas substâncias bioquimicamente ativas por apresentarem facilidade de obtenção de biomassa em comparação a outros grupos marinhos e ainda ser possível a realização de cultivos para a exploração dos compostos bioativos (Baweja et al., 2009), proporcionando a conservação dos bancos naturais (Yokoya & Yoneshigue-Valentin, 2011).

Após o conhecimento das espécies com potencial biotecnológico, isolamento e purificação das substâncias bioativas é necessário compreender os processos envolvidos na síntese desses metabolitos de interesse por meio da análise da influência de fatores ambientais nas respostas ecofisiológicas das algas (Perfeto, 2004) e na avaliação do processo de ação das enzimas envolvidas na síntese das substâncias bioativas (Wise et al., 2002; Rorrer et al. 2001; Hara & Sakurai, 1998).

Para a realização de estudos avançados de ecofisiologia de macroalgas se faz necessário a aplicação de cultivo de biorreatores, que constituem uma ferramenta poderosa, por permitir controlar os fatores ambientais, determinando a influência no metabolismo das algas (Baweja et al., 2009), além de possibilitar a produção de metabolitos de interesse por meio de bioprocessos (Rorrer & Cheney, 2004) com a manipulação dos parâmetros como o pH, salinidade e densidade de fluxo fotônico, além da adição de substâncias indutoras, hormônios e diferentes sais ao meio de cultura (Mtolera et al., 1996; Fu, 1999).

Para investigação de compostos bioativos a partir de cultivos de macroalgas em laboratório é necessário a utilização dos biorreatores, que permitem a obtenção de biomassa em quantidade suficiente para análise dos metabolitos bioativos (que geralmente estão presentes em baixas concentrações no talo da alga). Adicionalmente com uso desta tecnologia é possível o maior controle dos parâmetros de cultivo visto que em geral esses sistemas são

acoplados a sensores e uma central de monitoramento que permite isolar apenas o fator de interesse para investigar a indução da síntese de compostos bioativos (Rorrer et al. 1999).

As técnicas de cultivo podem ser aplicadas para indução a expressão ou inibição de diferentes enzimas por meio da manipulação dos parâmetros de cultura (Baweja et al. 2009). O conhecimento dos mecanismos de estimulação da atividade de enzimas relacionadas a síntese de metabolitos bioativos é uma ferramenta importante nos estudos que visem aumentar o rendimento de produtos naturais (Carter-Franklin & Butler, 2004, Wise et al., 2002).

Com base nos metabolitos já descritos para as duas espécies (polissacarídeos, esteróis e ácidos graxos para *H. musciformis* e monoterpenos halogenados para *O. secundiramea*) e indicados no extrato bioativo (Machado et al., 2013), o presente estudo avaliou a influência do enriquecimento por CO₂ e KBr, para as duas algas respectivamente, buscando determinar alterações no perfil dos compostos bioativos.

1.3. Espécies de macroalgas selecionadas

O presente estudo teve como ponto de partida as pesquisas realizadas por Machado (2008) e (2010), que deram origem aos artigos científicos Machado et al. (2011 e 2014). O estudo publicado em 2011 apresentou a triagem de extratos de macroalgas com atividade inibitória contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* autoria, causador da antracnose do mamoeiro, no qual foi constatado o potencial antifúngico para os extratos das macroalgas *Ochtodes secundiramea* e *Hypnea musciformis*. No estudo Machado et al. (2014) foi investigado, para estas duas macroalgas, o efeito do processo de desenvolvimento de cultivos em laboratório nas respostas fisiológicas e na atividade antifúngica dos extratos, realizando análises para espécimes coletados na natureza e após a realização de cultivo em laboratório, avaliando as possíveis correlações das respostas fisiológicas com as alterações

observadas na atividade antifúngica do extrato proveniente das macroalgas das duas condições.

Para a espécie *Ochtodes secundiramea* foi diagnosticado uma complexa mistura de monoterpenóides poli-halogenados derivados do mirceno e do ocimeno, com função antiépifitismo e antiherbivoria (Paul, et al., 1987, Gerwick, 1984, McConnell & Fenical, 1978) e a biossíntese desses metabolitos é influenciada pela disponibilidade de nitrogênio (Maliakal et al., 2001). Adicionalmente foram identificados diferentes ácidos graxos, alcoóis e hidrocarbonetos (Gressler, 2010).

A espécie *Hypnea musciformis* possui elevada importância por produzir a carragena, um polissacarídeo sulfatado utilizado como emulsificante e estabilizante em diversos setores da indústria (Cardozo et al., 2007). Para os extratos orgânicos e protéicos da espécie já foi verificado as atividades inibitórias sobre HSV (Mendes et al. 2012), fungo fitopatogênico (Melo et al. 1997), bactérias patogênicas em humanos e peixes (Selvin & Lipton 2004), fungo patogênico a humano e hemoaglutinante (Cordeiro et al. 2006).

H. musciformis apresenta variações fenotípicas intra-específicas representadas por linhagens pigmentares que apresentam diferenças em relação à tolerância aos fatores ambientais, à produção de biomassa e composição química (Martins, 2007).

A utilização de variantes pigmentares também é uma importante ferramenta para a compreensão da fisiologia e biologia das macroalgas, sendo que estudos com mutantes de cor de *Gracilaria* têm sido úteis para o conhecimento da composição e estrutura dos ficobilissomos (Kursar et al. 1983). No Brasil, a caracterização de variantes pigmentares, de espécies de *Gracilaria*, tem contemplado aspectos como composição pigmentar, crescimento, genética, frequência em populações naturais e ultra-estrutura do cloroplasto (Plastino, 2004).

Para as linhagens marrom (MA) tipo selvagem e verde clara (VC) de *H. musciformis*, deficiente na produção de ficoeritrina, foram realizados diversos estudos que evidenciaram

diferenças quanto ao crescimento e fotossíntese (Yokoya et al., 2007), enzimas do metabolismo do nitrogênio (Martins et al., 2007), composição de pigmentar (Martins & Yokoya, 2010), conteúdo de pigmentos e proteínas em resposta a tratamentos com nitrato e fosfato (Martins et al., 2011).

Martins (2007) constatou que a aumento na disponibilidade de nitrogênio induz ao acúmulo das ficobiliproteínas na linhagem MA, enquanto a VC assimila o excedente na forma de proteínas. Essa alocação do recurso é possivelmente associada ao aproveitamento diferenciado da luz entre as duas linhagens (Yokoya et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVAS

Os resultados dessas pesquisas preliminares foram determinantes para avançar até o presente estudo, no qual se buscou ampliar o conhecimento para as duas espécies de macroalgas selecionadas, visando realizar a purificação e a identificação dos metabolitos com atividade antifúngica, verificar a aplicação de cultivos em biorreatores para: (1) obtenção de biomassa e indução da produção dos bioativos (2) caracterizar a atividade antifúngica por métodos *in vitro* e o potencial de aplicação *in vivo*, tendo em vista tornar este potencial mais efetivo no controle da antracnose.

Neste contexto, insere-se o presente trabalho que testará a aplicação dos extratos e substâncias das macroalgas, que apresentam atividade inibitória sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, associado a biofilmes comestíveis, a base de amido, visando à proteção do fruto e conseqüentemente aumento do tempo em prateleira. Em seqüência será testado a aplicação de cultivos em biorreatores com manipulação de determinados parâmetros para obtenção dos compostos antifúngicos, promovendo o desenvolvimento da biotecnologia aliado à conservação das populações naturais das macroalgas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar as substâncias biossintetizadas pelas linhagens de cor de *Hypnea musciformis* e *Ochtodes secundiramea*, que possuem potencial antifúngico para controle de fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo* e verificar a influência de fatores abióticos em cultivo realizado em biorreatores na fisiologia das macroalgas e na produção dos metabolitos de interesse.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes métodos de processamento da biomassa algácea, logo após a coleta, na obtenção e na atividade dos extratos das macroalgas;
- Determinar a atividade antifúngica dos extratos das macroalgas, qualitativa e quantitativamente (limite de detecção da atividade e concentração inibitória mínima) sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos;
- Realizar o fracionamento bioquímico e caracterizar os constituintes químicos responsáveis pela atividade antifúngica do extrato das espécies de macroalgas;
- Avaliar, por meio de cultivo em biorreator, a influência do enriquecimento por CO₂ e KBr na fisiologia e na produção dos metabolitos de interesse em linhagens de cor de *H. musciformis* e *O. secundiramea*, respectivamente;
- Comparar a atividade antifúngica dos extratos e as respostas aos experimentos em biorreatores das linhagens marrom e verde clara de *H. musciformis*;
- Verificar a influência da aplicação de biofilmes comestíveis contendo substâncias das macroalgas estudadas no processo de amadurecimento e controle da antracnose do período de pós-colheita do mamão em condições *in vivo*, simulando o período de prateleira destes frutos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Organismos estudados

Neste tópico, serão descritos os protocolos de obtenção das macroalgas marinhas e dos fungos fitopatogênicos investigados no presente estudo e a metodologia geral de manutenção das culturas em laboratório. As metodologias para os experimentos de atividade antifúngica e cultivo das macroalgas para obtenção de bioativos serão descritas em itens específicos.

4.1.1. Macroalgas

4.1.1.1. Linhagens pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen)

J.V.Lamouroux

O presente estudo foi realizado com tetrasporófitos das linhagens pigmentares marrom (MA) e verde clara (VC, deficiente na produção de ficoeritrina) de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux.

As linhagens pigmentares de *H. musciformis* foram obtidas a partir de um espécime tetrasporofítico de coloração marrom que apresentava um ramo lateral verde coletado pela Dra. Noemy Yamaguishi-Tomita, em 1994, na Ponta da Baleia (20°15'54"S e 40°11'20"W), Espírito Santo. As linhagens MA e VC foram originadas a partir da propagação de segmentos apicais isolados de ramos marrons e do ramo verde, respectivamente. Exemplares das linhagens de *H. musciformis* foram depositados no herbário SP, sob os números SP365645 (VC) e SP365646 (MA).

4.1.1.2. Coleta e obtenção das culturas de *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A.Howe

A cultura de *O. secundiramea* foi iniciada a partir de carpósporos liberados pelos gametófitos femininos com cistocarpos coletados em janeiro de 2011 (SP401725), na Ponta da Baleia (20°15'54"S e 40°11'20"W), Espírito Santo. Em campo, foi realizada a limpeza do material coletado com a remoção de organismos associados como invertebrados marinhos e outras espécies de macroalgas. Em seguida, os talos de *O. secundiramea* foram transportados em frascos escuros de 500 mL, contendo 350 mL de água do mar esterilizada, para o laboratório.

Na etapa seguinte os talos foram observados em estereomicroscópio e limpos com o auxílio de pinças e estiletos esterilizados por aquecimento em bico de bunsen, sendo realizada a remoção de microepífitas.

O processo de obtenção das culturas de *O. secundiramea* foi realizado aplicando as técnicas de cultivo a partir de carpósporos e desenvolvimento dos germinantes ou por meio de propagação de seguimentos apicais.

Manutenção das culturas de macroalgas marinhas

A água do mar utilizada no cultivo das algas e em todos os experimentos realizados no presente estudo foi coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, em Ubatuba, SP. Água foi esterilizada por filtração em membrana de celulose Millipore AP 20 e submetida, por duas vezes, ao banho-maria durante 1 hora, contados após o início da fervura do banho.

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 modificado por Yokoya (1996)). Essas culturas foram iniciadas a partir do isolamento de segmentos apicais das linhagens selecionadas e cultivadas em meio de cultura VSES/2 durante todo o período de estudo.

A troca do meio de cultura foi feita semanalmente e foram utilizados frascos (500 mL), contendo 350 mL de meio. As culturas unialgáceas e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Algas "Marilza Cordeiro Marino" do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, nas seguintes condições: temperatura média de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h, salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 ± 10 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo "luz do dia", dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Toda a vidraria utilizada foi autoclavada a 121°C e 1,5 atm durante 30 minutos e os instrumentos utilizados no manuseio das algas foram esterilizados em etanol 70% e esterilizados por aquecimento em bico de Bunsen.

Tabela 1 - Composição química da solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996).

| Substâncias | Concentração final/ litro de meio |
|--|--------------------------------------|
| NaNO ₃ | 0,50 mM |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 30 μM |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 1 μM |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,1 μM |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 10 μM |
| Tiamina.HCl | 0,59 μM * |
| Biotina | 4,10 nM * |
| Cianocobalamina | 1,0 nM * |

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

Liberção e germinação carpósporos e desenvolvimento de plântulas

Gametófitos femininos, de *O. secundiramea*, com cistocarpos foram seccionados (segmentos de 2 cm) e limpos. Posteriormente estes segmentos foram colocados sobre lâminas de vidro (2,5 x 2,5 cm) que estavam dentro de placas de Petri, com 15 mL de água do mar esterilizada (salinidade 32 ups e pH 8,0), enriquecida com solução de von Stosch 50% (VSES/2), 24 ± 2 °C, irradiância de 10 ± 5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com 14:10 h de luz:escuro (L:E). Foram realizadas observações diárias para verificar se houve liberação de carpósporos. Após esta etapa, os carpósporos recém liberados foram observados em microscopia óptica e obtidas imagens com câmera digital AxioCam ERcS5 acoplada ao microscópio trinocular Primo Star (Carl Zeiss, Alemanha), sendo realizada medição do diâmetro dos carpósporos (n=20) utilizando o programa Axiovision 4.6 (Zeiss Vision Image, Alemanha). Os esporos fixados foram cultivados em frascos contendo 60 mL de meio VSES/2 nas condições descritas anteriormente, sendo realizada a observação diária do padrão de germinação do espora e do desenvolvimento dos germinantes.

Isolamento e propagação de segmentos apicais

A partir dos gametófitos femininos sem estruturas reprodutivas de *O. secundiramea* foram isolados segmentos apicais com 2 cm. Para o início do processo de cultivo foram utilizados com três segmentos por frasco contendo 80 mL de meio de cultura.

No entanto, os tratamentos realizados desde a coleta, transporte, limpeza e isolamento dos segmentos apicais de *O. secundiramea* para o início do cultivo em laboratório geraram uma condição de estresse para a espécie, acarretando na perda de vários talos. Desta forma, os segmentos apicais selecionados foram mantidos por duas semanas no laboratório de cultura

(condições descritas anteriormente) e sob baixos níveis de irradiância ($10 \pm 5 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), para a sua aclimação as condições em laboratório.

Após esse período, os segmentos apicais apresentaram baixa taxa de crescimento e observou-se o crescimento de diferentes espécies de algas epífitas contaminantes (figura 12).

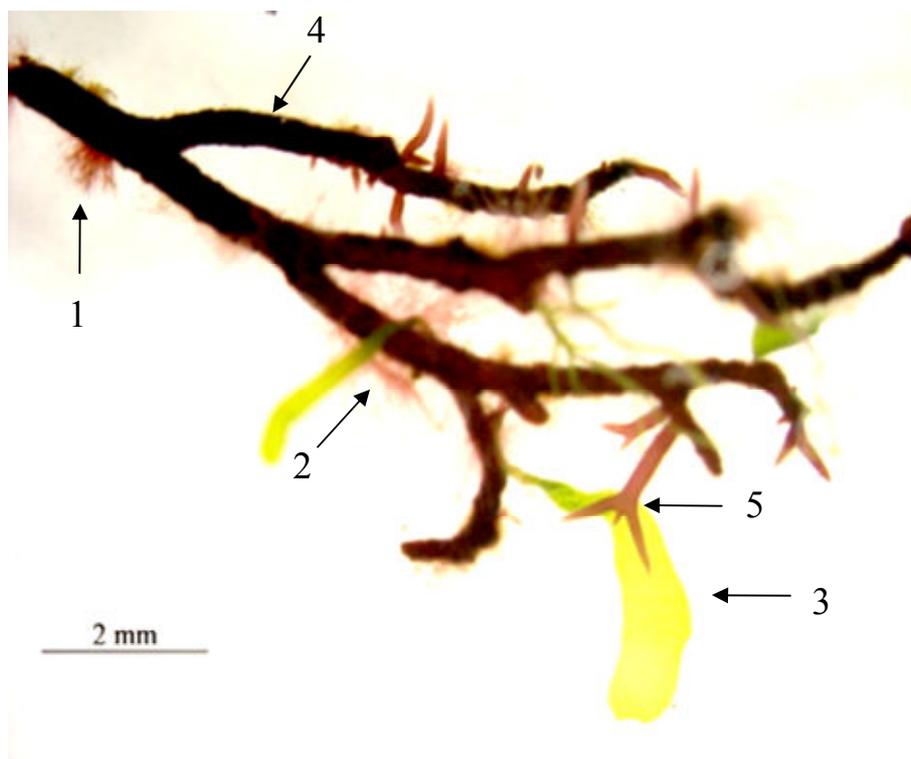


Figura 12 - Segmento apical de *O. secundiramea* após duas semanas de cultivo em laboratório em meio VSES/2, de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, irradiância de $10 \pm 5 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 14:10 h luz:escuro (L:E). Apresentando as algas epífitas: 1 - *Acrochaetium* sp., 2 - *Erythrotrichia* sp., 3 - *Ulva* sp., 4 - *Sahlbingia* sp e 5 - biomassa crescida de *O. secundiramea*.

Devido à baixa taxa de crescimento observado e o elevado grau de contaminação por epífitas, optou-se por primeiramente realizar experimentos visando determinar a melhor condição de cultivo para a espécie *O. secundiramea* com a promoção do crescimento da macroalga associado ao menor desenvolvimento de contaminantes, para posteriormente aplicar os protocolos de descontaminação da cultura.

4.1.1.3. Testes para o isolamento e crescimento de segmentos apicais de *O. secundiramea*

Experimento com diferentes meios de cultura em diferentes soluções de nutrientes

Para determinar a melhor condição para obtenção de biomassa e com o menor desenvolvimento de epífitas contaminantes em segmentos apicais de *O. secundiramea* foram avaliadas as soluções de nutrientes de von Stosch (VSES) (Edwards, 1970) e de Provasoli (PES) (Provasoli, 1968), sem adição do tampão tris(hidroximetil)-aminometano. O experimento foi realizado utilizando as concentrações de 100% e 50% das duas soluções totalizando quatro tratamentos: VSES, VSES/2, PES e PES/2. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas ($n = 3$) e cada repetição continha três segmentos apicais em 80 mL de meio de cultura.

Experimento de cultura em diferentes níveis de irradiância

O segundo experimento utilizou o meio de cultura selecionado no experimento anterior e avaliou quatro níveis de irradiância de 10, 30, 50 e $70 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas ($n=3$) e cada repetição continha três segmentos apicais (150 mg) em 80 mL de meio de cultura.

Experimento de culturas com e sem aeração

Posteriormente à determinação das melhores condições de luz e de nutrientes, foi investigada a influência da aeração com ar úmido, no crescimento dessa alga. Para tanto foi utilizado um compressor de ar BOYU[®] ($0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), que introduziu ar em um Kitassato contendo água destilada. Em seguida o ar úmido formado foi introduzido nos frascos contendo as algas como meio de cultura e comparou-se com algas cultivadas em cultivos

estagnados, como controle. Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas (n=3) e cada repetição continha três segmentos apicais em 150 mL de meio de cultura.

Aplicação do protocolo de descontaminação

Após a investigação das condições ideais para o crescimento de *O. secundiramea*, em laboratório, foi realizada a aplicação do protocolo para descontaminação descrito por Fernandes et al. (2011) com modificações. O tratamento consistiu na limpeza dos talos com papel toalha, seguido exposição por 20 segundos a solução de 1% cloro ativo e 5% de detergente, isento de fosfato, em água do mar esterilizada, seguido de posterior agitação em água destilada por 10 segundos e limpeza em papel toalha. O processo foi repetido semanalmente até a obtenção de culturas unialgáceas.

Para todos os tratamentos foi realizado o acompanhamento fotográfico semanal em estereomicroscópio Zeiss Stemi 200c trinocular e obtidas imagens com câmera digital AxioCam ERcS5 Primo Star, acoplada ao estereomicroscópio (Carl Zeiss, Alemanha), as escalas inseridas no programa Axiovision 4.6 (Zeiss Vision Image, Alemanha).

Análise dos experimentos

O crescimento dos ápices foi determinado por meio da medição semanal da biomassa fresca nos mesmos intervalos de renovação do meio de cultura. As taxas de crescimento foram calculadas como $[\ln (Bf \cdot Bo^{-1}) \cdot t^{-1}]$, onde Bo é a biomassa fresca inicial, Bf é a biomassa fresca após 21 dias que correspondeu ao período experimental.

Para todos os tratamentos foi realizado o acompanhamento fotográfico semanal em estereomicroscópio Zeiss Stemi 200c trinocular e obtidas imagens com câmera digital AxioCam ERcS5 Primo Star, acoplada ao estereomicroscópio (Carl Zeiss, Alemanha), com escalas inseridas no programa Axiovision 4.6 (Zeiss Vision Image, Alemanha).

4.1.2. Fungos fitopatogênicos

Os isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc (antracnose do mamão, IB Col. 48) e *Colletotrichum lagenarium* Ellis & Halst (antracnose das curcubitáceas, IB Col. 19) foram obtidos em parceria com o Instituto Biológico de São Paulo por meio da Micoteca de Fungos fitopatogênicos "Mário Barreto Figueiredo". O fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Penz.) IBt nº SPC 491 foi obtido de culturas mantidas no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, cedidos pela Dra. Maria Cláudia Marx Young.

As matrizes do fungo foram cultivadas (figura 13) em meio BDA (batata, dextrose e ágar) (Difco). Os fungos foram repicados por meio de retirada de discos de 5 cm de diâmetro e inoculados em placas contendo meio de cultura estéril. Estas placas foram incubadas posteriormente em uma estufa sem fotoperíodo a uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante uma semana, tempo suficiente para a colonização de toda área da placa contendo o meio de cultura.

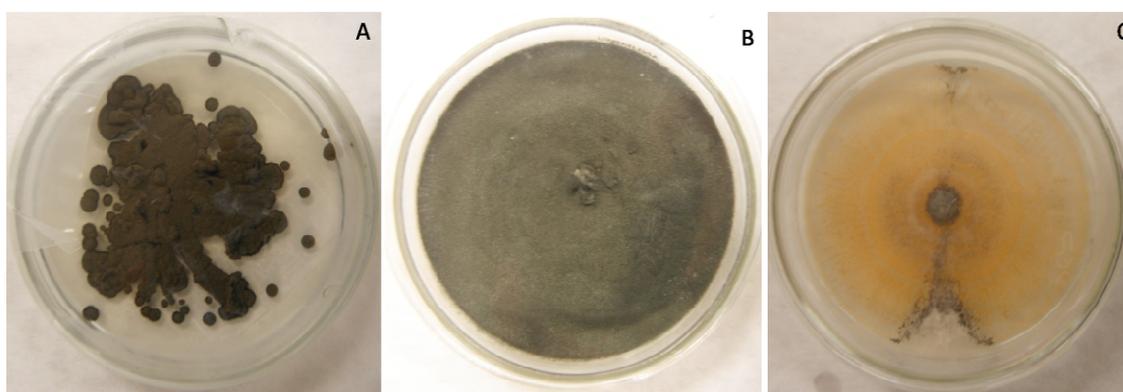


Figura 13 - Matrizes dos fungos utilizados nos experimentos de bioatividade A - *Cladosporium sphaerospermum*, B - *Colletotrichum lagenarium* e C - *Colletotrichum gloeosporioides*.

A partir destas colônias, foi realizada a extração de conídios por meio da raspagem do micélio com auxílio de alça de platina e dissolução em água destilada, sendo realizada uma agitação mecânica para que os esporos fossem liberados do micélio com posterior filtragem

em gaze estéril. Essa suspensão filtrada teve a concentração avaliada por contagem em câmara de Neubauer (figura 14) com unidade expressa em conídios.mL⁻¹ e conservadas pelo método de Castellani (1939).

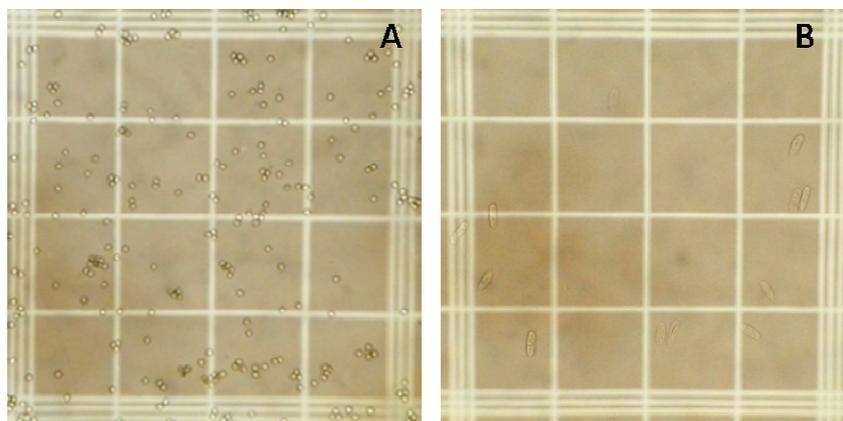


Figura 14 - Conídios do fungo *Colletotrichum lagenarium* (A) e *Colletotrichum gloeosporioides* (B) analisados em câmara de Neubauer. Escala = 0,02 mm.

4.2. Cultivo das macroalgas em biorreatores

Os experimentos de cultivo das macroalgas em biorreatores foram realizados tomando por base o conhecimento prévio dos compostos com atividade antifúngica produzidos pelas espécies estudadas, sendo polissacarídeos, esteróis e gliceróis para *H. musciformis* e monoterpenos halogenados para *O. secundiramea* (Machado et al. 2013, Nassir et al, 2011, Polzin & Rorrer 2003, Maliakal et al. 2001). Adicionalmente foram avaliadas as respostas fisiológicas (carboidratos solúveis totais, pigmentos, proteínas e taxa de crescimento) das linhagens de *H. musciformis* e ao tratamento com enriquecimento com CO₂ enquanto que para *O. secundiramea* foi avaliada a resposta a adição de bromo no meio de cultura.

Todos os experimentos de cultivos em biorreatores foram realizados com culturas unialgáceas no Laboratório de Cultura de Algas "Marilza Cordeiro Marino" do Núcleo Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica nas seguintes condições: irradiância de 90 ± 10 $\mu\text{mol de f\u00f4tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura média de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h,

salinidade 30-32 ups, pH 8,0. Todo experimento foi realizado com água do mar do mesmo lote coletada em agosto de 2013.

O sistema de biorreatores (modelo TE-BIT-E3, Tecnal, Brasil) foi composto por seis vasos de cultura, controles e tratamentos (n=3), com volume total de 2,5 L sendo 1,8 L de volume útil, dispostos em suportes de sustentação e tampas de aço inox apresentando anel de vedação tipo “O-Ring”.

O sistema possui entradas para sensores de temperatura (Tecnal), pH, oxigênio dissolvido e CO₂ dissolvido (Mettler Toledo) conectados a um sistema de controle e aquisição de dados (Tecbio-soft, Tecnal). Foi realizada a aeração por meio de um compressor (TEC-Bio AI) que borbulha ar esterilizado (filtro HEPA-VENT 0,3 µm Whatman) em água destilada que em seguida é direcionado aos biorreatores por meio de mangueiras de silicone ligadas a um manifold com controle de vazão regulada por um rotâmetro para 0,5 L ar.min⁻¹ (de forma intermitente a cada 30 minutos) em cada vaso de cultura. O conjunto de vasos, suportes, tampas, mangueiras e sensores foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 30 minutos antes do início dos experimentos. O sistema completo é apresentado na figura 15.

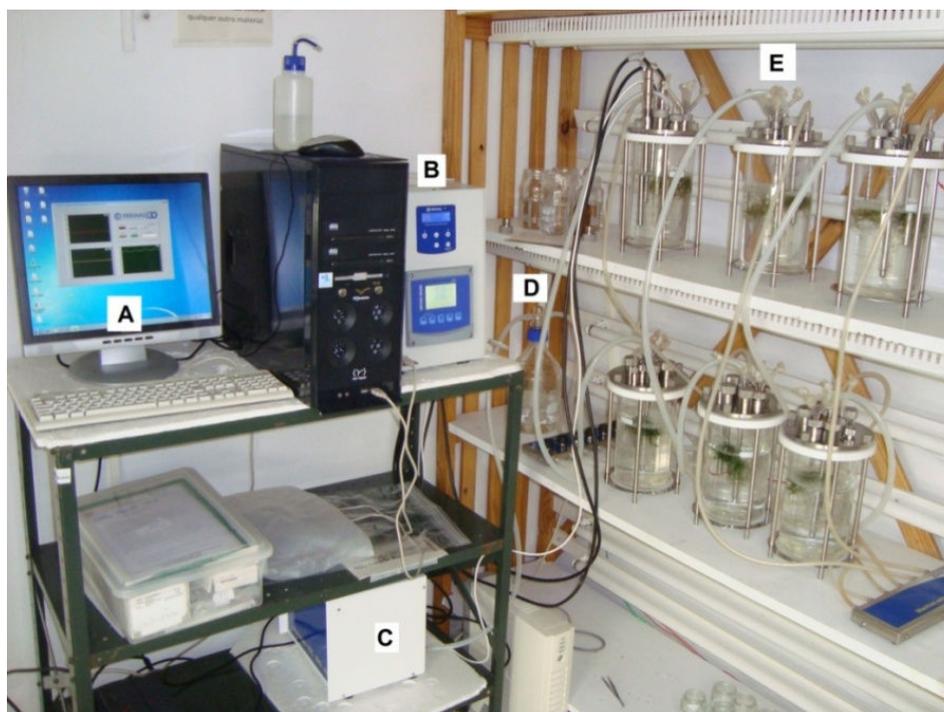


Figura 15 - Estrutura do modelo TE-BIT-E3 (TECNAL[®]), A – Sistema de aquisição dos dados; B – Sistema de controle; C – Compressor para injeção de ar no sistema; D – Estrutura para filtragem e umidificação do ar; E – Sistema dos vasos de cultura, as macroalgas e os sensores.

4.2.1. Efeito do enriquecimento com CO₂ nas linhagens pigmentares de *H. musciformis*

Os experimentos com as duas linhagens de *H. musciformis* foram realizados com a inserção do gás, proveniente de cilindro contendo 100% de CO₂ no meio de cultura em uma entrada independente da aeração por ar. A vazão do CO₂ foi ajustada por meio de um rotâmetro específico para gás carbônico para 2 mL.min⁻¹, resultando na concentração média de CO₂ de 5,5 mg.L⁻¹ no tratamento, enquanto que a condição controle apresentou (aeração com ar úmido) apresentou 0,5 mg.L⁻¹ de CO₂ dissolvido. Os demais parâmetros monitorados pelos sensores do sistema do biorreator foram apresentados na figura 16. A duração do experimento por 21 dias foi utilizada devido a observação em cultivos anteriores realizados no mesmo sistema, a linhagem MA apresentou o desenvolvimento de estruturas reprodutivas após este período, o que reduziu o crescimento da alga. Cada tratamento (com ou sem adição

de CO₂) foi testado com 3 repetições simultâneas (n=3) e cada repetição continha uma biomassa inicial de 2,5 g em 1,8 L de meio de cultura.

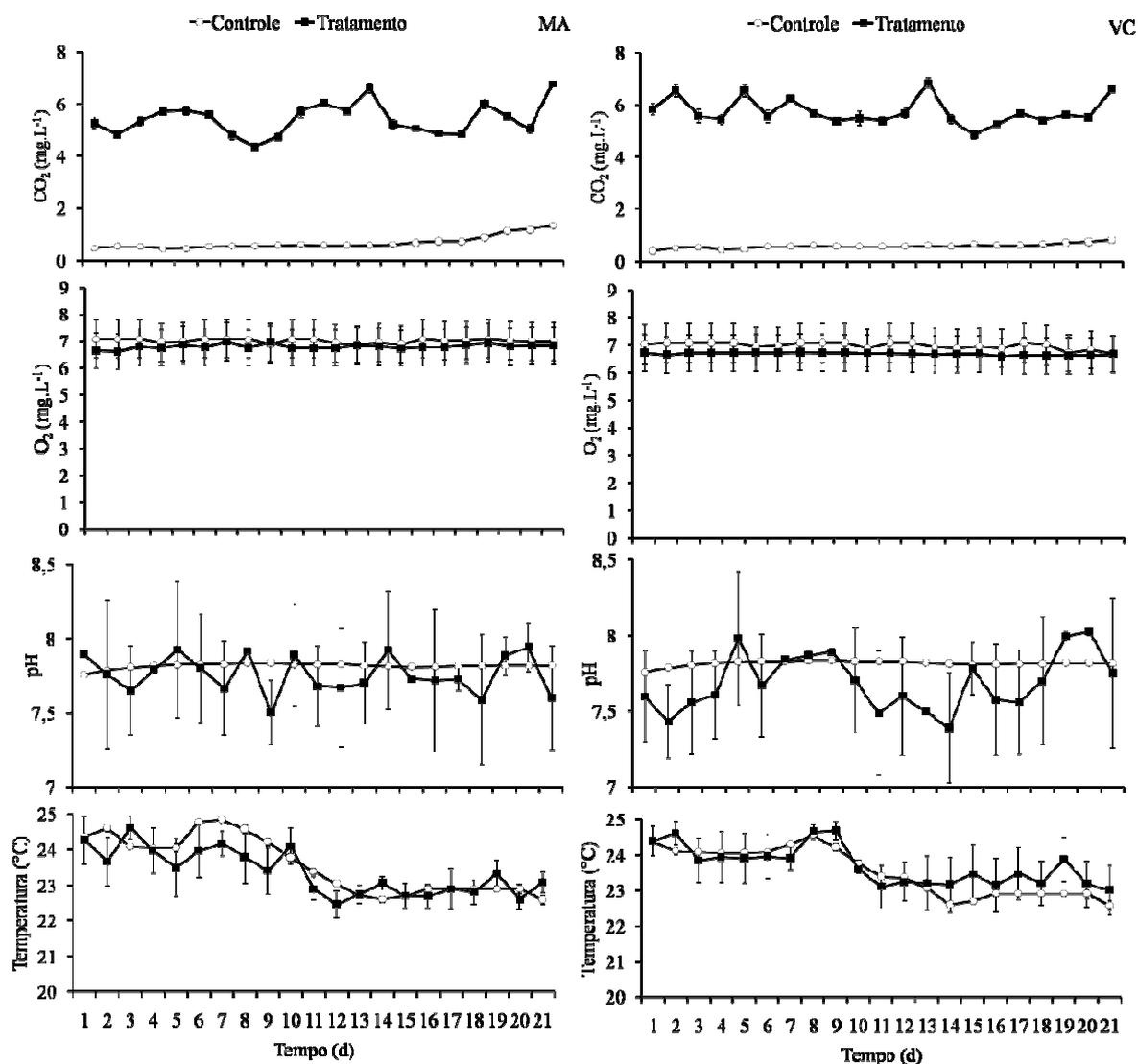


Figura 16 - Médias diárias das concentrações de CO₂ e O₂ dissolvido (mg.L⁻¹) e os valores de pH e temperatura (°C) nos biorreatores com as culturas das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* ao longo 21 dias de cultivo em resposta as condições controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min⁻¹ de CO₂). Barras indicam desvio padrão das medições diárias (registradas a cada 4 minutos) ao longo dos 21 dias de experimento.

Os cálculos de O₂ e CO₂ dissolvidos em mg.L⁻¹ foram realizados usando os valores de concentração em (%) no meio de cultura obtidos no biorreator e as pressões de vapor da água do mar (0,03094 atm) e pressão parcial dos gases baseado na lei Henry de acordo com as equações a seguir:

$$p_{\text{gás}} = (P^{\circ} - p_{\text{H}_2\text{O}(\text{mar})}) * [C_{\text{gás}}] \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

$p_{\text{gás}}$ = pressão parcial do gás (atm);

P° = pressão atmosférica (atm);

$p_{\text{H}_2\text{O}_{\text{mar}}}$ = pressão de vapor da água do mar (atm);

$[C_{\text{gás}}]$ = Concentração dos gases em (%) fornecida pelos sensores do biorreator.

$$[\text{Gás (aquoso)}] = K_{\text{H}} * p_{\text{gás}} \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

$[\text{Gás (aquoso)}]$ = Concentração do gás dissolvido (mol.L^{-1});

K_{H} = Constante de Henry $\text{CO}_2 = 3,38.10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{O}_2 = 1,28.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$;

$p_{\text{gás}}$ = pressão parcial do gás (atm) obtido para cada um dos gases na equação 1.

A conversão para mg.L^{-1} foi realizada pela multiplicação da $[\text{Gás(aquoso)}]$ pela massa molecular de cada um dos gases. Os demais parâmetros monitorados durante o experimento foram obtidos diretamente dos registros gerados pelos sensores.

Variáveis analisadas

Taxa de crescimento

A massa da matéria fresca dos talos cultivados nos diferentes tratamentos foi determinada semanalmente, durante três semanas, utilizando uma balança analítica. Antes da pesagem, o excesso de água foi retirado utilizando papel absorvente. As taxas de crescimento (TC) foram calculadas utilizando-se a equação $\text{TC} = [\ln(\text{Bf.Bo}^{-1}) \cdot \text{t}^{-1}]$. Adicionalmente, foram determinadas as curvas de crescimento de biomassa fresca em (%) para as duas linhagens em resposta ao enriquecimento com CO_2 .

Extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes

A extração de pigmentos fotossintetizantes foi realizada pela trituração de 80mg de massa fresca em nitrogênio líquido de amostras de cada repetição ($n=3$). Ao material triturado foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4 °C. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 14000 g a 4 °C. O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi mantido no escuro em eppendorfs, para posterior leitura em espectrofotômetro.

O sedimento foi ressuspensionado em acetona 90% para obter um homogeneizado e foi centrifugado a 12000 g a 4 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante (contendo a clorofila a) foi transferido para eppendorfs e mantido no escuro até a leitura em espectrofotômetro. As concentrações das ficobiliproteínas e da clorofila a foram determinadas pelas equações de Kursar et al. (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975), respectivamente, e estão representadas na tabela 2.

Tabela 2 - Equações utilizadas para quantificar as concentrações de ficobiliproteínas e clorofila a (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) segundo Kursar et al (1983) e Jeffrey & Humphrey (1975), respectivamente.

| Pigmento | Equação |
|----------------------|---|
| Aloficocianina - AFC | $AFC = 181,3. A_{651} - 22,3. A_{614}$ |
| Ficocianina - FC | $FC = 151,1. A_{614} - 99,1. A_{651}$ |
| Ficoeritrina - FE | $FE = 155,8. A_{498,5} - 40,0. A_{614} - 10,5. A_{651}$ |
| Clorofila a - Cl a | $Cl a = 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.08 A_{630}$ |

$A_{498,5}$ = Valor da absorvância no comprimento de onda de 498,5 nm; A_{614} = Valor da absorvância no comprimento de onda de 614 nm; A_{630} = Valor da absorvância no comprimento de onda de 630 nm; A_{647} = Valor da absorvância no comprimento de onda de 647 nm; A_{651} = Valor da absorvância no comprimento de onda de 651nm.

Os valores obtidos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram convertidos para mg de pigmento por g de massa fresca, considerando a biomassa inicial (80 mg) utilizada para a extração.

Extração e quantificação das proteínas solúveis totais

A extração de proteínas foi realizada através da trituração de 80 mg de biomassa fresca em nitrogênio líquido de amostras de cada repetição (n=3). O material triturado foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,5 mM EDTA; 1 mM DTT) na proporção de 0,1 g.mL^{-1} de massa fresca de alga por tampão. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 12000 g e 4 °C. O conteúdo de proteína solúvel total foi determinado por espectrofotômetro a 595 nm, após a adição da solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo

o método de Bradford (1976). A curva padrão (figura 17) de BSA (albumina sérica bovina) foi utilizada para determinar as concentrações das proteínas solúveis totais.

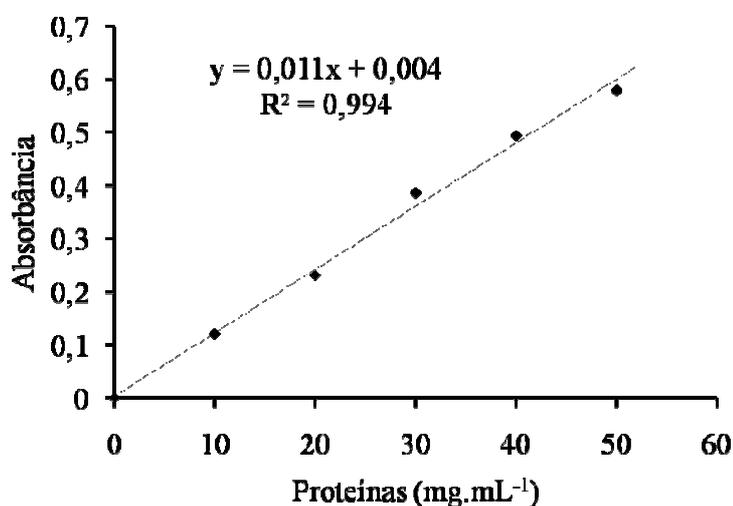


Figura 17 - Curva padrão da absorbância para diferentes concentrações de (albumina sérica bovina) com a equação para determinação das proteínas solúveis totais no talo das algas.

Extração e quantificação dos açúcares solúveis totais

Amostras de 300 mg de massa fresca de cada repetição (n=3) do controle e do tratamento foram trituradas em nitrogênio líquido, e em seguida suspensas e fervidas em 3 mL de etanol 80% por 5 minutos para inativação enzimática. Após esse processo, o material foi centrifugado a 5.000 g por 15 minutos, onde o sobrenadante foi separado, adicionou-se mais 3 mL de álcool 80% ao precipitado aquecido em banho-maria por 30 minutos a 60°C e a centrifugação foi repetida. O extrato alcoólico obtido foi concentrado por evaporação a baixa temperatura sob vácuo. Após a remoção do solvente, o extrato resultante foi congelado até a análise. O extrato seco foi ressuspensionado em 3 mL de água deionizada e utilizado na determinação dos açúcares solúveis totais por leitura a 490 nm em espectrofotômetro, após

reação com fenol e ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956) e comparação com curva padrão de glicose (figura 18).

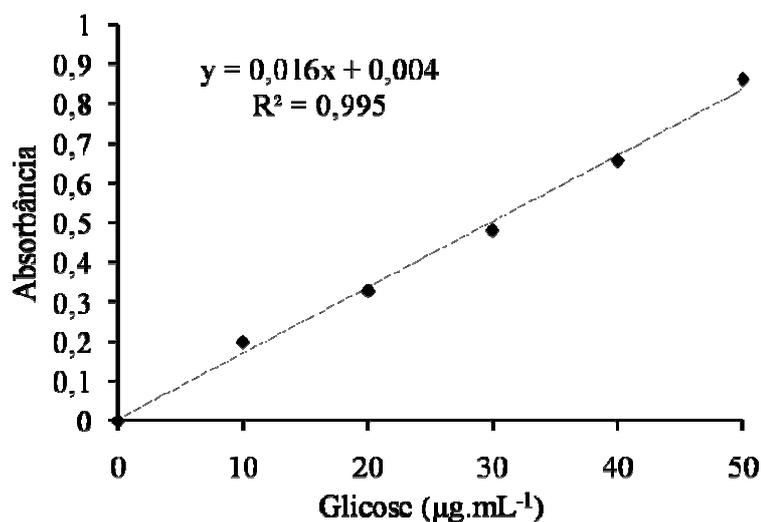


Figura 18- Curva padrão da absorvância para diferentes concentrações de glicose com a equação para determinação dos açúcares solúveis totais no talo das algas.

Análise dos compostos com atividade antifúngica

A biomassa que não foi utilizada nas avaliações fisiológicas foi empregada para confecção dos extratos bioativos utilizados para avaliar a resposta do enriquecimento com CO₂ na composição química e na bioatividade dos metabólitos com potencial antifúngico das linhagens de *H. musciformis*. Os resultados desse item serão apresentados juntamente com os do tópico **Extração, determinação e purificação dos compostos bioativos** (Item 4.3).

4.2.2. Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo de *O. secundiramea*

Para a espécie *O. secundiramea* foi realizado, ao longo de 21 dias, o enriquecimento com bromo (na forma do sal KBr) ao meio de cultura composto por água do mar esterilizadas

e VSES/2. Como condição controle, foi utilizada água do mar esterilizada meio VSES/2, com a quantidade natural de bromo disponível, enquanto o tratamento testado correspondeu a adição de 200 mg.L^{-1} no tempo zero e pulsos semanais de 100 mg.L^{-1} de KBr. Cada tratamento (com e sem adição de KBr) foi testado com 3 repetições simultâneas ($n=3$) e cada repetição continha uma biomassa inicial de 0,25 g em 1,8 L de meio de cultura.

A concentração testada foi selecionada com base no estudo de Paradas et al. (2010) que verificou o aumento na formação de estruturas associadas ao armazenamento de compostos halogenados em *Laurencia dendroidea* J.Agardh (citada como *Laurencia obtusa*, Rhodophyta).

O biorreator foi montado com as mesmas configurações descritas para os experimentos com as linhagens de *H. musciformis*. No entanto, não foi adicionado CO_2 e o único parâmetro testado entre o controle e o tratamento foi o enriquecimento com bromo. A seguir são apresentados os dados dos sensores para os 21 dias de experimento com *O. secundiramea* (figura 19).

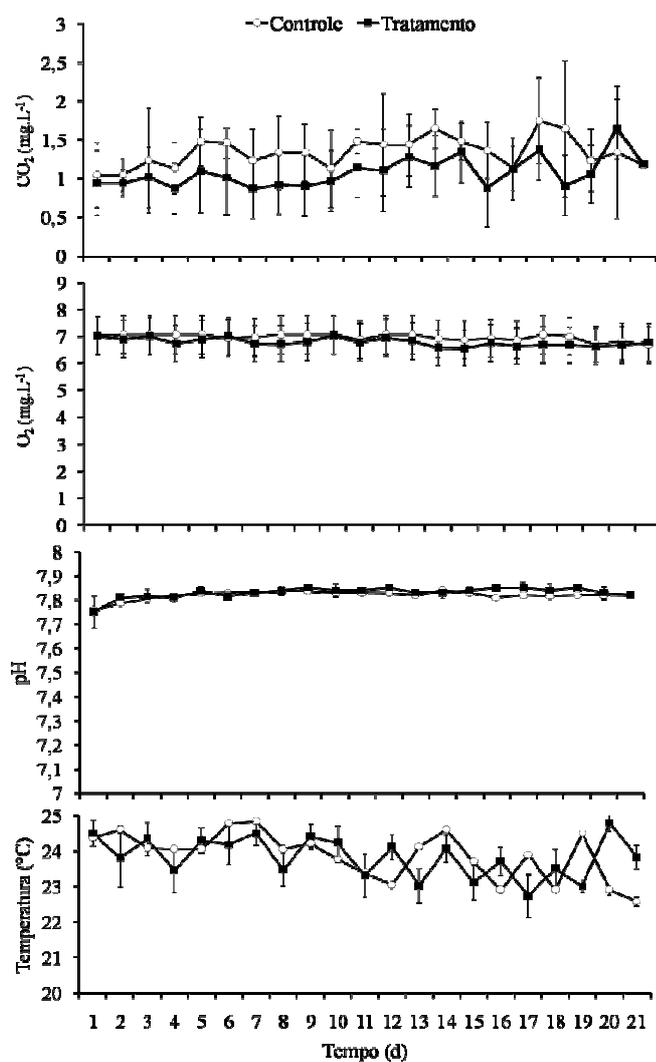


Figura 19 - Médias diárias das concentrações de CO₂ e O₂ dissolvido (mg.L⁻¹) e os valores de pH e temperatura (°C) nos biorreatores com as culturas de *O. secundiramea* ao longo 21 dias de cultivo em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr. Barras indicam desvio padrão das medições diárias (registradas a cada 4 minutos) ao longo dos 21 dias de experimento.

Variáveis analisadas

Foram avaliadas as mesmas variáveis já descritas para os experimentos com as linhagens pigmentares de *H. musciformis*: taxa de crescimento, pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis totais, carboidratos solúveis totais e os compostos com atividade antifúngica.

Especificamente, no cultivo da espécie *O. secundiramea* foram avaliadas semanalmente a absorção do bromo no meio e a sua incorporação no talo da alga no controle (sem adição de KBr ao meio) e no tratamento (com adição de KBr ao meio), após 21 dias de cultura. Avaliou-se também a quantidade da enzima bromoperoxidase responsável pela incorporação do bromo nas moléculas orgânicas da alga.

Análise da remoção do bromo no meio e sua incorporação nos talos de *O. secundiramea*

A quantificação do bromo no meio foi realizada por método colorimétrico (Saenger, 1972), baseado na reação de 5,0 mL H₂SO₄ (16 N), 5,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL cloramina T (Sigma) (15 g.L⁻¹) e 20,0 mL de soluções com concentrações conhecidas de KBr, curva padrão nas concentrações de 0 a 600 mg.L⁻¹ em água destilada. Esta mistura foi agitada vigorosamente e após separação em funil de destilação a fase de clorofórmio foi utilizada para a análise espectrofotométrica com leituras a 400 nm (figura 20).

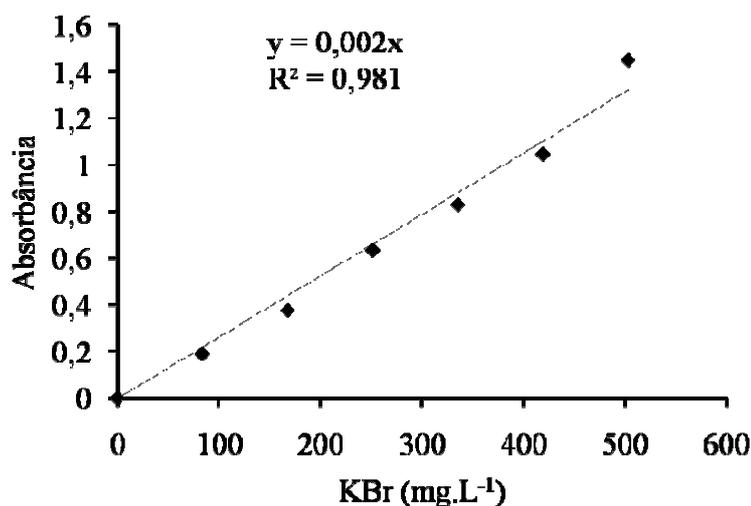


Figura 20- Curva padrão da absorbância para diferentes concentrações de KBr com a equação para determinação de bromo no meio de cultura e no talo de *O. secundiramea*.

Para a determinação da concentração de bromo na água do mar foi realizado o mesmo procedimento para curva padrão, substituindo os 20 mL das soluções de KBr pelo mesmo volume de água do mar.

A água do mar utilizada no experimento de cultura antes do processo de esterilização apresentava 58 mg.L^{-1} de bromo dissolvido, similar ao observado por Saenger (1972) para diferentes locais de coleta. O processo de esterilização reduziu o valor para 52 mg.L^{-1} , que foi considerado como controle para o experimento. Para o tratamento foram adicionados 200 mg.L^{-1} KBr na água do mar esterilizada e feita a análise que determinou o valor final de 250 mg.L^{-1} .

Antes do início do experimento foram realizadas as análises semanais da concentração de bromo, ao longo de 21 dias, nas condições controle (água do mar estéril) e tratamento (água do mar estéril enriquecida com 200 mg.L^{-1}) sem a presença da macroalga. Nesta pré-análise foi verificada ausência de alterações significativas na concentração do bromo dissolvido durante o período experimental (figura 21). Para este teste foi realizada uma Anova unifatorial entre as concentrações de bromo medidas nos intervalos semanais.

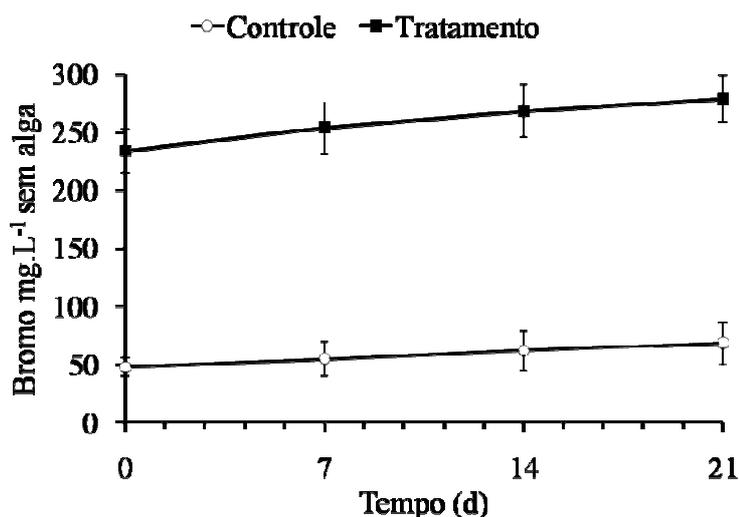


Figura 21 - Concentração de bromo (mg.L^{-1}) no meio de cultura durante 21 dias, sem a presença de *O. secundiramea* nos frascos, mantidos nas seguintes condições: irradiância de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 (L:E). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$).

No experimento de cultivo com a macroalga *O. secundiramea*, nos biorreatores, foi realizado análise do bromo dissolvido semanalmente para meio de cultura do controle e do tratamento, determinado, desta forma, a remoção pela macroalga do bromo dissolvido do meio de cultura.

Para determinação do conteúdo de bromo no talo de *O. secundiramea* foi utilizado 100 mg de massa fresca das condições controle e tratamento (n = 3) após 21 dias de cultivo. Os talos foram enxaguados duas vezes em água destilada e secas em estufa a 65 °C durante 24 horas, em seguida, foram triturados e o pó foi depositado em cadinhos de porcelana, ao qual foram adicionados 10 mL Na₂CO₃ a 10%. Este sal foi adicionado para evitar a volatilização do bromo durante a incineração em mufla a 440 °C por 8 horas. As cinzas obtidas foram suspensas em 5 mL de água destilada, e em seguida filtradas utilizando filtros de papel Whatman No. 541. O material foi lavado repetidamente com água destilada até o volume final de 20 mL. Estas soluções foram tratadas como soluções de KBr.

Quantificação da enzima bromoperoxidase nos talos de *O. secundiramea*

A quantificação da enzima bromoperoxidase foi realizada pelo método e fórmulas padronizados para a espécie *O. secundiramea* (Rorrer et al. 2001). Foram utilizados 100 mg dos talos de *O. secundiramea* de cada repetição (n = 3) coletados após 21 dias de experimento. O material foi imediatamente triturado em nitrogênio líquido e suspenso em tampão fosfato 50 mM KH₂PO₄ contendo 25 mM H₂O₂, com pH ajustado para 6,0 com adição de NaOH 50% (v/v). O peróxido de hidrogênio foi adicionado para proteger a bromoperoxidase contra inativação por fosfato (Soedjak et al., 1991).

O extrato obtido ficou em repouso por 15 minutos para decantação do material particulado, e o sobrenadante límpido foi imediatamente utilizado para a determinação da bromoperoxidase. A medição da atividade bromoperoxidase (BPO) baseia-se na bromação do

substrato monoclorodimedone (1,1-dimetil-4-cloro-3,3-ciclohexanodiona, MCD) com Br em presença de H₂O₂. A reação ocorre com a bromação da forma enólica de MCD na posição C-4 (figura 22) (Butler & Walker, 1993). A perda da ligação dupla resulta na diminuição na absorbância em 290 nm.

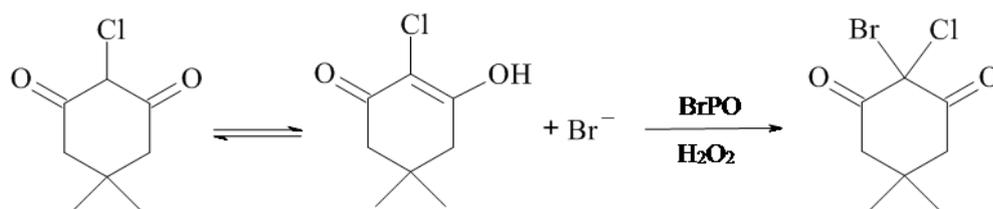


Figura 22- Esquema da bromação do MCD na forma enólica em meio contendo BrPO (bromoperoxidase) e H₂O₂. Ocorrendo a quebra dupla ligação gerando o MCD-Br com redução da absorbância a 290 nm.

O meio reacional foi composto por 0,025 mL de uma solução 1,0 mM de MCD (Sigma cat. No. M4362), 0,30 mL de uma solução de 100 mM de H₂O₂ e 2,60 mL de solução KBr 50 mM, dissolvidos em tampão KH₂PO₄ 50 mM, e o pH foi ajustado a 6,0 com 50 % v/v de NaOH. Este meio foi adicionado a uma cubeta de quartzo. Em seguida, a cubeta foi agitada para completa mistura dos reagentes e a absorbância foi medida a 290 nm em um espectrofotômetro (UV-1650PC, Shimadzu) durante 1 minuto para estabelecer uma linha de base.

A este meio foi adicionado 0,10 mL de extrato de *O. secundiramea* iniciando a reação determinação da atividade da enzima bromoperoxidase curva de decréscimo da absorbância a 290 nm, registrada a uma velocidade de 60 pontos.min⁻¹ durante 2 min.

Paralelamente, foi realizado o padrão contendo 0,10 mL de uma solução 1,25 U mL⁻¹ de bromoperoxidase purificada disponível comercialmente e isolada de *Corallina officinalis* Linnaeus (Rhodophyta, Corallinales) (Cat. B2170, lote n° 105H38993, Sigma), que foi adicionada à cubeta para determinar a curva de atividade da enzima.

A redução da absorvância promovida pela adição do bromo ao MCD em um intervalo de tempo é utilizada para determinar o número de unidades de bromoperoxidase existentes no extrato da macroalga. Portanto, a unidade de enzima é definida como a quantidade que catalisa a conversão de 1,0 micromole de mono - clorodimedon (MCD) a mono - bromoclorodimedon (MCD-Br) por minuto no pH 6,4 e a 25 °C (nmol MCD mL⁻¹.min⁻¹), denominada como R₀ e calculada de acordo com a equação:

$$R_0 (\text{U enzima.mL}^{-1}) = - \frac{1}{l \cdot \epsilon_{\text{MCD}}} \cdot \frac{\Delta A_{290}}{\Delta t}$$

(Equação 3)

Onde:

l = passo óptico da cubeta 1 cm

ϵ_{MCD} = Absorção constante do MCD a 290 nm;

ΔA_{290} = Variação da absorvância da amostra a 290 nm;

Δt = Tempo de leitura em minutos

O R₀ foi utilizado juntamente com a concentração inicial de MCD (C₀) no meio de reação (0,09 μM) e com a constante de saturação do MCD (K_s em nmol MCD.mL⁻¹) para calcular a taxa de conversão máxima (R_{max} na unidade nmol MCD.mL⁻¹.min⁻¹) do MCD a MCD-Br a partir da derivação da equação 4:

$$R_0 = \frac{R_{\text{max}} \cdot C_0}{K_s - C_0}$$

(Equação 4)

Em seguida foi determinada a atividade específica máxima da bromoperoxidase (R'_{max} da unidade de enzima por grama de massa seca da alga). A massa seca (M_s) foi determinada para três talos de 0,2 g que foram secos em estufa a 80 °C e monitorados diariamente até atingir massa constante, resultando em 18,95% da massa fresca inicial. Na determinação da

R'_{\max} foi utilizado o R_{\max} , o volume de reação da cubeta do espectrofotômetro (V_R), o volume total de tampão usado para obter o extrato bruto de 100 mg da alga (V_C) e o volume da alíquota desse extrato utilizado para análise (V_A), conforme o apresentado na equação 5:

$$R'_{\max} = \frac{R_{\max} \cdot V_R}{M_s} \cdot \frac{V_C}{V_A}$$

(Equação 5)

O valor de R_{\max} foi utilizado para determinação da constante de conversão do MCD (K_0 na unidade MCD μg^{-1} enzima. min^{-1}) adotando como base a concentração equivalente em proteína (e_0 na unidade $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a bromoperoxidase comercial verificada pela quantificação das proteínas solúveis totais (Bradford, 1976). O cálculo foi realizado de acordo com a equação 6:

$$R_{\max} = K_0 \cdot e_0$$

(Equação 6)

O valor de e_0 fornece a informação da quantidade de proteína total na fração purificada de bromoperoxidase. Este valor não é conhecido para o extrato obtido para *O. secundiramea* que pode ser estimado por meio da K_0 da enzima purificada e o R'_{\max} determinado para extrato da alga. Desta forma a concentração específica da bromoperoxidase (E_0 na unidade μg de proteína da bromoperoxidase por grama de massa seca de *O. secundiramea*) é determinada pela equação 7:

$$E_0 = \frac{R'_{\max}}{K_0}$$

(Equação 7)

A análise do decaimento da absorbância do MCD convertido a MCD-Br pelo extrato contendo a bromoperoxidase, permitiu determinar a atividade e a concentração específica da enzima, verificando, dessa forma, a influência do enriquecimento com KBr neste passo da síntese dos compostos bioativos em culturas de *O. secundiramea*.

Análise dos compostos com atividade antifúngica

A biomassa não utilizada nas avaliações fisiológicas foi empregada para a obtenção dos extratos bioativos utilizados para avaliar a resposta do enriquecimento com bromo na composição química e na bioatividade dos metabolitos com potencial antifúngico de *O. secundiramea*. Os resultados desse item serão apresentados juntamente com os do tópico **Extração, determinação e purificação dos compostos bioativos** (Item 4.3).

4.3. Extração, fracionamento e determinação dos compostos bioativos

Neste tópico, será abordado o processo de obtenção dos extratos bioativos, a obtenção de frações por técnicas de fracionamento guiado das substâncias com atividade antifúngica e a identificação dos compostos bioativos.

Todas as análises descritas neste tópico foram realizadas com extratos provenientes de biomassa das linhagens de *H. musciformis* cultivadas em laboratório e de *O. secundiramea* coletada na natureza. Foi realizada, ainda, uma análise comparativa do perfil químico dos extratos provenientes da biomassa das algas cultivadas em biorreatores em resposta a diferentes concentrações de CO₂ (linhagens de *H. musciformis*) e de bromo adicionado ao meio de cultura (*O. secundiramea*).

4.3.1. Obtenção dos extratos das linhagens de *H. musciformis* e *O. secundiramea*

Os gametófitos femininos de *O. secundiramea* foram coletados em setembro de 2010, na Ponta da Baleia-ES (20°15'54"S e 40°11'20"W), e uma parte do material foi depositada no herbário de São Paulo, sob o número SP401694.

Os extratos empregados no isolamento de substâncias antifúngicas e testes de bioatividade foram obtidos a partir de algas frescas, segundo o protocolo estabelecido por Machado (2008). A extração foi realizada por incubação durante 07 dias, com a mistura de solventes diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (2:1) (v/v), na proporção de 1 g da macroalga para 10 mL da mistura de solventes. Os extratos foram concentrados a vácuo, a baixa temperatura e pesados para a determinação do rendimento (%) do processo de extração.

Com relação às linhagens de *H. musciformis*, seus extratos foram obtidos a partir de biomassa resultante de cultivo realizado em 2011 e foram empregados na investigação (1) dos efeitos de diferentes métodos de processamento da biomassa, no perfil cromatográfico obtido por CG/EM e também (2) na atividade antifúngica.

Já os extratos provenientes das biomassas obtidas no cultivo em biorreatores, em diferentes concentrações de CO₂, realizado em 2013, foram empregados no (1) fracionamento guiado e na caracterização de compostos bioativos e também no (2) para avaliar efeito do enriquecimento com CO₂ no perfil cromatográficos desses mesmos extratos.

Todos os cultivos de linhagens de *H. musciformis* e as subseqüentes extrações realizadas com sua biomassa estão apresentados na figura 23.

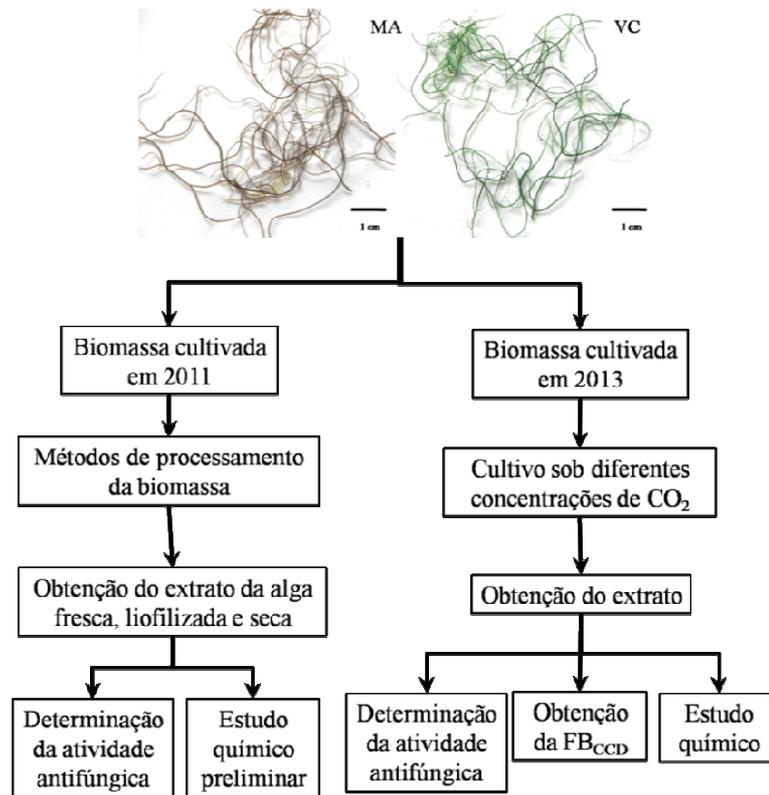


Figura 23- Fluxograma de obtenção dos extratos e atividades desenvolvidas para cada cultivo das linhagens de *H. musciformis*.

Para o estudo de *O. secundiramea*, o extrato obtido diretamente de espécimes coletados em 2010 (SP401694) foi submetido ao (1) fracionamento guiado para caracterização de substâncias antifúngicas e também à (2) avaliação quantitativa de seu potencial antifúngico.

Uma parte dos espécimes de *O. secundiramea* (SP401695), coletados em fevereiro de 2011, foi destinada ao cultivo em biorreator, para avaliar da influência do bromo dissolvido no meio sobre a composição química de seu respectivo extrato e outra parte foi empregada na determinação da influência de diferentes tratamentos sobre o perfil químico e a atividade antifúngica dos extratos provenientes dessa biomassa.

As coletas, os cultivos e as extrações realizados nesse estudo para *O. secundiramea* são apresentados na figura 24.

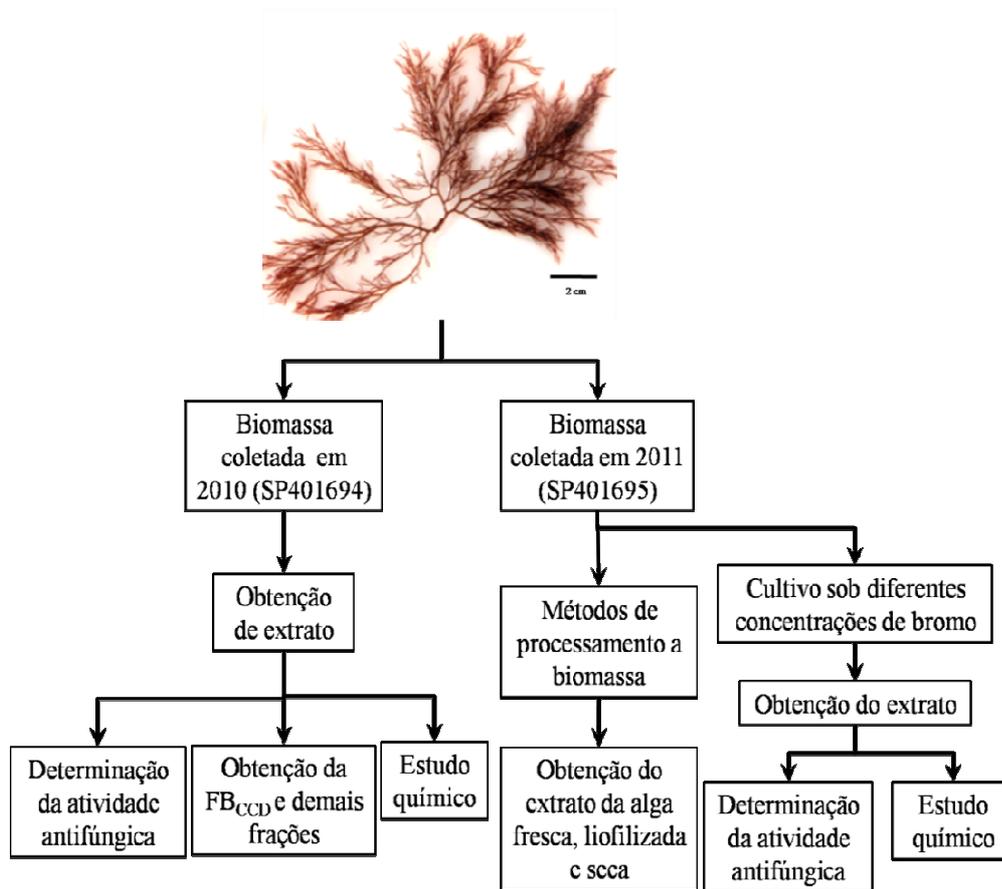


Figura 24 - Fluxograma de obtenção dos extratos e atividades desenvolvidas para cada coleta e cultivo de *O. secundiramea*.

Avaliação da influência de tratamentos da biomassa das linhagens de *H. musciformis* e *O. secundiramea* na composição química, atividade e rendimento de seus extratos

Amostras de 27 g de biomassa fresca das macroalgas *O. secundiramea* (coletada na natureza em 2011) e das linhagens de *H. musciformis* (provenientes de cultivo em biorreatores) foram divididas em 3 lotes de 9 g (3 repetições com 3 g). O primeiro lote foi submetido à extração, sem qualquer tratamento; o segundo, foi congelado em nitrogênio líquido e em seguida liofilizado e o terceiro, foi seco em estufa a 50 °C, até atingir massa constante (24 h).

Após esses procedimentos, todos os lotes foram submetidos à extração, conforme descrito no item anterior (figura 25).

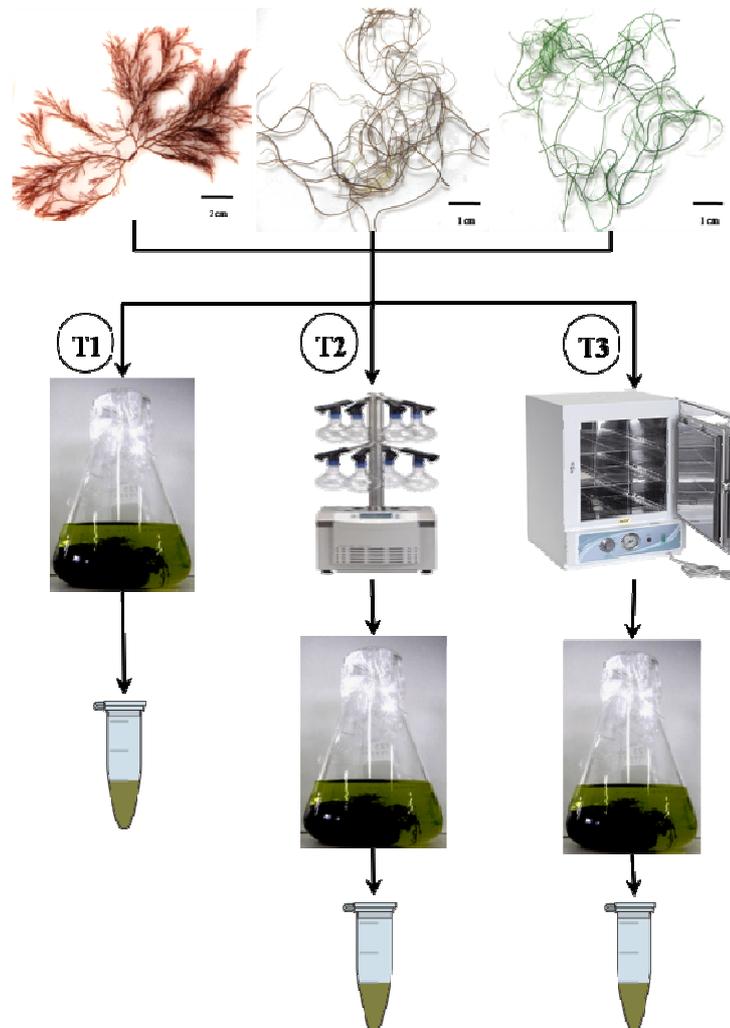


Figura 25 - Fluxograma dos tratamentos da biomassa das algas para obtenção dos extratos. Para a espécie *O. secundiramea* e as linhagens de *H. musciformis* foram realizados a extração a partir da biomassa fresca (T1), liofilizada (T2) e seca a 50 °C (T3).

Todos os extratos foram submetidos à análise química e à prospecção de atividade antifúngica, sendo abordados tanto os aspectos qualitativos quanto os quantitativos, desses ensaios.

4.3.2. Ensaios antifúngicos

A atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* foi avaliada pela técnica da bioautografia (realizada em cromatoplasmas de alumínio, cobertas com gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254, E.Merck). Esses dois fungos foram selecionados por apresentarem elevada produção de

esporos e coloração escura. Para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que apresenta nível de esporulação menor e esporos de cor clara, foi determinada a concentração inibitória mínima, pelo método de difusão em ágar.

Estudos realizados por Machado *et al.* (2014, 2013, 2011) mostraram que o potencial antifúngico dos extratos de *H. musciformis* é inferior aos de *O. secundiramea*, motivo pelo qual, nas análises realizadas com suas linhagens, foram utilizados extratos com concentrações mais elevadas.

Por fim, para a avaliação do efeito inibitório sobre o desenvolvimento da antracnose do mamão na pós-colheita e também para observar sua influência sobre o amadurecimento desses frutos, sobre a superfície destes, foi aplicado um biofilme à base de amido de milho, contendo substâncias isoladas das macroalgas.

4.3.2.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antifúngica pelo método de bioautografia

Este ensaio consiste na aplicação de alíquotas de 10 µL de solução, contendo 500 µg dos extratos das linhagens de *H. musciformis* e 100 µg dos extratos de *O. secundiramea*, a placas de gel de Sílica (cromatoplasas de alumínio, 20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254, E.Merck), que foram desenvolvidas nas fases móveis DCM/MeOH, 99:1, v/v, para *O. secundiramea* e em DCM/MeOH, 95:5, v/v, para as linhagens de *H. musciformis*.

Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas em capela, em corrente de ar e nebulizadas com suspensão de glicose e sais (6:1) contendo esporos dos fungos, na concentração de 10^8 esporos.mL⁻¹. A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida a 28 ± 2 °C, por 48 h, no caso de *C. sphaerospermum* e por 120 h, no caso de *C. lagenarium*.

Após o período de incubação, as placas foram avaliadas quanto à formação de manchas claras sobre o fundo escuro, que são indicativas da presença de substâncias com

atividade antifúngica. Também foram anotados os seus Rfs (Fator de Retenção = razão entre a distância da mancha ao ponto de partida e a distância total percorrida pela fase móvel) e suas intensidades foram avaliadas.

Nesta análise, foi determinado o limite de detecção da atividade antifúngica (LD), pelo método da bioautografia. Para tanto, alíquotas contendo 200, 100, 50, 25, 10 µg de cada extrato das linhagens de *H. musciformis* e 50, 25, 10, 5 e 1 µg, de extrato de *O. secundiramea* foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente, quanto à aplicação dos fungos e incubação das placas. Quando necessário, foram testadas concentrações superiores e inferiores dos extratos, até que o limite de detecção do método fosse atingido.

4.3.3. Fracionamento guiado dos compostos com atividade antifúngica por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Porções de 100 mg dos extratos de cada macroalga foram, separadamente, aplicados a placas cromatográficas preparativas (20x20 cm, 1,50 mm, 60GF254, E.Merck), que foram desenvolvidas em DCM/MeOH 95:5, v/v, no caso de *H. musciformis*, e em DCM/MeOH 99:1, v/v, para *O. secundiramea*.

Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas em capela, em corrente de ar e em cada uma delas, com base nos valores dos RFs determinados previamente para as substâncias com atividade antifúngica, foram demarcadas as áreas a serem retiradas das placas, por conterem as substâncias de interesse.

Cada um desses materiais retirado das placas foi, separadamente, submetido à extração (5 x) com DCM/MeOH (90:10), v/v e os extratos reunidos foram centrifugados (5.000 x g). Os sobrenadantes foram reunidos e filtrados em membrana de PVDF (poro de 0,2 µm e diâmetro 13 mm); o filtrado foi evaporado em corrente de ar, à temperatura ambiente e denominado fração bioativa da CCD (FB_{CCD}). O material seco foi pesado e estocado a -20 °C

para a realização de análises posteriores. O rendimento do processo de purificação foi determinado.

4.3.4. Purificação e caracterização dos metabolitos dos extratos e frações bioativas das macroalgas

Devido às diferenças observadas na intensidade da atividade biológica e no rendimento do processo de fracionamento bioguiado, as frações FB_{CCD} resultantes do extrato de *O. secundiramea* e as resultantes dos extratos das linhagens de *H. musciformis* foram submetidas a diferentes processos de purificação.

Para facilitar o acompanhamento da purificação dos compostos ativos, recorreu-se à CCD, derivatizada com solução ácida de *p*-hidroxibenzaldeído, seguida por aquecimento, o que leva à formação de manchas azuis, rosadas e roxas indicativas da presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos e terpenos.

4.3.4.1. Tratamentos realizados para os extratos das linhagens de *H. musciformis*

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Em virtude de as moléculas componentes dos extratos das linhagens de *H. musciformis* apresentarem baixa volatilidade, essas amostras foram submetidas à siliilação (substituição de grupos hidroxila por grupos trimetil-silil, para posterior análise por CG/EM).

Para tanto, os extratos tratados com piridina e BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% TMCS (trimetilclorosilano) na proporção de 4:1, foram injetados em sistema CG/EM (Agilent GC 6890 e MSD 5973N, Agilent) equipado com coluna de 30 m HP5 com 0,25 µm de espessura da fase estacionária (Supelco). A temperatura de injeção foi fixada em 230 °C, a interface em 250 °C e a fonte de íons ajustada em 150 °C. Como gás de transporte foi utilizado o Hélio, com fluxo de 1 mL·min⁻¹. O programa

empregado foi o seguinte: 5 minutos a 70°C, seguido por uma rampa, com aumento de 5 °C min⁻¹ até 310 °C, temperatura mantida constante por um minuto. Os espectros de massa foram registrados em duas varreduras por segundo, na faixa de 50 a 650 *m/z*. Os espectros de massas foram avaliados com base no programa ChemStation (Agilent, EUA). Os picos foram identificados e comparados com os dados da biblioteca de espectros de massa NIST 08 (levando-se em conta similaridade superior a 95 %), adicionalmente foi realizado a análise da série de n-alcenos para o cálculo dos índices de Kovats e com bibliografias específicas.

Estudo dos compostos da FB_{CCD} das linhagens de *H. musciformis* por análise em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE/EM)

O isolamento dos componentes das FB_{CCD} das linhagens de *H. musciformis* foi realizado em cromatógrafo Shimadzu LC-20, acoplado à coluna de fase reversa Phenomenex Luna C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µM). A fase móvel foi constituída por - solução aquosa de Ácido Fórmico 0,01% (Solvente A) e Metanol 100% (Solvente B) e a eluição foi do tipo gradiente: 0 a 10 min (20 - 50%B); 10 a 15 min (50 - 80%B); 15 a 30 min (80% B); 30 a 36 min (80 - 20% B); 36 a 42 min (20% B). O fluxo foi de 1 mL·min⁻¹. As análises no espectrômetro de massas Bruker MicroTOF Q-II foram realizadas no modo positivo, calibrado com formiato de sódio, com duas aquisições por segundo, na faixa de massas entre *m/z* 50 e 1100. Os resultados foram analisados por meio do script smart formule 4.1 (Bruker software data compass). A exatidão das medidas das massas foi calculada como a diferença (erro) entre a massa medida (experimental) e a massa teórica, em ppm, segundo a equação (Lanças, 2013):

$$Erro = \frac{Massa_{Teórica} - Massa_{Obtida}}{Massa_{Teórica}} \times 10^6$$

A massa teórica foi calculada com base nos valores das massas precisas, dos elementos (Pavia et al., 2010).

4.3.4.2. Tratamentos realizados para o extrato de *O. secundiramea*

Purificação por Cromatografia Líquida em Coluna

A FB_{CCD} proveniente do extrato de *O. secundiramea* SP401694, coletada em 2010, foi submetida à Cromatografia Líquida em Coluna, sob pressão atmosférica, empregando-se como fases estacionárias Sephadex LH-20 (Sigma, 9041-37-6) (I) e gel de sílica (60, 0,2-0,5 mm, Merck, 7733) (II),

Coluna de Sephadex (I)

Uma coluna de vidro foi preenchida com 25 g de Sephadex LH-20 como fase estacionária, cujas dimensões, após o empacotamento foram 78 cm de altura x 1,2 cm diâmetro. Sendo em seguida aplicado a FB_{CCD} à coluna, que foi eluída em modo isocrático, com a fase móvel Hexano-DCM (4:1) sendo coletados o volume morto (7 mL), 100 frações de 1 mL, seguidas de 10 frações de mL. A vazão foi de 0,01 mL·s⁻¹.

As frações coletadas foram submetidas à CCD em gel de sílica, desenvolvida com a fase móvel DCM 100%; os cromatogramas foram avaliados sob luz UV ($\lambda = 254$ e 366nm) e em seguida, derivatizados com *p*-hidroxibenzaldeído. As frações que, nestas análises, mostraram-se iguais, foram reunidas.

Coluna de Sílica (II)

Neste procedimento, foram empregados 17,2 g de sílica como fase estacionária, a qual após o empacotamento apresentou dimensões de 38 cm de altura x 1 cm de diâmetro. O modo de eluição foi o isocrático e a fase móvel, o Diclorometano; a velocidade de eluição foi de

0,006 mL·s⁻¹. Os materiais submetidos a este processo foram as frações eluídas do procedimento realizado na coluna de Sephadex-LH-20, que, por CCD, mostraram ser constituídas por mistura de substâncias, sendo pelo menos uma delas, de interesse. Foram coletadas uma fração de 3 mL (volume morto), 90 frações de 1 mL e 10 frações de 10 mL. Essas frações foram avaliadas de modo semelhante ao empregado na análise das frações obtidas no item anterior.

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

As análises qualitativa e semi-quantitativa da composição química do extrato, da FB_{CCD} e das substâncias isoladas de *O. secundiramea* foram conduzidas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, QP2010 Plus, Shimadzu, Japão), dotado de coluna capilar HP5MS (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m, com espessura de 0,25 µm e diâmetro de 0,25 mm. A temperatura estabelecida para o injetor foi de 220°C e o gradiente de temperatura da coluna foi de 60 a 260°C (3°C·min⁻¹), seguido pela manutenção em 260°C, durante 40 min; o volume de injeção foi 0,1 µL, com split de 1:10 para as frações e 1:50 para o extrato bruto; o gás de arraste foi o Hélio, mantido em fluxo constante de 1 mL·min⁻¹.

O espectrômetro de massas do tipo quadrupolo operou com Ionização eletrônica (70 eV), sendo a temperatura de interface CG/EM, de 240°C. Os espectros de massas foram analisados quanto aos fragmentos formados e comparados com artigos específicos e dados das bibliotecas da NIST 08 e do 08s (National Institute of Standards and Technology), disponíveis no banco de dados do equipamento. A partir da área de todos os picos, observados no TIC, foram calculadas a somatória da área total e a concentração relativa (%) das substâncias presentes nas amostras.

Análise das sub-frações obtidas por cromatografia líquida em coluna por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrofotômetro DRX-500 (Bruker), na Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo. O Clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi empregado como solvente e como padrão interno ($\delta = 77,24$ e $77,0$). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos partes por milhão (ppm) e o tetrametilsilano empregado como referência interna de calibração ($\delta = 0,00$ ppm).

A discussão dos resultados foi realizada com base nos valores dos deslocamentos obtidos comparados com os descritos para os compostos identificados previamente por CG-EM. Adicionalmente os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H bem como os espectros de COSY (correlação homonuclear de identificação do acoplamento de hidrogênios) obtidos na análise das sub-frações foram comparados com os previstos para cada monoterpêdo halogenado com base no “NMR Predict” (Castillo et al. 2011) (Acessado em 06/2014 e disponível em: http://www.nmrdb.org/new_predictor/).

4.3.5. Efeitos da aplicação do extrato e fração bioativa de *O. secundiramea* no controle da antracnose do mamão: testes *in vitro* e *in vivo*

4.3.5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* para o fungo *C. gloeosporioides*

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de diluição no meio BDA. O teste foi realizado em placa para microtitulação tipo ELISA de 96 poços, esterilizada por tratamento em microondas por três minutos (repetido por vezes) e luz UV por 30 minutos. Em cada poço foram aplicados 100 μL de meio BDA (controle negativo), os tratamentos foram compostos por meio BDA e os extratos e frações solubilizados primeiramente em 10 μL de DCM e em seguida misturado com o BDA a 60 $^\circ\text{C}$ (promovendo a remoção do DCM por evaporação) nas concentrações finais de 150, 100, 50, 25, 15, 10 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, adicionalmente

foi realizado o controle positivo contendo apenas os 100 μL de BDA e 10 μL de DCM, o aspecto inicial (antes da inoculação do fungo) do experimento é apresentado na figura 26.

Para a determinação da CIM, foi utilizado o método da diluição em meio BDA. As amostras a serem analisadas foram aplicadas à placa para microtitulação, tipo ELISA, contendo 96 poços. Foi realizado o processo de esterilização em microondas, por três séries de aquecimento durante três minutos, seguidas de exposição à luz UV, por 30 minutos.

As amostras foram compostas por 100 μL de meio BDA (controle negativo) aplicados previamente aos poços, aos quais eram acrescentados os extratos ou frações solubilizados em 10 μL de DCM, que eram então submetidas a aquecimento a 60 $^{\circ}\text{C}$, para promover a mistura do material ao meio BDA e a remoção do DCM, por evaporação.

As concentrações finais dos materiais testadas foram de 150, 100, 50, 25, 15, 10 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como controle positivo, foi utilizado amostras contendo 100 μL de BDA e 10 μL de DCM.

A figura 26 mostra o aspecto da placa de microtitulação contendo as amostra, antes da inoculação do fungo

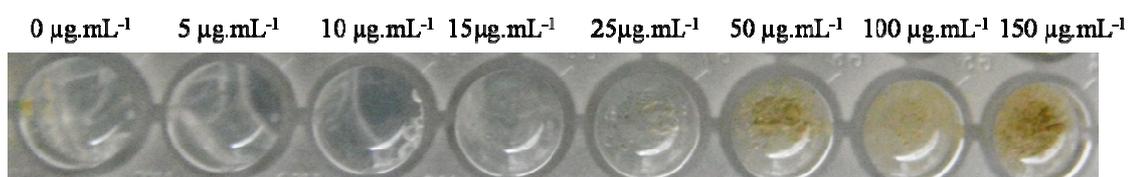


Figura 26 - Placa de microtitulação tipo ELISA de 96 poços contendo meio BDA e o extrato de *O. secundiramea* nas concentrações de 150, 100, 50, 25, 15, 10, 5 e 0 (apenas o solvente DCM) $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O fungo foi inoculado utilizando 5 μL da suspensão contendo 10^4 conídios. mL^{-1} e as placas serão incubadas por dois dias com temperatura, ajustada para $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O ensaio realizado com três repetições avaliando a menor concentração capaz inibe 100% do crescimento visual do fungo.

4.3.5.2. Avaliação da aplicação *in vivo* do extrato e da fração de *O. secundiramea* na forma de biofilme em frutos de mamão

Este ensaio, dividido em três etapas, foi realizado segundo Oliveira Jr et al. (2013). A primeira etapa consistiu na obtenção e seleção dos frutos, a segunda, no preparo e aplicação do biofilme e o terceiro, na avaliação dos parâmetros de qualidade dos frutos, durante o período de prateleira.

Devido aos motivos (rendimento e intensidade da atividade antifúngica) mencionados anteriormente o ensaio de aplicação das substâncias de macroalgas foi realizado apenas para o extrato e FB_{CCD} da espécie *O. secundiramea*.

Obtenção dos frutos

Frutos, da cultivar “Sunrise solo” ou Havaí, foram produzidos nas Fazendas Reunidas 2 Irmãos, situada na região de Teixeira de Freitas - BA e cedidos pela empresa produtora, fornecedora e proprietária do Box Frutas BS LTDA, no CEAGESP. Para garantir a homogeneidade visual das amostras e eliminar as unidades que apresentassem ferimentos ou manchas, a seleção dos frutos foi feita quando estes ainda estavam totalmente verdes.

Os frutos foram transportados para o Instituto de Química da USP, onde foram lavados e submetidos a tratamento com solução clorada contendo 100 mg.L⁻¹ de cloro ativo, por 30 segundos em seguida, os frutos foram secos à temperatura ambiente e armazenados a 15 °C, até a realização do experimento.

Preparo e aplicação do biofilme de amido do controle e contendo o extrato e FB_{CCD} de *O. secundiramea*

Para a preparação do biofilme de amido, foi utilizada fécula de milho comercial aplicada na concentração de 20 mg.mL⁻¹ de amido em água destilada. Esta concentração foi

determinada por Santos et al. (2011) como a melhor para aplicação de biofilme de amido no período de pós-colheita em frutas.

As soluções de amido foram aquecidas até 70°C sob agitação constante por 15 min dando início ao processo de gelificação do amido em água. Esta solução foi deixada em repouso até o resfriamento em temperatura ambiente.

O extrato e a FB_{CCD} de *O. secundiramea* foram, separadamente, dissolvidos em 10 µL de DCM. Estas soluções resultantes foram adicionados 1 mL de Tween 80 e 9 mL de água destilada. Após homogeneização em vórtex, essas soluções foram adicionadas a volumes pré-determinados da solução de amido, de modo a obter-se a concentração final de 10 µg.mL⁻¹ dos bioativos, equivalente a CIM determinada, no ensaio antifúngico, frente ao fungo *C. gloeosporioides* no ensaio *in vitro*. Nos controles, à solução de amido foram adicionados apenas Tween 80 e 10 µL de DCM.

Não foram realizados ensaios adicionais para a verificação da influência do biofilme na conservação dos mamões, pois Oliveira Jr. et al. (2013) demonstraram que a aplicação deste material não promove alterações significativas às frutas. A aplicação do biofilme foi feita por imersão das frutas na solução de amido, por 1 minuto; a secagem foi feita em bancada, sob ventilação artificial mantida por 30 min.

Avaliação dos parâmetros de qualidade dos frutos e do desenvolvimento da antracnose pós-colheita durante o período de prateleira

A aplicação do biofilme foi feita no estágio 1 de maturação dos frutos, no qual manchas amarelas ocupam menos de 15% da casca (figura 27). Imediatamente após, foi iniciada a simulação do período em prateleira, quando os frutos foram armazenados em sala climatizada a 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar entre 80-85% (figura 28).



Figura 27 - Aspecto dos frutos antes da aplicação do biofilme de amido (T0).



Figura 28 - Aspecto dos frutos, durante a simulação do período de prateleira.

Os frutos de mamão do controle, contendo apenas biofilme, e os tratados com o extrato e a FFB_{CCD} de *O. secundiramea* os foram submetidos a avaliações por 6 dias (medições em 0, 3 e 6 dias) do processo amadurecimento e pós-colheita dos frutos e ocorrência de antracnose. Para tanto foram efetuadas análises dos seguintes parâmetros, sendo avaliados três frutos (n = 3) para cada tratamento:

Perda de massa fresca

Por meio de uma balança digital foram registradas as diferenças entre o peso inicial do fruto e o peso final a cada três dias, sendo o resultado expresso em % (porcentagem de perda de massa).

Os sólidos solúveis, acidez titulável e pH da polpa dos frutos foram avaliados a partir do suco produzido por 5 g da polpa da região mediana do fruto, ao qual foi adicionado 50 mL de água destilada.

Teor de sólidos solúveis

Foi determinado com auxílio de refratômetro portátil (Instrutherm, RT-90ATC), na faixa de 0 a 32 °Brix. Para a análise, gotas dos sucos foram colocadas sobre a lente refratômetro.

Acidez titulável

A acidez titulável foi obtida pela titulação de uma alíquota de suco, em presença de fenolftaleína, com NaOH 0,1 N até o pH atingir 8,1 (AOAC, 1992), sendo expressa em (%) de ácido cítrico na polpa.

pH da polpa

O pH da polpa foi medido por potenciometria, em pHmetro digital (AOAC, 1992).

Firmeza da polpa e resistência da casca

Ambos os parâmetros foram determinadas por meio de um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) (figura 29), operando com software Texture Expert, localizado no IPEN-USP (Instituto de Pesquisas Nucleares). A firmeza da polpa foi medida por meio de um corpo de prova tipo agulha (probe) P/2N de aço inox penetrando 15 mm na polpa

enquanto que para determinar a resistência da casca, utilizou-se a probe P/2 com ponta de 2 mm de diâmetro penetrando 5 mm no fruto. O resultado registrado corresponde ao valor obtido para força máxima, com velocidade de penetração de 1 mm.s^{-1} , determinado por meio análise da curva força x tempo e expressas em Newtons (N). As medidas foram tomadas em três pontos na região equatorial dos frutos, sendo a média entre eles o valor final.



Figura 29 - Texturômetro TA-XT2 utilizado para a determinação da firmeza da polpa e resistência da casca dos frutos de mamão em resposta a aplicação de biofilme enriquecido com extrato e FB_{CCD} de *O. secundiramea*.

Índice de doença

Foi determinado por análise subjetiva a partir de uma escala de categorias proposta por Azevedo (1998) que define notas de acordo com a intensidade do desenvolvimento da antracnose, sendo que a nota 0 (zero) refere-se ao mamão sem nenhum sintoma de doença; 1 refere-se ao mamão com lesões de diâmetro inferior a 1,0 cm; 2 refere-se ao mamão com lesões de diâmetro entre 1,0 e 2,0 cm e 3 refere-se ao mamão com lesões de diâmetro maior que 2,0 cm.

4.4. Análises estatísticas dos dados

Todos os experimentos foram conduzidos com delineamento inteiramente casualizado e realizado com três repetições. Os resultados de crescimento das algas em laboratório e das variáveis fisiológicas avaliadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial e testes “a posteriori” de comparação múltipla de Tukey para distinguir os tratamentos significativamente diferentes. As análises foram realizadas com o software gratuito ASSISTAT (Versão 7.6).

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção e manutenção das culturas de *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A.Howe

Experimento sobre liberação e germinação carpósporos e desenvolvimento de plântulas

A partir de gametófitos femininos com cistocarpos foram obtidos carpósporos de *O. secundiramea*, com diâmetro médio $6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($n = 20$) após 24 h (figura 30). Após 48 h, foi observada a germinação de esporos de $3,5 \mu\text{m}$ com o padrão do tipo Nematolion e a degradação dos esporos de $6 \mu\text{m}$ (Figura 31). Os esporos germinados deram origem germinantes após 4 dias e em seguida foi observada a formação de monosporângios (6 dias), que posteriormente foi identificada pelas características morfológicas e moleculares como *Acrochaetium infestans* M.A. Howe & Hoyt (figura 32) Esta espécie foi isolada e mantida em cultura no laboratório.

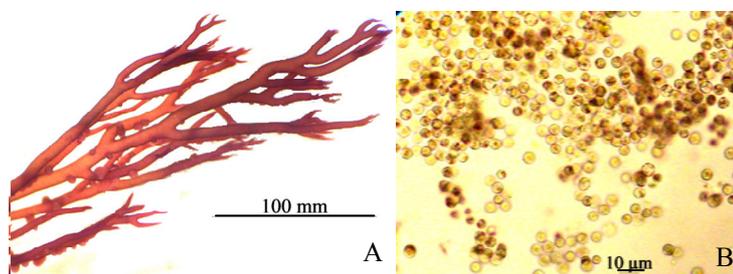


Figura 30 - Gametófito feminino de *O. secundiramea* com cistocarpos (A). Carpósporos liberados após 24 h (B).



Figura 31 - Germinação dos esporos da alga vermelha *Acrochaetium infestans* apresentando o padrão de germinação do tipo Nemaion, após 48 h.

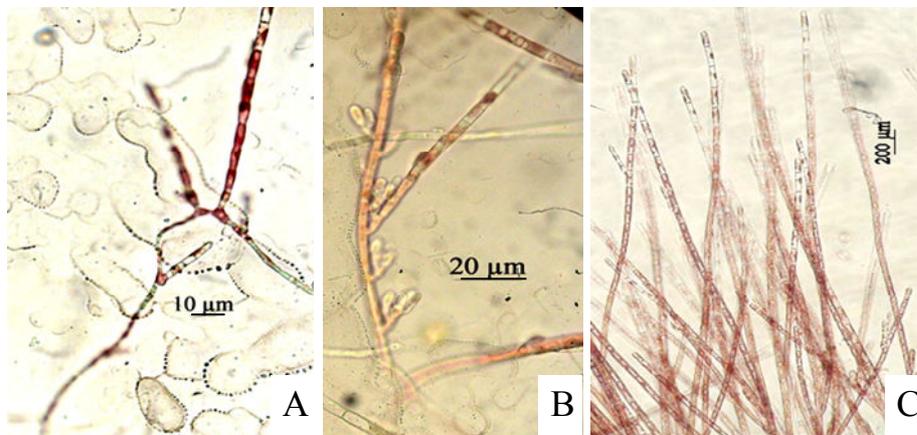


Figura 32 - Plântulas eretas com 4 dias (A), formação de monosporângios após 6 dias (B), estabelecimento de cultura de *Acrochaetium infestans* em laboratório obtidas a partir da germinação de esporos (C).

Nas condições de laboratório (irradiância de $10 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e salinidade de 33 ups) observou-se que os carpósporos de *O. secundiramea* apresentaram elevada sensibilidade e não germinaram, impedindo a obtenção de culturas com o aplicação desta técnica.

Propagação de segmentos apicais

Como os esporos de *O. secundiramea* não foram viáveis em laboratório, segmentos apicais de 2 cm dos ramos de gametófitos femininos não férteis foram utilizados para a determinação das melhores condições de cultura para a obtenção de biomassa.

5.1.1. Testes para isolamento e crescimento de segmentos apicais de *O. secundiramea*

Experimento de cultura com diferentes soluções de nutrientes

Em resposta aos tratamentos com diferentes concentrações de duas soluções de nutrientes (von Stosch e Provasoli), os talos de *O. secundiramea* apresentaram taxa de crescimento de 0,2 % por dia em todos os tratamentos testados, não sendo observadas diferenças significativas ($F = 1,6243$, $p = 0,2357$) entre os tratamentos após 21 dias de cultura (Figura 33). Desta forma, para a continuidade dos experimentos foi selecionado o meio de cultura VSES/2.

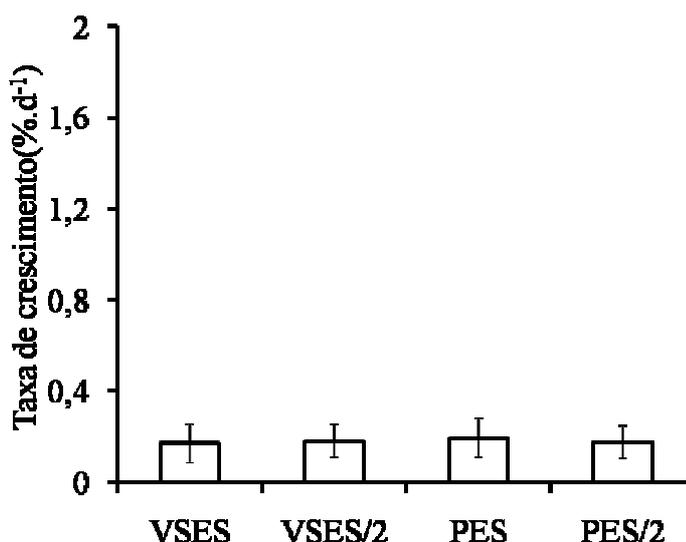


Figura 33 - Taxa de crescimento dos segmentos apicais de *O. secundiramea* em resposta a diferentes concentrações de nutrientes após 21 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $15 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$).

Experimento de cultura em diferentes n\u00edveis de irradi\u00e2ncia

As maiores taxas de crescimento de segmentos apicais de *O. secundiramea* foram observadas nos tratamentos de 30 e $50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ap\u00f3s 21 dias diferen\u00e7a significativas ($F = 9,5702$, $p = 0,0017$) (Figura 34).

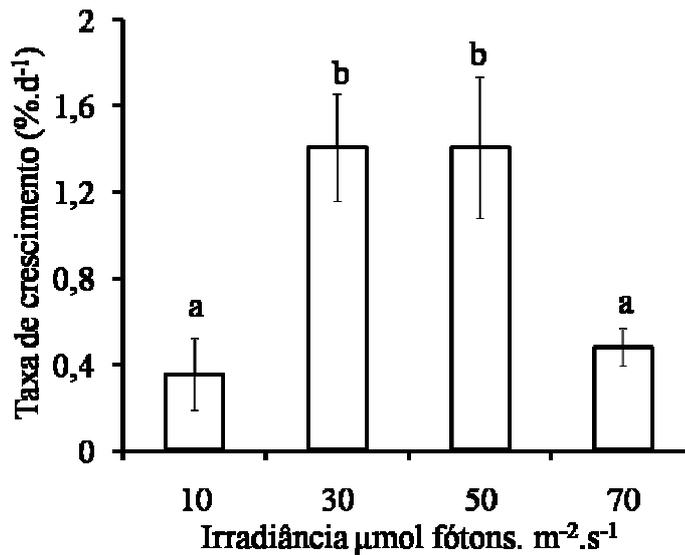


Figura 34 - Taxa de crescimento (%.d⁻¹) dos segmentos apicais de *O. secundiramea* em porcentagem de biomassa por dia em respostas a diferentes n\u00edveis de irradi\u00e2ncia ap\u00f3s 21 dias cultivadas nas seguintes condi\u00e7\u00f5es: meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de signific\u00e2ncia.

N\u00e3o foram observadas diferen\u00e7as significativas no crescimento das algas cultivadas na irradi\u00e2ncia de 30 e 50 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Por outro lado, na condi\u00e7\u00e3o de 10 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram observadas a aus\u00eancia de contaminantes e a ocorr\u00eancia de degrada\u00e7\u00e3o dos pigmentos. O tratamento com o n\u00edvel mais elevado de irradi\u00e2ncia promoveu o desenvolvimento de algas ep\u00edfitas associado a degrada\u00e7\u00e3o dos talos de *O. secundiramea* (Figura 35).

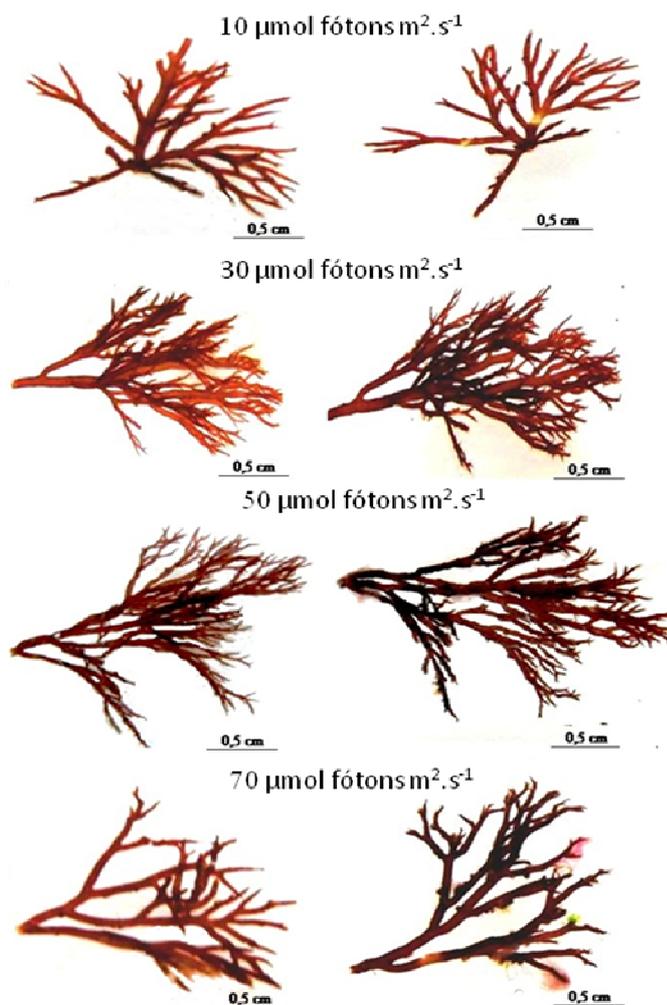


Figura 35 - Segmentos apicais de *O. secundiramea* em resposta a diferentes níveis de irradiância. Algas do lado esquerdo ilustram a condição inicial e no lado direito correspondem a algas após 21 dias de cultivo nas seguintes condições: meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E).

Experimento de cultura com e sem aeração

Após a seleção dos melhores tratamentos com solução de nutrientes e de irradiância para o cultivo de *O. secundiramea*, foi realizada a avaliação do efeito da aeração na produção de biomassa. Não foram observadas diferenças significativas ($F = 1,7141$, $p = 0,2605$) na taxa crescimento que foram próximas a 6% por dia nos tratamentos testados (Figura 36). No entanto, o movimento da água fez com que os talos da alga apresentassem maior rigidez e resistência, e o escurecimento do talo da alga associado ao crescimento de organismos epífiticos contaminantes (Figura 37).

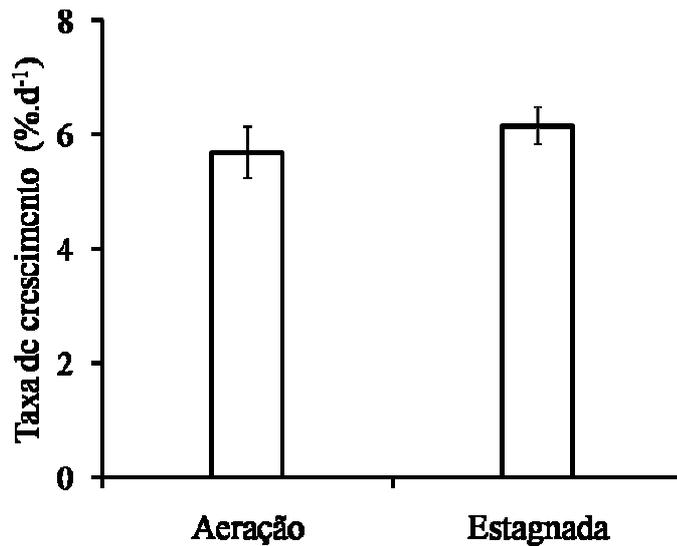


Figura 36 - Taxa de crescimento dos segmentos apicais de *O. secundiramea* em porcentagem de biomassa por dia em respostas a aeração com 0,5 L.min⁻¹ de ar úmido e o controle com cultura estagnada após 21 dias cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 30 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). Valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o (n=3).

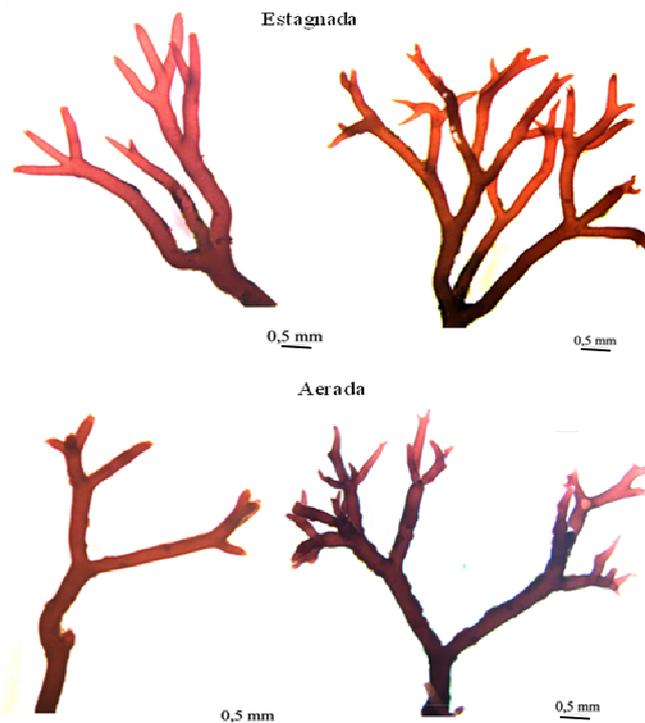


Figura 37 - Segmentos apicais de *O. secundiramea* cultivados de forma estagnada e sob aera\u00e7\u00e3o com 0,5 L.min⁻¹ de ar \u00famido, algas do lado esquerdo ilustram a condi\u00e7\u00e3o inicial e no lado direito ap\u00f3s 21 dias de cultivo irradi\u00e2ncia nas seguintes condi\u00e7\u00f5es: irradi\u00e2ncia de 30 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E).

Aplicação do protocolo de descontaminação

Após a definição da melhor condição de cultivo ($30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2.\text{s}^{-1}$; meio de cultura enriquecido com VSES/2 e sem aera\u00e7\u00e3o) para obten\u00e7\u00e3o de biomassa associada ao baixo desenvolvimento de ep\u00edfitas em segmentos apicais de *O. secundiramea*, iniciou-se o protocolo de descontamina\u00e7\u00e3o para controle das ep\u00edfitas, que com a aplica\u00e7\u00e3o continua foi poss\u00edvel obter culturas em que o desenvolvimento das ep\u00edfitas estavam sob controle ap\u00f3s 8 semanas (Figura 38).

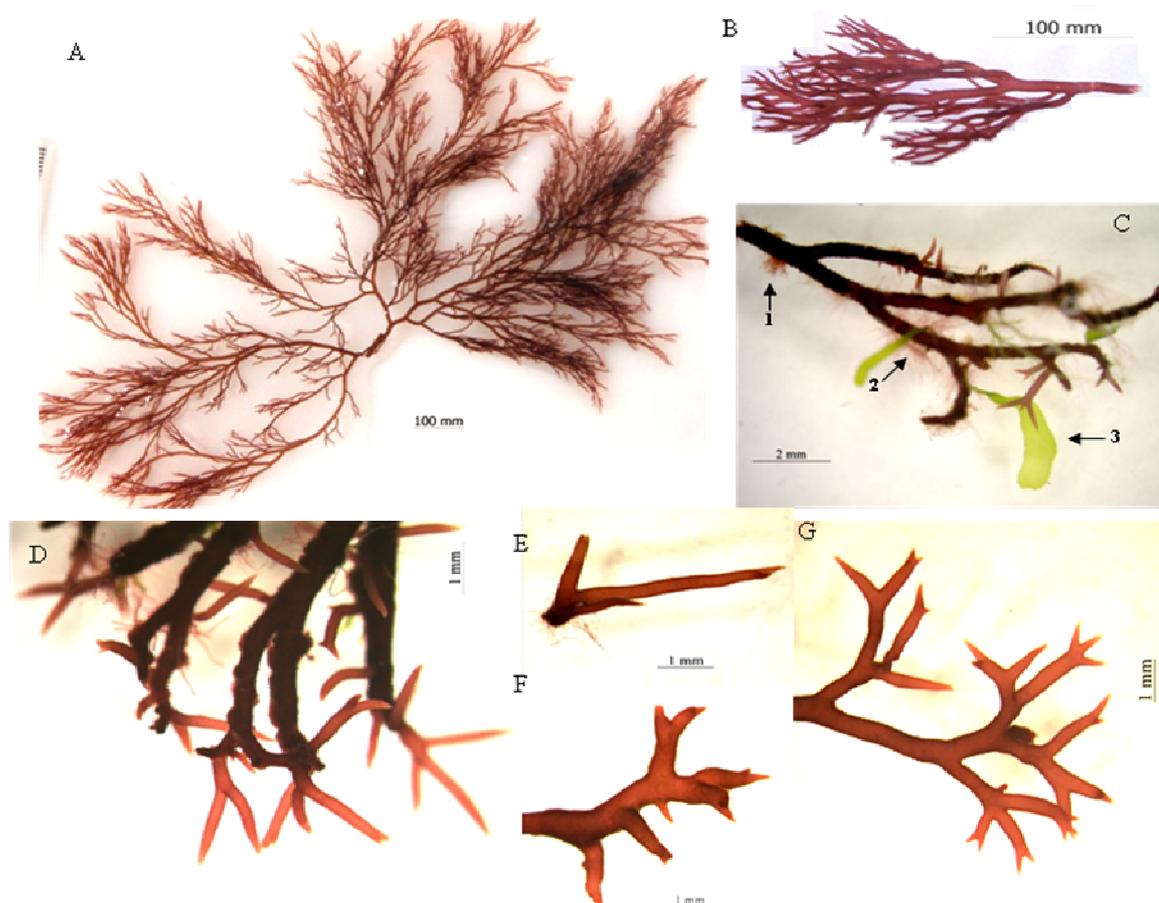


Figura 38 - Desenvolvimento da cultura de *O. secundiramea*, realizada com $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2.\text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). A - Aspecto geral de *O. secundiramea* ap\u00f3s a coleta; B - Segmento apical inicial com 2 cm; C - Segmentos apicais com 4 semanas, com setas indicam os ep\u00edfitas macroalgas, 1 - *Acrochaetium* sp., 2 - *Erythrotrichia* sp., 3 - *Ulva* sp., D - Forma\u00e7\u00e3o de \u00e1pices de *O. secundiramea* ap\u00f3s 5 semanas, E - \u00c1pices seccionados, F - desenvolvimento dos \u00e1pices ap\u00f3s 6 semanas; G - Cultura de *O. secundiramea* estabelecida ap\u00f3s 8 semanas.

5.2. Experimentos em biorreatores

5.2.1. Efeito do enriquecimento com CO₂ no cultivo das linhagens pigmentares de *H. musciformis*

Após 21 dias de cultivo das linhagens de *H. musciformis* nas condições de controle (0,5 mg.L⁻¹ de CO₂) e o tratamento (5,5 mg.L⁻¹ de CO₂) observaram-se taxas de crescimento diário de 12 % para a linhagem MA e 10 % para a linhagem VC tendo sido obtidos um total de 33,172 g para o controle e 24,978 para o tratamento da linhagem MA e 25,773 g e 20,058 g para controle e tratamento da linhagem VC (somatório total da biomassa das três repetições de cada tratamento). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas taxas e nas curvas decrescimento das algas em resposta a adição de CO₂ ao longo de 21 dias quando comparadas ao controle (Figuras 39 e 40).

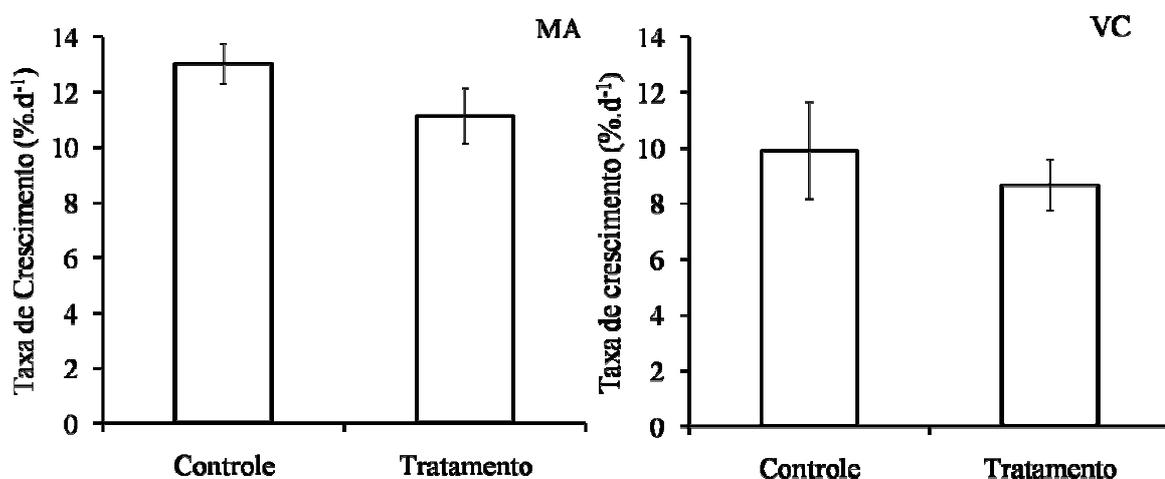


Figura 39 - Taxa de crescimento das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min⁻¹ de CO₂) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de 23 \pm 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (n=3).

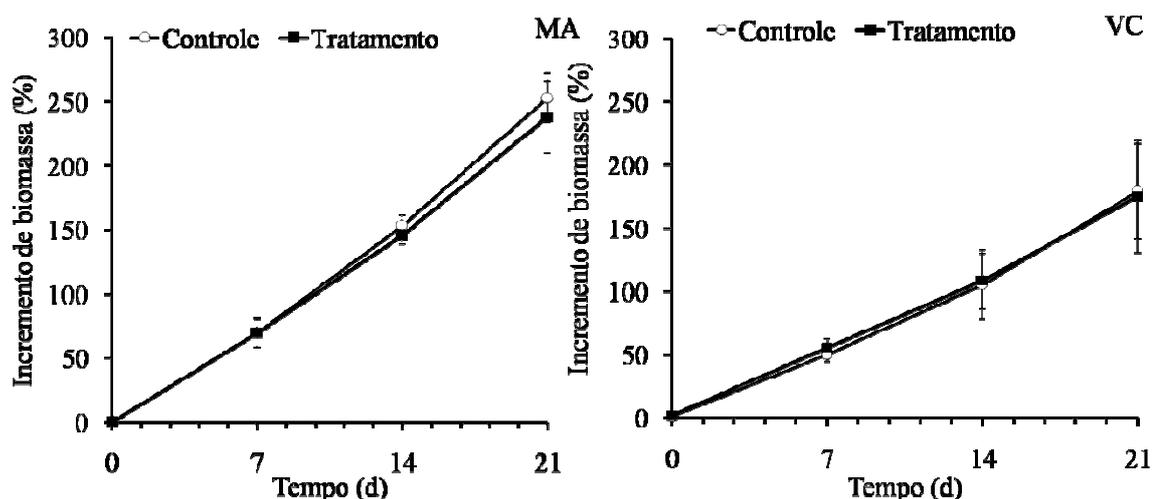


Figura 40 - Curva de crescimento por aumento da biomassa fresca em (%) das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min⁻¹ de CO₂) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹, meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3).

O enriquecimento com CO₂ no cultivo em biorreatores não promoveu alterações significativas das concentrações dos pigmentos fotossintetizantes sendo verificados valores de Clorofila *a* de 0,1562 (controle) e 0,1535 mg.g⁻¹ (tratamento com CO₂) na linhagem MA (F = 1,1879; p = 0,3369), enquanto que a linhagem VC apresentou os valores 0,205 e 0,247 mg.g⁻¹ (F = 0,006549; p > 0.050) para o controle e tratamento, respectivamente. Foi verificado o mesmo padrão de respostas para as concentrações de ficobiliproteínas que apresentaram valores similares entre as condições testadas em cada linhagem de *H. musciformis*. Os resultados observados para proteínas totais e açúcares totais não indicaram alterações significativas nas concentrações desses parâmetros em resposta ao enriquecimento com CO₂ durante os 21 dias de cultivos em biorreatores (figura 41).

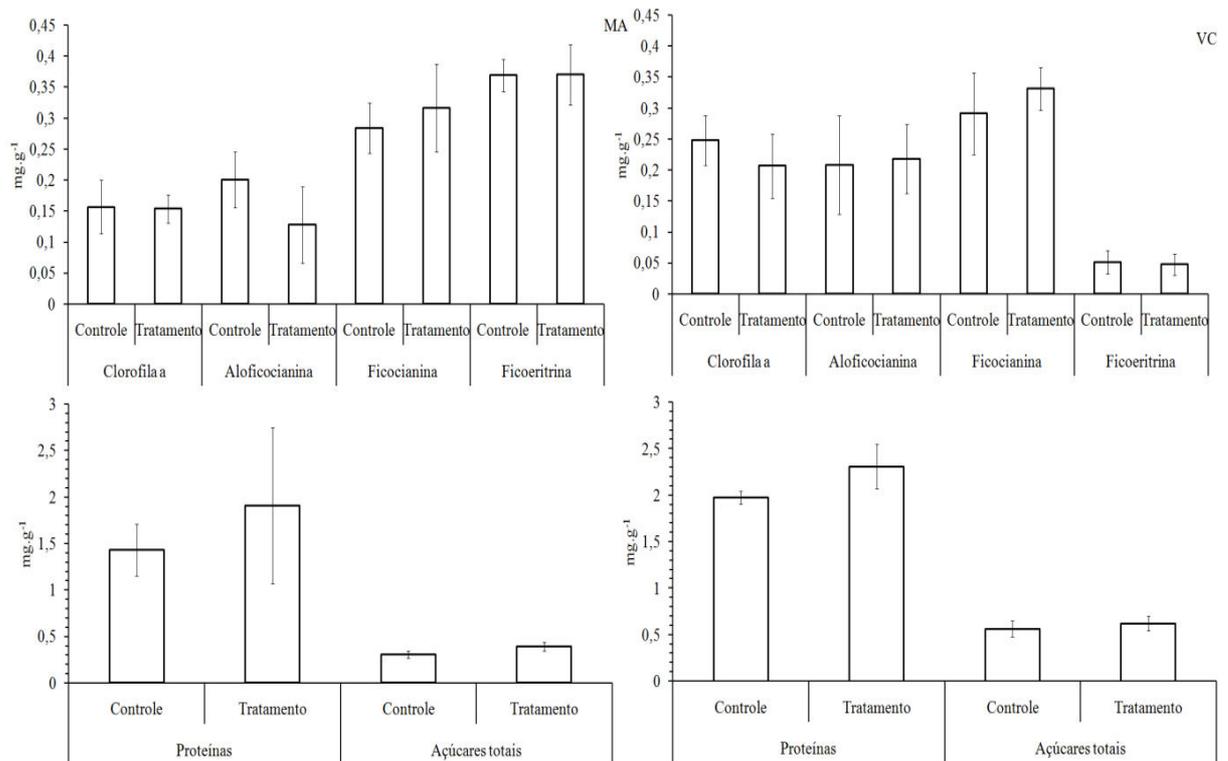


Figura 41 - Concentração de média pigmento, proteínas e açúcares totais (mg.g^{-1}) nos talos das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta ao controle (aeração com ar úmido) e o tratamento (ar úmido + 2 mL.min^{-1} de CO_2) cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$).

5.2.2. Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo de *O. secundiramea*

O enriquecimento com bromo no meio de cultura de *O. secundiramea* n\u00e3o promoveu altera\u00e7\u00f5es significativas na taxa de crescimento ($F = 0.56312$; $p > 0.050$) e na curva de incremento de biomassa durante os 21 dias de experimento (figura 42). Ao final do per\u00edodo de cultivo foram obtidas a biomassa total de 2,382 g e 2,378 g, respectivamente, para o controle (sem adi\u00e7\u00e3o de KBr) e tratamento (com adi\u00e7\u00e3o de KBr).

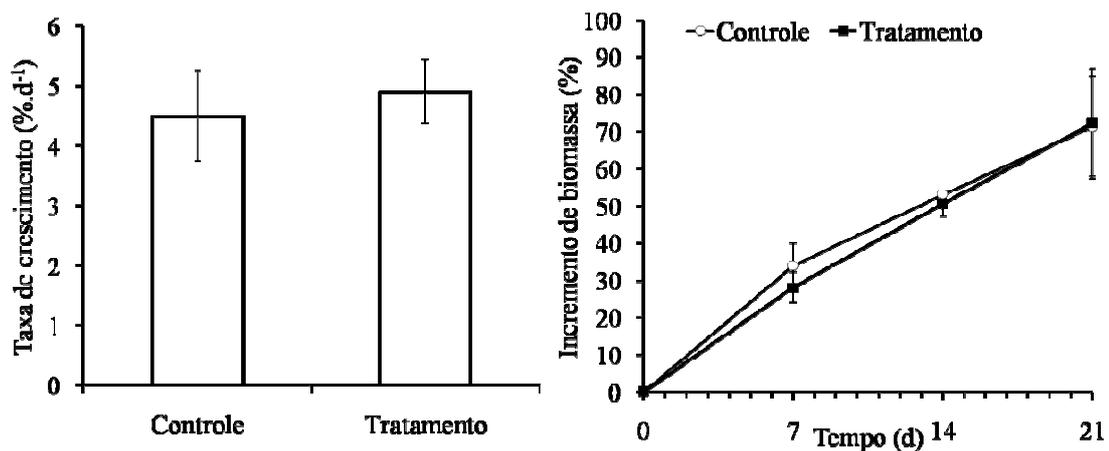


Figura 42 - Taxa de crescimento (%.d⁻¹) e curva de crescimento por incremento da biomassa fresca em (%) de *O. secundiramea* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e ao tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹) de KBr, cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 $\mu\text{mol f\^otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (n=3).

Apesar de não ter influenciado o crescimento de *O. secundiramea*, o enriquecimento com bromo no meio de cultura promoveu o aumento significativo das concentrações de todos os pigmentos e das proteínas totais, sendo que para as proteínas, a concentração praticamente dobrou de 3,146 para 5,913 mg.g⁻¹, enquanto que para os açúcares totais não foram verificadas alterações significativas em sua concentração ($F = 1,1078$; $p = 0,3518$) em resposta ao tratamento quando comparada ao controle (figura 43).

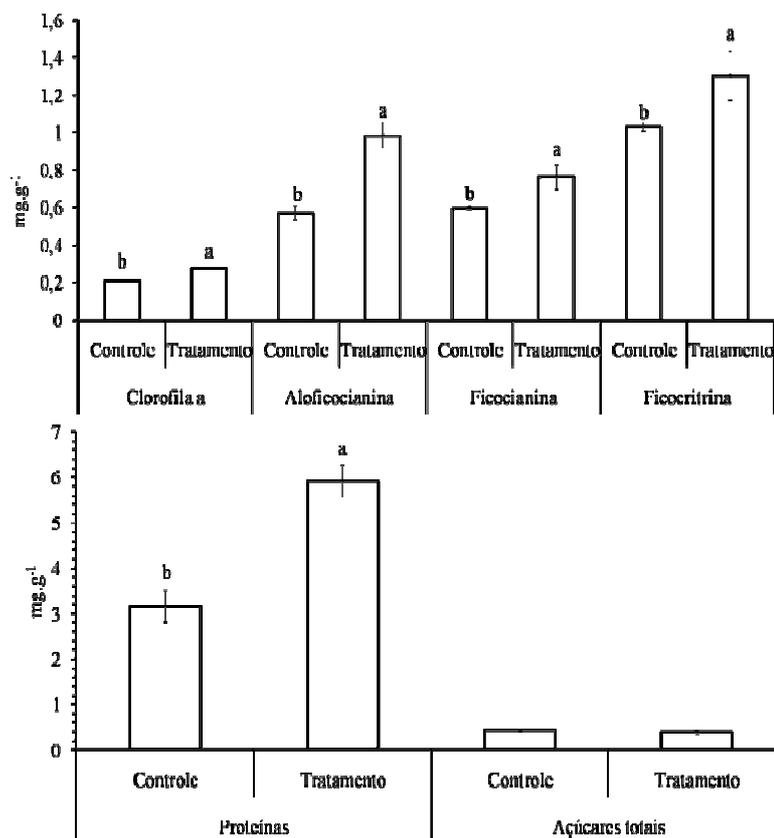


Figura 43 - Taxa de crescimento (%.d⁻¹) e curva de crescimento por aumento da biomassa fresca (%) de *O. secundiramea* após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L⁻¹) e o tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹ de KBr), cultivadas nas seguintes condições: irradiância de 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹, /2, temperatura de 23 ± 2 °C, salinidade de 33 ups e fotoperíodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância.

A avaliação da concentração de bromo dissolvido no meio de cultura demonstrou a taxa de remoção do bromo, de 1,89 mg.d⁻¹ e 7,09 mg.d⁻¹, para as condições de controle e tratamento, respectivamente, nos cultivos de *O. secundiramea* em biorreatores. As medições de bromo dissolvido foram realizadas semanalmente permitindo verificar a curva de remoção do bromo dissolvido (figura 44).

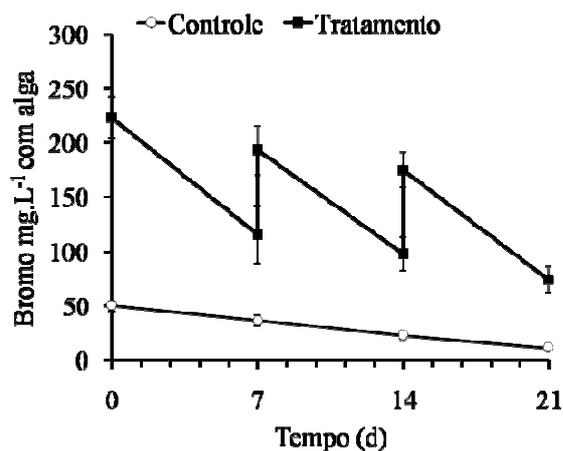


Figura 44 - Concentração de bromo (mg.L^{-1}) no meio de cultura após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle (50 mg.L^{-1}) e o tratamento (250 mg.L^{-1} e adições semanais de 100 mg.L^{-1}) de KBr, cultivadas nas seguintes condições: irradiância de $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, meio VSES/2, temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ups e fotoper\u00edodo 14:10 h (L:E). Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$).

Os resultados da incorpora\u00e7\u00e3o de bromo no talo de *O. secundiramea* corroboraram os de remo\u00e7\u00e3o do bromo dissolvido no meio de cultura, sendo significativamente superior na condi\u00e7\u00e3o de tratamento em rela\u00e7\u00e3o ao controle ($F = 18,2203$; $p = 0,013$), com valores de 106,3 e 45,8 mg de bromo por grama de massa fresca da alga (figura 45).

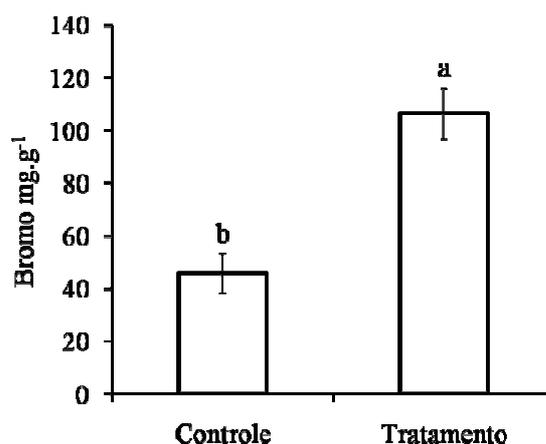


Figura 45 - Concentra\u00e7\u00e3o de bromo (mg.g^{-1}) nos talos de *O. secundiramea* ap\u00f3s 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condi\u00e7\u00f5es controle (50 mg.L^{-1}) e o tratamento (250 mg.L^{-1} e adições semanais de 100 mg.L^{-1}) de KBr. Os valores correspondem \u00e0 m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o ($n=3$). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de signific\u00e2ncia.

O enriquecimento com KBr no meio de cultura realizado no tratamento promoveu diferentes respostas na remoção e incorporação do bromo no talo bem como na fisiologia da espécie (pigmentos e proteínas). A elevada taxa de assimilação do bromo em *O. secundiramea* no tratamento foi em função da atividade específica e da quantidade de bromoperoxidase na alga que foi significativamente maior ($F = 26,8536$; $p = 0,0066$) no de tratamento quanto comparado ao controle (figura 46).

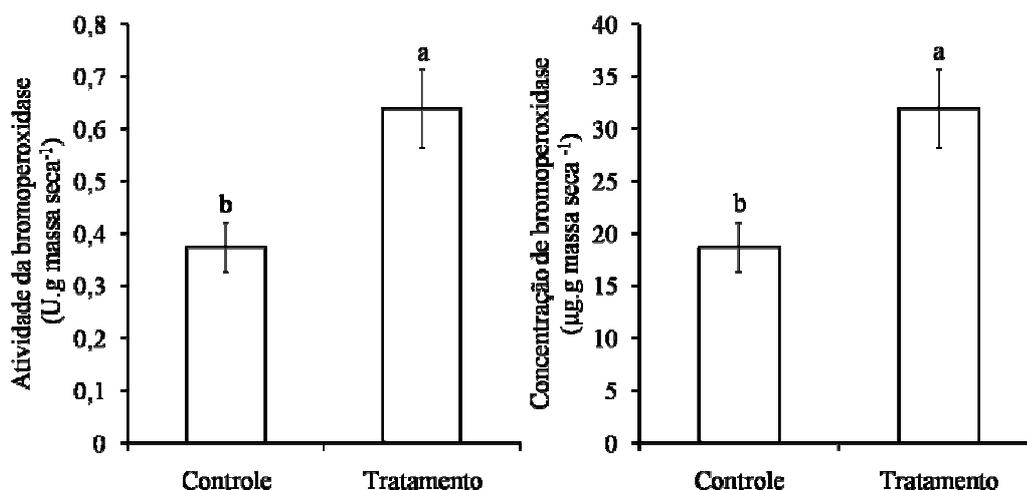


Figura 46 - Atividade específica da enzima bromoperoxidase em unidades de enzima ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$), onde unidade definida pela conversão de 1 micromol de MCD a MCD-Br por minuto em pH 6,4 a 25°C) e concentração da enzima ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), ambos por grama de massa seca da alga. Após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e o tratamento ($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e adições semanais de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de KBr. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão ($n=3$). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância.

5.3. Extração, fracionamento e determinação dos compostos bioativos

5.3.1. Obtenção dos extratos das linhagens de *H. musciformis* e *O. secundiramea*

Os resultados (tabela 3) indicaram que os diferentes métodos de processamento da biomassa fresca, liofilizada e seca não afetaram o rendimento das amostras de *O. secundiramea* coletadas em 2011 ($F = 1.2421$; $p = 0.3537$). No entanto, o oposto foi verificado para as linhagens de *H. musciformis*, sendo que a linhagem marrom (MA) apresentou rendimento de extração da biomassa seca significativamente inferior aos demais

tratamentos ($F = 81.0734$; $p < 0.001$) e para a linhagem verde clara (VC), o tratamento com biomassa fresca foi superior quando comparada a outras condições de processamento ($F = 49.1769$; $p < 0.001$).

Não foram observadas diferenças significativas no rendimento de extração em resposta aos cultivos em biorreatores no experimento de enriquecimento com bromo para *O. secundiramea* ($F = 1,7869$; $p = 0,5183$). Para *H. musciformis*, o enriquecimento por CO_2 nos cultivos das linhagens MA ($F = 50.0734$, $p < 0.001$) e VC ($F = 27.0727$, $p < 0.001$) foram observadas diferenças significativas, com o aumento do rendimento de extração em resposta ao tratamento com enriquecimento por CO_2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Rendimento da obtenção dos extratos em (%) relativa a quantidade de extrato obtida pela biomassa de alga utilizada (g). Dados referentes a extratos provenientes de biomassa submetida a diferentes métodos de processamento e da biomassa produzida após 21 dias de cultivo em biorreatores em resposta as condições controle e tratamento em *Ochtodes secundiramea* e nas linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *Hypnea musciformis*. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão ($n=3$). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância.

| Macroalga utilizada | Processamento da biomassa | Quantidade de extrato (g) | Biomassa de alga (g) | Rendimento de extração (%) |
|--|---------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694) | Fresca | 0,7000 \pm 0,065 | 50,000 | 1,400 \pm 0,0137 |
| | Fresca | 0,0264 \pm 0,003 | 3,000 | 0,881 \pm 0,115 |
| <i>O. secundiramea</i> coletada em 2011 (SP401695) | Liofilizada | 0,0224 \pm 0,005 | 3,000 | 0,746 \pm 0,182 |
| | Seca | 0,0210 \pm 0,004 | 3,000 | 0,699 \pm 0,137 |
| | Fresca | 0,0112 \pm 0,052 | 3,000 | 0,379 \pm 0,153 a |
| <i>H. musciformis</i> (MA) | Liofilizada | 0,0081 \pm 0,032 | 3,000 | 0,270 \pm 0,090 a |
| | Seca | 0,0035 \pm 0,024 | 3,000 | 0,117 \pm 0,063 b |
| | Fresca | 0,0136 \pm 0,001 | 3,000 | 0,440 \pm 0,038 a |
| <i>H. musciformis</i> (VC) | Liofilizada | 0,0089 \pm 0,010 | 3,000 | 0,292 \pm 0,067 b |
| | Seca | 0,081 \pm 0,012 | 3,000 | 0,270 \pm 0,060 b |
| | Fresca | 0,0205 \pm 0,005 | 2,332 | 0,878 \pm 0,060 |
| <i>O. secundiramea</i> cultivada em biorreator (controle 50 mg.L ⁻¹ de bromo) | Fresca | 0,0205 \pm 0,005 | 2,332 | 0,878 \pm 0,060 |
| <i>O. secundiramea</i> cultivada em biorreator (tratamento 250 mg.L ⁻¹ de bromo) | Fresca | 0,0219 \pm 0,020 | 2,336 | 0,938 \pm 0,090 |
| <i>H. musciformis</i> MA cultivada em biorreator (controle 0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂) | Fresca | 0,1034 \pm 0,021 | 31,172 | 0,332 \pm 0,102 b |
| <i>H. musciformis</i> MA cultivada em biorreator (tratamento 5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂) | Fresca | 0,1280 \pm 0,020 | 23,696 | 0,540 \pm 0,160 a |
| <i>H. musciformis</i> VC cultivada em biorreator (controle 0,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂) | Fresca | 0,2418 \pm 0,023 | 24,493 | 0,987 \pm 0,145 b |
| <i>H. musciformis</i> VC cultivada em biorreator (tratamento 5,5 mg.L ⁻¹ de CO ₂) | Fresca | 0,2642 \pm 0,021 | 18,30 | 1,444 \pm 0,221 a |

5.3.2. Ensaios antifúngicos

5.3.2.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antifúngica pelo método de bioautografia

A bioautografia dos extratos obtidos a partir das linhagens de *H. musciformis* revelou que tanto a linhagem marrom quanto a verde clara apresentaram potencial antifúngico inferior ao extrato de *O. secundiramea* (Tabelas 4 e 5). Adicionalmente, foi verificada atividade qualitativa diferenciada para as duas linhagens sendo que a linhagem marrom possui apenas uma mancha com potencial antifúngico enquanto que a linhagem verde clara apresentou três manchas (Tabela 4). Diferentemente de *O. secundiramea*, o processo de tratamento da biomassa das linhagens de *H. musciformis* não afetou o Rf das manchas com atividade antifúngica e a atividade não foi tão pronunciada para os dois fungos testados, sendo mais intensa contra *Cladosporium sphaerospermum* (figura 47 e tabela 4).

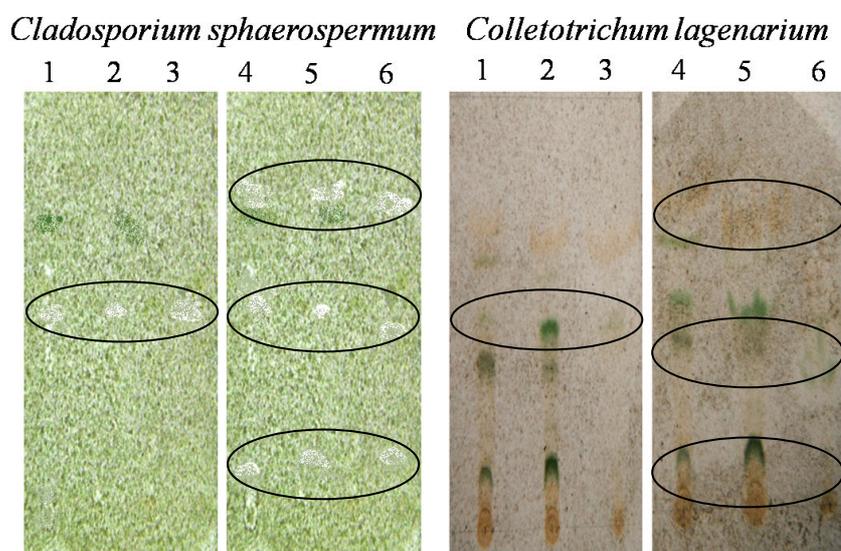


Figura 47 - Bioautografia realizada com 500 µg dos extratos das linhagens de *Hypnea musciformis* contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel. 1- extrato da linhagem MA extração com biomassa fresca; 2 - extrato da linhagem MA extração com biomassa liofilizada; 3 - extrato da linhagem MA extração com biomassa seca; 4 - extrato da linhagem VC, extração com biomassa fresca; 5 - extrato da linhagem VC, extração com biomassa liofilizada; 6 - extrato da linhagem VC extração com biomassa seca. Os extratos foram eluídos com o solvente DCM:MeOH (95:5 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel.

Tabela 4 - Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antifúngico contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* determinadas pelo teste de bioautografia de 500 µg dos extratos das linhagens de *Hypnea musciformis* provenientes de diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca). Os extratos foram eluídos com a mistura de solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel.

| Macroalga utilizada | Processamento da biomassa | Rf da mancha com atividade | Intensidade da mancha com atividade |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| <i>H. musciformis</i> (MA) | Fresca | 0,42 | Fraca |
| | Liofilizada | 0,42 | Fraca |
| | Seca | 0,42 | Fraca |
| <i>H. musciformis</i> (VC) | Fresca | 0,71; 0,42 e 0,14 | Fraca |
| | Liofilizada | 0,71; 0,42 e 0,15 | Fraca |
| | Seca | 0,71; 0,42 e 0,16 | Fraca |

Para os extratos de *O. secundiramea* provenientes de biomassa fresca das algas coletadas em 2010 (SP401694) e 2011 (SP401695), foram verificados resultados similares tanto no Rf quanto na intensidade das manchas com potencial antifúngico no teste de bioautografia utilizando o fungo *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium*. Os resultados ainda indicaram a mudança nos Rf's e o aparecimento de novas manchas de atividade antifúngica para os extratos obtidos a partir de *O. secundiramea* coletada em 2011 e que passaram pelos processos de liofilização e secagem em estufa (figura 48 e tabela 5).

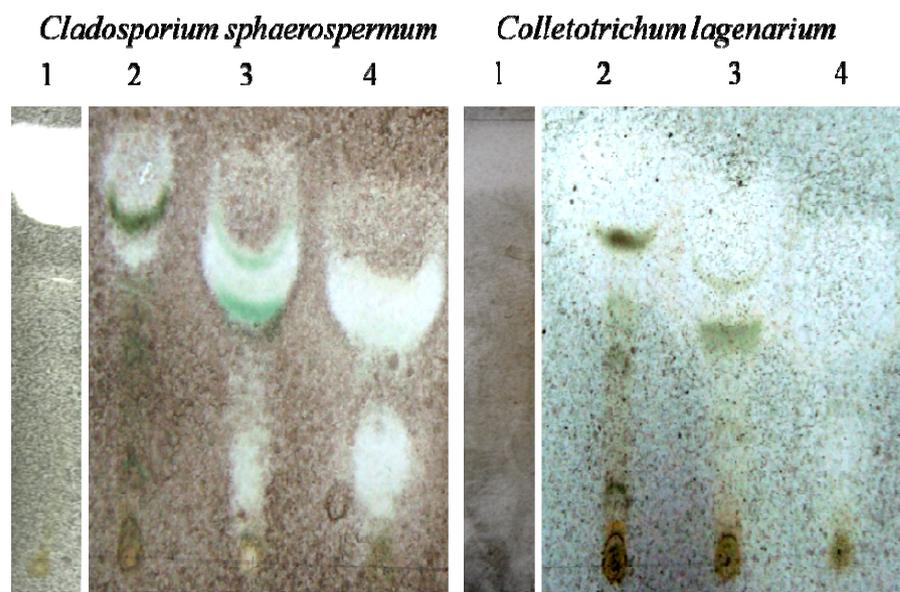


Figura 48 - Bioautografia realizada com 100 µg dos extratos da alga *Ochtodes secundiramea* contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel. 1 - extrato da alga coletada em 2010 (SP401694), extração com biomassa fresca; 2 - extrato da alga coletada em 2011 (SP401695), extração com biomassa fresca; 3 - extrato da coletada em 2011, extração com biomassa liofilizada e 4 - extrato da alga coletada em 2011, extração com biomassa seca. Os extratos foram eluídos com os solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel.

Tabela 5 - Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antifúngico contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* determinadas pelo teste de bioautografia de 100 µg do extrato de *Ochtodes secundiramea* coletada em 2010 (SP401694) e coletada em 2011 (SP401695) para a qual foram testados diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca). Os extratos foram eluídos com os solventes DCM:MeOH (99:1 v/v) por cromatografia em camada delgada de sílica gel.

| Macroalga utilizada | Processamento da biomassa | Rf das manchas com atividade | Intensidade das manchas com atividade |
|--|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| <i>O. secundiramea</i> coletada em 2010 (SP401694) | Fresca | 0,85 | Forte |
| <i>O. secundiramea</i> coletada em 2011 (SP401695) | Fresca | 0,85 | Forte |
| | Liofilizada | 0,8 e 0,4 | Forte |
| | Seca | 0,76 e 0,4 | Forte |

Devido à observação dos mesmos Rf's para manchas bioativas e baixa resolução na bioautografia qualitativa para o fungo *Colletotrichum lagenarium* (figuras 47 e 48), a avaliação comparativa da atividade antifúngica foi realizada apenas com *Cladosporium*

sphaerospermum para os extratos das algas cultivadas nos biorreatores, em resposta ao enriquecimento com bromo (para *O. secundiramea*) e com CO₂ (para as linhagens de *H. musciformis*).

O experimento de cultivo em biorreatores com enriquecimento com bromo não promoveu diferenças no potencial antifúngico qualitativo para o extrato de *O. secundiramea* em resposta ao as condições controle (50 mg.L⁻¹ de bromo) e tratamento (250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹ de KBr).

Para a linhagem VC de *H. musciformis* foram observados os mesmos padrões qualitativos de atividade, mantendo os três Rf's indicadores da presença de substâncias antifúngicas (0,71, 0,42 e 0,17) nas duas concentrações de CO₂ testadas no cultivo. Para a linhagem MA, foi observado na condição controle a existência de apenas um Rf bioativo (0,42) e o aparecimento de manchas bioativas no Rf 0,71 para o tratamento com enriquecimento por CO₂ (figura 49).

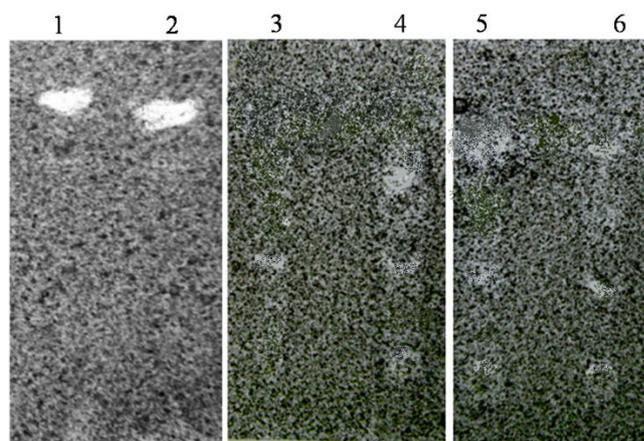


Figura 49 - Bioautografia qualitativa realizada com 100 µg dos extratos de *Ochtodes secundiramea* e 500 µg das linhagens de *Hypnea musciformis*, provenientes dos cultivos em biorreatores, contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum* em CCD de sílica gel. 1 - extrato de *O. secundiramea* proveniente do controle (algas cultivada a 50 mg.L⁻¹ de bromo); 2 - extrato de *O. secundiramea* proveniente de tratamento (algas cultivada a 250 mg.L⁻¹ e adições semanais de 100 mg.L⁻¹ de bromo); 3 - extrato da linhagem marrom proveniente do controle (algas cultivada a 0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 4 - extrato da linhagem marrom proveniente do tratamento (algas cultivada a 5,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 5 - extrato da linhagem verde clara proveniente do controle (algas cultivada a 0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); 6 - extrato da linhagem verde clara proveniente do tratamento (algas cultivada a 5,5 mg.L⁻¹ de CO₂).

Após a determinação dos Rf's pela análise qualitativa das substâncias com potencial antifúngico dos extratos das algas de diferentes coletas, diferentes métodos de processamento da biomassa e de diferentes tratamentos no cultivo em biorreatores, foi realizada a avaliação quantitativa por meio do limite de detecção da atividade pelo método da CCD.

Para o extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694), o limite de detecção da atividade foi de 1 µg (figura 50), enquanto que os extratos provenientes de diferentes métodos de processamento da biomassa de *O. secundiramea* coletada em 2011 (SP401695) o limite de detecção foi de 5 µg para *Cladosporium sphaerospermum* e 10 µg para *Colletotrichum lagenarium*, para os extratos das diferentes formas de processamento (fresca, liofilizada e seca) (figura 51).

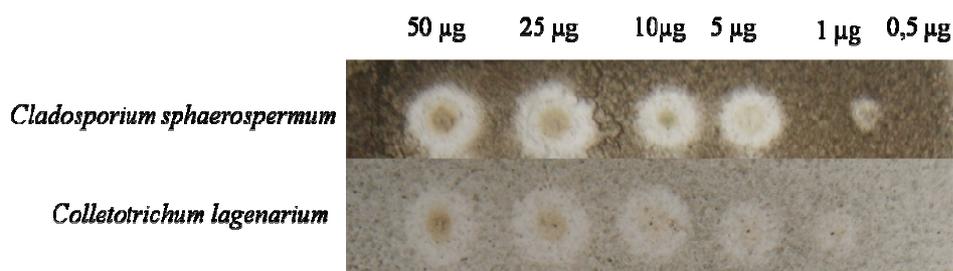


Figura 50 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel para o extrato de *Ochtodes secundiramea* (SP401694), nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg.

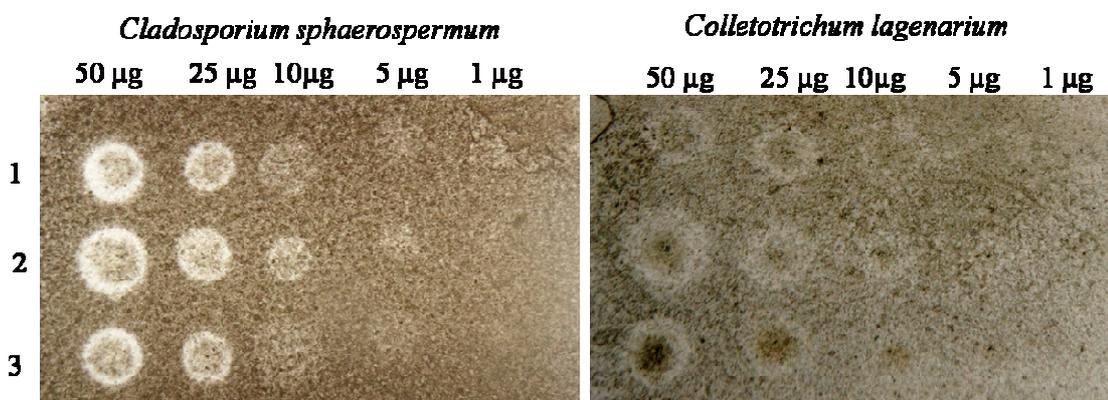


Figura 51 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel para o extrato de *O. secundiramea* (SP401695) nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 µg obtidos a partir de diferentes métodos de processamento da biomassa: alga fresca (1), liofilizada (2) e seca (3).

Devido à fraca atividade verificada no ensaio qualitativo para os extratos das linhagens de *H. musciformis*, foi realizada a determinação do limite de detecção da atividade apenas para o fungo *C. sphaerospermum* para os extratos provenientes de diferentes métodos de processamento da biomassa. Foi verificado o valor de 100 µg para o limite de detecção para os extratos provenientes dos três tratamentos em ambas a linhagens (Figura 52).

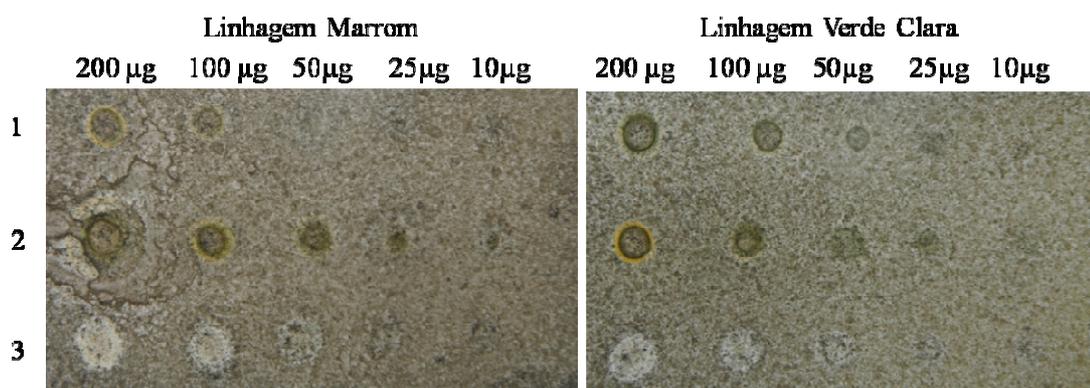


Figura 52 - Determinação do limite de detecção da atividade por bioautografia com o fungo *C. sphaerospermum* em CCD de sílica gel para os extratos das linhagens *Hypnea musciformis* nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 10 µg obtidos a partir de diferentes métodos de processamento da biomassa: alga fresca (1), liofilizada (2) e seca (3).

Os tratamentos realizados nos cultivos em biorreatores com enriquecimento com bromo para *O. secundiramea* e com CO₂ para as linhagens de *H. musciformis* não promoveram alterações observáveis no limite de detecção da atividade antifúngica contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*, sendo verificados os valores de 5 µg para os extratos de *O. secundiramea* e 100 µg para as linhagens de *H. musciformis* (figura 53)

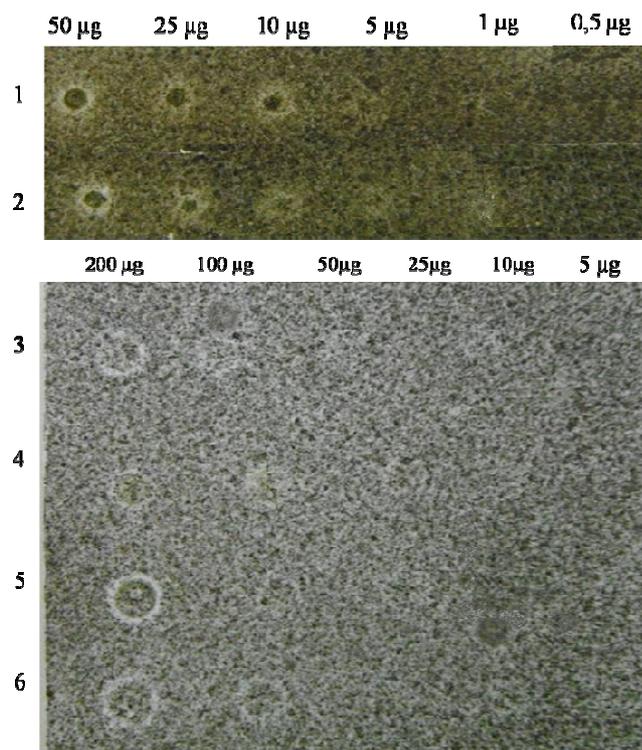


Figura 53 - Limite de detecção da atividade antifúngica contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum* dos extratos de *Ochtodes secundiramea* e das linhagens de *Hypnea musciformis*, provenientes dos cultivos em biorreatores, em CCD de sílica gel. 1 - extrato de *O. secundiramea* proveniente do controle (cultivada a 50 mg.L^{-1} de bromo); 2 - extrato de *O. secundiramea* proveniente do tratamento (cultivada a 250 mg.L^{-1} e adições semanais de 100 mg.L^{-1} de bromo); 3 - extrato da linhagem marrom proveniente do controle (cultivada a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2); 4 - extrato da linhagem marrom proveniente do tratamento (cultivada a $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2); 5 - extrato da linhagem verde clara proveniente do controle (cultivada a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2); 6 - extrato da linhagem verde clara proveniente do tratamento (cultivada a $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2).

5.3.3. Fracionamento guiado dos compostos com atividade antifúngica por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Foi realizada a CCD preparativa utilizando os Rf's das manchas que apresentaram atividade contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* na bioautografia analítica. Para 250 mg do extrato de *O. secundiramea*, foram obtidos 58 mg de fração bioativa, correspondente ao Rf $0,85$, com um rendimento de $23,2\%$. A fração obtida apresentou o mesmo valor para o limite de detecção de atividade verificado para o extrato bruto de 1 µg para os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* (figura 54).

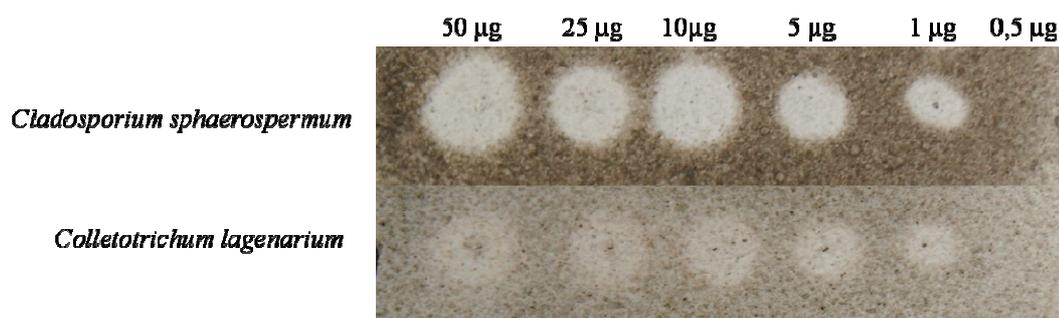


Figura 54 - Determinação do limite de detecção de atividade por bioautografia com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium* em CCD de sílica gel para a fração bioativa do extrato de *Ochtodes secundiramea* (SP401694), nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg.

Para 20 mg do extrato de cada uma das linhagens de *H. musciformis* provenientes dos cultivos em biorreatores dos tratamentos com e sem adição de CO₂, foram obtidas as frações bioativas de acordo com a tabela 6. Para estas frações, devido ao baixo rendimento e quantidade obtidos, não foi realizada a determinação do limite de detecção de atividade antifúngica.

Tabela 6 - Quantidade de fração (mg) e rendimento (%) obtidos para fracionamento guiado para cada Rf das manchas com atividade antifúngica em CCD preparativa para 20 mg dos extratos das linhagens de *H. musciformis* cultivadas em biorreatores.

| Rf | Marrom | | Verde clara | |
|------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | Fração (mg) | Rendimento (%) | Fração (mg) | Rendimento (%) |
| 0,71 | 0,42 | 2,1 | 0,52 | 2,6 |
| 0,42 | 0,78 | 3,9 | 0,74 | 3,7 |
| 0,14 | 0,56 | 2,8 | 0,82 | 4,1 |

As frações extraídas, denominadas FB_{CCD}, foram submetidas a análises de composição química por diferentes técnicas analíticas, a fracionamentos cromatográficos para isolamento das substâncias com atividade antifúngica.

5.3.4. Isolamento e caracterização dos metabolitos dos extratos e frações bioativas das macroalgas

5.3.4.1. Tratamentos realizados para os extratos das linhagens de *H. musciformis*

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Diferentemente dos resultados referentes ao rendimento da extração (tabela 3), não foram observadas alterações no perfil em CG/EM do extrato das duas linhagens de *H. musciformis* submetidas a diferentes métodos de processamento da biomassa (figura 55).

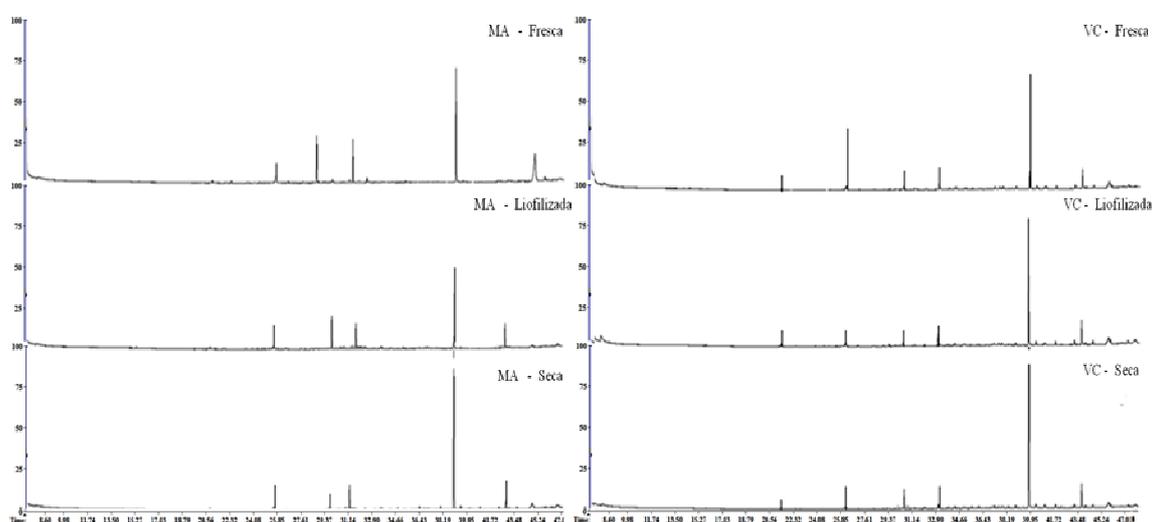


Figura 55 - Cromatogramas em CG/EM dos extratos das linhagens de *H. musciformis*, cultivadas em biorreatores, em resposta aos diferentes métodos de processamento da biomassa (fresca, liofilizada e seca).

O extrato obtido de biomassa fresca, cultivada em biorreatores no experimento com diferentes concentrações de CO₂, apresentou maior rendimento, motivo pelo qual foi selecionado para a investigação dos compostos antifúngicos das linhagens de *H. musciformis*.

Efeito do enriquecimento do meio de cultivo com CO₂, na composição química obtida em CG/EM dos extratos das linhagens de *H. musciformis*

Devido ao baixo rendimento do processo de extração, e à fraca atividade antifúngica, verificados para os extratos das linhagens de *H. musciformis* foi realizado apenas fracionamento bioguiado, que resultou na obtenção de FB_{CCD}, sem a aplicação de técnicas cromatográficas para isolar os metabolitos.

A comparação dos perfis cromatográficos, obtidos por CG/EM, dos extratos (das linhagens de *H. musciformis* cultivada sem e com enriquecimento por CO₂) e que haviam sido submetidos previamente à sililação, mostrou que a adição deste composto, promove alterações na composição química dos extratos. O cromatograma do extrato da amostra-controle da linhagem MA apresentou 7 picos e o extrato da amostra tratada, 11 picos, sendo que todos eles também mostraram atividade antifúngica. Na linhagem VC, o cromatograma da amostra controle apresentou 10 picos e o da amostra do tratamento, 11 picos (figura 56).

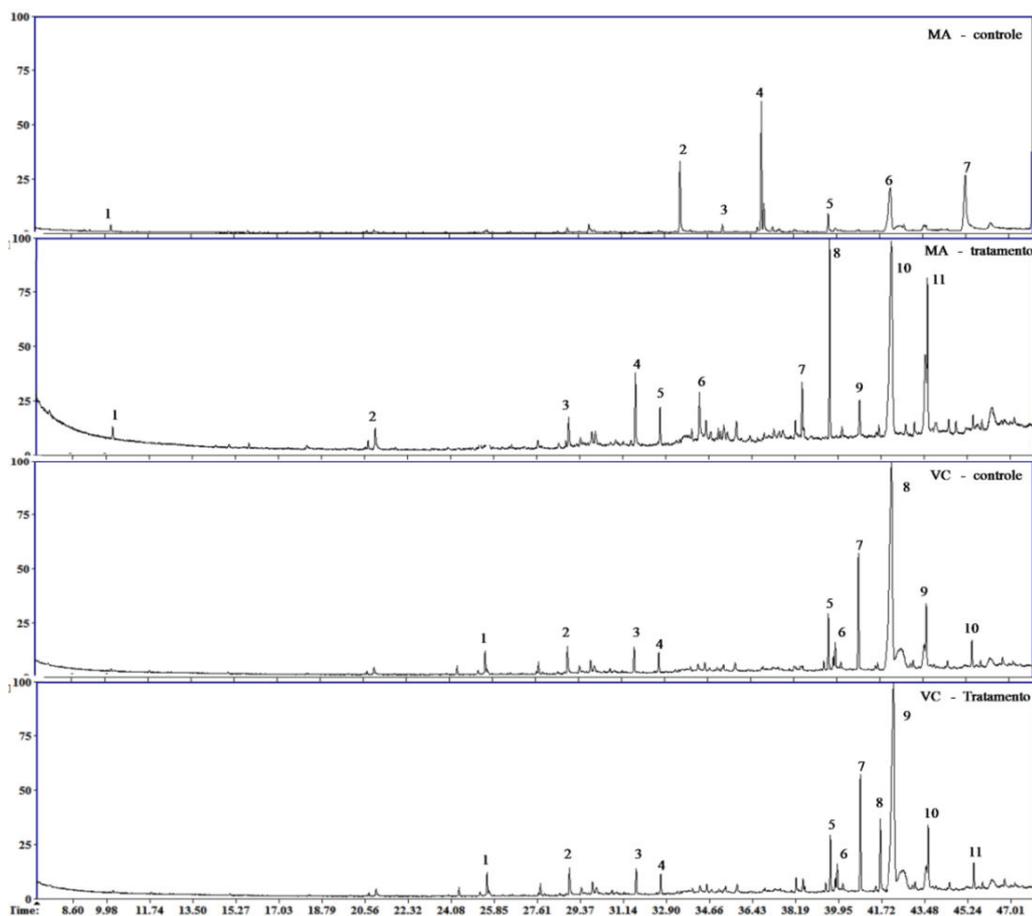


Figura 56 - Cromatograma em CG/EM do extrato sililados das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H.musciformis* cultivadas em biorreator nas condições controle ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2) e tratamento ($5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CO_2).

A análise dos índices de Kovats, dos fragmentos de massa e a comparação dos valores obtidos com os a biblioteca NIST (tabela 7), indicou a presença de ácidos graxos, esteróis e glicolipídeos nos cromatogramas das linhagens de *H. musciformis*. A linhagem VC apresentou maior diversidade química quando comparada m a linhagem MA, fator que explica a diferença qualitativa na atividade antifúngica. O tratamento com CO_2 promoveu aumento no número de picos observados, sendo um fator associado à mudança na atividade antifúngica da linhagem MA de *H. musciformis*.

Tabela 7 - Tempo de retenção (RT), área (%), molécula sililada identificada (MSI) índices de Kovats da literatura e o observado (IK_{Lit} e IK_{Obs}), fragmentos de massa e metabolito correspondente na base de dados NIST do picos observados na análise em CG/EM do extrato sililados das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *Hypnea musciformis* cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 mg.L⁻¹ de CO₂), e tratamento (5,5 mg.L⁻¹ de CO₂).

| MA Controle | | | | | | | | |
|---------------|----------------|--------|---|---------------------|---------------------|---|--|-----------------------------|
| Pico | T _R | (%) | MSI | I.K. _{lit} | I.K. _{obs} | Fragmentos | | Metabolito |
| 1 | 10.232 | 0.906 | C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | 1044 | 1040 | - | C ₃ H ₆ O ₃ | Acido láctico |
| 2 | 33.552 | 11.824 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 2045 | 2043 | - | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | Acido hexadecanoico |
| 3 | 35.293 | 1.159 | C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si | 2131 | 2130 | - | C ₂₀ H ₃₆ O | Fitol |
| 4 | 36.886 | 18.388 | C ₂₇ H ₆₆ O ₈ Si ₆ | 2199 | 2191 | - | C ₉ H ₁₈ O ₈ | Galactosilglicerol |
| 5 | 39.628 | 5.595 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | 2243 | 2240 | - | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | Acido octadecanoico |
| 6 | 42.168 | 21.018 | C ₃₀ H ₅₂ O ₂ Si | - | - | 452; 327; 255; 185; 129; 111; 93; 68 | C ₂₇ H ₄₀ O | Colesta-5,24-dien-3-nol |
| 7 | 45.289 | 23.609 | C ₃₀ H ₅₅ O ₂ Si | - | - | 384; 366; 300; 255; 185; 133; 93; 68 | C ₂₇ H ₄₄ O | Colesta-5,22-3-nol |
| MA Tratamento | | | | | | | | |
| 1 | 10.232 | 0.906 | C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | 1044 | 1040 | - | C ₃ H ₆ O ₃ | Acido láctico |
| 2 | 20.7198 | 0.325 | | 1806 | | - | C ₁₈ H ₃₈ | Octadecano |
| 3 | 28.937 | 2.542 | | 1891 | 1885 | - | C ₂₀ H ₄₀ O | Tetrametil-2-hexadecen-1-ol |
| 4 | 32.104 | 0.356 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | | | 185;169;141;129;71;57 | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Galactopiranosil |
| 5 | 32.676 | 2.701 | | | | - | | Ftalato |
| 6 | 34.291 | 4.466 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 2045 | 2046 | - | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | Acido hexadecanoico |
| 7 | 38.499 | 3.809 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | 2385 | 2380 | - | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | Acido octadecanoico |
| 8 | 39.6263 | 3.167 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈ | | | 341; 273; 185; 129 | C ₁₄ H ₂₈ O ₆ | Glucopiranosil |
| 9 | 40.854 | 3.167 | | | | 384; 368; 269; 247;136;95; 69;43 | C ₂₈ H ₄₄ O | Colesta-8,24-dien-3-one |
| 10 | 42.157 | 43.245 | C ₃₀ H ₅₂ O ₂ Si | | | 452; 327; 255; 185; 129; 111; 93; 68 | C ₂₇ H ₄₀ O | Colesta-5,24-dien-3-nol |
| 11 | 43.548 | 22,956 | C ₃₀ H ₅₄ O ₂ Si | | | 458; 433;368; 353; 329;145;129;105 | C ₂₇ H ₄₅ O | Colesterol |
| VC Controle | | | | | | | | |
| 1 | 25.236 | 0.507 | | 1698 | 1695 | - | C ₁₇ H ₃₆ | Heptadecano |
| 2 | 28.826 | 0.370 | | | | - | | Ftalato |
| 3 | 31.669 | 4.466 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 2045 | 2043 | - | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | Acido hexadecanoico |
| 4 | 32.804 | 0.474 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | | | 185;169;141;129;71;57 | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Galactopiranosil |
| 5 | 39.6263 | 3.809 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | 2385 | 2380 | - | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | Acido octadecanoico |
| 6 | 39.9017 | 3.261 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈ | | | 341; 273; 185; 129 | C ₁₄ H ₂₈ O ₆ | Glucopiranosil |
| 7 | 40.876 | 51.459 | | | | 384; 368; 269; 247;136;95; 69;43 | C ₂₈ H ₄₄ O | Colesta-8,24-dien-3-one, |
| 8 | 42.209 | 3.551 | C ₃₃ H ₆₄ O ₂ Si ₂ | | | - | C ₂₇ H ₄₀ O ₂ | Colesta-5,24-dien-3-il |
| 11 | 43.548 | 22,956 | C ₃₀ H ₅₄ O ₂ Si | | | 458; 433;368; 353; 329;145;129;105 | C ₂₇ H ₄₅ O | Colesterol |
| 10 | 45.505 | 2.040 | | 2790 | 2788 | - | C ₃₀ H ₅₀ | Esqualeno |
| VC Tratamento | | | | | | | | |
| 1 | 25.236 | 0.507 | | 1698 | 1695 | - | C ₁₇ H ₃₆ | Heptadecano |
| 2 | 28.826 | 0.370 | | | | 149 | | Ftalato |
| 3 | 29.817 | 0.281 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | 1845 | 1840 | - | C ₁₄ H ₂₇ O ₂ | Acido tetradecanoico |
| 4 | 31.669 | 4.466 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 2045 | 2043 | 185;169;141;129;71;57 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | Acido hexadecanoico |
| 5 | 32.804 | 0.474 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | | | - | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Galactopiranosil |
| 6 | 38.499 | 3.809 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | 2385 | 2380 | - | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | Acido octadecanoico |
| 7 | 39.6263 | 3.167 | C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈ | | | 341; 273; 185; 129 | C ₁₄ H ₂₈ O ₆ | Glucopiranosil |
| 8 | 40.876 | 51.459 | | | | - | C ₂₈ H ₄₄ O | Colesta-8,24-dien-3-one |
| 9 | 42.157 | 43.245 | C ₃₀ H ₅₂ O ₂ Si | | | 452; 327; 255; 185; 129; 111; 93; 68 | C ₂₇ H ₄₀ O | Colesta-5,24-dien-3-nol |
| 10 | 42.209 | 3.551 | C ₃₃ H ₆₄ O ₂ Si ₂ | | | - | C ₂₇ H ₄₀ O ₂ | Colesta-5,24-dien-3-il |
| 11 | 43.548 | 22,956 | C ₃₀ H ₅₄ O ₂ Si | | | 458; 433;368; 353; 329;145;129;105 | C ₂₇ H ₄₅ O | Colesterol |
| 12 | 45.505 | 2.040 | | 2790 | 2788 | - | C ₃₀ H ₅₀ | Esqualeno |

Determinação dos compostos da FB_{CCD} das linhagens de *H. musciformis* por análise em CLAE/EM

A investigação dos compostos com atividade antifúngica das linhagens de *H. musciformis* cultivadas sob diferentes concentrações de CO₂ foi realizada por CLAE/EM de alta resolução devido ao baixo rendimento no processo de extração e de obtenção da FB_{CCD} (figura 57).

Assim como os resultados verificados em CG/EM, a análise comparativa entre os mesmos Rf 0,7, 0,4 e 0,1 (referentes às manchas com atividade antifúngica que foram separadas por CCD preparativa) dos extratos provenientes do controle mostrou entre as linhagens, sendo que a linhagem MA apresentou menos metabolitos do que a linhagem VC. O enriquecimento com CO₂ promoveu o aumento do número de picos comparando-se as condições controle e tratamento para o mesmo Rf em cada linhagem.

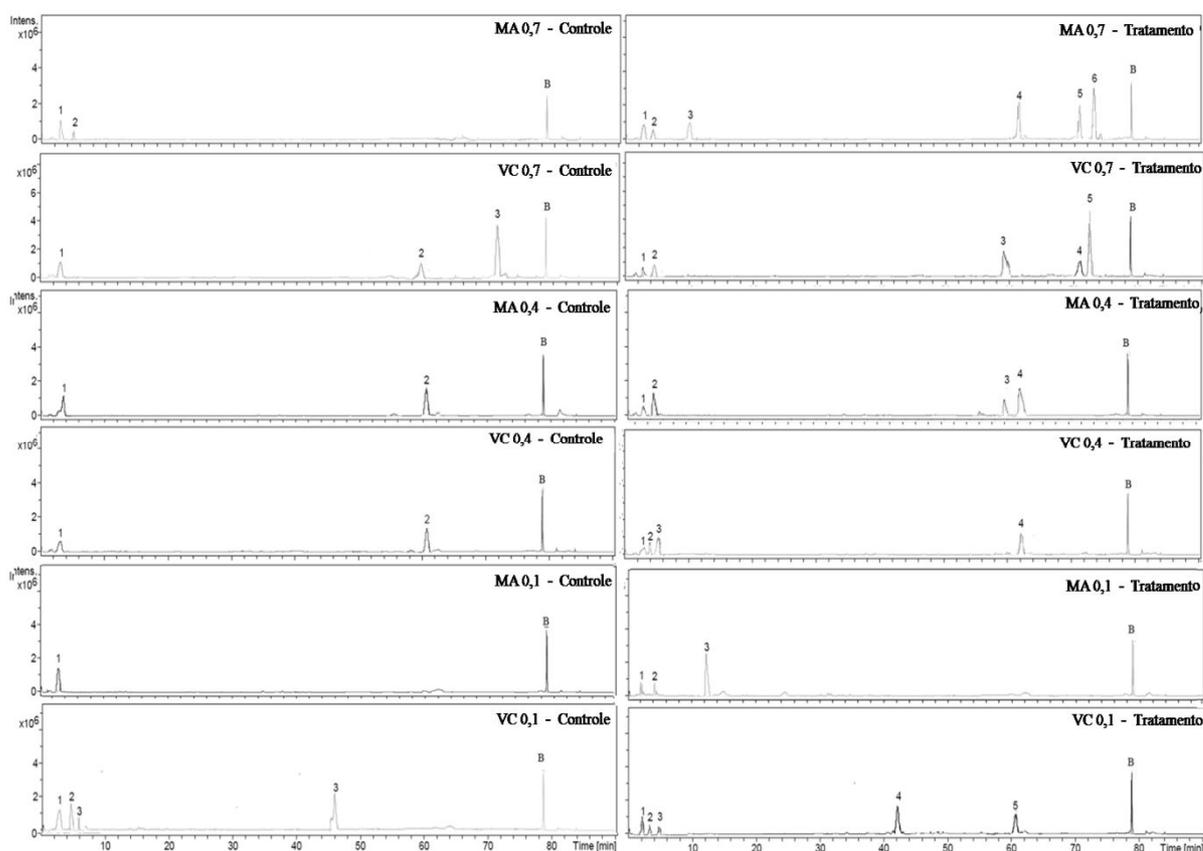


Figura 57 - Cromatograma em CLAE/EM da FB_{CCD} (Rf - 0,7, 0,4 e 0,1) das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); e tratamento (5,5 mg.L⁻¹ de CO₂).

A análise por CLAE/EM de alta resolução indicou a existência de compostos com íons moleculares com massas entre m/z 541,2513 e 906,4157 (tabela 8), superiores ao valor esperado, com base nos resultados observados no CG/EM dos extratos das linhagens. No entanto, os dados de fragmentação indicaram a presença de fragmentos m/z 180.1961, típico da perda de molécula de glicosil ou galactosil e fragmentos com m/z 458, 365, 289, 251, 213, 191 e 133 característicos da clivagem do esqueleto de moléculas de esterol (anexo A). Com base nos valores dos supostos íons moleculares foram comparados com os dados compilados de massas para esteróis glicosilados para a determinação molécula sugerida (Basha & Ahmad, 2007).

Tabela 8 - Tempo de retenção (RT), área (%), íon molecular, molécula sugerida e erro em ppm correspondente cada pico observado no cromatograma da análise em CLAE/EM das FB_{CCD} 0,7, 0,4 e 0,1 das linhagens marrom (MA) e verde clara (VC) de *H. musciformis* cultivadas em biorreator nas condições controle (0,5 mg.L⁻¹ de CO₂); e tratamento (5,5 mg.L⁻¹ de CO₂).

| Marrom controle RF 0,7 | | | | | | Marrom tratamento RF 0,7 | | | | | |
|-----------------------------|----------------|------|---------------|---|------------|-------------------------------|----------------|------|---------------|---|------------|
| Pico | T _R | (%) | Íon molecular | Molécula sugerida | Erro (ppm) | Pico | T _R | (%) | Íon molecular | Molécula sugerida | Erro (ppm) |
| 1 | 3.2 | 18,4 | 613.3402 | C ₃₃ H ₅₆ O ₁₀ | 4,87 | 1 | 2.7 | 8,1 | 541.2513 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 |
| 2 | 3.7 | 14,5 | 651.4108 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 | 2 | 2.8 | 6,8 | 588.7278 | C ₃₄ H ₅₂ O ₈ | 4,89 |
| 3 | 61.9 | 16,5 | 579.2939 | Ftalato | - | 3 | 9.9 | 10,2 | 629.3426 | C ₃₅ H ₅₁ NO ₉ | 3,52 |
| | | | | | | 4 | 61.9 | 16,5 | 579.2939 | Ftalato | - |
| | | | | | | 5 | 70.8 | 17,3 | 826.4377 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 |
| | | | | | | 6 | 72.9 | 19,1 | 906.5957 | C ₄₉ H ₇₈ O ₁₅ | 4,87 |
| Verde clara controle RF 0,7 | | | | | | Verde clara tratamento RF 0,7 | | | | | |
| 1 | 2.8 | 15,1 | 575.7877 | C ₃₄ H ₅₅ O ₇ | 4,15 | 1 | 2.7 | 8,1 | 541.2513 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 |
| 2 | 61.3 | 14,2 | 579.2939 | Ftalato | - | 2 | 2.8 | 12,1 | 575.7877 | C ₃₄ H ₅₅ O ₇ | 4,15 |
| 3 | 70.2 | 30,4 | 826.4377 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 | 3 | 61.6 | 18,2 | 579.2939 | Ftalato | - |
| | | | | | | 4 | 71.4 | 25,8 | 826.4357 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 |
| | | | | | | 5 | 72.1 | 17,3 | 906.5959 | C ₄₉ H ₇₈ O ₁₅ | 4,87 |
| Marrom controle RF 0,4 | | | | | | Marrom tratamento RF 0,4 | | | | | |
| 1 | 2.9 | 30,2 | 651.3662 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 | 1 | 2.9 | 10,3 | 575.7835 | C ₃₄ H ₅₅ O ₇ | 4,15 |
| 2 | 61.6 | 18,2 | 579.2939 | Ftalato | - | 2 | 3.8 | 15,4 | 651.4901 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 |
| 3 | 71.4 | 34,3 | 826.4357 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 | 3 | 61.3 | 16,1 | 579.2939 | Ftalato | - |
| | | | | | | 4 | 72.1 | 12,8 | 826.4357 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 |
| Verde clara controle RF 0,4 | | | | | | Verde clara tratamento RF 0,4 | | | | | |
| 1 | 2.9 | 20,5 | 651.3662 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 | 1 | 2.8 | 10,2 | 575.7835 | C ₃₄ H ₅₅ O ₇ | 4,15 |
| 2 | 61.6 | 18,2 | 579.2939 | Ftalato | - | 2 | 2.9 | 13,1 | 613.3402 | C ₃₃ H ₅₆ O ₁₀ | 4,87 |
| 3 | 71.4 | 34,3 | 826.4357 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 | 3 | 3.2 | 15,6 | 651.3671 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 |
| | | | | | | 4 | 71.4 | 34,3 | 826.4357 | C ₅₂ H ₉₀ O ₇ | 2,17 |

| Continuação Tabela 8 | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|------|----------|---|------|-------------------------------|------|------|----------|---|------|
| Marrom controle RF 0,1 | | | | | | Marrom tratamento RF 0,1 | | | | | |
| 1 | 2.8 | 12,7 | 541.2621 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 | 1 | 2.7 | 12,8 | 541.2627 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 |
| 2 | 61.6 | 18,2 | 579.2939 | Ftalato | - | 2 | 2.8 | 13,2 | 588.7278 | C ₃₄ H ₅₂ O ₈ | 4,89 |
| | | | | | | 3 | 2.9 | 45,7 | 575.3131 | C ₃₄ H ₅₅ O ₇ | 4,15 |
| Verde clara controle RF 0,1 | | | | | | Verde clara tratamento RF 0,1 | | | | | |
| 1 | 2.8 | 12,1 | 541.3542 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 | 1 | 2.8 | 12,7 | 541.2621 | C ₂₉ H ₄₈ O ₈ Na | 4,76 |
| 2 | 3.2 | 13,4 | 588.7278 | C ₃₄ H ₅₂ O ₈ | 4,89 | 2 | 2.9 | 11,1 | 588.7278 | C ₃₄ H ₅₂ O ₈ | 4,89 |
| 3 | 3.4 | 8,2 | 629.3140 | C ₃₅ H ₅₁ NO ₉ | 3,52 | 3 | 3.2 | 9,8 | 629.3134 | C ₃₅ H ₅₁ NO ₉ | 3,52 |
| 4 | 44.1 | 18,6 | 651.7079 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 | 4 | 42.0 | 18,2 | 651.8445 | C ₄₅ H ₇₈ O ₂ | 4,92 |
| 5 | 61.6 | 18,2 | 579.2939 | Ftalato | - | 5 | 61.0 | 13,9 | 579.2939 | Ftalato | - |

5.3.4.2. Tratamentos realizados para os extratos *O. secundiramea*

No estudo cromatográfico (CCD) do extrato de *O. secundiramea*, a derivatização com *p* - hidroxibenzaldeído, comprovou a presença de terpenos, com Rf em 0,85, região em se acumularam manchas azuladas, róseas e roxas (figura 58), cores indicativas da existência desta classe de compostos. O RF destas manchas coincidiu com o das substâncias com atividade antifúngica, permitindo a correlação dos terpenos de *O. secundiramea*, com esta atividade.



Figura 58 - Derivatização com *p* - hidroxibenzaldeído do extrato orgânico de *O. secundiramea* em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), apresentando manchas com as cores azul rosa e roxa.

A purificação dos compostos com atividade antifúngica, por cromatográfica líquida em colunas de sephadex e de sílica, foi guiada por CCD derivatizada com *p*-hidroxibenzaldeído, tendo-se como referência o Rf e a coloração das manchas relativas a esses compostos ativos.

Purificação por Cromatografia Líquida em Coluna

Coluna de Sephadex (I)

As amostras de FB_{CCD} aplicadas às colunas cromatográficas tinham massa de 50 mg. Na eluição da CL em coluna de sephadex foram coletadas 100 frações de 1 mL, das quais foram retiradas alíquotas de cerca de 20 µL, para a realização da CCD, desenvolvida com diclorometano. A derivatização das placas resultantes da CCD mostrou a formação de uma mancha azul nas frações 33 a 39 e de manchas de coloração roxa e rosa nas frações 40 a 53, indicando a presença de mais de uma substância (Figura 59).

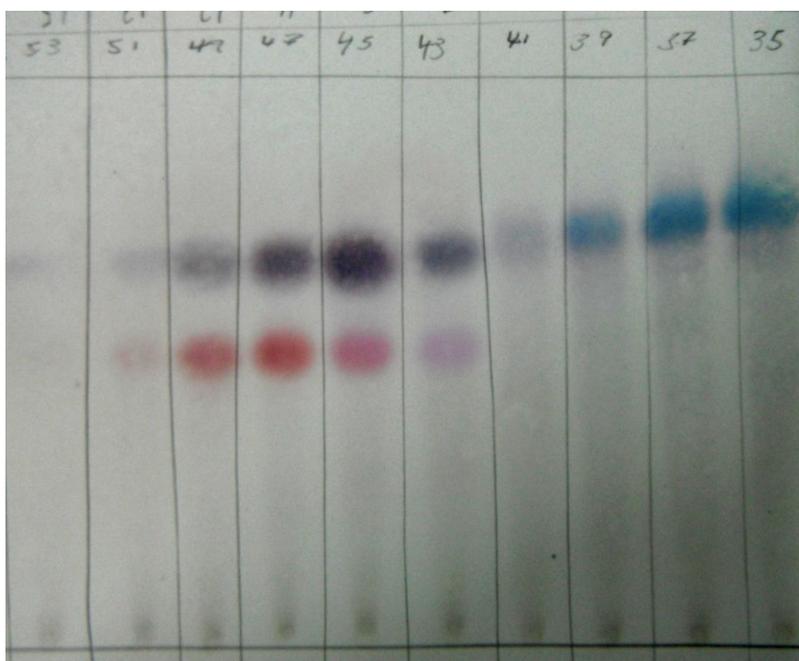


Figura 59 - Derivatização com *p* - hidroxibenzaldeído das frações provenientes de LC em coluna de sephadex (I) da FB_{CCD} do extrato de *O. secundiramea* em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), revelando as frações com as cores azul rosa e roxa.

As frações 33-39 (coloração azul) foram reunidas (6,3 mg) e denominadas OC II. As frações de 40 a 53 foram reunidas (20,1 mg) e submetidas a refraçãoamento por CL, em coluna.

Coluna de sílica gel (II)

A CL em coluna de gel de sílica (II) foi eluída com diclorometano (Figura 60). As frações coletadas foram submetidas à CCD e derivatizadas com *p*- hidroxibenzaldeído. Neste estudo cromatográfico, as frações 15 a 29 apresentaram uma única mancha roxa. A reunião dessas frações foi denominada sub-fração OC III e apresentou massa de 5,5 mg. As frações 37- 50 mostraram coloração rosa: sua reunião resultou na sub-fração OC II2, que apresentou massa de 4,2 mg (figura 60).

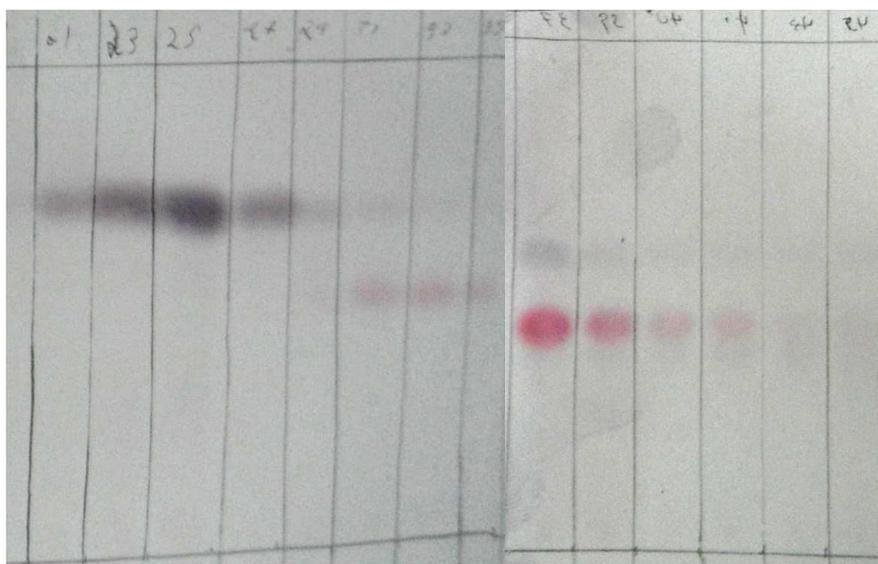


Figura 60 - Derivatização com *p*- hidroxibenzaldeído das frações provenientes de LC em coluna de sílica (II) da FB_{CCD} do extrato de *O. secundiramea* em placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254) (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), revelando as frações com as cores rosa e roxa.

Os limites de detecção de atividade, frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*, dessas quatro sub-frações (OCI, OCII 1, OCII 2 e OCII 3) foram de 5, 1, 10 e 1 µg respectivamente (Figura 61).

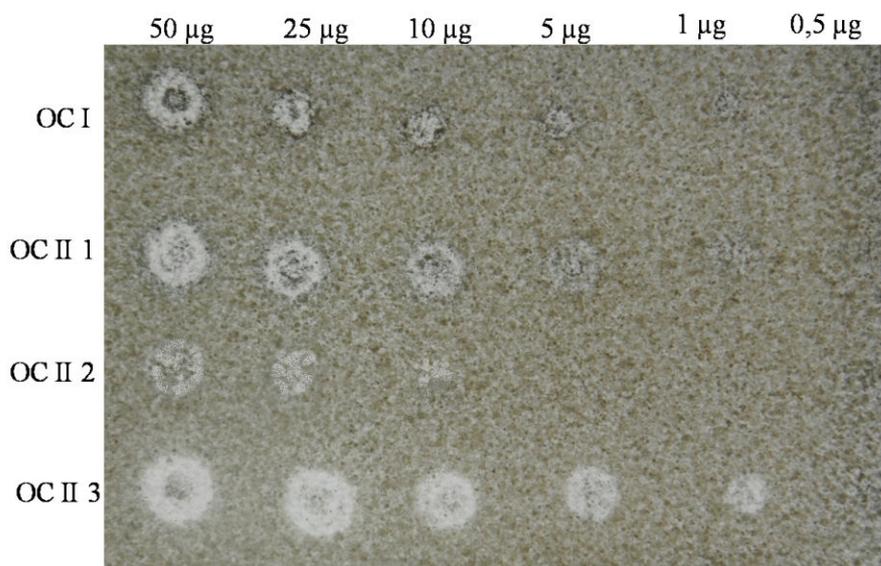


Figura 61 - Determinação da CIM por bioautografia com os fungos *C. sphaerospermum*, em CCD de sílica gel (20x20 cm, 0,20 mm, 60GF254), para as sub-frações OC I, OC II 1, OC II 2 OC II 3 provenientes de CL da fração bioativa CCD de *O. secundiramea* nas concentrações de 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg.

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise por CG/EM do extrato obtido da biomassa fresca de *O. secundiramea*, coletada em 2010, indicou a presença de 20 picos, no cromatograma (figura 62). Os tempos de retenção e os picos de fragmentação a 70 eV, de cada molécula, foram comparados a dados bibliográficos (tabela 9). Os picos 1, 2 e 3 são devidos a impurezas presentes nos solventes das amostras e o pico 19 corresponde a ftalato, proveniente de contaminação ambiental ou da manipulação, no processo de extração (Gressler, 2010).

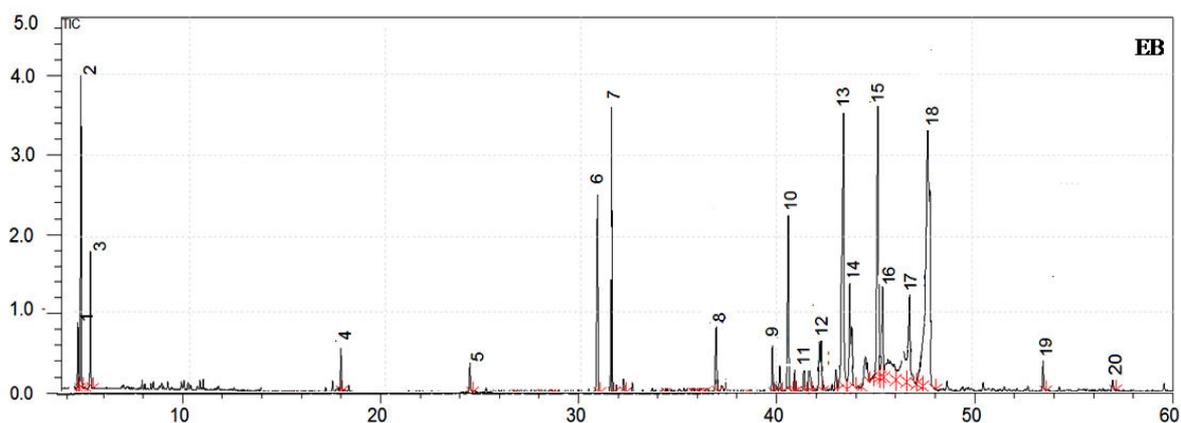


Figura 62 - Cromatograma em CG/EM do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

A análise dos espectros de massas indicou a existência de fragmentos em m/z 69, atribuíveis a unidades de isopreno, bem como picos em m/z 136, relativos ao dímero do isopreno (monoterpeno) (Anexo B). Também foram observados picos em m/z 35 e 79, característicos, respectivamente, das perdas do cloro e do bromo, cujas presenças puderam ser confirmadas pelas multiplicidades dos picos moleculares, devidas à abundância dos isótopos dos halogênios - $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl}$ (75,2 : 24,8%) e $^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br}$ (51 : 49%).

Os tempos de retenção observados no cromatograma, obtido por CG-EM, do extrato de *O. secundiramea* (SP401694) e as fragmentações, íons moleculares e fórmulas moleculares correspondentes estão dispostos na tabela 9.

Tabela 9 - Dados referentes a cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

| Pico | T_R | Fragmentos e (%) | Íon molecular – halogênio | Íon Molecular | Fórmula Molecular | Referência |
|------|--------|---|--------------------------------|------------------|---|------------------------|
| 4 | 18,036 | 41(50) 69(100) 78 81(20) 93(90) 107(25) 119(50) 135(80) 136 (traço) | - | 135 | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ | Barahona & Rorrer 2003 |
| 5 | 24,089 | 41(50) 78, 79, 81(40) 91(100) 117 (50) 133(80) 169(5) 171 (traço) | 133 - Cl | 169; 171 | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Cl}$ | Barahona & Rorrer 2003 |
| 6 | 30,913 | 41(40) 53(40) 79(70) 91 (100) 105 (95) 122(85) 133(55) 149(80) 185(30) 229, 230(70) | 149 - Br | 229; 230 | $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{OBr}$ | Paul et al 1980 |
| 7 | 31,636 | 41(15) 65(15) 77(20) 91(50) 105(40) 118(50) 133(100) | 213 - Br 133- Br_2 | 292; 294; 296 | $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Br}_2$ | Barahona & Rorrer 2003 |

| | | | | | | |
|----|--------|--|---|------------------|--|--------------------------|
| 8 | 36,215 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 167 169 (20) 212 213(5) | 214 - Cl 167 - Br 133 - BrCl | 248; 249; 251 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl | Maliakal et al. 2001 |
| 9 | 39,856 | 41(50) 55 (50) 65(40) 79(80) 91(100) 105(40) 118(60) 133(95) 149(25) 229(20) | 229 - Br 149 - Br ₂ | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ | Paul et al. 1980 |
| 10 | 40,682 | 41(40) 65(30) 77(50) 91(95) 105(50) 117(60) 133(100) 167(40) 217(40) | 245 - Br 217 - BrCl 167 - Br ₂ 133 - Br ₂ Cl | 323; 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl | Polzin et al. 2003 |
| 11 | 41,013 | 41(20) 65(30) 77(50) 91(100) 105(50) 117 (70) 133(95) 153(10) 169(50) 185(10) 203(5) 213(20) 233(10) 249(50) 269(10) | 249 - Cl; 233 - Cl ₂ ; 203- Br 169 - BrCl 133 - BrCl ₂ | 282; 284; 286 | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ | Polzin et al. 2003 |
| 12 | 41,493 | 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 185 187 (20) 197 199(5) 212 213(5) | 199 - Cl; 187 - Br 148 - BrCl 375 - Cl 329 - Br; | 263; 265; 267 | C ₁₀ H ₁₄ BrClO | Burreson et al. 1975 |
| 13 | 43,298 | 41(10) 77(40) 91(50) 105 (30) 117(50) 133(100) 167 197 213 249 294 329 375 (5) | 249 - Br ₂ 167 - Br ₃ ; 133 - Br ₃ Cl; 294 - BrCl | 408; 410 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl | Gerwick 1984 |
| 14 | 43,839 | Isômero de 14 | - | - | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl | - |
| 15 | 45,273 | 69(15) 77(40) 91(50) 105(40) 133(100) 167(50) 213(5) 249(5) 294(3) | 249 - Br 213 - BrCl 167 - Br ₂ 133 - Br ₂ Cl | 328; 330; 332 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl | Coll & Wright, 1987 |
| 16 | 45,511 | Isômero 16 | - | - | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl | - |
| 17 | 46.900 | 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60); 147(15) 185 187 (20) 197 199(5) 212 213(5); 229(10); 267 269(5); 285 287 (5); 310 311(5) | 310 -Cl 267 - Br 229 - BrCl 185 - Br ₂ 147 - Br ₂ Cl 329 - Cl 294 - Cl ₂ | 344; 346; 348 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ ClO | Crews et al. 1984 |
| 18 | 47.972 | 77(40) 91(50) 105 (30) 117(50) 133(100) 167(80) 213(40) 247(15) 284(20) 294(15) 329 (5) | 284 - Br ₂ 247 - BrCl 213 - BrCl ₂ 167 - Br ₂ Cl 133 - Br ₂ Cl ₂ | 360; 362; 364 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ Cl ₂ (Ochtodene) | McConnell & Fenical 1978 |
| 19 | 55,754 | 44(90) 57(90) 71(50) 83(30) 111(30) 129(100) 147(20) | - | 259 | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ (Ac. Docosadienoico) | NIST |
| 20 | 59,569 | 44(60) 57(40) 71(30) 83(10) 113(10) 149(100) 167(30) | - | 278 | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ (ftalato) | NIST |

A análise por CG/EM dos extratos de *O. secundiramea* (coletada em 2011), obtidos a partir de biomassa fresca, liofilizada e seca resultou em cromatogramas que apresentaram 6, 10 e 9 picos, respectivamente, indicando que diferentes tratamentos aplicados à biomassa, antes da extração, determinam alterações no número e na quantidade das substâncias que compoem esses extratos (figura 63). Nesses cromatogramas, os picos 1 e 2 são devidos aos solventes.

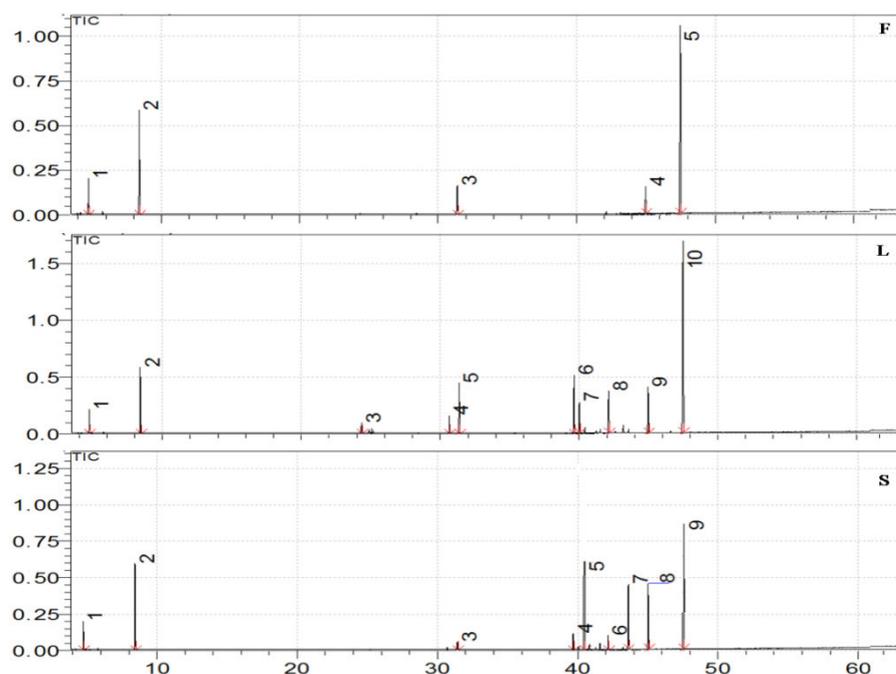


Figura 63 - Cromatograma em CG/EM do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2011 (SP401695) em resposta aos diferentes métodos de processamento da biomassa (F - fresca; L - liofilizada e S - seca).

Dentre essas alterações, observou-se o surgimento, nos extratos das biomassas liofilizadas e secas, de picos com íons moleculares e fragmentações de massa indicativas de monoterpenos cíclicos e oxigenados (tabela 10 e espectros de massas correspondente Anexo B).

Também, nos extratos provenientes das biomassas liofilizada e seca, foi observada redução no conteúdo da substância que eluiu em $Tr = 47,49$ min., o monoterpeno $C_{10}H_{15}Br_2Cl$, quando foram comparadas as áreas deste pico, com a área do pico correspondente no cromatograma do extrato obtido de biomassa fresca (tabela 10).

Dados relativos aos picos presentes nos cromatogramas realizados com os extratos provenientes de diferentes métodos de processamento da biomassa de *O. secundiramea* (SP401695) assim como os correspondentes íons moleculares, estão compilados na tabela 10.

Tabela 10 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM dos extratos de *O. secundiramea* coletada em 2011 (SP401695) proveniente de biomassa submetida a diferentes métodos de processamento.

| Método de processamento da biomassa | Pico | T _R | Área (%) | Íon molecular | Fórmula Molecular |
|-------------------------------------|------|----------------|----------|---------------|--|
| Fresca (F) | 3 | 31.366 | 13.84 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 4 | 44.960 | 4.69 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 5 | 47.491 | 44.33 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| Liofilizada (L) | 3 | 24.345 | 1.77 | 165 | C ₁₀ H ₁₄ Cl |
| | 4 | 30.655 | 2.37 | 229 | C ₁₀ H ₁₅ OBr |
| | 5 | 31.376 | 10.59 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 6 | 39.628 | 9.91 | 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl |
| | 7 | 40.012 | 4.58 | 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl |
| | 8 | 42.134 | 8.18 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| | 9 | 44.975 | 8.47 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 10 | 47.494 | 40.98 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| Seca (S) | 3 | 31.416 | 1.85 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 4 | 39.671 | 2.42 | 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl |
| | 5 | 40.459 | 15.14 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 6 | 42.164 | 2.56 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 7 | 43.607 | 11.84 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 8 | 45.018 | 13.30 | 410 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl |
| | 9 | 47.498 | 26.34 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |

O cromatograma resultante da análise por CG-EM, da FB_{CCD} obtida do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010, apresentou 13 picos (figura 64), dos quais o que apresentou maior área foi o de Tr = 45,108, atribuído ao composto C₁₀H₁₅Br₂Cl. Esta substância possui atividade antifúngica e apresentou-se, igualmente, como majoritária no extrato (tabela 11).

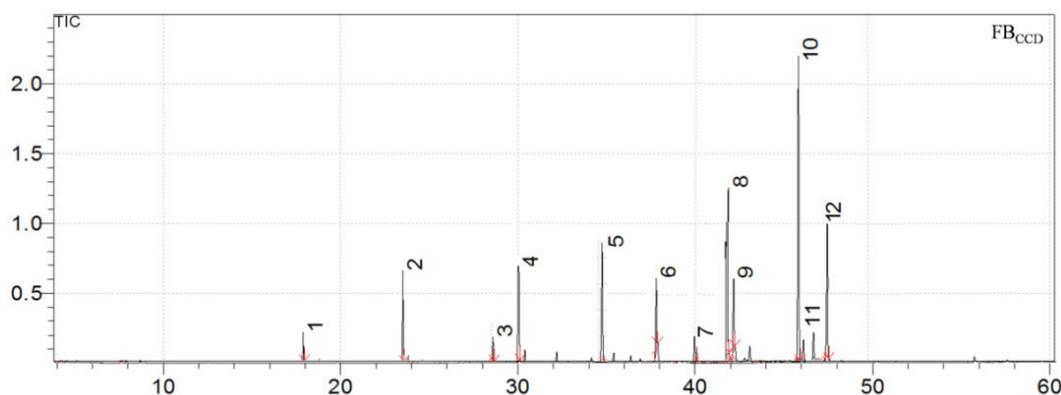


Figura 64 - Cromatograma em CG/EM da fração FB_{CCD} obtida pela cromatografia preparativa de 250 mg do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

Tabela 11 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM da FB_{CCD} do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

| Pico | T _R | Área (%) | Íon molecular | Fórmula Molecular |
|------|----------------|----------|---------------|---|
| 1 | 18.036 | 2,27 | 135 | C ₁₀ H ₁₆ |
| 2 | 24.089 | 7,95 | 169 | C ₁₀ H ₁₄ Cl |
| 3 | 29.963 | 2,27 | 229 | C ₁₀ H ₁₅ OBr |
| 4 | 30.361 | 7,82 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| 5 | 35.715 | 9,09 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| 6 | 39.841 | 6,81 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| 7 | 41.479 | 2,27 | 264 | C ₁₀ H ₁₄ BrClO |
| 8 | 42.981 | 14,7 | 284 | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ |
| 9 | 43.175 | 6,81 | 410 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl |
| 10 | 45.108 | 26,13 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| 11 | 43.987 | 2,52 | 344 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ ClO |
| 12 | 46.891 | 11,36 | 362 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ Cl ₂ |

Os cromatogramas obtidos por CG/EM das sub-frações OC II, OC III, OC II2 e OC II3, oriundas da FB_{CCD}, após cromatografia líquida em coluna, de *O. secundiramea* apresentaram perfis distintos, sendo que as três primeiras sub-frações eram formadas por três substâncias e a última, por quatro (figura 65).

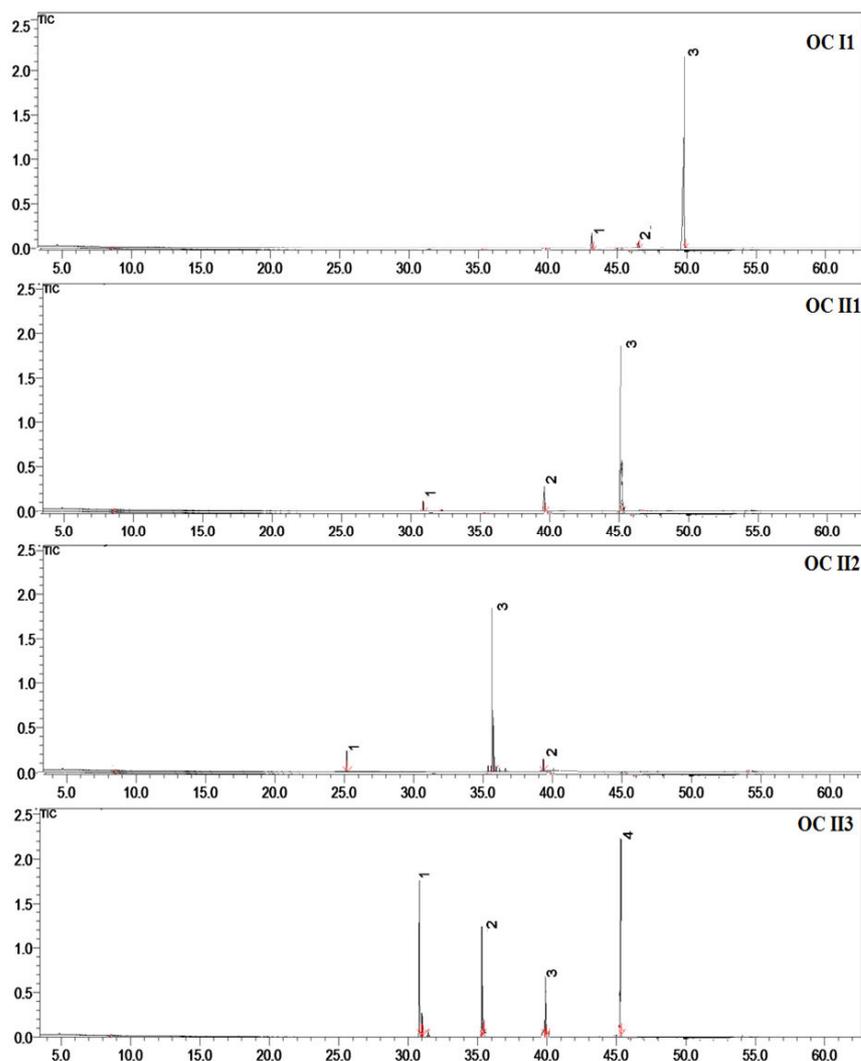


Figura 65 - Cromatograma em CG/EM das sub-frações OC II1, OC III1, OC II2 e OC II3 obtidas em cromatografia líquida em coluna de sephadex (I) e sílica gel (II) da FB_{CCD} do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

Da análise dos cromatogramas, é possível inferir, comparando-se a área (%) dos picos (tabela 12), a predominância de uma substância, nas três primeiras sub-frações; a sub-fração OC II3 apresentou 4 picos. As substâncias componentes da fração OC II3 apresentaram tempos de retenção e espectros de massas semelhantes aos dos três componentes de OC III1 e a um dos componentes de OC II2. Os dados dos cromatogramas e dos espectros de massas obtidos por análise das sub-frações OC II1, OC III1, OC II2 e OC II3, provenientes do extrato de *O. secundiramea* (SP401694), estão na tabela 12.

Tabela 12 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM nas sub-frações da FB_{CCD} do extrato de *O. secundiramea* coletada em 2010 (SP401694).

| Amostra | Pico | T _R | Área do pico (%) | Íon Molecular | Fórmula Molecular |
|--------------------------------|------|----------------|------------------|---------------|---|
| OC I1 (Mancha Azul) | 1 | 43.987 | 2,52 | 344 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ ClO |
| | 2 | 46.675 | 1,89 | 410 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₃ Cl |
| | 3 | 49.259 | 95,59 | 362 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ Cl ₂ |
| OC II1 (Mancha Roxa) | 1 | 31.987 | 4,42 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 2 | 39.862 | 0,24 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 3 | 45.172 | 95,34 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| OC II2 (Mancha Rosa) | 1 | 25.089 | 0,89 | 169 | C ₁₀ H ₁₄ Cl |
| | 2 | 36.096 | 96,1 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 3 | 38.396 | 3,01 | 284 | C ₁₀ H ₁₅ BrCl ₂ |
| OC II3 (Mancha Roxa + Rosa) | 1 | 31.987 | 28,99 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 2 | 36.096 | 21,74 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 3 | 39.862 | 14,49 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 4 | 45.175 | 34,78 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |

Nos cromatogramas das sub-frações OC I1, OC II1 e OC II2, é possível observar a predominância de um monoterpeno halogenado, em cada uma das frações, pois as áreas de seus picos são superiores a 95% da área total.

Análise das sub-frações obtidas por cromatografia líquida em coluna por ressonância magnética nuclear (RMN)

Com o intuito de coletar maior número possível de informações sobre os monoterpenos halogenados previamente identificados, por CG-EM, em cada uma das sub-frações OC I1, OC II1, OC II2 e OC II3, amostras de cada uma delas foram analisadas por RMN ¹³C e de ¹H. No entanto, devido ao baixo rendimento do processo cromatográfico empregado para obter a FB_{CCD}, não foi possível dar continuidade à purificação das substâncias contidas nas sub-frações (OC I1, OC II1, OC II2 e OC II3).

Devido à presença de mais um monoterpeno halogenado em cada sub-fração, não foi possível atribuir os valores dos deslocamentos observados a todos os átomos de cada

molécula, nos espectros de RMN ^{13}C . Entretanto, foi possível observar, nestes espectros, picos com deslocamentos coincidentes com as das moléculas caracterizadas por seus espectros de massas, em análise por CG-EM.

Abaixo são apresentados os valores do deslocamento (δ em ppm) observados nas análises de RMN de ^{13}C e ^1H , dos componentes das sub-frações bioativas do extrato de *O. secundiramea*. Os espectros se encontram apresentados nos Anexos C, D e E.

OC II

^{13}C NMR (125MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm = 138.6, 132.7, 131.0, 70.6, 62.1, 57.0, 54.3, 53.4, 42.0, 37.4, 34.0, 31.9, 29.7, 27.9, 26.1, 24.8, 22.7, 19.1, 14.1.

^1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm = 5.96 (m, 4 H), 5.82 (m, 1 H), 5.32 (s, 2 H), 5.11 (t, $J=7.26$ Hz, 3 H), 4.88 (m, 4 H), 4.73 (m, 3 H), 4.54 (dd, $J=12.30, 3.63$ Hz, 2 H), 4.17 (d, $J=7.91$ Hz, 3 H), 4.09 (s, 1 H), 3.82 (m, 9 H), 3.65 (m, 1 H), 2.75 (m, 9 H), 2.45 (d, $J=5.64$ Hz, 1 H), 1.57 (s, 7 H), 1.36 (m, 17 H), 1.21 (m, 24 H), 1.06 (m, 2 H), 0.90 (s, 3 H), 0.02 (m, 4 H).

OC III

^{13}C NMR (125MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm = 141.3, 139.1, 138.5, 137.8, 134.8, 132.8, 130.6, 127.4, 109.8, 72.9, 62.4, 61.3, 60.1, 58.0, 56.3, 55.7, 54.0, 48.5, 40.3, 35.7, 34.5, 32.0, 28.8, 27.9, 23.9, 17.6.

^1H NMR (500MHz, CHLOROFORM-d) δ = 6.97 - 6.92 (m, 2 H), 5.99 - 5.89 (m, 3 H), 5.83 - 5.80 (m, 1 H), 5.38 - 5.30 (m, 2 H), 5.14 - 5.10 (m, 3 H), 4.90 - 4.86 (m, 4 H), 4.76 - 4.62 (m, 3 H), 4.60 - 4.52 (m, 1 H), 4.37 - 4.31 (m, 1 H), 4.18 - 4.02 (m, 3 H), 3.93 - 3.72 (m, 10 H), 3.69 - 3.65 (m, 1 H), 3.06 - 2.94 (m, 1 H), 2.83 - 2.60 (m, 9 H), 2.58 - 2.41 (m, 1 H), 2.40 - 2.30 (m, 1 H), 2.29 - 2.20 (m, 1 H), 1.75 - 1.63 (m, 1 H), 1.61 - 1.52 (m, 6 H), 1.41 - 1.20 (m,

34 H), 1.19 - 1.17 (m, 2 H), 1.16 - 1.12 (m, 4 H), 1.07 - 1.04 (m, 1 H), 0.97 - 0.76 (m, 3 H), 0.03 - 0.02 (m, 4 H).

OC II2

¹H NMR (500MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.54 7.33, 7.31 - 7.37 (1H, m, M12), 7.26 - 7.29 (25H, m, M11), 7.12 - 7.15 (1H, m, M10), 5.59 (1H, s, M09), 4.07 - 4.17 (2H, m, M08), 3.66 - 3.88 (2H, m, M07), 2.25 - 2.35 (4H, m, M06), 1.50 - 1.57 (38H, m, M05), 1.41 - 1.47 (2H, m, M04), 1.17 - 1.38 (20H, m, M03), 1.13 (1H, s, M02), 0.80 - 1.02 (4H, m, M01).

OC II3

¹H NMR (500MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.49, 7.07(9H, m, M14), 5.31 - 5.37 (9H, m, M13), 4.71 (1H, s, M12), 4.06 - 4.25 (1H, m, M11), 3.76 - 3.91 (1H, m, M10), 2.72 - 2.86 (1H, m, M09), 2.67 (1H, s, M08), 2.33 (1H, br. s., M07), 1.92 - 2.12 (1H, m, M06), 1.50 - 1.71 (48H, m, M05), 1.16 - 1.40 (20H, m, M04), 0.82 - 0.98 (5H, m, M03), 0.03 - 0.11 (2H, m, M02), -0.01 - 0.02 (1H, m, M01).

A análise do espectro de correlação homonuclear do acoplamento de hidrogênios (COSY) apresentou, devido à presença diferentes moléculas em cada sub-fração, superposição de diversos picos, o que dificultou a interpretação desses acoplamentos.

Avaliação do efeito do enriquecimento com KBr em cultivos nos biorreatores no perfil cromatografico obtido por CG/EM e no potencial antifúngico dos metabolitos de *O. secundiramea*

Na comparação entre os perfis cromatográficos (Figura 66) obtidos na análise por CG-EM dos extratos da alga cultivada na condição controle (50 mg·L⁻¹ de bromo) e com adição de bromo (250 mg·L⁻¹ e adições semanais de 100 mg·L⁻¹ de bromo) foram observadas as seguintes desigualdades: 1) o pico em TR 31,342 min. aparece apenas no cromatograma do

extrato controle. Ele foi identificado, pelo seu espectro de massas, como o monoterpreno de fórmula molecular $C_{10}H_{12}OBr_2$ (tabela 13 e Anexo B). O pico com TR 41,738 min, que aparece nos dois cromatogramas e que é devido à substância com fórmula molecular $C_{10}H_{12}OBr_2$, apresentou área maior no cromatograma do extrato da alga tratada (tabela 13). CG/EM (figura 66).

O pico em Tr 76,734 min. que aparece em ambos os cromatogramas, não foi detectado nos extratos das algas coletadas na natureza. A comparação do espectro de massas dessa substância revelou similaridade superior a 95% com o colesterol de acordo com a biblioteca NIST.

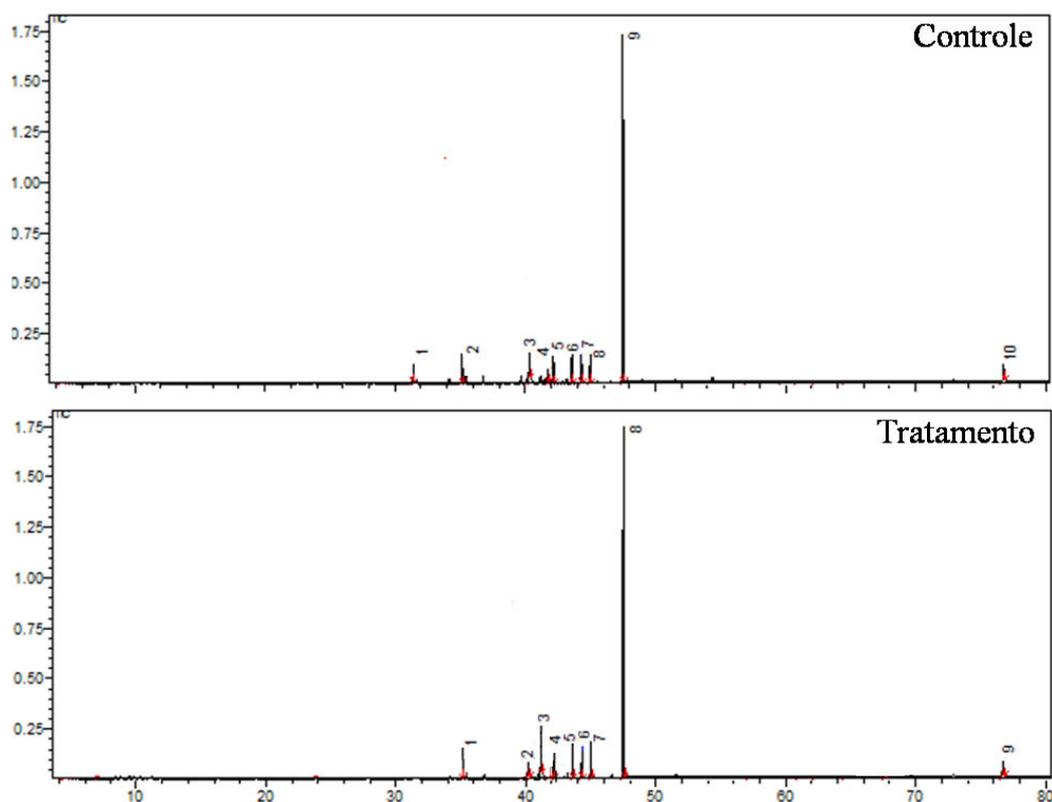


Figura 66 - Cromatograma dos extratos de *Ochtodes secundiramea* provenientes dos cultivos em biorreator nas condições de controle (cultivada a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bromo) e tratamento (cultivada a $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e adições semanais de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bromo).

Tabela 13 - Tempo de retenção, porcentagem da área do pico no cromatograma, íon molecular e molécula correspondente para cada pico observado no cromatograma da análise em CG/EM dos extratos de *O. secundiramea* provenientes dos cultivos em biorreator nas condições de controle (cultivada a 50 mg·L⁻¹ de bromo) e tratamento (cultivada a 250 mg·L⁻¹ e adições semanais de 100 mg·L⁻¹ de bromo).

| Experimento de cultivo em biorreatores | Pico | T _R | Área (%) | Íon molecular | Fórmula Molecular |
|---|------|----------------|----------|---------------|--|
| Controle (cultivada a 50 mg·L ⁻¹ de bromo) | 1 | 31,342 | 4,1 | 229 | C ₁₀ H ₁₅ OBr |
| | 2 | 35,167 | 5,81 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 3 | 40,310 | 5,13 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 4 | 41,738 | 3,7 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 5 | 42,166 | 4,4 | 284 | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ |
| | 6 | 43,596 | 4,81 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 7 | 44,330 | 4,56 | 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl |
| | 8 | 45,002 | 5,17 | 410 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl |
| | 9 | 47,507 | 57,52 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| | 10 | 76,734 | 4,8 | 386 | C ₂₇ H ₄₆ O |
| Tratamento (cultivada a 250 mg·L ⁻¹ e adições semanais de 100 mg·L ⁻¹ de bromo) | 1 | 35,164 | 3,36 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 2 | 40,307 | 4,18 | 249 | C ₁₀ H ₁₄ BrCl |
| | 3 | 41,738 | 6,16 | 311 | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ |
| | 4 | 42,162 | 4,97 | 284 | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ |
| | 5 | 43,593 | 4,58 | 294 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ |
| | 6 | 44,331 | 3,87 | 325 | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl |
| | 7 | 45,005 | 4,95 | 410 | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl |
| | 8 | 47,507 | 59,88 | 329 | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl |
| | 9 | 76,734 | 3,75 | 386 | C ₂₇ H ₄₆ O |

5.3.5. Efeitos da aplicação do extrato e FB_{CCD} de *O. secundiramea* no controle da antracnose do mamão *in vitro* e *in vivo*

5.3.5.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* para o fungo *C. gloeosporioides*

A determinação da CIM frente ao fungo *C. gloeosporioides* foi realizada apenas com o extrato de *O. secundiramea* (SP401694) e com a FB_{CCD}, que resultou do fracionamento, por CCD preparativa, desse extrato. O valor encontrado para a concentração inibitória mínima foi 10 µg·mL⁻¹, tanto para o extrato, quanto para a FB_{CCD} (figura 67).

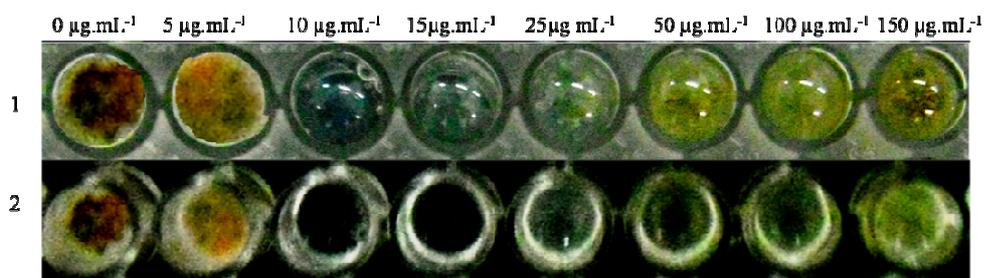


Figura 67 - Placa de microtitulação tipo ELISA de 96 poços contendo meio BDA e o extrato de *O. secundiramea* nas concentrações de 150, 100, 50, 25, 15, 10, 5 e 0 (apenas o solvente DCM) $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O valor da concentração inibitória mínima ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato e da fração de *O. secundiramea* serviu de base para a avaliação da proteção proporcionada por biofilme contendo esses materiais antifúngicos, no controle da antracnose do mamão, no período pós-colheita.

5.3.5.2. Avaliação da aplicação *in vivo* do extrato e da fração de *O. secundiramea* na forma de biofilme em frutos de mamão

Os resultados dos testes aplicados aos frutos antes do início da experiência no estágio 1 de maturação, (T0) foram: peso médio - 550,30 g; sólidos solúveis - 9° Brix; acidez titulável - 0,98 % de ácido cítrico; pH da polpa - 5,23; firmeza da polpa - 2,038 N e resistência da casca - 11,205 N.

A análise dos parâmetros de qualidade dos frutos, em resposta a aplicação dos tratamentos com o biofilme contendo o extrato de *O. secundiramea* (SP401694) e da FB_{CCD}, por 6 dias, resultou em alterações significativas, indicando uma redução da perda de massa fresca e discreto aumento na acidez titulável, enquanto a firmeza da polpa e a resistência da casca não foram alteradas, quando comparadas ao controle (figura 68).

Verificou-se que a aplicação do biofilme contendo o extrato ou a FB_{CCD} de *O. secundiramea* promoveu respostas similares ao longo do experimento, simulando período de prateleira. No terceiro dia, a perda de massa fresca dos mamões do tratamento foi 4% inferior ao do controle ($F = 53,076$; $p < 0,001$), o valor de sólidos solúveis foi 3° Brix, sendo significativamente superior no controle ($F = 32,6738$; $p < 0,001$). Tanto a acidez titulável quanto o pH não apresentaram diferenças significativas na comparação entre os controles e os tratamentos. O mesmo foi verificado para a resistência da casca, enquanto a firmeza da polpa apresentou um aumento significativo nos tratamentos ($F = 64,823$; $p < 0,001$).

Ao final dos seis dias de experimento, todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos. Os frutos protegidos por biofilme com extrato e FB_{CCD} apresentaram menor perda de massa fresca e menor teor de sólidos solúveis; o tratamento promoveu, ainda, menor acidez titulável, associada ao pH mais elevado. Outro resultado positivo foi o aumento tanto da firmeza da polpa quanto da resistência da casca, quando tratados com o biofilme contendo as substâncias bioativas presentes no extrato de *O. secundiramea* (figura 68).

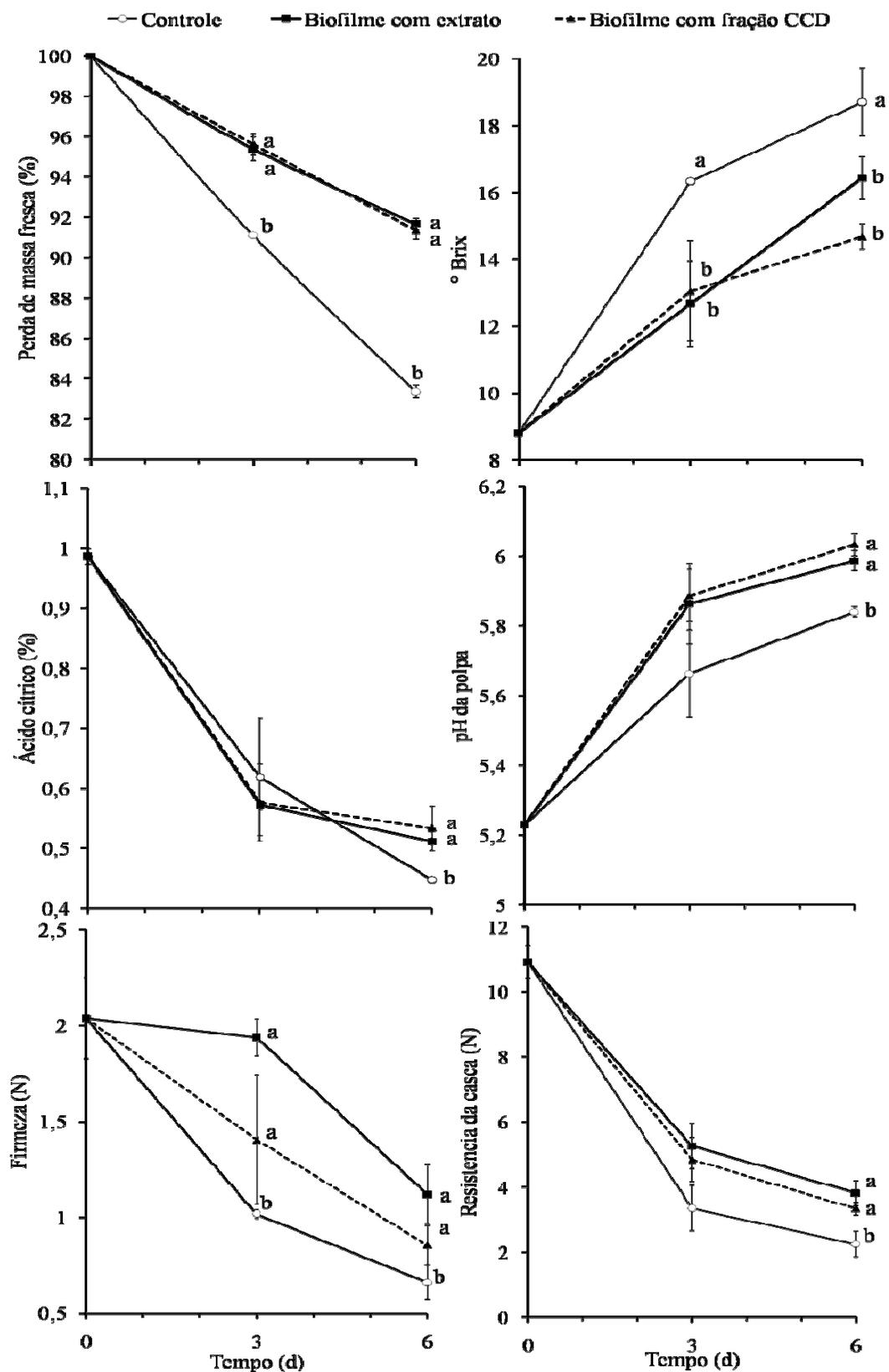


Figura 68 - Avaliação dos parâmetros de qualidade do período de prateleira (durante 0, 3 e 6 dias) em frutos de mamão em resposta a aplicação de biofilme de amido contendo extrato e FB_{CCD} de *O. secundiramea* (SP401694). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (n=3). Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando 1% de significância..

No terceiro dia, os mamões tratados com o extrato apresentaram aspecto menos maduro, quando comparados aos frutos do controle. O mesmo foi observado no sexto dia, quando também não foram notados quaisquer sinais de fitotoxicidade, em resposta à adição das substâncias extraídas de *O. secundiramea*. A adição do extrato e da FB_{CCD} promoveu aumento na durabilidade do biofilme de amido, que no controle negativo começou a desprender da superfície do fruto, após o terceiro dia (figura 69).

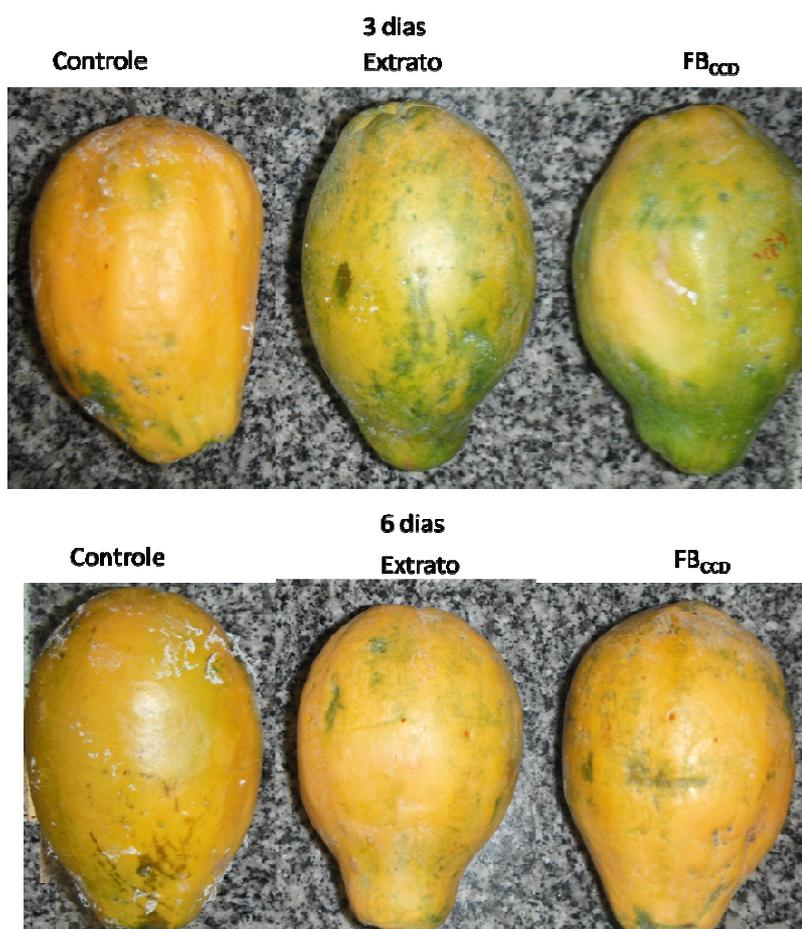


Figura 69 - Avaliação visual dos frutos ao terceiro e sexto dias na simulação do período de prateleira em resposta a aplicação de biofilme de amido contendo extrato e FB_{CCD} de *O. secundiramea* (SP401694).

Dentre as três repetições, um mamão apresentou o desenvolvimento de antracnose a partir do quarto dia e no sexto dia apresentou lesões superiores a 2,0 cm caracterizados como nota 3 na escala do índice de doença (figura 70). Os frutos do tratamento com extrato e FB_{CCD}

de *O. secundiramea* não apresentaram lesões típicas do desenvolvimento de antracnose, durante o período experimental (6 dias).

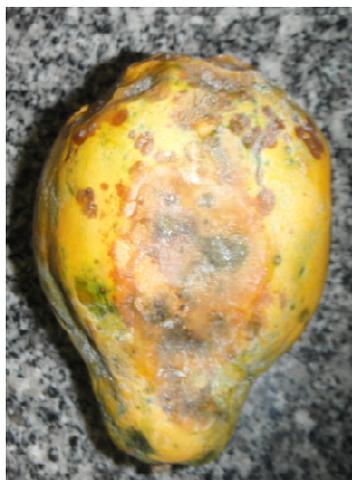


Figura 70 - Fruto de mamão (condição controle) apresentando marcas típicas da antracnose com mais de 2 cm de diâmetro, caracterizado como nota 3 na escala de índice de doença.

6. DISCUSSÃO

6.1. Linhagens de *Hypnea musciformis*

6.1.1. Efeito do enriquecimento com CO₂

A comparação entre as taxas de crescimento das linhagens de *H. musciformis* cultivadas em biorreatores evidenciou que a linhagem MA apresentou taxas superiores quando comparadas a linhagem VC. Padrão similar foi verificado em estudos anteriores com as mesmas linhagens de *H. musciformis* (Yokoya et al., 2007).

A resposta na produção de biomassa das macroalgas em função do enriquecimento por CO₂ dissolvido é extremamente diversificada. As espécies podem ser extremamente sensíveis como foi observado em *Porphyra leucostica* (Rhodophyta) que apresentou redução de 85,4% em resposta ao aumento de 1% na concentração de CO₂ (Mercado et al., 1999). *Ulva rigida* (Chlorophyta) apresentou a taxa de crescimento aumentada em 3 vezes quando cultivada em condição de CO₂ 28 vezes superior a condição natural (Gordillo et al. 2001). *Gracilaria*

lemaniformis (Rhodophyta) apresentou um aumento na taxa de crescimento em resposta ao enriquecimento de 0,5% na concentração de CO₂ (Zou & Gao, 2009). Algumas macroalgas não apresentam alterações na taxa de crescimento em resposta ao enriquecimento por CO₂ conforme o verificado por Martins (2013) ao cultivar *Dictyota menstrualis* (Phaeophyceae) em biorreatores com concentração de CO₂ 44 vezes superior a verificada naturalmente. Este resultado é similar ao obtido no presente estudo quanto aos efeitos da concentração de CO₂ 10 vezes superior nas linhagens de *H. musciformis*. O conhecimento das respostas da taxa de crescimento de macroalgas em diferentes concentrações de CO₂ é fundamental para a conservação no cenário global com o aumento das emissões devido a ação antrópica e possível impactos natural e aplicações biotecnológicas (Gao & McKinley, 1994).

As concentrações de CO₂ avaliadas nos cultivos em biorreatores não promoveram alterações significativas tanto nas concentrações dos pigmentos (clorofila *a* e ficobiliproteínas) quanto nos teores de proteína e açúcares solúveis totais das linhagens de *H. musciformis*. Esta resposta corrobora os resultados de Martins (2013) que verificou que as alterações nas concentrações de proteínas e açúcares solúveis de *Dictyota menstrualis* são influenciadas principalmente pela disponibilidade de nitrogênio dissolvido e não pela disponibilidade de CO₂ no meio de cultura. No presente estudo, não foi testada a influência do nitrogênio, no entanto, Martins et al. (2007) verificou que o aumento da disponibilidade de nitrato promoveu o aumento nas concentrações dos pigmentos das duas linhagens de *H. musciformis*.

Os resultados indicam ainda, apesar de não ter sido avaliado diretamente no presente estudo, que não ocorreu aumento na assimilação de carbono das linhagens possivelmente por limitação em relação á atividade de enzimas do ciclo de fixação do carbono, visto que o tratamento por CO₂ também não afetou as quantidade de proteínas solúveis totais e, desta forma, possivelmente o mesmo para enzimas. Conforme o verificado por Martins (2013) que

não detectou alterações na atividade a enzima rubisco em função do enriquecimento por CO₂ no cultivo de macroalgas.

Os resultados descritos em estudos anteriores para os parâmetros fotossintetizantes (Yokoya et al., 2007) e metabolismo do nitrogênio (Martins et al., 2007) das linhagens MA e VC de *H. musciformis*, juntamente com os apresentados no presente estudo para as respostas em relação ao enriquecimento por CO₂ fornecem subsídios para análise comparativa entre linhagens de macroalgas e estabelecimento de sistemas modelos para avaliar as respostas a fatores ambientais em macroalgas e realização de seleção de linhagens (Plastino, 2004, Hanisak, 1990).

6.1.2. Avaliação do efeito do enriquecimento com CO₂ em cultivos nos biorreatores no perfil em CG/EM dos compostos com potencial antifúngico

Suárez-Álvarez et al. (2012) verificaram um aumento na taxa de crescimento de *Hypnea spinella* cultivada com adição de CO₂ em meio contendo amônio. No presente estudo, a ausência de alterações nas taxas de crescimento das linhagens de *H. musciformis* cultivadas em biorreatores são condizentes com a teoria do balanço carbono - nutrientes, sugerindo que o excedente de carbono, disponibilizado no meio de cultura, não é incorporado na forma de biomassa devido à limitação de outros nutrientes (Xu et al., 2010, Cronin & Hay, 1996, Fajer et al., 1992).

Foi observado que o tratamento com CO₂ não promoveu alterações na concentração de açúcares totais, estando este resultado possivelmente associado à ocorrência da glicólise dessas moléculas, que não foram direcionadas para construção de parede celular, e sim a diferentes vias de síntese de compostos secundários (Ghasemzadeh & Jaafar, 2011, Penuelas & Estiarte, 1998). Com a adição de CO₂, no cultivo das linhagens de *H. musciformis* houve aumento significativo no rendimento da extração e na quantidade de substâncias, segundo resultados das análises químicas. .

O resultado da análise de CG/EM das linhagens de *H. musciformis* indicaram a presença de diversos ácidos graxos, alguns grupos de glicopiranosil (especialmente de galactose e glucose) e triterpenos do tipo esterol (C₂₇- C₂₉), comuns a diversos grupos de algas vermelhas e já identificados para esta mesma espécie (Balamurugan et al., 2013, Machado et al., 2013, Nasir et al., 2011, Ragan, 1981).

Na análise comparativa entre as linhagens de *H. musciformis*, na condição controle (sem adição de CO₂), a linhagem VC apresentou uma diversidade maior de metabólitos quando comparada a linhagem MA, com 10 e 7 picos no cromatograma em CG/EM, respectivamente. O enriquecimento pela adição de CO₂ promoveu o aumento no número de substâncias observadas no perfil obtido em CG/EM, passando para 11 na linhagem MA e 12 na linhagem VC. Essa diferença relacionada aos compostos orgânicos com esqueletos de carbono, possivelmente pode estar relacionada com o que foi observado por Yokoya et al. (2007) que verificou taxas fotossintéticas mais elevadas na linhagem VC em relação a MA, o que influencia o metabolismo e o total de carbono fixado pelas duas linhagens.

Na análise da FB_{CCD} das linhagens de *H. musciformis*, cultivadas em diferentes condições de CO₂, foram observados, por espectrometria de massas de alta resolução, substâncias com massas moleculares superiores às observadas por CG/EM.

Os fragmentos observados nos espectros de massa, associados aos dados relativos aos esteróis glicosilados (com grupos gluco ou galactopiranosil) comumente verificados em macroalgas, sugerem a presença de esteróis-glicosilados (Ahmad et al., 1992). Esta classe de metabólitos pode estar ligado a ésteres de ácidos graxos (Grillea et al., 2010) e apresentar diferentes atividades biológicas, entre as quais está o potencial antifúngico (Chludil et al., 2002).

A fração MA foi a única a não apresentar atividade antifúngica em Rf 0,7 (bioautografia) e também não apresentou o pico com TR 2,8 min, por CLAE de alta resolução. A presença da glucopiranosil - colesterodienona foi sugerida devido à análise de

seus fragmentos de massa e à coincidência do valor atribuído ao seu íon molecular com o verificado na literatura (Lin, et al., 2009).

Os resultados das análises por CG-EM do extrato de linhagem MA, do extrato obtido de VC após o tratamento e do controle endossam esta hipótese, porque em todos os espectros foi detectada a presença do colest-8,24-dien-3-one e do grupo glucopiranosil.

A análise por CLAE-EM dos materiais das duas linhagens correspondentes à mancha em Rf 0,4 (correspondente à atividade antifúngica), tanto do controle quanto dos tratamentos, sugeriu a presença de composto com fragmentação de massa e íon molecular compatíveis com os dados de um colesterol associado ao galactopiranosil, para o qual foi determinado e o m/z de 575,7877 (Schröder et al., 2003).

O único pico verificado em todas as amostras referentes ao Rf 0,1 (exceto o MA 0,1 controle que não apresentou atividade antifúngica), correspondente à mancha de Rf 0,1 que apresentou atividade antifúngica na bioautografia, apresenta fragmentação de massa semelhante à da macroalga verde *Codium iyengarii*, relativa à molécula formada por colesterol ligada a um grupo galactoglicosil (Ali et al., 2003).

Kovganko e Kashkan (1999) destacam a dificuldade na investigação dos esteróis-glicosilados de macroalgas, devido à pequena quantidade com que são encontrados nos extratos, aliada à grande diversidade e similaridade estruturais destes compostos.

A análise do perfil dos extratos por CG-EM indicou que a linhagem MA apresentou maiores taxas de crescimentos enquanto a VC possuem maior diversidade de metabólitos, diferenças que indicam a possibilidade da seleção de linhagem para futuras investigações ou aplicações biotecnológicas (Levy et al., 1990).

6.2. *Ochtodes secundiramea*

Experimento com liberação e germinação carpósporos e desenvolvimento de plântulas

Os carpósporos de *O. secundiramea* foram mantidos em condições indicadas como ideais para a germinação de esporos de macroalgas tropicais (Miranda et al., 2012, Orduña-Rojas & Robledo, 1999, Yokoya & Oliveira, 1993), no entanto, esta espécie apresentou uma elevada sensibilidade aos tratamentos testados.

O resultado obtido apresenta duas possíveis explicações, a primeira é a sensibilidade da espécie ao cultivo em laboratório, este fator é difícil de ser confirmado devido à ausência de informações referentes ao ciclo de vida e a reprodução de *O. secundiramea* em laboratório, visto que o único estudo que abordou as fases esta temática foi realizado com a observação de espécimes coletados na natureza (Joly & Ugadim, 1966).

O segundo fator que potencialmente favoreceu a inviabilidade dos esporos de *O. secundiramea* foi a presença dos esporos da macroalga *Acrochaetium infestans*, que é uma espécie que apresenta hábito epífita e produz grande quantidade de esporos como uma estratégia de rápido desenvolvimento dos germinantes, e esta competição possivelmente afetou de forma negativa a germinação dos carpósporos de *O. secundiramea* (Weinberger et al., 2007).

Experimento com propagação de segmentos apicais

As plantas matrizes de *O. secundiramea* foram inicialmente mantidos em baixa irradiância objetivando o baixo desenvolvimento dos epífitas e manutenção das culturas vivas para o fornecimento dos ápices utilizados nos experimentos posteriores e durante esta fase foi observado o baixo crescimento da espécie. A manutenção das culturas matrizes não isoladas em baixa irradiância possibilita a redução do desenvolvimento de algas contaminantes (Fernandes et al., 2011).

6.2.1. Isolamento e crescimento em segmentos apicais

Experimento de cultura em diferentes soluções de nutrientes

A disponibilidade de nutrientes é um dos principais fatores que influenciam o desenvolvimento de algas, na natureza ou em laboratório de cultura no entanto não existe um padrão de resposta das espécies às diferentes condições. Neste estudo, não foram verificadas diferenças no crescimento de *O. secundiramea* em resposta aos tratamentos com diferentes soluções de nutrientes, o mesmo foi relatado para *Gracilaria domingensis* (Ramlov et al. 2011). No entanto, Bravin e Yoneshigue-Valentin (2002) observaram que *Hypnea musciformis* apresentou maiores taxas de crescimento na solução de PES, caracterizada pela alta disponibilidade de nutrientes, enquanto a *Gracilaria cornea* apresentou maior desenvolvimento em VSES/8, condição de baixa disponibilidade de nutrientes (Ferreira et al., 2006).

Polzin et al. (2003) relataram que cultivo de *O. secundiramea*, em condições axênicas, apresentaram taxa de crescimento elevada em tratamentos com maior disponibilidade de nitrogênio, no entanto, sob baixa disponibilidade de nitrogênio observaram o aumento no acúmulo de monoterpenos halogenados, compostos que possuem atividade anti-epifitismo (Bhadury & Wright, 2004). O resultado da ausência de diferenças significativas no crescimento dos ápices em resposta as diferentes soluções testadas, juntamente com os dados existentes na bibliografia para a espécie foi para a seleção da solução VSES/2, que apresenta menor concentração de nitrogênio.

Experimento de cultura em diferentes níveis de irradiância

Em geral, níveis de irradiância próximos aos de saturação fotossintético da alga promovem elevadas taxas de crescimento em culturas unialgáceas ou axênicas (Ramlov et al., 2011; Yokoya et al., 2007; Ferreira et al., 2006; Polzin et al., 2003). Maliakal et al. (2001) verificaram que para *O. secundiramea*, em condições axênicas, o ponto de saturação é próximo a $200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2.\text{s}^{-1}$. No presente estudo, o valor de $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2.\text{s}^{-1}$ foi o

mais indicado por permitir o crescimento da alga sem o desenvolvimento exagerado e prejudicial das demais algas vermelhas epífitas (Fernandes et al., 2011)

Experimento de cultura com aeração

A movimentação da água influencia diretamente a produção de biomassa de macroalgas em laboratório de cultura (Bravin & Yoneshigue-Valentin, 2002), e em populações naturais (Reis & Yoneshigue-Valentin, 1998) por propiciar a maior difusão dos nutrientes e disponibilidade de gases dissolvidos.

No entanto, as espécies de macroalgas possuem diferentes limites de sensibilidades em relação à agitação da água, fazendo com que esse movimento, em alguns casos, configure em uma condição de estresse físico e bioquímico, que promove a redução do seu rendimento fotossintético da alga (Hurd, 2000). Os ápices de *O. secundiramea*, no presente estudo não apresentaram diferenças significativas entre as condições de cultivo estagnado e com agitação por adição de $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar úmido. No entanto, apesar de não afetar o crescimento da espécie de interesse a agitação da água favoreceu o desenvolvimento indesejado de outras espécies, desta forma, foi selecionada a condição cultura estagnada para o desenvolvimento das etapas posteriores de obtenção da cultura de *O. secundiramea*.

Aplicação do protocolo de descontaminação

Após a determinação das condições de cultivo de VSES/2, $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ e sem aeração do meio de cultura como melhores formas de cultivo para o crescimento e redução da elevada susceptibilidade de *O. secundiramea* ao desenvolvimento de diferentes macroalgas epífitas em cultura de laboratório. A aplicação do protocolo de descontaminação, similar ao descrito por (Fernandes et al., 2011) foi eficiente para o controle do desenvolvimento dos contaminantes, em 8 semanas.

6.2.2. Efeito do enriquecimento com Bromo (KBr) no cultivo

O enriquecimento por KBr promoveu, ao final de 21 dias de cultivo, o aumento de 35% na concentração de bromo incorporado em *O. secundiramea*, concentração de KBr foi selecionada com base no estudo de Paradas et al. (2010) que verificaram o aumento próximo a 40% na área das vesículas com função de armazenar os composto orgânicos bromados em *Laurencia dendroidea* durante 20 dias de experimento.

Barahona et al. (2003) verificaram taxas de crescimento de 5,2 % \cdot d⁻¹ para *O. secundiramea* cultivada em biorreatores, valor similar ao verificado no presente estudo para o controle (4,8 % \cdot d⁻¹) e tratamento (5 % \cdot d⁻¹). Não foram observadas diferenças significativas na taxa de crescimento de relação ao incremento de bromo no meio de cultura. Diversos estudos demonstraram que o bromo, apesar de não ser um elemento essencial, influencia o desenvolvimento de macroalgas podendo desempenhar papel benéfico ou inibitório (Fries, 1966) e apresentar requerimento específico em fases iniciais do ciclo de vida de algumas macroalgas (Anderson et al., 1992).

Apesar de não apresentar alterações no crescimento, os talos de *O. secundiramea* cultivados sob elevada disponibilidade de bromo apresentaram maiores concentrações de clorofila *a* e de ficobiliproteínas (especialmente aloficocianina e ficoeritrina) bem como no teor de proteínas totais, e não foram verificadas alterações na concentração de carboidratos solúveis totais. Estes resultados podem ser explicados por meio dos valores obtidos para quantificação de enzima bromoperoxidase e sua atividade específica, os quais dobraram no tratamento em relação ao controle. A enzima é responsável pela halogenação dos compostos orgânicos da macroalga, sendo este processo um dos principais mecanismos de combater o estresse oxidativo (Dring, 2006).

Os resultados indicam que o enriquecimento por bromo promove o aumento na quantidade e na atividade da enzima bromoperoxidase em *O. secundiramea*, o que proporciona aumento no sequestro dos radicais livres e atua como fator de proteção ao

estresse oxidativo, reduzindo a degradação dos pigmentos e proteínas analisadas (Fenical, 1975). Os valores de atividade específica e concentração da bromoperoxidase em *O. secundiramea*, após 21 dias de cultivo nos biorreatores, foram similares aos verificados por Rorrer et al. (2001) para a fase exponencial da curva de crescimento da espécie.

Mata et al. (2011) demonstraram que a adição, por curto intervalo de tempo, de espécies reativas de oxigênio induz o acúmulo de compostos halogenados em cultura de *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta), fator que pode ser aplicado juntamente com a adição de bromo para aumento no rendimento de obtenção de compostos halogenados bioativos.

No entanto apesar de proporcionar maior incorporação do bromo e atividade da bromoperoxidase, não foi observado alterações no perfil e na atividade antifúngica dos compostos de *O. secundiramea*. Este resultado pode ser atribuído a limitação de carbono para síntese dos monoterpenos, visto que não foi realizada a oferta de nenhuma fonte de carbono e redução no balanço carbono - nitrogênio (Mata et al., 2012). A ausência de estímulos diretos a enzima mirceno sintase, responsável pela síntese dos monoterpenos (Wise et al., 2002) possivelmente é outro fator associado aos resultados obtidos.

O bromo excedente incorporado por *O. secundiramea* no cultivo na condição de tratamento (enriquecido com KBr) pode ter ocorrido em diferentes classes de moléculas acumulados pela alga como ácidos graxos (Dembitsky & Srebnik, 2002) ou fenóis (Carvalho & Roque, 2000) visto a falta de especificidade da enzima bromoperoxidase em relação ao substrato carbônico utilizado para halogenação (Butler & Carter-Franklin, 2004).

Desta forma os resultados obtidos juntamente com o conhecimento da enzima mirceno sintase (Wise et al., 2002), da influência do CO₂ na síntese de compostos voláteis (Mata et al., 2012) e aumento na obtenção de compostos halogenados em algas expostas a H₂O₂ (Mata et al., 2011) proporcionam plataformas para desenvolver estratégias para plataformas de cultivo

em laboratório de macroalgas com visando indução da síntese e obtenção compostos bioativos (Rorrer & Cheney, 2004).

6.2.3. Análises químicas e de atividade antifúngica

Efeitos do processamento da biomassa para obtenção do extrato

Os monoterpenos são uma classe de moléculas suscetíveis à volatilização, quando a biomassa é submetida à secagem em estufa (Venskutonis 1997). Em contraste, o processo de liofilização é indicado para aumentar o rendimento de extração de compostos orgânicos voláteis, por promoção de interação mais eficaz entre o solvente e a biomassa (Diaz-Maroto et al. 2002). No entanto, neste estudo foi observada a formação de compostos oxidados propiciando a obtenção de monoterpenos diferentes do verificado para o extrato da alga fresca, porém existentes naturalmente e referenciados para espécie (Paul et al., 1980). Estes resultados encontrados na sugerem que o processamento da biomassa pode favorecer a ocorrência de reações, tais como a oxidação.

Os monoterpenos, em geral, apresentam elevada volatilidade o que dificulta a aplicação em biofilmes, para proteção de frutas (Garcia et al. 2008). Entretanto, os monoterpenos halogenados apresentam baixa volatilidade (não sendo degradados quando a biomassa da alga foi submetida ao tratamento em estufa a 50 °C) o que torna os monoterpenos halogenados de *O. secundiramea*, candidatos muito promissores a constituírem biofilmes para o controle dos fungos fitopatogênicos que infestam frutas, no período pós-colheita

Fracionamento guiado e análise dos compostos com atividade antifúngica

O bioautografia (CCD) foi um ensaio sensível e eficiente tanto para a detecção da atividade, quanto para guiar o fracionamento dos extratos de *O. secundiramea*: este ensaio permitiu a análise quantitativa da atividade antifúngica e mostrou que o extrato bruto, a FB_{CCD} e a sub-fração OC III (rica em C₁₀H₁₅Br₂Cl) apresentaram valores similares (1 µg) para o limite de detecção da atividade antifúngica. No entanto, apesar da coincidência dos valores encontrados para o limite de detecção do extrato bruto, da FB_{CCD} e da sub-fração (1 µg), a atividade das duas primeiras apresentou maior intensidade, fator que aponta para a existência de efeito sinérgico entre os monoterpenos reunidos, quanto à atividade antifúngica.

A existência dessa sinergia, aliada à ausência de evidências de toxicidade, no extrato bruto de *O. secundiramea* (Machado et al., 2013) indicam a possibilidade de sua aplicação, ou da FB_{CCD}, diretamente sobre os frutos, para inibição do desenvolvimento fungos, eliminando as dispendiosas e demoradas etapas de fracionamento de extratos e isolamento de substâncias ativas.

A análise dos fragmentos de massa relativos aos picos dos cromatogramas obtidos por CG-EM do extrato, da FB_{CCD} e das subfrações indicou a presença de diversos monoterpenos halogenados, previamente descritos para a *O. secundiramea* ou para espécies dos gêneros *Chondrococcus*, *Ochtodes* e *Potieria*, pertencentes todos à família Rhizophyllidaceae (Polzin et al., 2003; Barahona & Rorrer, 2003; Maliakal et al., 2001; Crews et al., 1984; Gerwick, 1984; Paul et al., 1980; McConnell & Fenical, 1978 e Burreson et al., 1975).

Foram constatadas diferenças (por CG-EM) no número dos monoterpenos componentes dos extratos obtidos de biomassa fresca de *O. secundiramea*, coletadas em épocas distintas (2010 e 2011). Esse tipo de resultado é comum, em macroalgas que sintetizam esta classe de compostos e foi detalhado na análise das diferenças qualitativas e quantitativas dos monoterpenos halogenados de *Portieria hornemannii*, decorrentes da

variação intra-específica (Puglisi, & Paul, 1997) e espacial - temporal (Matlock et al., 1999). As alterações químicas estão associadas à interação de fatores ambientais e ecológicos (Payo et al., 2011).

No presente estudo, a análise semi-quantitativa de todos os extratos mostrou que o pico de maior área relativa era devido ao monoterpene de cadeia aberta de fórmula molecular $C_{10}H_{15}Br_2Cl$. Os trabalhos de Polzin et al. (2003), Barahona & Rorrer (2003) e Maliakal et al. (2001) apontaram, como composto majoritário, o monoterpene acíclico $C_{10}H_{14}Br_2$, para algas coletadas na Jamaica e cultivadas em laboratório. Enquanto McConnell & Fenical (1978) identificaram os monoterpenos cíclicos ochtodeno ($C_{10}H_{14}Br_2Cl_2$) e ochitodiol ($C_{10}H_{16}BrClO_2$) como majoritários em algas coletadas na costa de Belize, Gerwick (1984) detectou o $C_{10}H_{14}Br_3Cl$, como majoritário, nas algas coletadas na costa do Caribe, o que evidencia variação da composição química da espécie, em função do local de coleta.

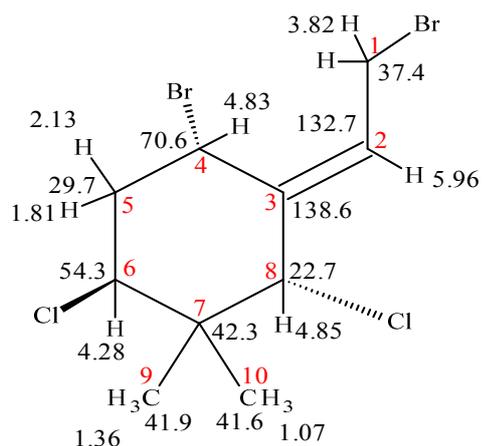
Payo et al. (2011) verificaram que a fase do ciclo de vida da macroalga também é fator determinante nesta variabilidade, pois o gametófito feminino apresentou 202 diferentes compostos enquanto que o gametófito masculino e o tetrasporófito, respectivamente 102 e 106 metabolitos. Os estudos dos monoterpenos halogenados realizados anteriormente para *O. secundiramea* (citados no parágrafo anterior) não apontaram a fase do ciclo de vida dos espécimes coletados. Na presente pesquisa, foram utilizados, em todas as fases de investigação, somente gametófitos femininos. Este pode ser um dos fatores aos quais se deve a variação encontrada entre os monoterpenos halogenados de *O. secundiramea*, em todas essas investigações realizadas até o presente.

Para a caracterização dos monoterpenos das sub-frações, os dados obtidos na análise por CG-MS, aliados aos dados de RMN, foram comparados com os dados existentes na bibliografia. A indicação da presença do monoterpene $C_{10}H_{14}Br_2Cl_2$, principal componente da sub-fração OC II (95,59 % da área relativa, na análise semi-quantitativa do cromatograma

obtido por CG-MS), foi reforçada por meio da comparação com os dados obtidos por McConnel e Fenical (1978) para o monoterpene ochtodeno (tabela 14).

Tabela 14 - Dados comparativos de deslocamento (δ ppm) em RMN ^{13}C e ^1H na análise de RMN do Ochtodeno (monoterpene tetrahalogenado) em CDCl_3 isolado de *O. secundiramea* (McConnel & Fenical, 1978) e os resultados verificados para a subfração OC II (presente estudo), juntamente com a estrutura proposta para molécula com base na bibliografia.

| Carbono | Ochtodeno McConnel & Fenical (1978) | | OC II ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{Cl}_2$) | |
|---------|-------------------------------------|--------------|--|--------------|
| | ^{13}C | ^1H | ^{13}C | ^1H |
| 1 | 37.6 | 5,96 | 37.4 | 5,96 |
| 2 | 132.2 | 4,99 | 132.7 | 5,11 |
| 3 | 137.7 | 4,85 | 138.6 | 4,88 |
| 4 | 69.9 | 4,4 | 70.6 | 4,54 |
| 5 | 28.7 | 4,2 | 29.7 | 4,16 |
| 6 | 52.7 | 4,05 | 54.3 | 4,07 |
| 7 | 41.6 | 2,71 | 42.3 | 2,75 |
| 8 | 20.2 | 2,55 | 22.7 | 2,45 |
| 9 | 41.6 | 1,3 | 41.9 | 1,36 |
| 10 | 41.3 | 1,03 | 41.6 | 1,06 |

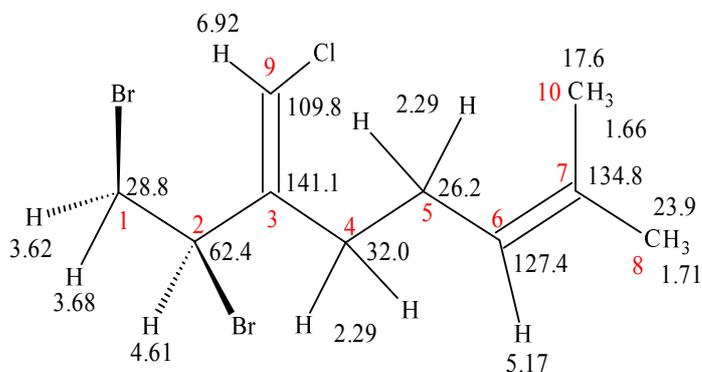


A análise por CG-EM da fração OC II indicou, em menor quantidade, a presença dos monoterpenos $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Br}_3\text{Cl}$ (Gerwick, 1984) e $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{ClO}$ (Burreson et al., 1975). A possível presença destes monoterpenos na fração OC II é reforçada pela existência de picos com deslocamentos de 62,1, 31,9 e 27,9 ppm e de picos com deslocamentos de 57, 34, 26,1, 24,8, 19,1 e 14,1 ppm em seu espectro de RMN ^{13}C , pois estes valores são similares aos deslocamentos obtidos para essas moléculas, segundo a bibliografia.

A identificação do composto $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{Cl}$ (área relativa de 95,34%, no cromatograma CG-EM), componente da sub-fração OC II1, foi corroborada pela comparação com os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do dibromo - cloro, metileno - metil, ochtodeno, obtidos por Coll e Wright (1987) (tabela 15).

Tabela 15 - Dados comparativos de deslocamento (δ ppm) em RMN ^{13}C e ^1H na análise de RMN do 1-2 Dibromo-9 cloro, metileno-10 metil, octodeno (monoterpeno trihalogenado) em CDCl_3 isolado de *O. secundiramea* (Coll & Wright, 1987) e os resultados verificados para a subfração OC III (presente estudo), juntamente com a estrutura proposta para molécula com base na bibliografia .

| Carbono | Dibromo - cloro, metileno - metil, octodeno Coll & Wright (1987) | | OC III | |
|---------|--|--------------|-----------------|--------------|
| | ^{13}C | ^1H | ^{13}C | ^1H |
| 1 | 30.0 | 6,48 | 28.8 | 6,92 |
| 2 | 62.8 | 5,17 | 62.4 | 5,3 |
| 3 | 141.2 | 4,61 | 141.1 | 4,76 |
| 4 | 32.9 | 3,68 | 32.0 | 3,72 |
| 5 | 26.4 | 3,62 | 26.2 | 3,69 |
| 6 | 127.4 | 2,29 | 127.4 | 2,49 |
| 7 | 134.8 | 1,71 | 134.8 | 1,75 |
| 8 | 25.7 | 1,66 | 23.9 | 1,61 |
| 9 | 110.7 | | 109.8 | |
| 10 | 17.8 | | 17,6 | |



No espectro de RMN ^{13}C da sub-fração OC III, foram observados ainda picos com deslocamentos em 137,8, 54,4, 40,3 27,9 ppm, e 138,5, 132,8, 60,1 e 34,2 ppm, valores próximos aos descritos para os monoterpenos $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{OBr}_2$ (Burreson et al., 1975) e $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Br}_2$ (Barahona & Rorrer, 2003), substâncias obtidas em menor quantidade e observadas na análise por CG-EM, nesta sub-fração.

As sub-frações OC II2 e OC II3 não foram obtidas em quantidade suficiente para a obtenção de seus espectros de RMN ^{13}C . A análise por RMN ^1H de OC II3 mostrou, para cada substância componente da amostra (caracterizadas por CG-EM), a presença de picos com deslocamentos compatíveis com os dos espectros para elas obtidos, em outros estudos (Polzin et al., 2003; Coll & Wright, 1987; Paul et al., 1980).

A impossibilidade do isolamento dos monoterpenos halogenados dificultou o aprofundamento da análise e completa caracterização das moléculas por RMN ^1H , com base nos valores dos deslocamento e/ou das constantes de acoplamento. No entanto, ao se comparar os mapas de correlação COSY da OC II e OC III com os esperados para o

Ochodeno e para o 1-2 Dibromo-9 cloro, metileno-10 metil, ochodeno obtidos no “NMR Predict” (Castillo et al. 2011) (http://www.nmrdb.org/new_predictor/) foi possível observar grande similaridade, reforçando a indicação da presença desses compostos (Anexo F).

6.2.4. Efeitos da aplicação do extrato e fração no controle da antracnose do mamão *in vitro* e *in vivo*

6.2.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* para o fungo *C. gloeosporioides*

O valor do limite de detecção da atividade antifúngica, por bioautografia, foi de 1 µg, tanto para o extrato quanto para a FB_{CCD} de *O. secundiramea* porém o valor da CIM, verificado pelo método de difusão em ágar foi de 10 µg.mL⁻¹. Esse resultado é semelhante ao verificado por Rahalison et al. (1994) que comparou os valores de LD e CIM para extratos, substâncias puras e padrões comerciais pelos dois métodos. Segundo esses autores, essa diferença entre os valores deve-se ao contato direto entre o microorganismo e o princípio ativo, na bioautografia, enquanto que o meio sólido interfere na difusão das moléculas da substância ativa, minimizando este contato.

O valor da CIM de 10 µg.mL⁻¹ é considerado como forte atividade antifúngica (Murakami et al., 2013 e Aligiannis et al., 2001) e é similar ao obtido por Tavares e Souza (2005) que avaliaram, pelo mesmo protocolo, a inibição, no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, causada pela aplicação dos antifúngicos comerciais prochloraz, propiconazol e tebuconazol, utilizados para controle da antracnose do mamoeiro. Estes resultados enfatizam o elevado potencial das substâncias antifúngicas de *O. secundiramea*, para o controle de fungos causadores de antracnose.

6.2.4.2. Avaliação da aplicação *in vivo* do extrato da fração na forma de biofilme de amido em frutos de mamão

Mamões são constituídos por 90% de água e a perda de massa fresca é o principal determinante da duração do período de armazenamento e da qualidade do mamão; assim sendo, perdas elevadas de massa fresca são indesejáveis, já que a desidratação interfere nas propriedades físicas, fisiológicas, patológicas, estéticas, nutricionais e econômicas do fruto (Solon et al., 2005). A aplicação do biofilme contendo o extrato e da FB_{CCD} de *O. secundiramea* causou a redução de 6% na perda de massa fresca dos frutos, ao longo do experimento, em comparação com o controle. Resultado semelhante foi observado em mamões tratados com ozônio (Ali et al., 2014).

A principal via de perda de água é através da casca, por isso a aplicação de biofilmes, que reduzem o processo de transpiração, constitui uma proteção importante, no período pós-colheita (Oliveira Jr et al., 2013, Espitia et al., 2012). No presente estudo, o biofilme enriquecido com as substâncias da macroalga apresentou maior integridade, ao longo do experimento, fator que possivelmente proporcionou a redução da perda de massa fresca, quando comparado ao fruto tratado apenas com biofilme.

O aumento do teor de sólidos solúveis (°Brix) é algo esperado, no processo amadurecimento dos frutos, que ocorre no período de prateleira. Esse aumento que está associado à degradação dos polissacarídeos de reserva e da parede celular e também à perda de água é desejável por estar relacionado à doçura da fruta. Neste experimento, os frutos dos tratamentos apresentaram valor de °Brix significativamente inferior ao controle, porém apesar desta redução, enquadraram-se na faixa ideal dos valores estabelecidos para comercialização, acima de 14 °Brix, tanto nos controle como nos tratamentos (Fagundes & Yamanishi, 2001). O valor inferior de °Brix, nos frutos submetidos a tratamento com o extrato ou a fração da

macroalga, pode estar associado à redução na perda de massa fresca, que ocorreu nos tratamentos.

Os aumento do pH e a redução da acidez titulável foram similares aos descritos por Chitarra e Chitarra (2005), em função ao período de amadurecimento. Essas alterações estão associadas à degradação dos ácidos orgânicos, especialmente o cítrico, promovida pelo aumento das taxas de respiração, comuns em frutos climatéricos como o mamão (Espitia et al., 2012). No presente estudo, o controle e os tratamentos apresentaram valores de pH de 5 a 5,7, dentro da faixa ideal para consumo (Martins & Costa, 2003).

A firmeza da polpa e a resistência da casca são importantes parâmetros da qualidade sensorial do amadurecimento dos frutos, sendo rejeitados os frutos que apresentem alterações nos valores da firmeza (Rodolfo Jr. et al., 2007). Estudos recentes destacam a sensibilidade da casca dos frutos ao contato com determinadas substâncias, especialmente compostos voláteis. Essa sensibilidade pode ser decorrência de fitotoxicidade, como foi observado na aplicação de óleo essencial de aroeira (rico em terpenos) em biofilmes, no período de pós-colheita de mamão (Oliveira Jr et al., 2013, Garcia et al., 2008). Essa sensibilidade inviabiliza a aplicação de substâncias bioativas que apresentam excelente ação antimicrobiana, porém que eventualmente depreciem as características desejáveis dos frutos (Bosquez-Molina et al., 2010).

No presente estudo, os parâmetros avaliados, no grupo tratado, no sexto dia, apresentaram valores equivalentes aos do controle, no terceiro dia, indicando que o extrato e a fração de *O. secundiramea* retardam o processo de amadurecimento, aumentando a vida de prateleira dos frutos. Este atraso no processo de amadurecimento está, possivelmente, associado à redução de fatores indutores do amadurecimento, como enzimas e produção de etileno (Workneh et al. 2012).

Nesse aspecto, os monoterpênicos halogenados de *O. secundiramea*, que apresentaram elevado potencial inibitório contra o fungo da antracnose *in vitro*, promoveram diferenças significativas no processo e nos parâmetros de qualidade do mamão. No entanto, os valores dos parâmetros de qualidade apresentaram-se dentro das faixas consideradas ideais para a comercialização dos frutos (Martins & Costa, 2003), provocaram atraso no processo de maturação e não causaram sinais de fitotoxicidade ou de desenvolvimento de antracnose, nos mamões.

Esses resultados positivos obtidos mostram a importância e o potencial de investigações futuras sobre o efeito desses monoterpênicos halogenados, na fisiologia do fruto (Tripathi & Dubey, 2004) e também a possibilidade de sua aplicação conjunta com tratamentos que já vêm sendo testados com sucesso, para aumentar o tempo de pós-colheita do mamão, tais como, atmosfera rica em ozônio (Ali et al., 2014), aplicação de substâncias e de técnicas de estocagem, sob baixas temperaturas o que reduz a atividade enzimática (Jacomino et al., 2002).

Também abrem espaço para a emprego de biofilmes que têm por base ágar e carragenas (Shit & Shah et al., 2014), que podem também conter substâncias antioxidantes como as ficobiliproteínas e alginatos (Cian et al. 2014), podem ser extraídos de diferentes macroalgas, e que aliarão os efeitos benéficos dos biofilmes de amido tradicionais à presença de antioxidantes, proporcionando a obtenção de melhores resultados quanto à maturação e qualidades sensoriais do mamão, sem o desenvolvimento de fitopatógenos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os objetivos propostos para a realização desta pesquisa desenvolvida com as linhagens de *H. musciformis* e *O. secundiramea* e realizando a análise dos resultados obtidos nos experimentos foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

O processamento da biomassa é um fator importante a ser observado, na prospecção de extratos bioativos, pois influencia diferentemente cada espécie estudada, em função das classes de metabólitos que serão extraídos. Em *H. musciformis*, espécie que apresentou esteróis-glicosilados e ácidos graxos como principais metabólitos, o processamento da biomassa não promoveu alterações no perfil químico e na atividade antifúngica. Em *O. secundiramea*, que produz monoterpenos halogenados, são detectados terpenos cíclicos e oxigenados, nos extratos obtidos de biomassa liofilizada e seca.

A linhagem MA de *H. musciformis* apresenta maior taxa de crescimento do que a linhagem VC no cultivo. No entanto, a linhagem VC apresenta maior diversidade de compostos nas análises em CG/EM e mais Rf's com atividade antifúngica, indicando diferentes estratégias com relação ao metabolismo de carbono. Esses resultados reforçam estudos que descrevem diferenças no metabolismo do nitrogênio e na fotossíntese entre essas linhagens.

A linhagem VC apresenta maior diversidade de esteróis e de glicosídeos que a linhagem MA, o que pode explicar a diferença entre o potencial antifúngico das duas linhagens; nos espectros de massas das frações bioativas. São observadas fragmentações que indicam a presença dos esteróis-glicosilados, com galacto e glucopiranosídeos. Será necessária a obtenção de maior quantidade destes compostos, para isolamento e determinação estrutural.

A adição de CO₂ nos cultivos das linhagens de *H. musciformis* não promove alterações nas concentrações de pigmentos, proteínas e açúcares totais, no entanto é observado o aumento da diversidade de metabolitos detectados na fração bioativa. Estes fatores estão associados à hipótese de balanço entre carbono - nutrientes. O aparecimento de manchas antifúngicas para o extrato da linhagem marrom cultivada com CO₂ evidencia a existência de diferenças no metabolismo de carbono nas duas linhagens. Este resultado indica a possibilidade da aplicação do CO₂ em cultivos de macroalgas como ferramenta para obtenção de compostos bioativos.

As análises de CG-EM e RMN, aliados a testes de atividade, evidenciam que os monoterpenos halogenados, previamente descritos para *O. secundiramea*, são os responsáveis pela intensa atividade antifúngica apresentado pelo extrato da macroalga. Os estudos químicos permitiram identificar os seguintes metabolitos: o monoterpeno de cadeia aberta C₁₀H₁₅Br₂Cl (1,2-dibromo-3-cloro,metileno-7-metil-oct-6-ene) produzido em maior quantidade e os monoterpenos C₁₀H₁₄Br₂Cl₂ (ochtodene), C₁₀H₁₂OBr₂ (chondrocole C), C₁₀H₁₄Br₂ e C₁₀H₁₄BrCl (3-10-dibromo-mirceno e 10-bromo-3-cloro-mirceno).

O enriquecimento por 250 mg.L⁻¹ de KBr dissolvido no meio de cultura induz ao aumento da concentração e atividade específica da enzima bromoperoxidase, que atua combatendo o metabolismo oxidativo. Este fator proporcionou maiores taxas de remoção e incorporação de bromo por *O. secundiramea* e efeito protetor contra a degradação oxidativa dos pigmentos e proteínas, explicando os valores elevados destes componentes celulares em relação a alga cultivada no controle 50 mg.L⁻¹.

A ausência de alterações na taxa de crescimento e na concentração de açúcares totais verificadas entre o controle e o tratamento é indicativa de possível limitação de carbono no cultivo de *O. secundiramea*, fator que explica o porque mesmo como aumento da atividade

enzimática e assimilação bromo pela alga não foram observadas alterações no perfil dos monoterpenos halogenados.

Os resultados similares do limite de detecção da atividade antifúngica para extrato bruto, fração bioativa e sub-frações purificadas, propiciam utilização do extrato ou fração bioativa para aplicação no controle do crescimento de fungos fitopatogênicos, obtendo desta forma maiores rendimentos e menores gastos com processo de purificação das moléculas.

Os tratamentos de aplicação do biofilme a base de amido associado ao extrato ou FB_{CCD} de *O. secundiramea* não causaram indesejáveis sintomas de fitotoxicidade no mamão ao longo do experimento que simulou o período de prateleiras não sendo verificado o desenvolvimento das lesões típicas da antracnose nos frutos tratados. Este resultado evidencia o potencial da aplicação dos monoterpenos halogenados com produto natural agregado ao período pós-colheita de frutas.

Por fim a análise integrada de todos os resultados obtidos no presente estudo permite as seguintes conclusões:

a - Evidências dos monoterpenos halogenados como compostos responsáveis pela atividade antifúngica do extrato de *O. secundiramea*;

b - Indicação dos esteróis - glicosilados na fração bioativa das linhagens de *H. musciformis*;

c - Os compostos de *O. secundiramea* apresentaram potencial antifúngico mais potente do que os das linhagens de *H. musciformis*;

c - As diferenças observadas no perfil químico, em CG/EM e CLAE/EM, entre as linhagens MA e VC de *H. musciformis* indicam que apesar de terem sido obtidas de uma mesma planta mãe (logo apresentando o mesmo material genético) existem diferenças quanto ao metabolismo. Os resultados sugerem que a linhagem MA é mais indicada para produção de biomassa enquanto a VC apresenta maior diversidade química;

d - As linhagens de *H. musciformis* apresentaram diferenças em relação ao enriquecimento por CO₂ e a aplicação deste tratamento proporcionou a alteração no perfil de compostos secundários, corroborando a hipótese de balanço entre carbono e nutrientes;

e - O enriquecimento por KBr estimulou a atividade da enzima bromoperoxidase, fato confirmado também pelas altas taxas de remoção e de bromo incorporado por *O. secundiramea* no tratamento. No entanto, não afetou o perfil dos monoterpenos halogenados e nem a atividade antifúngica dos extratos, fator explicado pela hipótese do balanço carbono - nutrientes, visto que não foi ofertado fontes de carbono nesse experimento levando a possível limitação deste elemento para síntese dos monoterpenos;

f - O aumento da atividade da enzima bromoperoxidase, no tratamento com enriquecimento por KBr, promoveu maior eficiência no seqüestro de espécies reativas de oxigênio e por consequência a maior proteção dos componentes celulares, explicando as elevadas concentrações de pigmentos e proteínas verificadas para *O. secundiramea* neste tratamento;

g - O extrato e a FB_{CCD} de *O. secundiramea*, aplicados juntamente com biofilme de amido, foram eficazes na inibição da antracnose pós-colheita do mamão, sem causar sinais indesejados de fitotoxicidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, G.F. Talamini, V., Stadnik, M.J.** 2008. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 34, p. 22-26.
- Ahmad, V.U., Aliya, R., Perveen, A., Shameel, M.** 1992. A sterol glycoside from marine green alga *Codium yengarii*. *Phytochemistry*, 31(4):1429-143.
- Ali, A., Ong, M.K. Forney, C.F.** 2014. Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage *Food Chemistry* 142:19-26.
- Ali, M, S., Saleem, M., Yamdagni, R., Ali, M.A.** 2003. Steroid and antibacterial steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen. *Natural Product Letters*. 16(6):407-13.
- Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B.,** 2001 .Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49:4168–4170.
- Anderson, S. Kautsky, L., Kautsky, N.** 1992. Effects of salinity and bromine on zygotes and embryos of *Fucus vesiculosus* from the Baltic Sea *Marine Biology*, 114:661-665
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists.** 1992. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12. ed. Washington, 1115p.
- Assis, O.B.G., Britto, D. ; Forato, L.A.** 2009. O Uso de Biopolímeros como Revestimentos Comestíveis Protetores Para Conservação de Frutas in natura e Minimamente Processadas (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária.
- Arunkumar, K.S.R., Sivakumar, S.R., Rengasamy, R.** 2010. A review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): a special emphasis on bioactive of seaweeds against plant pathogens. *Asian journal of plant sciences*, 9 (5) 227-240.

- Azevedo, L.A.S.** 1998. Manual de quantificação de doenças de plantas. São Paulo: Novartis Agro, 114p.
- Balamurugan, M., Selvam, G.G., Thinakaran, T., Sivakumar, K.** 2013. Biochemical Study and GC-MS Analysis of *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux. American-Eurasian Journal of Scientific Research 8 (3):117-123.
- Barahona, L.F.; Rorrer, G.L.** 2003. Isolation of halogenated monoterpenes from bioreactor-cultured microplantlets of the macrophytic red algae *Ochtodes secundiramea* and *Portieria hornemannii*. Journal of Natural Products, 66:743–751.
- Baweja, P., Sahoo, D., García-Jiménez, P., Robaina, P.R.** 2009. Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects. Phycological Research; 57:45–58.
- Bhadury, P., Wright P.C.** 2004. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. Planta, 219(4): 561-578.
- Basha, A., Ahmad, V.U., 2007.** Spectroscopic Data of Steroid Glycosides. Springer, Karachi, Pakistan.
- Bixler H.J., Porse H.** 2010. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. Journal of Applied Phycology. doi:10.1007/s10811-010-9529-3, 2010.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Bravin, I.C., Yoneshigue-Valentin, Y.** 2002. Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta). Revista Brasileira de Botânica, 25, 4: 469-474.
- Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Bañnos, S., Verde-Calvo, J.R., Morales-López, J.,** 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum*

gloeosporioides and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology Technology* 57, 132–137.

Burreson, B.J.; Woolard, F.X.; Moore, R.E. 1975. Chondrocole a and b, two halogenated dimethylhexahydrobenzofurans from the red alga *Chondrococcus hornemannii* (Mertens) Schmitz. *Tetrahedron Letters*, 16: 2155–2158.

Butler A, Walker JV. 1993. Marine haloperoxidases. *Chemical Reviews* 93: 1937–1944.

Butler, A., Carter-Franklin, J. 2004. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Products Report* 21:180–188.

Castillo, A.M., Patiny, L., Wist, J. 2011. Fast and Accurate Algorithm for the Simulation of NMR spectra of Large Spin Systems. *Journal of Magnetic Resonance*. 209 (2): 123–130.

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. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*, 146:60-78.

Carter-Franklin, J.N., Butler, A. 2004. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *Journal of American Chemical Society*. 24,126(46):15060-6.

Carvalho, L.R., Roque, N.F. 2004. Correlations between primary and secondary metabolites in Ceramiales (Rhodophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:1-10.

Carvalho, L.R., Roque, N.F. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*, 23(6): 757-764.

Castellani, A.1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: p. 225-226.

Challis G.L.; Naismith J.H. 2004. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* 14:748-756.

- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B.** 2005 Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio. Lavras: UFLA Editorial, 785 p.
- Chludil, H.D., Seldes, A.M., Maier, M.S.** 2002. Antifungal Steroidal Glycosides from the Patagonian Starfish *Anasterias minuta*: Structure–Activity Correlations. Journal of Natural Products. 65(2):153–157
- Cian, R.E., Salgado, P.R., Drago, S.R., González, R.J., Mauri, A.N.** 2014. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. Food Chemistry. 146:6–14.
- Coll, J.C.; Wright, A.D.** 1987. Tropical marine algae.1. New halogenated monoterpenes from *Chondrococcus hornemannii* (Rhodophyta, Gigartinales, Rhizophyllidaceae). Australian. Journal of Chemistry. 40:1893–1900.
- Cordeiro, R.A., Gomes, V.M., Carvalho, A.F.U., Melo, V.M.M.** 2006. Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. Brazilian Archives of Biology and Technology,49:915-921.
- Craigie, J.S.** 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture Journal of Applied Phycology, 23:371–393.
- Crews, P., Naylor, S.N., Hanke, FJ., Hogue, E.R., Kho, E., Braslau R.** 1984. Halogen regiochemistry and substituent stereochemistry determination in marine monoterpenes by carbon-13 NMR. Journal of Organic Chemistry, 49(8):1371-1377.
- Cronin, G.** 2001 .Resource allocation in seaweed and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. In: McClintock J. M. & B. J. Baker (Eds.), Marine chemical ecology. CRC Press, pp.325-353.
- Cronin, G., Hay, M.E.** 1996. Effects of Light and Nutrient Availability on the Growth, Secondary Chemistry, and Resistance to Herbivory of Two Brown Seaweeds Oikos 77(1):93-106.

- Davyt D, Entz W, Fernandez R, Mariezcurrena R, Mombru AW, Saldana, J.** 1998. A new indole derivative from the red alga *Chondria atropurpurea*. Isolation, structure determination, and anthelmintic activity. *Journal of Natural Products*, 61:1560–1563.
- Dembitsky, V.M., Srebnik, M.** 2002. Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progress in Lipid Research*, 41(4): 315–367.
- Dijkstra, A.J.R., Hamilton, J., Hamm, W.** 2008. *Fatty Acid Biosynthesis. Trans Fatty Acids*. Oxford: Blackwell Pub. 12 ed.
- Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S. , Cabezudo M.D.** 2002. Effect of Drying Method on the Volatiles in Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:4520-4524
- Dring, M.J.** 2006. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism, *Advances in Botanical Research*, n. 43, p. 175–207.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Edwards, P.** 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contribution of Marine Sciences Austin*, 15:1-228.
- Espitia, P.J., Perez, S.N.F.F., Botti, L.C.M., Melo, N.R., Pereira, O.L., Silva, W.A.** 2012. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(4):333-342.
- Fajer, E.D., Bowers, M.D., Bazzaz, F.A.** 1992. The Effect of Nutrients and Enriched CO₂ Environments on Production of Carbon-Based Allelochemicals in *Plantago*: A Test of the Carbon/Nutrient Balance Hypothesis. *The American Naturalist* 140(4):707-723

- Fagundes, G.R., Yamanishi, O.K.** 2001. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo “Solo” comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília –DF. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(3):541-545.
- FAO**, Agricultural data, agricultural production – 2010. [Online]. Available: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> .
- Felício, R., Deboni, H.M., Yokoya, N.S.** 2008. triph4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, ceramiales) *Química Nova* 31(4): 8-13
- Fenical, W.** 1975. Halogenation in the Rhodophyta: a review. *Journal of Phycology* 11:245–259
- Fernandes, D.R.P., Yokoya, N.S., Yoneshigue-Valentin, Y.** 2011. Protocol for seaweed decontamination to isolate unialgal cultures.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21: 313-316.
- Ferreira, L.B., Barufi, J.B., Plastino, E.M.** 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 187-192.
- Fries, L.** 1966. Influence of iodine and bromine on growth of some red algae in axenic culture. *Physiologia Plant.* 19:800-808.
- Fu, T.J.** 1999. *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. 304 p. Kluwer Academics / Plenum Publishers, New York.
- Fuller, R.W., Cardellina, J.H., Kato, Y., Brinen, L.S., Clardy, J., Snader, K.M.** 1992 A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Med Chem* 35:3007–3011.
- Gama, B.A.P., Plouguerne, E., Pereira, R.C.** . 2014. The antifouling defence mechanisms of marine macroalgae. *Advances in Botanical Research*. 71:413-440.

- Gao, K., Mckinley, K.R.,** 1994. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remédiation – a review. *Journal of Applied Phycology* 6: 45–60.
- Garcia R., Santos R.B., Alves E.S.S., Santos M.P., Aquije G.M.F.V., Fernandes A.A.R., Ventura J.A., Fernandes P.M.B.** 2008. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:163-168.
- Gerwick, W.H.** 1984. 2-chloro-1,6 (S*),8-tribromo-3-(8) (Z)-ochtodene: A metabolite of the tropical red seaweed *Ochtodes secundiramea*. *Phytochemistry* 23:1323–1324.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E.** 2011. Effect of CO₂ Enrichment on Synthesis of Some Primary and Secondary Metabolites in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences* 12:1101-1114.
- Gordillo, F.J.L., Niell, F.X. and 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.
- Gressler, V.** 2010. Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira. 283 p. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas), Universidade de São Paulo – USP, São Paulo.
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P. Filho, J.M., Torres, R.P., Pinto, E.** 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acids and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, v. 120, p. 585-590.
- Grillea, S., Zaslowski, A., Thielea, S., Plat, J., Warnecke, D.** 2010. The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals *Progress in Lipid Research* 49:262–288.

- Hanisak, M.D.** 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. *Hydrobiologia*. 204-205(1):79-87.
- Hara, I., Sakurai, T.** 1998. Isolation and characterization of vanadium bromoperoxidase from a marine macroalgae, *Ecklonia stolonifera* *Journal of Inorganic Biochemistry* n.1, v. 72, p. 23-28.
- Harper, M. K., Bugni, T. S., Copp, B. R., James, R. D., Lindsay, B. S., Richardson, A. D., Schnabel, P. C., Tasdemir, D., VanWagoner, R. M., Verbitseki, S. M., Ireland, C. M.** 2001. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: McClintock, J. B. & Baker, B. J. (eds.). *Marine chemical ecology*. CRC Press. pp. 3-69.
- Hay, M. E.** 2009. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*.1:193-212.
- Hay, M.E.; Fenical, W.** 1988. Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 19: 111–145.
- Hurd, C.L.** 2000. Water motion, marine macroalgal physiology, and production. *Journal of Phycology*. 36(3):453–472.
- Jacomino, A.P., Kluge, R.A., Brackmann, A., Castro, P.R.C.** 2002. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. *Scientia Agricola*, 59(2): 303-308.
- 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 (BPP)*. 167: 191-194.
- Joly, A.B., Ugadim, Y.** 1966. The reproduction of *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Gigartinales, Rhizophyllidaceae). *Boletim do Instituto Oceanográfico* 15: 55-64.
- Knaggs A.R.** 2003. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Products Reports*. 20(1):119-36.

- Kimati, A.R., Bergamim F.C. Camargo, L.F.A.** 2005. Manual de Fitopatologia - Volume 2. Agronômica Ceres, 663 p.
- Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.R.; Hodges, M.A.; Critchley, A.T.; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithviraj, B.** 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28:386–399.
- Kornprobst, J.M.; Al-Easa, H.S.** 2003. Brominated Diterpenes of Marine Origin, *Current Organic Chemistry*. 7:1181-1229.
- Kovganko, N.V., Kashkan, N.V.** 1999. Sterol glycosides and acylglycosides. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(5):479-497.
- 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 Physiology* 73: 353-360.
- Lanças, F.M.** 2013. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massa. *Scientia Chromatografica* 5(1): 27-46.
- Lerdau, M., Coley, P.D.** 2008. Benefits of the Carbon-Nutrient Balance Hypothesis. *Oikos*. 98(3):534 - 536.
- Levy, I., Beer, S., Friedlander, M.** 1990 Growth, photosynthesis and agar in wild-type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (Gracilariales, Rhodophyta), as a strain selection experiment. *Hydrobiologia*. 204-205(1):381-387.
- Lima Filho, R.M., Oliveira, S.M.A., Menezes, M.** 2003. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira*, 28(6): 620-625.

- Lima-Filho, J.M., Carvalho, A.F.F.U., Freitas, S.M., Melo, V.M.M.** 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian coast; Brazilian Journal of Microbiology.33:311-313.
- Lin X, Ma L, Racette SB, Anderson Spearie CL, Ostlund Jr RE.** 2009 Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296:931–935
- Loffaguen, J.C., Hartmann, O.E.L., Talamini, V., Stadnik, M.J.** 2004. Extratos naturais no controle da antracnose e na produtividade do feijoeiro. Fitopatologia Brasileira. 29:107.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J.** 2004 Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press. 358 p.
- Lhullier, C., Horta P., Falkenberg, M.** 2006. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*. Revista Brasileira de Farmacognosia.16:158–163.
- Machado, L.P., Matsumoto, S. T., Cuzzuol, G.R.F., Oliveira Jr, L.F.G.** 2014. Influence of laboratory cultivation on species of Rhodophyta physiological evaluations and antifungal activity against phytopathogens. Revista Ciência Agronômica, 45:52-61.
- Machado, L.P., Matsumoto, S.T., Jamal, C.M., Silva, M.B., Centeno, D.C., Colepicolo, P., Carvalho, L.R., Yokoya, N.S.** 2013. Chemical analysis and toxicity of seaweed extract with inhibitory activity against tropical fruits anthracnose fungi. Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI: 10.1002/jsfa.6483.
- Machado, L.P., Bispo, W.M.S., Matsumoto, S.T., Santos, R.B., Reis, F.O., Oliveira Jr, L.F.G.** 2011. Triagem de macroalgas com potencial antifúngico no controle in vitro da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Revista Brasileira de Agrociencia. 17:463-467.

- Machado, L.P.** 2010. Avaliações fisiológicas e antifúngicas de três espécies de macroalgas cultivadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), 41 p., UFES – Vitória.
- Machado, L.P.** 2008. Avaliação do Potencial Antifúngico de Extratos de Macroalgas no Controle da Antracnose do Mamoeiro. Monografia (graduação em Ciências Biológicas), 43 p., UFES – Vitória.
- Maliakal, S., Cheney, C., Rorrer, G.** 2001. Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet cultures of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Journal of Phycology*, 37: 1010-1019.
- Mann, J.** 1994. *Chemical Aspects of Biosynthesis*. 92 pp., Oxford Science Publications.
- Maschek, J. A., Baker, B. J.** 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. In Amsler, C. D. (ed.). *Algal chemical ecology*. Springer - Verlag. Berlin. pp. 1-23.
- Martins, A.P.** 2013. Potencial biotecnológico de macroalgas marinhas. Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade de São Paulo - USP, 199 p.
- Martins A.P., Necchi Jr., 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.
- Martins, A.P.; Yokoya, N.S.** 2010. Intraspecific variation in the colour morphs of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) in relation to nitrogen availability. *Hoehnea*. 37:599-613.
- Martins, A. P.** 2007. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). 131p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica, São Paulo.
- 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.
- Martins, D.S.; Costa, A.F.S.** 2003. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória: Incaper, 497p.
- Mata, L., Gaspar, H., Santos, R.** 2012. Carbon/nutrient balance in relation to biomass production and halogenated compound content in the red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Phycology* 48(1): 248–253.
- Mata, L., Gaspar, H., Justino, F. Santos, R.** 2011. Effects of hydrogen peroxide on the content of major volatile halogenated compounds in the red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Applied Phycology*. 23(5): 827-832.
- Matlock, D.B., Ginsburg, D.W., Paul, V.J.** 1999. Spatial variability in secondary metabolite production by the tropical red alga *Portieria hornemannii* *Hydrobiologia*, 398/399: 267–273.
- Mayer, A.M.S., Hamann, M.T.** 2004. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*. 6, 37–52.
- Mayer, A.M.S., Lehmann, V.K.B.** 2001. Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Research*. 21, 2489–2500.
- McConnell O.J., Fenical W.** 1978. Ochtodene and ohtodiol: Novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. *Journal of Organic Chemistry*. 43:4238–4241.
- McHugh, D.J.** 2003. A guide to the seaweed industry - FAO Fisheries Technical Paper 441; disponível em : <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>

- Melo, V.M.M., Medeiros, D. A., Rios, F. J. B., Castelar, L. I. M., Carvalho, A.F.F.U.** 1997. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (wulfen) lamouroux. *Botanica Marina*, v. 40, p. 281-284.
- Melo, F.R. Medeiros, D.A., Rios, F.J.B., Castelar, L.I.M., Carvalho, A.F.F.U.** 2004. Purificação e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. *Revista brasileira de Botanica* 27(2):263-269.
- Mendes, G.S., Yokoya, N.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Bravin, I.C., Romanos, M.T.V.** 2012 Anti-HSV activity of *Hypnea musciformis* cultured with different phytohormones. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22:789–794.
- 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*. *Journal of Applied Phycology* 11(5): 455-461.
- Miller, M.B., Haubrich, B.A, Wang, Q., Snell, W.J., Nes, W.D.** 2012. Evolutionarily conserved $\Delta^{25(27)}$ -olefin ergosterol biosynthesis pathway in the alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Miranda, G.E.C., Yokoya, N.S., Fujii, M.T.** 2012. Effects of temperature, salinity and irradiance on carposporeling development of *Hidropuntia caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 818-824.
- Murakami, C., Lago, J.H.G., Perazzo, F.F., Ferreira, K.S., Lima, M.E.L., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Chromolaena laevigata* during Flowering and Fruiting Stages. *Chemistry & Biodiversity* 10: 621-627.
- Misurcová, L.** 2011. Chemical composition of seaweeds. *In* Se-Khon, K. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley, 1 ed-592 pag.
- Mtolera, M.S.P., Collen, J., Pedersén, M., Ekdahl, A., Abrahamsson, K., Semesi, A.** 1996. Stress-induced production of volatile halogenated organic compounds in *Euclima*

- denticulatum (Rhodophyta) caused by elevated pH and high light intensities. *European Journal of Phycology*. n. 31, p. 89–95.
- Nakamura, H., Kobayashi, J., Hirata, Y.** 1982. Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 250, 113–118.
- Nasir, M., Saeidnia, S., Mashinchian-Moradi, S., Gohari, A.R.** 2011. Sterols from the red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacognosy Magazine*, 7(26): 97–100.
- Norrie, J., Hiltz, D.A.** (1999) Seaweed extract research and applications in agriculture. *Agro Food Industry Hi-Tech* 10:15–18.
- Nys, R., Leya, T., Maximilien, R., Afsar, A., Nair, P. S. R., Steinberg, P. D.** 1996. The need of standardised broad scale bioassay testing: a case study using the red algae *Laurencia rigida*. *Biofouling*, 10(1-3): 213-224.
- Oliveira Jr, L.F.G, Santos, R.B., Reis, F.O., Matsumoto, S.T, Bispo, W.M.S., Machado, L.P., Oliveira, L.F.M.** 2013. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15: 150-157.
- Oliveira, A.L.L.** 2009. Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae). 101 pp. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, USP.
- Orduña-Rojas, J., Robledo, D.** 1999. Effect of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 42: 315-319.
- Paul, V.J.; Puglisi, M.P.** 2004. Chemical médiation of interactions among marine organisms. *Natural Products Report*, 21: 189-209.
- Paul V.J.; Hay M.E.; Duffy J.E.; Fenical W.; Gustafson K.** 1987. Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): Effects of its

- monoterpenoid components upon diverse coral-reef herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 114:249–260.
- Paul, V.J., McConnell, O.J., Fenical, W.** 1980. Cyclic monoterpenoid feeding deterrents from the red marine alga *Ochtodes crockeri*. *Journal Organic Chemistry* 45:3401–7.
- Paulert, R., Talamini, V., Cassolato, J.E.F., Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D., Smania, Júnior A., Stadnik, M.J.** 2009 Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection* 116:263-270.
- Paradas, W.C., Salgado, L.T., Sudatti, D.B., Crapez, M.A.C., Fujii, M.T., Coutinho, R. ; Pereira, R.C., Amado Filho, G.M.** 2010. Induction of halogenated vesicle transport in cells of the red seaweed *Laurencia obtusa*. *Biofouling* (New York), v. 26, p. 277-286.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R.** 2010. Espéctometria de massas. pp. 399- 499 Cap. 8; In: Introdução à espectroscopia. Tradução da 4a edição americana; tradução de Pedro Barros. Revisão técnica de Paulo Sérgio Santos. 4a edição, CENGAGE Learning 700 p.
- Payo, D.A., Colo, J. Calumpong, H., Clerck, O.** 2011. Variability of Non-Polar Secondary Metabolites in the Red Alga *Portieria*. *Marine Drugs*. 9(11): 2438–2468.
- Penuelas, J.; Estiarte, M.** 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trees*, 13: 20–24.
- Perfeto, P.N.M.** 2004. Efeitos de variáveis abióticas na composição química de *Gelidium crinale* (Gelidiaceae, Rhodophyta) em cultivo unialgal. 123 p. Tese (Doutorado em botânica) UFRS – Rio Grande do Sul.
- Pianka, E. R.** 1999. *Evolutionary ecology*. Benjamin Cummings, 431p.
- Plastino, E.M.** 2004. Diversidade intraespecífica em algas gracilarióides. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo. 48p

- Polzin, J.J., Rorrer, G.L., Cheney, D.P.** 2003. Metabolic Flux Analysis of Halogenated Monoterpene Biosynthesis in Microplantlets of the Macrophytic Red Alga *Ochtodes secundiramea*. *Biomolecular Engineering*, 20, 205-215.
- Prieur, H., Schmid, D., Schürch, C., Züllli, F., Nissen, H.P.** 2003. Mycosporine-like amino acids: Natural UV-screening compounds from red algae to protect the skin against photoaging. *SÖFW-Journal*. 7:129-135.
- Provasoli, L.** 1968. Média and prospects for cultivation of marine algae. *In Cultures and Collections of Algae* (A. Watanabe & A. Hattori, eds.). Japanese Society of Plant Physiology, Tokyo, 47-74.
- Puglisi, M.D., Paul, V.J.** 1997. Intraspecific variation in the red alga *Portieria hornemannii*: monoterpene concentrations are not influenced by nitrogen or phosphorus enrichment. *Marine Biology*, 128(1): 161-170.
- Raffaelli, D.G., Hawkins, S.J.** 1996. *Intertidal Ecology* Springer, 356 p.
- Ragan, M.A.** 1981. Chemical constituents of seaweed. Pag 584, *In Lobban, C.S., Wynne, M.J..The Biology of Seaweed*. Los Angeles: University of California Press, 786p.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Frenk, E., Hostettmann, K.** 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic fungi and human pathogenic fungi. *Planta Medica*, 60: 41-4
- Ramlov, F., Souza, J.M.C., Faria, A.V.F., Maraschin, M., Horta, P.A., Yokoya, N. S.** 2011. Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21:255-261.
- Reis, R.P., Yoneshigue-Valentin, Y.** 1998. Variação espaço-temporal de populações de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) na Baía de Sepetiba e Armação de Búzios, R.J., Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 12:465-483.

- Rodolfo Jr, F., Torres, L.B.V., Campos, V.B., Lima, A.R., Oliveira, A.D., Mota, J.K.M.** 2007. Caracterização físico-química de frutos de mamoeiro comercializados na EMPASA de Campina Grande-PB. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 9:53-58
- Rorrer, G.L., Cheney, D.P.** 2004. Bioprocess Engineering of Cell and Tissue Cultures for Marine Seaweeds. *Aquacultural Engineering*, 32, 11–41.
- Rorrer, G., Tucker, M., Cheney, D., Maliakal, S.** 2001. Bromoperoxidase activity in microplantlet suspension cultures of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *Biotechnology and Bioengineering*. n. 74, p. 389-395.
- Rorrer, G.L., Mullikin, R.K., Huang, B., Gerwick, W.H., Maliakal, S., Cheney, D.P.** (1999). Production of Bioactive Metabolites by Cell and Tissue Cultures of Marine Macroalgae in Bioreactor Systems. In: *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*, T.-J. Fu, G. Singh, and W.R. Curtis, Eds., Kluwer Academic / Plenum Publishing, New York, pp. 165-184.
- Saenger, P.** 1972. A rapid spectrophotometric method for the determination of bromine in seawater and in the ash of marine algae. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* 23:32-37.
- Santos, A.E.O., Assis, J.S., Berbert, P.A., Santos, O.O., Batista, P.F., Gravina, G.A.** 2011. Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins'. *Agrária*, 6:508-513.
- Schröder NW, Schombel U, Heine H, Gobel UB, Zähringer U, Schumann RR.** Acylated cholesteryl galactoside as a novel immunogenic motif in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Biol Chem* 2003;278:33645–53.
- Selitrennikoff, C.P.** 2001. Antifungal proteins. *Applied Environment Microbiology*. 67:2883-2894.

- Selvin J. Lipton, A.P.**, 2004. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. *Journal of Marine Science and Technology*, 12(1):1-6.
- Shit, S.C., Shah, P.M.** 2014. Edible Polymers: Challenges and Opportunities. *Journal of Polymers*, ID 427259: 1-13, 10.1155/2014/427259.
- Silva, P.M.** 2009. Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras. 91 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo.
- Singh, I.P., Bharate, S.B.** 2005. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*. 23: 558-59.
- Smit, A.J.** 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*.16:245-262.
- Soedjak, H.S., Everett, R.R., Butler, A.** 1991. The novel non-heme vanadium bromoperoxidase from marine algae: Phosphate inactivation. *Journal of Industrial Microbiology* 8:37-44.
- Solon, K.N., Menezes J.B., Medeiros, M.K.M. De, Aroucha, E.M.M., Mendes, M.** 2005. Conservação pós-colheita do mamão formosa produzido no Vale do Assu sob atmosfera modificada. *Revista Caatinga*, 18(2):105-11.
- Somei, M.; Yamada F.** 2004. Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 278 – 311.
- Stadnik, M.J., De Freitas, M.B.** 2014. Algal polysaccharides as source od plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology* 39:109-116.
- Stadnik M.J., Paulert R.** 2008. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. In: XI Congresso Brasileiro de Ficologia. Rio de Janeiro, RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro. pp. 267-279.
- Stirk, W.A., Novák, O., Strnad, M., Van Staden, J.** Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41:13–24, 2003.

- Suárez-Álvarez, S., Gómez-Pinchetti J.L., García-Reina, G.** 2012. Effects of increased CO₂ levels on growth, photosynthesis, ammonium uptake and cell composition in the macroalga *Hypnea spinella* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 24:815–823.
- Suzuki, M., Matsuo, Y., Takeda, S., Suzuki, T.** 1993. Intricatetraol, a halogenated triterpene alcohol from the red alga *Laurencia intricata*. *Phytochemistry*. 33(3):651–656.
- Taiz, L., Zeiger, E.** 2002. *Plant Physiology*. 672 p.3ed. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tavares, G.M., Souza, P.E.** 2005. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.) *Ciência e agrotecnologia*. 29(1):52-59.
- Teixeira, V. L.** 2013. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. *Revista Virtual Química*, 5 (3):343-362.
- Teixeira, V.L., Rocha, F.D., Pereira, R.C., Kaplan, M.A.C.** 2007. Produtos Naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17:631-639.
- Teixeira, V.L., Kelecom, A., Gotlieb, O.R.** 1991. Produtos naturais de algas marinhas. *Química nova*. 14(2): 41-47.
- Teixeira, V.L., Tomassini T., Fleury, B.G., Kelecom A.** 1986. Dolastane and Secodolastane Diterpenes from the Marine Brown Alga, *Dictyota cericornis*. *Journal of Natural Products*, 49 (4): 570–575.
- Tripathi, P., Dubey, N.K.** 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Review. *Postharvest Biology and Technology*. 32:235-45.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M.** 1995. *Algae - an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Venskutoins, P.R.** 1997. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thimus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) Food Chemistry 59:219-227.
- Verkleij, F.N.** 1992. Seaweed Extracts in Agriculture and Horticulture: a Review. Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems. 8:41-47.
- Weinberger, F., Beltran, J., Correa, J.A., Lion, U., Pohnert, G., Kumar, N., Steinberg, P., Kloareg, B., Potin, P.** 2007. Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. Journal of Phycology 43(2): 235–241.
- Wise, M.L., Rorrer, G.L., Polzin, J.J., Croteau, R.** 2002. Biosynthesis of Marine Natural Products: Isolation and Characterization of a Myrcene Synthase from Cultured Tissues of the Marine Red Alga *Ochtodes secundiramea*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 400:125-132.
- Workneh, T.S., Azene M., Tesfay, S.Z.** 2012. A review on the integrated agro-technology of papaya fruit. African Journal of Biotechnology, 11(85):15098-15110.
- Yokoya, N.S., Yoneshigue-Valentin, Y.** 2011. Micropropagation as a tool for sustainable utilization and conservation of populations of Rhodophyta. Revista Brasileira de Farmacognosia. 21: 334-339.
- Yokoya, N.S., Orlando N. 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). Journal of Applied Phycology, 19: 197-205.
- 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*. 202 p. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Yokoya, N.S., Oliveira, E.C.** 1993. Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). *Japanese Journal of Phycology* 41: 283-293.
- Xu, Z., Zou, D., Gao, K.** 2010. Effects of elevated CO₂ and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Botanica Marina* 53:123–129.
- Zou, D., Gao K.** 2009. Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. *Phycologia*: 48(6): 510-517.

RESUMO

A macroalga *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe (Rhodophyta, Gigartinales) e as linhagens pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) apresentam expressivo potencial biotecnológico, principalmente no que se refere à aplicação de seus extratos (ricos em monoterpenos halogenados e esteróis, ácidos graxos e gliceróis, respectivamente) na inibição do crescimento de fungos do gênero *Colletotrichum*. Esses fungos fitopatógenos causam antracnose em frutas e por isso, promovem perdas significativas ao agronegócio. Para isso, os objetivos do presente estudo foram: (1) realizar o fracionamento bioguiado e determinar as substâncias bioativas dos extratos das linhagens de cor de *H. musciformis* e *O. secundiramea*, que possuem potencial antifúngico para controle de fungos fitopatogênicos *in vitro* e *in vivo*, avaliando adicionalmente o efeito do uso de biomassa fresca, liofilizada e seca na bioatividade e composição dos extratos; (2) verificar a influência do enriquecimento por CO₂ para as linhagens de *H. musciformis* e de KBr para *O. secundiramea* em cultivos realizados em biorreatores, avaliando a fisiologia das macroalgas e a produção dos metabolitos de interesse e (3) Avaliar o efeito, no desenvolvimento da antracnose e no amadurecimento de frutos de mamão em resposta a aplicação de biofilme contendo os bioativos de macroalgas. A utilização da biomassa de alga fresca permitiu maior rendimento na obtenção de extratos das linhagens de *H. musciformis*, e a atividade antifúngica e o perfil em cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM) não foi alterado. Está análise revelou que o extrato da linhagem marrom (MA) de *H. musciformis* apresentou uma quantidade menor de substâncias e de manchas bioativas do que a linhagem verde clara (VC) na bioautografia qualitativa. O limite de detecção (LD) foi 100 µg para os extratos das duas linhagens, sendo considerada uma fraca atividade antifúngica. Para *O. secundiramea*, não houve diferença no rendimento de extração, no entanto, foi observado a formação de monoterpenos oxidados nos tratamentos com biomassa liofilizada e seca, associado com o aparecimento de manchas de atividade antifúngica em bioautografia por cromatografia em

camada delgada (CCD). Após o fracionamento bioguiado por CCD preparativa, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência/espectrometria de massas de alta resolução (CLAE/EM) revelou a presença de esteróis-glicosilados, compostos derivados de colesterol associados à galacto ou glicopiranosil e ácidos graxos. Análise por CG/EM do extrato e da fração bioativa de *O. secundiramea* indicou a presença de diversos monoterpênicos halogenados, e após cromatografia em coluna foram isoladas sub-frações e as avaliações em CG/EM e ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a presença dos monoterpênicos $C_{10}H_{13}Br_3Cl$ e $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ e indicaram a presença dos terpenos $C_{10}H_{12}OBr_2$, $C_{10}H_{14}Br_2$ e $C_{10}H_{14}BrCl$. Estas sub-frações apresentaram o mesmo limite de detecção (1 μg) que o extrato da FB_{CCD} . A aplicação dos biofilmes de amido contendo extrato ou FB_{CCD} na concentração de 10 $\mu g.mL^{-1}$, valor da concentração inibitória mínima contra o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* (determinada pelo método da difusão em ágar), inibiram o desenvolvimento da antracnose pós-colheita e não causaram sintomas de toxicidade no fruto, no experimento simulando o período de prateleira do mamão. O cultivo em biorreatores com enriquecimento por CO_2 não afetou o crescimento e as concentrações de pigmentos fotossintetizantes, proteínas e açúcares totais das linhagens de *H. musciformis*, no entanto, foi observada a síntese de diferentes esteróis-glicosilados relacionados como aparecimento de manchas antifúngicas no extrato da linhagem MA. O enriquecimento do meio com bromo, no cultivo de *O. secundiramea*, causou aumento de 50% na concentração e na atividade da enzima bromoperoxidase, o que promoveu aumento equivalente na remoção do bromo do meio e na sua incorporação ao talo da alga. Este tratamento causou também aumento nas concentrações de pigmentos e de proteínas associadas à proteção, promovida pela enzima, contra estresse oxidativo, e não foram observadas alterações no perfil dos monoterpênicos oxigenados em resposta ao tratamento. Os resultados permitiram de linear as seguintes conclusões: (1) os monoterpênicos halogenados de *O. secundiramea* apresentaram elevado potencial antifúngico para aplicação do controle da antracnose; (2) Indicação da presença de esteróis - glicosilados

na fração bioativa das linhagens de *H. musciformis*, sendo que a linhagem VC apresentou maior diversidade química e potencial antifúngico do que a linhagem MA; (3) a manipulação de parâmetros abióticos nos cultivos em biorreatores possibilitaram a obtenção de biomassa e dos metabolitos bioativos das espécies estudadas; e (4) O extrato e a FB_{CCD} de *O. secundiramea*, aplicados juntamente como biofilme de amido, foram eficazes na inibição da antracnose pós-colheita do mamão, sem causar sintomas de fitotoxicidade.

Palavras chaves: Monoterpenos halogenados, Esteróis glicosilados, *Ochtodes secundiramea*, linhagens de *Hypena musciformis*, Fungos fitopatógenos, Antracnose.

ABSTRACT

The red seaweeds *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe (Rhodophyta, Gigartinales) and colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) have significant biotechnological potential, especially for the application of their extracts to inhibit the growth of fungi of the genus *Colletotrichum*. These fungal phytopathogens cause anthracnose in fruits and therefore causing significant losses to the agribusiness. For that, the objectives of this study were: (1) perform bioguided fractionation and determine the bioactive substances of the extracts from strains of *H. musciformis* color and *O. secundiramea*, which have antifungal potential to control pathogenic fungi in vitro and in vivo additionally evaluating the effect of the use of fresh biomass, lyophilized and dried in composition and bioactivity of the extracts; (2) verify the influence of CO₂ enrichment for strains of *H. musciformis* and KBr for *O. secundiramea* in bioreactors cultures, assessing the physiology of macroalgae and the production of bioactive metabolites (3) assess the effect on development of anthracnose and fruit ripening papaya in response to application of biofilm with macroalgae bioactive compounds. The use of fresh biomass seaweed allowed greater efficiency in obtaining extracts of strains of *H. musciformis*, and antifungal activity profile and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) has not changed. Analysis revealed that the extract of brown strain (MA) of *H. musciformis* showed a lower amount of bioactive substances than stains light green strain (VC) in qualitative bioautography. The limit of activity detection (LD) for this two strains extracts were 100 µg, considered a low antifungal activity. *O. secundiramea*, there was no difference in extraction yield, however, the formation of oxidized monoterpenes in treatments with lyophilized and dry biomass, associated with the appearance of antifungal activity spots by bioautography on thin-layer chromatography (TLC) was observed. After fractionation by preparative TLC, were observed in analysis by high performance liquid chromatography/mass spectrometry, high resolution (HPLC / MS) the presence of glycosides-sterols, association between cholesterol

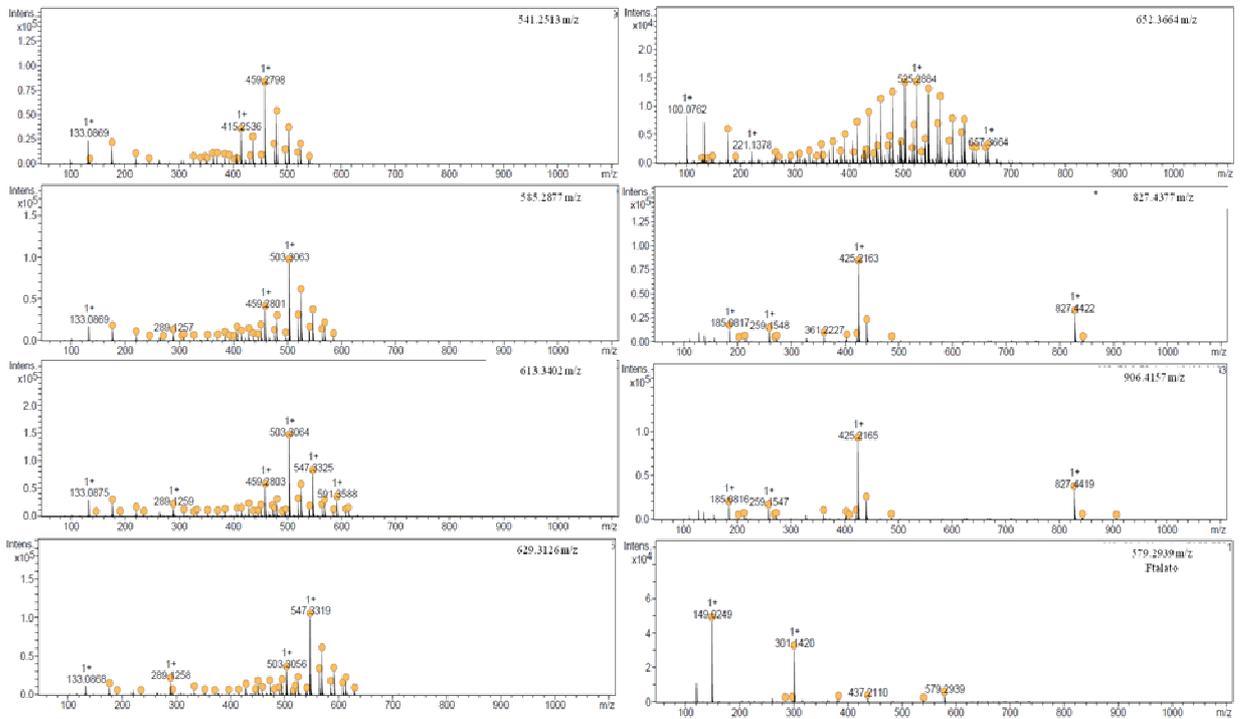
derivates, glucopyranosyl or galactose and fatty acids. Analysis by GC / MS of the extract or bioactive fraction *O. secundiramea* indicated the presence of several halogenated monoterpenes, and after column chromatography were isolated sub-fractions and reviews on GC/MS and nuclear magnetic resonance (NMR) confirmed the presence of monoterpenes $C_{10}H_{13}Br_3Cl$ and $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ and suggested the presence of terpenes $C_{10}H_{12}OBr_2$, $C_{10}H_{14}Br_2$ e $C_{10}H_{14}BrCl$. The application of starch biofilms containing extract or fraction of *O. secundiramea* the concentration of $10 \mu g.mL^{-1}$ (value of the minimum inhibitory concentration against the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* determined by the agar diffusion method), inhibited the development of anthracnose postharvest and did not cause toxicity in the fruit, in the experiment on simulation of the papaya shelf-life. The culture in bioreactors with CO_2 enrichment did not affect growth and concentrations of photosynthetic pigments, protein and total sugars of *H. musciformis* strains, however, in MA strain were observed the synthesis of different glycosylated-sterols, related with appearance of spots on the antifungal extract. The enrichment of the medium with bromine, on *O. secundiramea* culture, caused a 50% increase in concentration and activity of bromoperoxidase, which promoted an equivalent increase in the removal of the dissolved bromine and their incorporation by macroalgae. This treatment also promoted an increase in the concentration of pigments and proteins associated with protection promoted by the enzyme against oxidative stress, and no were observed changes of the halogenated monoterpenes profile in response to treatment. The results allowed delineate the following conclusions: (1) the halogenated monoterpenes from *O. secundiramea* showed high antifungal potential for application control of anthracnose; (2) an indication of the presence of sterols - glycosylated bioactive fraction of *H. musciformis* strains , and the VC strain showed higher chemical diversity and antifungal potential of the MA stain; (3) manipulation of abiotic parameters in bioreactors cultures of seaweed allowed obtaining biomass and bioactive metabolites of the studied species; and (4) extract and bioactive fraction of *O. secundiramea*, applied into a starch biofilm, were

effective in inhibiting of papaya postharvest anthracnose, without causing phytotoxicity symptoms.

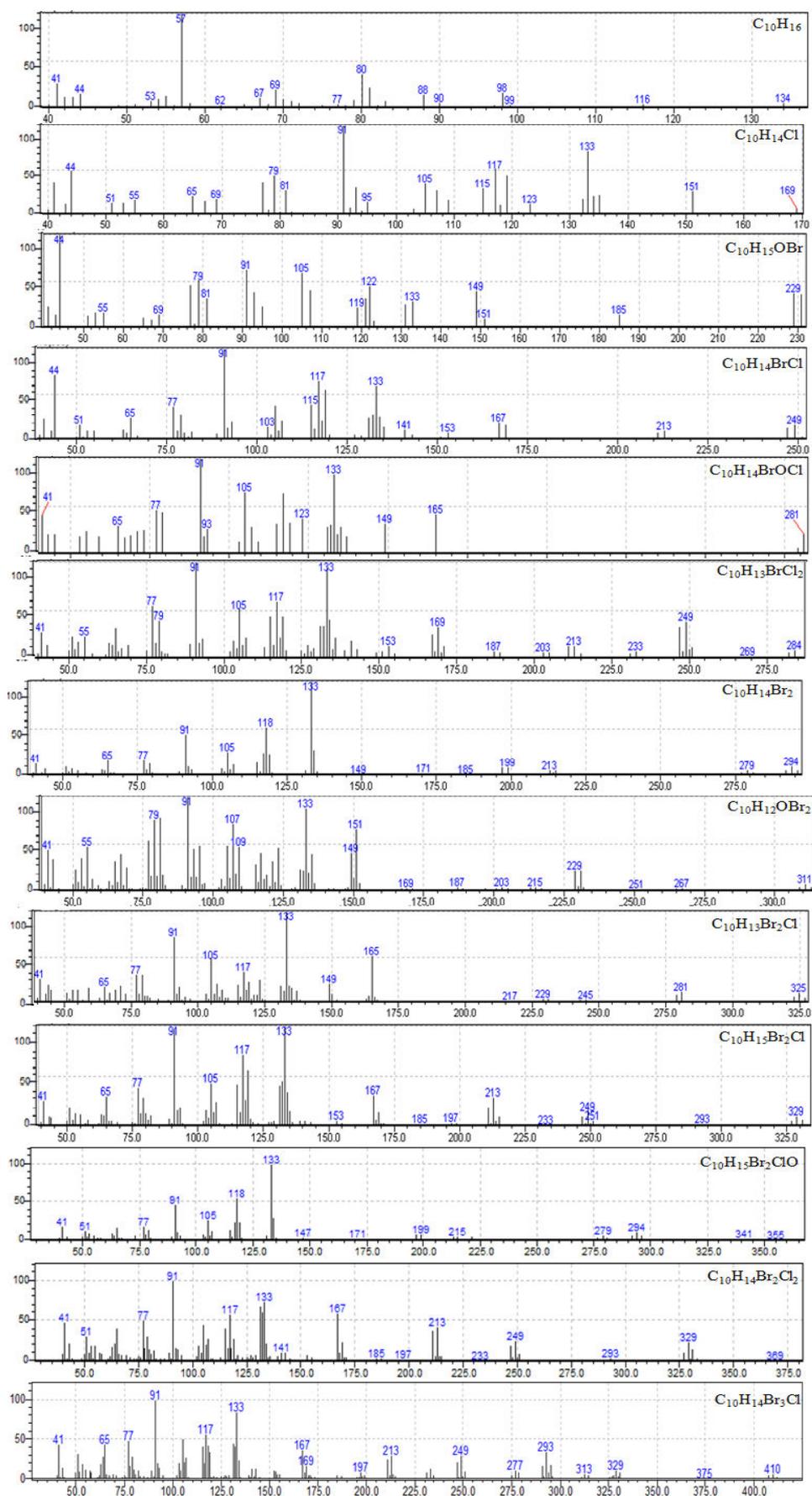
Key words: Halogenated monoterpenes, glycosylated-sterols, *Ochtodes secundiramea*, *Hypena musciformis* colour strains, Phytopathogens, Anthracnose.

ANEXOS

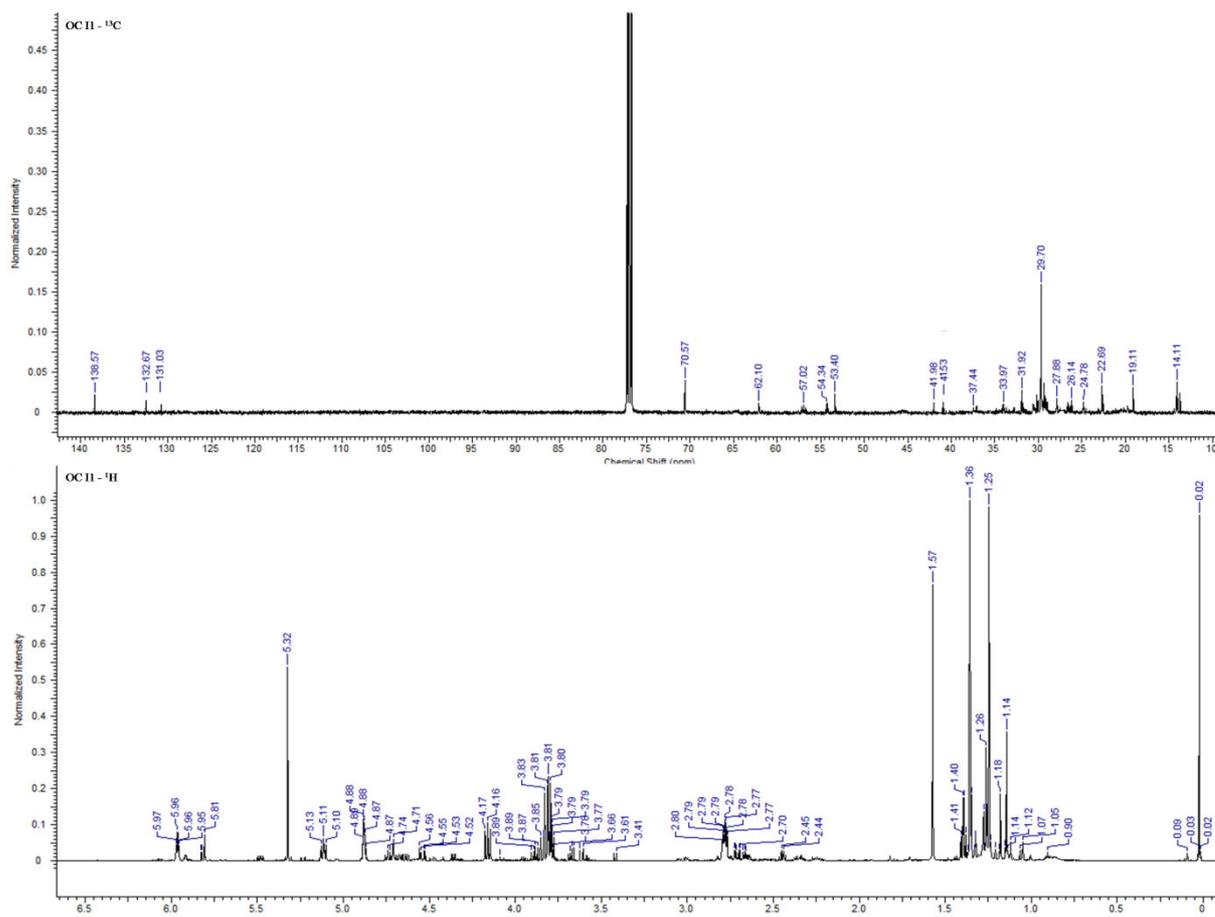
Anexo A - Fragmentos de massa da análise CLAE/EM de alta resolução observado nas FB_{CCD} das linhagens de *Hypnea musciformis*



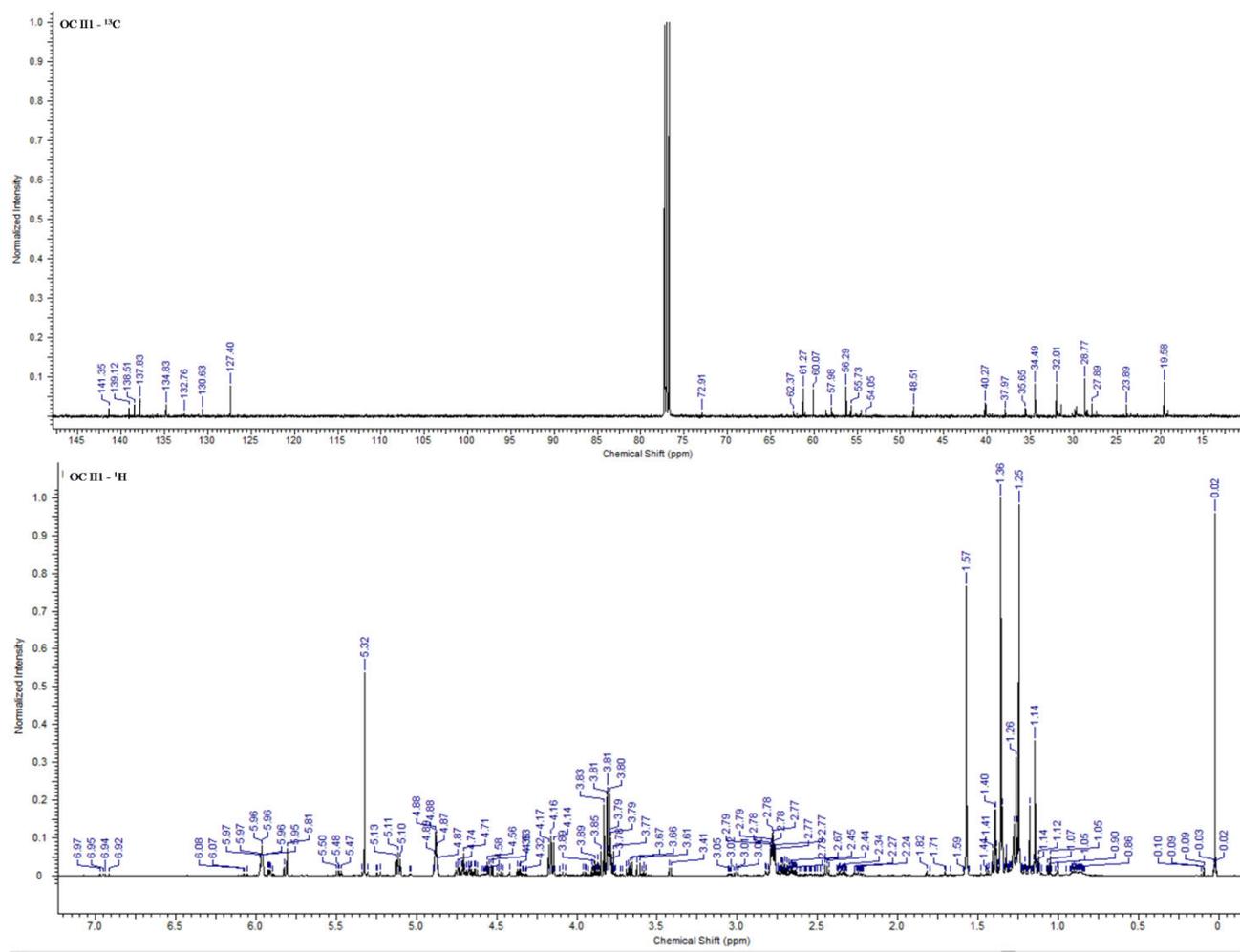
Anexo B - Fragmentos de massa de CG/EM observados para *Ochtodes secundiramea*



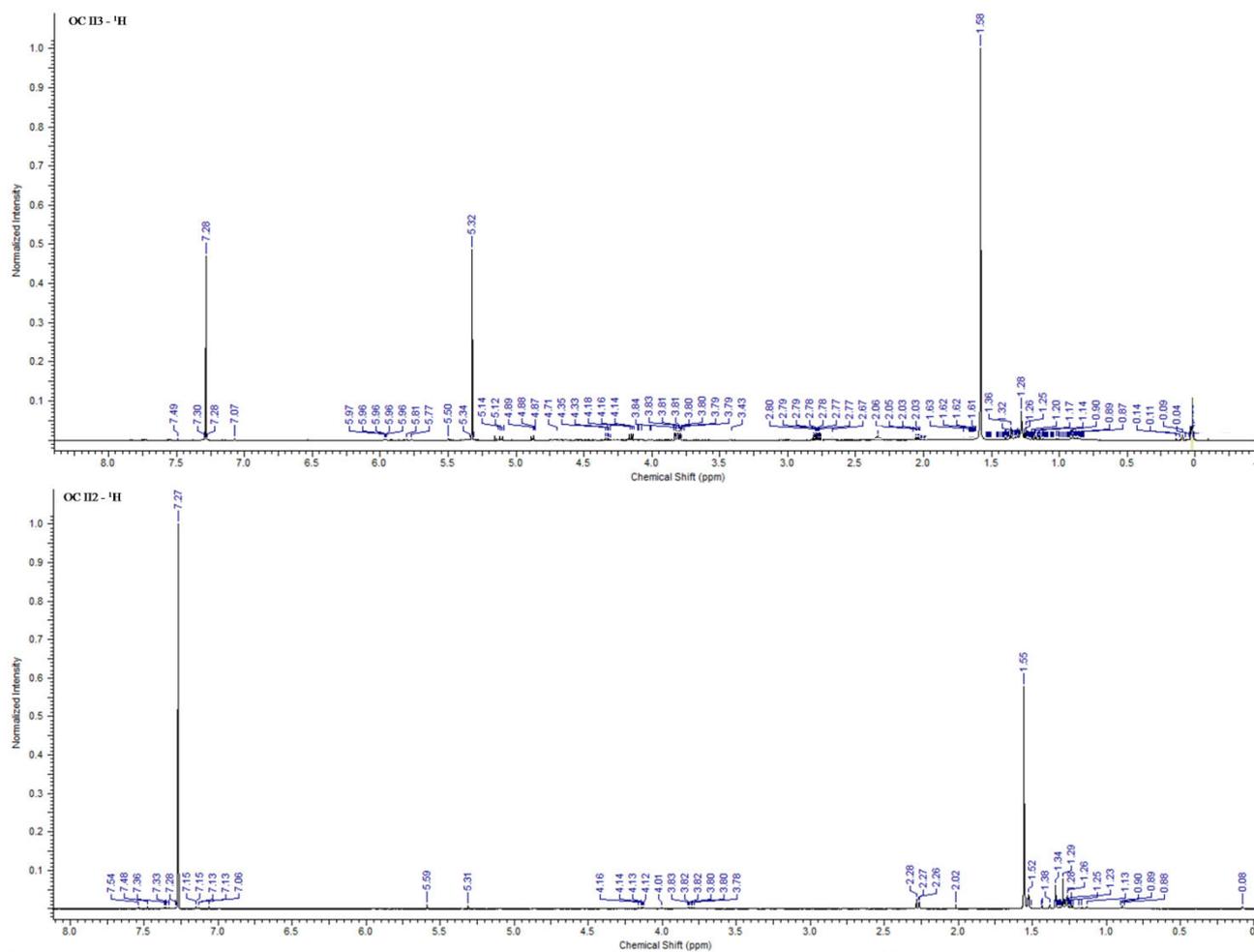
Anexo C - Espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da sub-fração OC II de *Ochodes secundiramea*



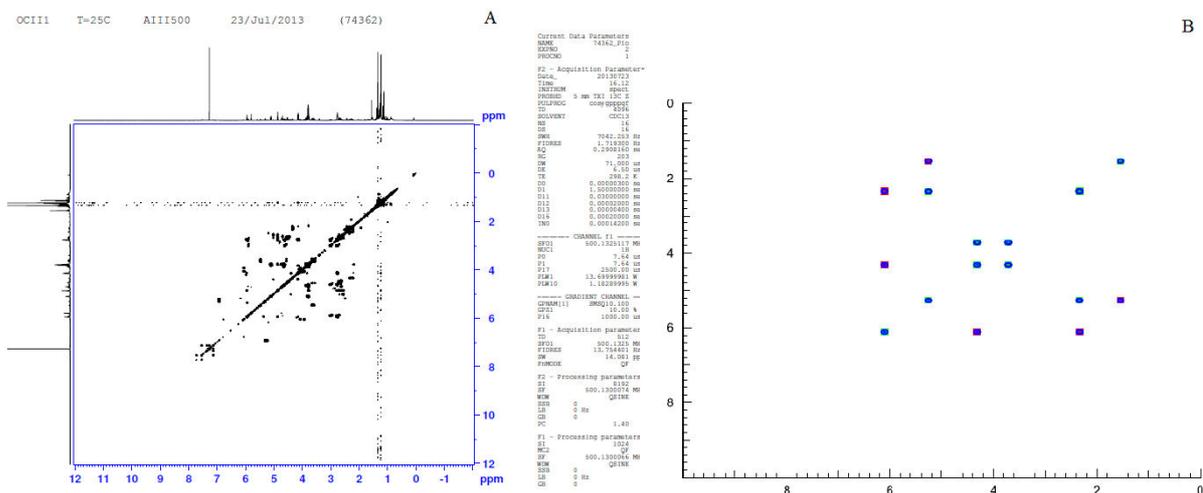
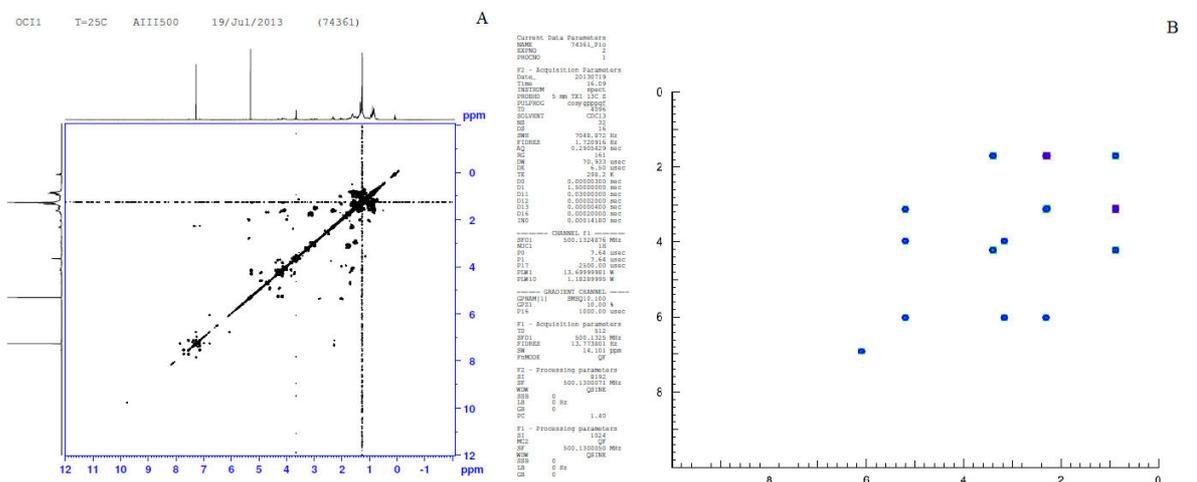
Anexo D - Espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da sub-fração OC II1 de *Ochtodes secundiramea*



Anexo E - Espectros de RMN (^1H) das sub-frações OC II2 e OC II3 de *Ochtoades secundiramea*



Anexo F - Mapa de correlação COSY obtido para as sub-frações, do extrato de *Ochtodes secundiramea*, OC II e OC III juntamente com o esperado para os monoterpênicos $C_{10}H_{14}Br_2Cl_2$ e $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ obtidos “NMR Predict” (Castillo et al. 2011) (http://www.nmrdb.org/new_predictor/).



Anexo G - Artigo publicado “Comparative chemical analysis and antifungal activity of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods” Journal of Applied Phycology - 2014

Comparative chemical analysis and antifungal activity of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods

Levi Pompermayer Machado · Luciana Retz de Carvalho · Maria Cláudia Marx Young · Leonardo Zambotti-Villela · Pio Colepicolo · Daniel Xavier Andregueti · Nair S. Yokoya

Received: 20 December 2013 / Revised and accepted: 26 May 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The activities of bioactive compounds can be influenced by countless factors, including post-collection sample treatment. In this study, the activities of *Ochtodes secundiramea* extracts obtained using different processes are compared; the biomass was macerated immediately, lyophilized in liquid nitrogen, or dried in an oven at 50 °C after collection. The chemical profiles of the extracts were evaluated using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and their biological activities were assessed using qualitative and quantitative bioautography thin-layer chromatography (TLC) assays against phytopathogenic fungi. Preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to isolate the major compound observed in semi-quantitative (CG-MS). The biomass processing methods were shown to influence the chemical profiles of the extracts that promote the oxidation of

halogenated monoterpenes; however, C₁₀H₁₅Br₂Cl was the major compound identified in all of the extracts regardless of the preparation method used. Similarly, changes in qualitative antifungal activity were observed depending on the preparation method, even though the minimum amount of material required for the inhibition of fungal growth (the activity detection limit) was 5 µg in all cases. The activity detection limits for the HPLC-purified majority compound were 5 and 10 µg against *Cladosporium sphaerospermum* and *Colletotrichum lagenarium*, respectively; these values are similar to those obtained for the crude extracts. These results point towards the possibility of using these crude extracts for the control of anthracnose in cucumbers post-harvest.

Keywords Halogenated monoterpenes · Phytopathogenic fungi · *Ochtodes secundiramea* · Biomass processing

L. P. Machado · L. R. de Carvalho · N. S. Yokoya (✉)
Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Av. Miguel Estéfano, 3687, 04301-012 Sao Paulo, SP, Brazil
e-mail: nyokoya@hotmail.com

N. S. Yokoya
e-mail: nyokoya@pq.cnpq.br

M. C. M. Young
Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Av. Miguel Estéfano, 3687, 04301-012 Sao Paulo, SP, Brazil

L. Zambotti-Villela · P. Colepicolo
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Cidade Universitária, Sao Paulo, SP, Brazil

D. X. Andregueti
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 13B, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil

Introduction

Macroalgae species are highly diverse and the dynamic and complex interactions between these organisms and their environment provide a fruitful scenario for the discovery of novel bioactive carbon compounds possessing new functional groups (Ibañez et al. 2012). Many of these bioactive compounds have potential applications in the pharmaceutical, nutraceutical, and agricultural fields (Cardozo et al. 2007). For example, such compounds can be used in agriculture to fight fungal contamination that can cause significant economic losses. Fungal contamination is responsible for 70 % of all plant disorders, and fungi quickly develop resistance to antifungal therapies. Furthermore, only a few antifungal products are readily available on the market (Arunkumar et al. 2010). As a result, many researchers are very interested in developing new antifungal compounds.

Anthrachnose, which can be caused by *Colletotrichum* species, is a major group of post-harvest plant diseases that is prevalent in tropical and subtropical regions of the world (Peres et al. 2002). In 2011, Brazil was the fifth largest producer of watermelon worldwide (the most important cucumber cultured). Brazil produced 2.2 million t of watermelon that year and controlled a US\$ 25 million market (FAO 2010). Cucumbers are highly susceptible to post-harvest anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lagenarium* Ellis & Halst.

The extract of the red macroalga *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe has been found to inhibit anthracnose infection (Machado et al. 2011). Thus, it became highly desirable to identify the bioactive compounds that are found in this extract. Indeed, halogenated monoterpenes are bioactive compounds that are abundant in *O. secundiramea* (Maliakal et al. 2001; Paul et al. 1987). Monoterpenes have been reported to have antifungal activity (Santos et al. 2004), and their association with chlorine/bromine ions (the most available halogens in sea water) can generate new antifungal compounds (Komprobst and Al-Easa 2003). Using a variety of assays, Machado et al. (2013) linked high antifungal activity with the presence of different halogenated monoterpenes in *O. secundiramea* extracts; these extracts do not present cytotoxicity and mutagenic potential.

Biomass processing methods can significantly affect both the yield and the metabolite composition of plant extracts; therefore, choosing the right method is an important aspect of plant bioprospecting (Díaz-Maroto et al. 2002; Venskutonis 1997). However, the effect of the processing method used on the bioactivity of the antifungal compounds found in seaweed (Vairappan et al. 2014) has not been thoroughly explored. Therefore, this study on *O. secundiramea* extract firstly aimed at compare the yields after different biomass treatment processes before extraction, and determining its qualitative gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) profile, as well as evaluating relative major compound by semi-quantitative analysis and quantitative antifungal activity by bioautography assay. Secondly, this study aimed to isolate the major compound in order to determine the detection limit of antifungal activity and to determine its mass fragmentation by GC-MS.

Materials and methods

Samples of *O. secundiramea* were collected in September 2012 on a lateritic reef at Manguinhos Beach (20° 11' 12" S 40° 11' 24" W) in the municipality of Serra, Espírito Santo, Brazil. After collection, the seaweed biomass was cleaned and immediately transported to the laboratory in dark plastic flasks containing filtered seawater held at 22 °C by thermal packaging. The alga was deposited at the Herbario do Instituto de Botânica "Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo" in São Paulo, Brazil, under the accession number SP 391090.

Biomass processing and extract preparation

Fresh algae were collected and subsequently washed with seawater and fresh water to remove sand particles and epiphytes. The cleaned material was separated into three treatments: fresh biomass, lyophilized biomass (using liquid nitrogen), and dried biomass (in an oven at 50 °C for 24 h until the weight became constant). The biomass was then extracted using 10 mL of the solvent mixture DCM/MeOH (2:1, v/v) per 1 g seaweed. After 1 week, the extracts were filtered through filter paper no. 5 (Whatman, UK) and concentrated by solvent evaporation under air flow. The extraction yield was calculated by comparing the crude extract weight with the original fresh biomass weight for each macroalgae sample.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis

A gas chromatograph-mass spectrometer (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Japan) was used to chemically evaluate the extracts and to high-performance liquid chromatography (HPLC)-isolated compounds in the extracts of *O. secundiramea*. The separation was accomplished with a HP-5MS column (30 m×0.25 mm×0.1 µm). The injector was used in split mode at 220 °C; the transfer line was set to a temperature of 240 °C. Helium (99.999 %) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. A linear oven temperature program was employed; the temperature was ramped from 60 to 260 °C at a rate of 3 °C min⁻¹, then it was held at 260 °C for 40 min. Detection was performed in full scan mode over mass-to-charge ratios ranging from 50 to 650 m/z. Electron impact ionization (collision energy = 70 eV) was employed, and the mass spectrometer ion source was maintained at 240 °C. Compounds were identified by their GC retention times and mass spectra (NIST 08 library). The peaks that were not identified using this library were identified by performing a literature search. The total ion chromatogram peaks were integrated to obtain their respective areas.

Bioautography antifungal assays

Cladosporium sphaerospermum Penzig (SPC 491) and *C. lagenarium* (IB Col. 19) were the two model fungi used to determinate antifungal activity. These fungi were maintained at the Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil. They were grown for 12 days until sporulation. *C. sphaerospermum* was cultured on potato dextrose agar (Difco), and *C. lagenarium* was grown on oatmeal agar (Difco). The spore suspensions were then extracted in a solution containing glucose and salt (Homans and Fuchs 1970; Rahalison et al. 1994) to a final concentration of 10⁸ spores mL⁻¹ and used for

qualitative assessment of the antifungal activity of the crude seaweed extracts and the quantitative analysis of the activity detection limits of the isolated compounds.

Qualitative antifungal activities were determined by bioautography of 10 μL of a solution containing 100 μg of crude extract. The samples were applied to Al-backed, silica gel GF 254 TLC plates (Merck, Germany) and developed with DCM/MeOH (99:1, *v/v*). The antifungal activity detection limit was assessed using the same test by evaluating 10- μL solutions containing 1, 5, 10, 25, and 50 μg of extract prepared with different methods and HPLC-isolated compounds. Then the solvent was completely removed and the plates were sprayed with fungal spore suspensions and incubated for 72 h at 28 °C. After incubation clear inhibition zones appeared against the dark backgrounds of the TLC plates. The retention factor (Rf), defined as the ratio of the distance from the origin to the location of the solvent front over the distance from the origin to the center of each spot, was recorded, and these data were used in preparative TLC to obtain the fraction of each major compound isolated by HPLC. Cinnamic acid (1.0 μg) was used as a standard.

Purification of the majority compound by preparative HPLC

The fraction obtained by TLC was used in preparative HPLC carried out with a Shimadzu HPLC. This system comprised two pumps (model LC-6 AD), an auto sampler (SIL-10AF), a PDA detector (SPD-M10A), and a fraction collector (model FRC-10A). An efficient method was developed using a Shim-pack PREP-ODS(H) C18 (4.6 \times 250 mm) column and then this method was adapted to a wider column (20 \times 250 mm). Solvent flows of 1 and 6 mL min^{-1} were used for the analytical and preparative columns, respectively. Wavelengths between 200 and 380 nm were scanned. The elution profile included the following steps: 0–3 min, 50–90 % B; 3–10 min, 90–100 % B; 10–22 min 100 % B. The mobile phases were formic acid (A, 1 % in water) and MeOH (B).

Statistical analyses

A completely randomized design was used to analyze extraction yield, and each treatment was tested in triplicate. Data were analyzed statistically using Assistat software (Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brazil). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed when statistically significant differences were detected by Tukey's test. Differences were considered statistically significant at a minimum level of $P < 0.05$.

Results

Biomass extraction yield The weight of each extract was subtracted from the weight of its corresponding fresh biomass to evaluate whether different biomass processing methods resulted in different extract yields. Differences in yield were not observed ($F=1.2412$; $P=0.3537$) among the extracts prepared using the three methods (fresh, lyophilized, and dried) (Fig. 1).

GC-MS analysis The way in which the seaweed biomass was processed affected the chemical composition of the extract; 5, 10, and 9 peaks were observed for the fresh, lyophilized, and dried samples, respectively. Ten different molecules and possible isomers were detected in extracts of *O. secundiramea* obtained using different biomass processing conditions. The first and second chromatogram peaks were present in GC-MS analysis of blank (solvents) and were not considered in results and discussion.

These compounds and their correspondent relative concentrations (area %) are listed in Table 1. The typical losses related to chlorine and bromine (respectively 35 and 79 m/z) were clearly observed on the mass spectra. The molecular ions of compounds showed the characteristic multiplicity of halogen isotope abundance ($^{35}\text{Cl}:$ ^{37}Cl –75.2:24.8 % and $^{79}\text{Br}:$ ^{81}Br –50:50 %).

In semi-quantitative analysis from fresh, lyophilized, and dried biomass, the major compounds which correspond to peaks 5, 10, and 9, respectively, were detected regardless of the preparation method used. The putative molecular ion is at m/z 329 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{Cl}$) and the fragment ions at m/z 294, relative to chlorine loss (M^+-Cl), at m/z 213 and 133 relative to bromine and chlorine losses (M^+-BrCl and $\text{M}^+-\text{Br}_2\text{Cl}$), respectively. The fragments at m/z 93 and 73 are typical of acyclic monoterpenes.

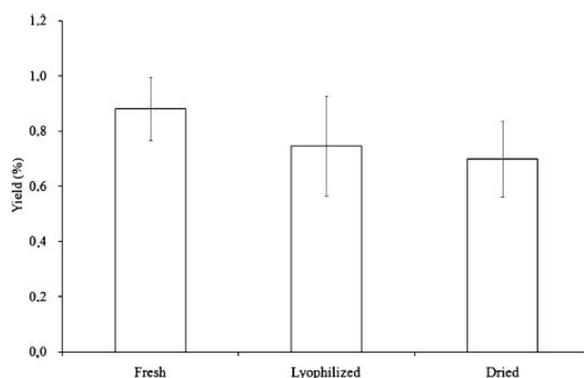


Fig. 1 Relative extract yield (%; mean \pm SD, $n=3$) from *Ochtodes secundiramea* collected in the southeastern Brazilian coast. Biomass processing methods: fresh, lyophilized (using liquid nitrogen), and dried (in an oven at 50 °C for 24 h)

Table 1 GC-MS data for compounds in DCM/MeOH extracts of *Ochtodes secundiramea* biomass obtained using different processing methods

| Seaweed biomass processing method | Peak | Retention time | Area (%) | Putative molecular ion | Mass fragment (100 %) | Other mass fragments (intensity of signal) | Molecular formula |
|-----------------------------------|------|----------------|----------|------------------------|-----------------------|---|--|
| Fresh | 1 | 4.723 | 8.38 | 96 | 67 | 41(30) 65(30) 67(100) 96(50) | C ₇ H ₁₂ ^a (solvent) |
| | 2 | 8.395 | 28.76 | 136 | 57 | 41(30) 57(100) 69 (25) 80(40) 98(40) 136(5) | C ₆ H ₁₀ O ₂ ^a (solvent) |
| | 3 | 31.366 | 13.84 | 294 | 133 | 41(20) 63(5) 77(15) 91(50) 105(40) 118(50) 133(100) 197(5) 229(10) 294(5) | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ ^b |
| | 4 | 44.960 | 4.69 | 249 | 91 | 41(60) 53(50) 69(40) 77(80) 91(100) 105(80) 121(60) 131(50) 149(60) 185(20) 229(80) 249(5) | C ₁₀ H ₁₄ BrCl ^b |
| | 5 | 47.461 | 44.33 | 329 | 91 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 167(40) 213(20) 249(50) 284(5) | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl ^c |
| Lyophilized | 1 | 4.729 | 3.01 | 96 | 67 | 41(30) 65(30) 67(100) 96(50) | C ₇ H ₁₂ ^a (solvent) |
| | 2 | 8.404 | 10.14 | 136 | 57 | 41(30) 57(100) 69(25) 80(40) 98(40) 136(5) | C ₆ H ₁₀ O ₂ ^a (solvent) |
| | 3 | 24.345 | 1.77 | 169 | 91 | 41(50) 81(40) 91(100) 117(10) 169(5) | C ₁₀ H ₁₄ Cl ^d |
| | 4 | 30.655 | 2.37 | 229 | 91 | 44(90) 55(30) 67(25) 79(60) 91(100) 107(50) 117(50) 133(60) 151(40) | C ₁₀ H ₁₅ OBr ^e |
| | 5 | 31.376 | 10.59 | 294 | 133 | 41(20) 63(5) 77(15) 91(50) 105(40) 118(50) 133(100) 197(5) 229(10) 294(5) | C ₁₀ H ₁₄ BrCl ^b |
| | 6 | 39.628 | 9.91 | 325 | 133 | 41(50) 55(20) 71(30); 91(90) 105(50) 117(40) 133(100) 149(20) 165(50) 229(5) 243(10) 281(30) 325 (10) | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl ^e |
| | 7 | 40.012 | 4.58 | 329 | 91 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 167(40) 213(20) 249(50) 284(5) | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl ^f |
| | 8 | 42.134 | 8.18 | 284 | 91 | 41(20) 65(30) 77(50) 91(100) 105(50) 117(70) 133(95) 153(10) 169(50) 185(10) 203(5) 213(20) 233(10) 249(50) 269(10) | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ ^e |
| | 9 | 44.975 | 8.47 | 249 | 91 | 41(60) 53(50) 69(40) 77(80) 91(100) 105(80) 121(60) 131(50) 149(60) 185(20) 229(80) 249(5) | C ₁₀ H ₁₄ BrCl ^b |
| | 10 | 47.474 | 40.98 | 329 | 91 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 167(40) 213(20) 249(50) 284(5) | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl ^f |
| Dried | 1 | 4.752 | 3.60 | 96 | 67 | 41(30) 65(30) 67(100) 96(50) | C ₇ H ₁₂ ^a (solvent) |
| | 2 | 8.436 | 12.95 | 136 | 57 | 41(30) 57(100) 69(25) 80(40) 98(40) 136(5) | C ₆ H ₁₀ O ₂ ^a (solvent) |
| | 3 | 31.416 | 1.85 | 294 | 133 | 41(20) 63(5) 77(15) 91(50) 105(40) 118(50) 133(100) 197(5) 229(10) 294(5) | C ₁₀ H ₁₄ Br ₂ ^b |
| | 4 | 39.671 | 2.42 | 325 | 133 | 41(50) 55(20) 71(30); 91(90) 105(50) 117(40) 133(100) 149(20) 165(50) 229(5) 243(10) 281(30) 325(10) | C ₁₀ H ₁₃ Br ₂ Cl ^e |
| | 5 | 40.459 | 14.14 | 329 | 91 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117(60) 133(60) 167(40) 213(20) 249(50) 284(5) | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl ^f |
| | 6 | 42.164 | 2.56 | 284 | 91 | 41(20) 65(30) 77(50) 91(100) 105(50) 117(70) 133(95) 153(10) 169(50) 185(10) 203(5) 213(20) 233(10) 249(50) 269(10) | C ₁₀ H ₁₃ BrCl ₂ ^e |
| | 7 | 43.607 | 11.84 | 311 | 91 | 43(80) 69(50) 73(60) 81(50) 91(100) 107(60) 121(50) 133(60) 149(60) 169(5) 187(10) 203(5) 229(40) 265(5) 311(5) | C ₁₀ H ₁₂ OBr ₂ ^e |
| | 8 | 45.018 | 13.30 | 410 | 133 | 41(10); 77(40) 91(50) 105 (30) 117(50) 133(100) 167; 197; 213; 249; 294; 329(5) | C ₁₀ H ₁₄ Br ₃ Cl ^e |
| | 9 | 47.508 | 27.34 | 329 | 91 | 44(60) 51(10) 65(20) 77(30) 91(100) 105(40) 117 (60) 133(60) 167(40) 213(20) 249(50) 284(5) | C ₁₀ H ₁₅ Br ₂ Cl ^f |

^a NIST08^b Maliakal et al. (2001)

Polzin and Rorrer (2003)

^d Barahona and Rorrer (2003)^e Paul et al. (1980)^f Coll and Wright (1987)

However, in lyophilized or dried samples, cyclic oxygenated and halogenated monoterpenes were detected, whose mass spectra fragmentation were consistent with the following data: $C_{10}H_{15}OBr$ (187 m/z M^+-CO_2 ; 149 m/z M^+-Br and 107 M^+-BrCO_2) and $C_{10}H_{15}OBr_2$ (265 m/z M^+-CO_2 ; 229 m/z M^+-Br ; 187 m/z M^+-BrCO_2 ; 151 m/z M^+-Br_2 and 107 $M^+-Br_2CO_2$). Both molecules displayed fragments at m/z 185, 107, and 91.

Antifungal assays The biomass treatments for extract preparation affected the qualitative antifungal responses with changes in the Rfs of the bioactive substances observed (Table 2). Quantitative differences in the activity detection limits were not observed for the extracts processed using different methods (Table 3).

Purification of the major compounds using preparative HPLC The Rfs obtained when assessing the qualitative antifungal activities of the extracts were used to perform preparative TLC. Preparative TLC was performed with 80-mg samples of the crude extracts using the same conditions described for the analytical TLC experiments. Twenty-nine milligrams of the crude extract was recovered (36.3 % of the crude extract) and subjected to preparative HPLC. The peak in the chromatogram with a retention time of 17.9 min and a maximum absorbance at 224 nm represented 19 % of the crude extract (15.2 mg), and GC-MS analysis presented result consistent with the monoterpene $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ (329 m/z), which had a retention time of 47.461 min with the following mass fragmentation patterns: 294 m/z, M^+-Cl ; 249 m/z M^+-Br ; 167 m/z M^+-Br_2 ; 213 m/z M^+-BrCl and 133 M^+-Br_2Cl .

This isolated compound ($C_{10}H_{15}Br_2Cl$) had activity detection limits of 5 and 10 μg against *C. sphaerospermum* and *C. lagenarium*, respectively; similar values were observed for the crude extracts (Table 3).

Table 2 Qualitative antifungal activity (Rf) of extracts of *Ochtodes secundiramea* biomass obtained using different processing methods against *Cladosporium sphaerospermum* and *Colletotrichum lagenarium*

| Seaweed biomass processing method | Qualitative antifungal activity (Rf) | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | | <i>Colletotrichum lagenarium</i> | |
| | Rf | Activity ^a | Rf | Activity ^a |
| Fresh | 0.75 | 3 | 0.75 | 3 |
| Lyophilized | 0.7/0.23 | 3/1 | 0.7/0.23 | 3/1 |
| Dried | 0.7/0.2 | 3/2 | 0.7/0.2 | 3/2 |

^a Intensity of the activity: 1, low; 2, intermediate; and 3, strong

Discussion

As observed in previous studies (Machado et al. 2011) that employed the agar diffusion test, dichloromethane extracts of *O. secundiramea* (at concentrations of 2 $\mu g mL^{-1}$) completely inhibit mycelial growth of papaya anthracnose fungi. Similar results were found when cucumber anthracnose fungi was analyzed using the bioautography method.

Current literature data about nuclear magnetic resonance spectra (^{13}C -NMR) (Crews et al. 1984; Paul et al. 1980; McConnell and Fenical 1978) as well as mass fragmentation (Polzin and Rorrer 2003; Barahona and Rorrer 2003) played a key role in the structure characterizations presented here (Maliakal et al. 2001). Ten different molecules and possible isomers were detected in extracts of *O. secundiramea* obtained using different biomass processing conditions, and similar results were obtained by Maliakal et al. (2001).

GC-MS mass spectra of $C_{10}H_{15}OBr$ and $C_{10}H_{15}OBr_2$ are similar to the mass spectra reported by Milligan (2002) for *O. secundiramea* monoterpenes. The fragmentation peak with major area on GC-MS chromatograms coincided with the fragmentation described for $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ by Coll and Wright (1987).

The halogenated terpenes are known for their antifungal bioactivity and have the potential to be used to control phytopathogens (Garcia et al. 2008). Peres et al. (2012) also verified that extracts of the seaweed *Laurencia dendroidea*, which is rich in elatol, inhibited *C. lagenarium* activity. Machado et al. (2013) confirmed the presence of halogenated monoterpenes in extracts of *O. secundiramea* that inhibited papaya and banana anthracnose fungi without causing mutagenic and cytotoxic effects using the *Allium cepa* root-tip mutagenicity test and the brine shrimp lethality assay.

Table 3 Antifungal activity detection limits (μg) of extracts obtained using different biomass processing methods, major HPLC-isolated compound of *Ochtodes secundiramea*, and positive control against the *Cladosporium sphaerospermum* and *Colletotrichum lagenarium*

| Sample analyzed | Antifungal activity detection limit (μg) ^a | |
|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | <i>Colletotrichum lagenarium</i> |
| Extract from fresh biomass | 5 | 5 |
| Extract from lyophilized biomass | 5 | 5 |
| Extract from dried biomass | 5 | 5 |
| Isolated major compound | 5 | 10 |
| Cinnamic acid (positive control) | 1 | 1 |

^a Minimum amount required for the inhibition of fungal growth on thin-layer chromatography (TLC) plates

In analytical bioautography, eluted with apolar solvents, lyophilized and dried biomass of *O. secundiramea* showed an antifungal substance spot at $R_f=0.2$ which might be associated with the presence of higher polarity oxygenated monoterpene, observed in GC-MS analysis. Conversely, the spot at $R_f=0.7$ might be associated with a lesser polar compound ($C_{10}H_{15}Br_2Cl$).

In general, monoterpenes are essential oils found in plants and degrade when plant biomass is subjected to drying in an oven (Venskutonis 1997). In contrast, the lyophilization process can be used to increase the concentration of many volatile compounds, particularly oxygenated terpenes, by promoting more effective interactions between the solvent and plant biomass (Díaz-Maroto et al. 2002). However, in this study, such degradation was not observed, but rather to the formation of oxidized compounds and changes in molecular saturation. This stability can be attributed to the presence of halogens. The halogenated monoterpenes are stable at 50 °C; they can be used to control phytopathogens, post-harvest.

Because terpenes are volatile, they cannot easily be applied as biofilms to protect fruits (Garcia et al. 2008). However, the stability of halogenated monoterpenes, in particular for isolated antifungal $C_{10}H_{15}Br_2Cl$, makes them highly effective candidates for the control of phytopathogenic fungi, post-harvest.

In conclusion, the processing of seaweed biomass affects the chemical composition and antifungal activity of the resulting extracts without changing their activity detection limits. In addition, halogenated monoterpenes from *O. secundiramea* are a source of natural products that can be applied to control fruit diseases.

Acknowledgments The authors would like to thank the Instituto Biológico de São Paulo and the Micoteca de phytopathogenic fungi "Mário Barreto Figueiredo" for providing the *C. lagenarium* used in this study. This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to NSY, MCMY, and PCN and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by the scholarships to LPM. This study is part of the thesis presented by the first author to the Graduate Programme in Plant Biodiversity and Environment, Institute of Botany, São Paulo, Brazil.

References

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) FAOSTAT, Agricultural production. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Accessed on 15 Jun 2013
- Arunkumar K, Sivakumar SR, Rengasamy R (2010) A review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): a special emphasis on bioactive of seaweeds against plant pathogens. *Asian J Plant Sci* 9:227–240
- Barahona LF, Rorrer GL (2003) Isolation of halogenated monoterpenes from bioreactor-cultured microplantlets of the macrophytic red algae *Ochtodes secundiramea* and *Portieria hornemannii*. *J Nat Prod* 66:743–751
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonona AP, Lopes NP, Camosa S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Phys C* 146:60–78
- Coll JC, Wright AD (1987) Tropical marine algae.1. New halogenated monoterpenes from *Chondrococcus hornemannii* (Rhodophyta, Gigartinales, Rhizophyllidaceae). *Aust J Chem* 40:1893–1900
- Crews P, Naylor SN, Hanke FJ, Hogue ER, Kho E, Braslau R (1984) Halogen regiochemistry and substituent stereochemistry determination in marine monoterpenes by carbon-13 NMR. *J Org Chem* 49:1371–1377
- Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS, Cabezudo MD (2002) Effect of drying method on the volatiles in Bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *J Agric Food Chem* 50:4520–4524
- Garcia R, Santos RB, Alves ESS, Santos MP, Aquije GMFV, Fernandes AAR, Ventura JA, Fernandes PMB (2008) Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol* 39:163–168
- Homans AL, Fuchs A (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J Chromatogr* 51:327–329
- Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M (2012) extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates, *Marine Bioactive Compounds*. Springer, New York, pp 55–98
- Kornprobst JM, Al-Easa HS (2003) Brominated diterpenes of marine origin. *Cur Org Chem* 7:1181–1229
- Machado LP, Bispo WMS, Matsumoto ST, Santos RB, Reis FO, Oliveira LFG Jr (2011) Triagem de macroalgas com potencial antifúngico no controle in vitro da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Rev Bras Agric* 17:463–467
- Machado LP, Matsumoto ST, Jamal CM, Silva MB, Centeno DC, Colepicolo P, Carvalho LR, Yokoya NS (2013) Chemical analysis and toxicity of seaweed extract with inhibitory activity against tropical fruits anthracnose fungi. *J Sci Food Agri*. doi:10.1002/jsfa.6483
- Maliakal S, Cheney DP, Rorrer GL (2001) Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet suspension cultures of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *J Phycol* 82:415–428
- McConnell OJ, Fenical W (1978) Ochtodene and ohtodiol: novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. *J Org Chem* 43:4238–4241
- Milligan KE (2002) Marine algal secondary metabolites of unique structure and biomedical or agrochemical potential. PhD Thesis, Oregon State University
- Paul VJ, McConnell OJ, Fenical W (1980) Cyclic monoterpene feeding deterrents from the red marine alga *Ochtodes crockeri*. *J Org Chem* 45:3401–3407
- Paul VJ, Hay ME, Duffy JE, Fenical W, Gustafson K (1987) Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): effects of its monoterpene components upon diverse coral-reef herbivores. *J Exp Mar Biol Ecol* 114:249–260
- Peres NAR, Kuramae EE, Dias MSC, Souza NL (2002) Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *J Physiol Lond* 150:128–134
- Peres JCF, Carvalho LR, Gonçalves E, Berian LOS, Felício JD (2012) Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Cienc Agrotec* 36:294–299

- Polzin JJ, Rorrer GL (2003) Metabolic flux analysis of halogenated monoterpene biosynthesis in microplantlets of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *Biomol Eng* 20:205–215
- Rahalison L, Hamburger M, Monod M, Frenk E, Hostettmann K (1994) Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Med* 60:41–44
- Santos RB, Palhano FL, Vilches TTB et al (2004) Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *Int J of Food Microb* 95:61–66
- Vairappan CS, Razalie R, Elias UM, Ramachandram T (2014) Effects of improved post-harvest handling on the chemical constituents and quality of carrageenan in red alga. *Kappaphycus alvarezii* Doty. *J Appl Phycol* 26:909–916
- Venskutonis PR (1997) Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chem* 59:219–227

Anexo H - Artigo publicado "Chemical analysis and toxicity of seaweed extract with inhibitory activity against tropical fruits anthracnose fungi." Journal of the Science of Food and Agriculture - 2013

Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi

Levi Pompermayer Machado,^{a*} Silvia Tamie Matsumoto,^b Claudia Masrouah Jamal,^c Marcelo Barreto da Silva,^d Danilo da Cruz Centeno,^e Pio Colepicolo Neto,^f Luciana Retz de Carvalho^a and Nair S Yokoya^a

Abstract

BACKGROUND: Banana and papaya are among the most important crops in the tropics, with a value amounting to millions of dollars per year. However, these fruits suffer significant losses due to anthracnose, a fungal disease. It is well known that certain seaweed extracts possess antifungal activity, but no published data appear to exist on the practical application of this property. In the present study, five organic Brazilian seaweed extracts were screened for their activity against banana and papaya anthracnose fungi. Furthermore, cytotoxic and mutagenic effects of the extracts were evaluated by the brine shrimp lethality assay and the *Allium cepa* root-tip mutagenicity test respectively, while their major components were identified by gas chromatography/mass spectrometry.

RESULTS: Strong fungus-inhibitory effects of *Ochtodes secundiramea* and *Laurencia dendroidea* extracts were observed on both papaya (100 and 98% respectively) and banana (89 and 78% respectively). This impressive activity could be associated with halogenated terpenes, the major components of both extracts. Only *Hypnea musciformis* extract showed cytotoxic and mutagenic effects.

CONCLUSION: The results of this study suggest the potential use of seaweed extracts as a source of antifungal agents with low toxicity to control anthracnose in papaya and banana during storage.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: antifungal activity; cytotoxicity; halogenated compounds; mutagenicity; phytopathogens

INTRODUCTION

A high level of seaweed biodiversity, especially in red algae, is observed in the Brazilian state of Espírito Santo compared with other regions of the Brazilian coast. However, the characteristics, functions and potential usefulness of the various seaweed species have not been studied in detail.¹ Seaweeds have a high chemical diversity of ecologically active substances with protective functions against herbivores, biofoulers and epiphytes as well as against the constant changes in abiotic conditions experienced by algae in a marine coastal environment.²

In addition, seaweeds are associated with antioxidant,³ antiviral,⁴ antibacterial,⁵ anthelmintic⁶ and antifungal⁷ activities as well as cytotoxicity,^{3,8} suggesting many potential applications in the pharmaceutical, nutraceutical and agricultural fields.⁹

Terpenes, sterols and polysaccharides are potential bioactive macroalgal metabolites, which could have antifungal activity and substitute the high toxic products available in the market. Consequently, the study of these compounds is particularly important and also due to the rapid development of fungal resistance to therapy.¹⁰

In 2010, Brazil was the second largest producer of papaya (18 million tons with a value of US\$53 million) and the fifth largest producer of banana (7 million tons with a value of US\$2 million).¹¹

Papaya and banana are highly susceptible to anthracnose caused by the fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx respectively.

* Correspondence to: Levi Pompermayer Machado, Núcleo de Pesquisa em Fisiologia, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Av. Miguel Estéfano 3687, 04301-902, São Paulo SP, Brazil. E-mail: levipmachado@yahoo.com.br

a Núcleo de Pesquisa em Fisiologia, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Av. Miguel Estéfano 3687, 04301-902 São Paulo, SP, Brazil

b Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari 514, Goiabeltras, 29075-910 Vitória, ES, Brazil

c Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Maruípe 1468, 29040-090 Vitória, ES, Brazil

d Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Rodovia RR 101, Km 60, Iitorâneo, 79937-540 São Mateus, ES, Brazil

e Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Santa Adélia 166, 09210-170 Santo André, SP, Brazil

f Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil

This disease affects the fruits postharvest, resulting in up to 40% crop losses.¹²

Two types of seaweed-derived bioactive compounds that inhibit anthracnose development in plants have been described previously. First, seaweed polysaccharides have been associated with resistance induction when applied directly onto crops.^{13,14} Second, metabolites with antifungal potential have been identified.^{15–17}

Among the seaweeds evaluated in the present study, *Ochtodes secundiramea* (Montagne) M.A. Howe and *Laurencia dendroidea* J. Agardh are known to synthesize polyhalogenated terpenes,^{18,19} this association between myrcene-derived compounds and halogen ions results in metabolites that are likely to be bioactive.²⁰ *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux and *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand are of biotechnological and commercial importance because of their role in the synthesis of carrageenan and agar respectively,²¹ extracts of these species show cytotoxic⁸ and antifungal¹⁶ activities. In addition, sulfated polysaccharides with antithrombotic and cytotoxic activities have been isolated from the brown alga *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonder.^{8,22}

There is current emphasis on the importance of integrating multidisciplinary research for natural product development,²³ especially in postharvest science.²⁴ Thus the present study evaluated the antifungal, cytotoxic and mutagenic activities and chemical composition of organic extracts of five Brazilian seaweeds to investigate the potential use of these organisms in the prevention of postharvest banana and papaya anthracnose.

MATERIALS AND METHODS

Seaweed collection

Samples of *H. musciformis*, *O. secundiramea*, *P. capillacea*, *L. dendroidea* and *P. gymnospora* were collected in July 2010 from the lateritic reef at Manguinhos Beach (20° 11' 12" S, 40° 11' 24" W) in the municipality of Serra, Espírito Santo, Brazil. After collection, the seaweeds were cleaned and identified. Voucher specimens were deposited at Herbário VIES, Universidade Federal do Espírito Santo.

Bioactive extract preparation

The fresh seaweeds were weighed and extracted with dichloromethane/methanol (2:1 v/v) at 0.1 g fresh seaweed mL⁻¹ solvent mixture for 1 week. The resulting extracts were filtered through Whatman No. 5 filter paper and concentrated by evaporation of the solvents at low temperature. Finally, the extraction yield in each case was calculated by comparing the crude extract weight with the initial fresh weight. All chemicals used were of analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany).

Low-resolution gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses of organic extracts of seaweeds

The organic extracts of the macroalgae were derivatized with 50 µL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + 10 mL L⁻¹ trimethylchlorosilane at 5 mg mL⁻¹ extract solubilized in dichloromethane/methanol (2:1 v/v). The composition was investigated in a GC/MS system (GC 6890 and MSD 5973N, Agilent, Santa Clara, CA, USA). GC was performed using a 30 m HP5 column with a film of thickness 0.25 µm (Supelco, Bellefonte, CA, USA). The injection temperature was set at 230 °C, the interface temperature was set at 250 °C and the ion source was adjusted to 150 °C.

Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The analysis was performed using the following temperature program: 5 min of isothermal heating at 70 °C followed by a 5 °C min⁻¹ oven temperature ramp to 310 °C and a final 1 min of heating at 310 °C. Mass spectra were recorded at 2 scans s⁻¹ over a scanning range of *m/z* 50–650. Both chromatograms and mass spectra were evaluated using Chemstation software (Agilent). Peaks were identified and verified by comparison with a library of mass spectra (NIST 08) and by comparison with a series of *n*-alkanes and calculation of Kovats indices.

Antifungal assays

Effects of organic extracts of macroalgae on *Colletotrichum musae* mycelial growth (banana anthracnose)

The organic extracts of the seaweeds were solubilized in potato dextrose agar (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) fungal culture medium at 48 °C at a final concentration of 5 µg mL⁻¹. After medium solidification, the fungus was inoculated as 7-day-old mycelial disks (diameter 7 mm) and incubated at 28 °C for 120 h. After the growth period, colony diameters were measured for each treatment and the negative control, and the relative % inhibition was calculated.

Effects of organic extracts of macroalgae on *Colletotrichum gloeosporioides* mycelial growth (papaya anthracnose)

Inoculants were obtained from 7-day-old colonies; 10⁵ conidia mL⁻¹ in suspension were measured in a Neubauer chamber. Then 15 µL of this suspension was applied to 5 mm diameter sterile paper disks arranged on PDA medium containing 5 µg mL⁻¹ extract and incubated at 28 °C for 6 days. After the growth period, colony diameters were measured for each treatment and the negative control, and the relative % inhibition was calculated.

Allium cepa root-tip mutagenicity test

For acute tests, onion seeds (*A. cepa*, Periform Baia variety) were germinated on Petri plates in ultrapure water until the roots reached 1 cm in length. The germinated onion seeds were then incubated with 400 µg mL⁻¹ organic seaweed extract solubilized in ethanolic/aqueous solvent (19:1 v/v). For the negative control, a 19:1 (v/v) mixture of ethanol/ultrapure water was used. For the positive control, the carcinogenic agent methyl methanesulfonate (MMA) was used at a concentration of 4 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. After 24 h of incubation, the roots were fixed in Carnoy solution (ethanol/glacial acetic acid, 3:1 v/v) for 24 h, carefully squashed and hydrolyzed with 1 mol L⁻¹ HCl at 60 °C for 8 min, washed with distilled water and Schiff stained for 2 h in the dark. After this process, five slides were prepared per sample for each treatment. For each slide, 1000 cells were counted and the mitotic index (ratio of number of dividing cells to total number of cells) and the mutagenicity index (ratio of number of cells with micronuclei to total number of cells) were determined.²⁵

Brine shrimp cytotoxicity assay

The median lethal concentration (LC₅₀) of each seaweed extract against *Artemia salina* was determined using a simplified version of the brine shrimp lethality bioassay.²⁶ *Artemia salina* encysted eggs were incubated in artificial seawater. The culture was maintained at 28 °C under constant light and aeration. The organic extracts of the seaweeds were dissolved in 0.2 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) solution and supplemented with 20 mL of artificial seawater; each

seaweed extract was tested in triplicate. Larval stage metanauplii (10 units) were added to each tube of dissolved seaweed extract, and the cultures were incubated for 24 h. The negative control consisted of 0.2 mL of DMSO. The positive control comprised 0.2 mL of 10 mg mL⁻¹ K₂Cr₂O₇ solution, which is known to be toxic to *A. salina*. The LC₅₀ values are reported as mg mL⁻¹.

Statistical analyses

For antifungal activity tests, a completely randomized design was used and each treatment was tested in triplicate. Analysis of variance and the Tukey mean separation test ($P \leq 0.05$) were performed. The mitotic and mutagenicity indices were statistically analyzed using the Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$). Data were analyzed using Assisat software (Universidade Federal de Campina Grande, Pa, Brazil). The LC₅₀ values were calculated using probit analysis.

RESULTS

Bioactive extracts

The algae *O. secundiramea*, *H. musciformis* and *L. dendroidea* produced higher yields than *P. gymnospora* and *P. capillacea* (Table 1) when extracted with the medium-polarity solvent mixture dichloromethane/methanol (2:1 v/v).

Analyses of organic extracts of seaweeds by low-resolution GC/MS

Besides the obvious differences in metabolic substances, the GC/MS chemical profile evaluation showed substantial differences in compound abundance: a total of ten peaks were observed for *P. capillacea*, 18 for *P. gymnospora*, 46 for *O. secundiramea*, 19 for *L. dendroidea* and nine for *H. musciformis*. Data on the three major peaks of each extract are compiled in Table 2.

The presence of fatty acids, mainly hexadecanoic acid, was observed in all seaweed extracts. The monosaccharide mannitol was found in high amounts in *P. gymnospora* and *H. musciformis* extracts. The major peaks found in *H. musciformis* and *P. capillacea* extracts corresponded to galactoglycerol and quercetin respectively. Two C₁₀ compounds were observed in *O. secundiramea* extract, and two C₂₀ metabolites in *L. dendroidea* extract, besides a bromine peak loss (typical for bromine isotopes ⁷⁹Br and ⁸¹Br).

Antifungal assays

The influence of the extracts of different seaweed species on the mycelial growth of phytopathogenic fungi *in vitro* and the % inhibition relative to the control are shown in Table 3.

Table 1. Initial fresh weight of algae and final weight and yield of their organic (dichloromethane/methanol, 2:1 v/v) extracts

| Seaweed | Fresh weight (g) | Organic extract (g) | Yield (%) |
|-------------------------------|------------------|---------------------|-----------|
| <i>Padina gymnospora</i> | 150 | 0.56 | 0.37 |
| <i>Hypnea musciformis</i> | 200 | 1.82 | 0.91 |
| <i>Laurencia dendroidea</i> | 150 | 1.17 | 0.78 |
| <i>Ochtodes secundiramea</i> | 150 | 2.10 | 1.40 |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | 200 | 0.40 | 0.20 |

The mycelial growth inhibition by each seaweed extract was similar for the two phytopathogenic fungus species. The extracts of the macroalgae *O. secundiramea* and *L. dendroidea* were the most bioactive. In contrast, the extract of the brown alga *P. gymnospora* showed lower antifungal activity.

Allium cepa root-tip mutagenicity test

The mitotic and mutagenicity indices (Table 4) calculated using the *A. cepa* system test indicated that the bioactive substances in the seaweed extracts do not cause damage to the genetic material or the cell cycle phases; this finding is true even for the species *L. dendroidea* and *O. secundiramea* that are associated with higher levels of antifungal activity. Only *H. musciformis* extract was significantly different from the negative control.

Brine shrimp cytotoxicity assay

According to protocol, extracts with LC₅₀ < 1 mg mL⁻¹ are classified as toxic, while those with LC₅₀ > 1 mg mL⁻¹ are considered non-toxic. Based on this classification, only *H. musciformis* extract showed cytotoxic effects on *A. salina*, with an LC₅₀ value of 0.337 mg mL⁻¹ (Table 5).

DISCUSSION

The highest level of antifungal activity and two C₁₀ molecules (OC1 and OC2, Table 2) thought to be possible monoterpenoids were observed in *O. secundiramea* extract. In this species, numerous halogenated monoterpenes that play a defensive role against herbivory have been identified previously.²⁷ This compound class displays specific cytotoxicity against human tumoral cells.²⁸ Although we observed antimicrobial activity in *O. secundiramea* extract, a finding consistent with results reported by others, we could not detect any cytotoxicity in the brine shrimp assay or any mutagenic effects in the onion root test.

The alcoholic extract of *L. dendroidea* also verified the antimicrobial potential of halogenated diterpenes in *L. dendroidea* ethanolic extract against *Colletotrichum lagenarium*.¹⁵ We confirmed the presence of two C₂₀-bromide compounds (LD2 and LD3, Table 2) in *L. dendroidea* extract. Similar compounds with the same molecular formula, the diterpenes prevezol A and prevezol B, and significantly toxic to *A. salina* were observed previously in other *Laurencia* species.²⁹

However, in our study, *L. dendroidea* extract was not found to be cytotoxic in the brine shrimp assay or mutagenic in the *A. cepa* root-tip mutagenicity test. These results suggest that the halogenated LD2 and LD3 compounds are efficient in controlling anthracnose but are not toxic. Similar results were observed for substance OC1.

The non-polar extract from the macroalga *H. musciformis* showed no mutagenic activity against human lymphocyte cultures³⁰ and exhibited cytotoxicity in brine shrimp.⁸ Galactoglycerol, which is a major compound found in *H. musciformis*, is associated with marine microalga anti-microfouling³¹ and cytotoxicity in brine shrimp.³² These findings are in agreement with our results.

Algal extracts reduce the mitotic index in onion root meristems, indicating the presence of bioactive substances with the potential for pharmacological use in chemotherapy.³³ Moreover, seaweeds are natural bioproducts of fatty acids,³⁴ which may possess antifungal activity, especially considering the presence of hexadecanoic and octadecanoic acids.³⁵ Antifungal activity was also observed in some of our seaweed extracts.

Table 2. Analysis of three major low-resolution GC/MS peaks for each seaweed species, including mass fragments, retention time, identified molecule, obtained Kovats index (KI_{obt}), literature Kovats index (KI_{lit}) and corresponding metabolite

| Species | Substance | Fragments (m/z) | Retention time (min) | Identified molecule | KI_{obt} | KI_{lit} | Seaweed metabolite formula and name | |
|-------------------------------|-----------|--|----------------------|-------------------------|------------|------------|-------------------------------------|---------------------------|
| <i>Padina gymnospora</i> | PG1 | 247, 205, 191, 172, 147, 131, 117, 85, 73, 59 | 12.044 | $C_{11}H_{26}O_3Si_2$ | 1192 | 1200 | $C_5H_{10}O_3$ | Hydroxypentadecanoic acid |
| | PG2 | 421, 319, 205, 147, 117, 73 | 30.805 | $C_{24}H_{62}O_6Si_6$ | 1925 | 1928 | $C_6H_{14}O_6$ | Mannitol |
| | PG3 | 328, 313, 129, 117, 73, 55 | 32.335 | $C_{19}H_{40}O_2Si$ | 2044 | 2045 | $C_{16}H_{32}O_2$ | Hexadecanoic acid |
| <i>Hypnea musciformis</i> | HY1 | 421, 319, 205, 147, 117, 73 | 30.80 | $C_{24}H_{62}O_6Si_6$ | 1925 | 1928 | $C_6H_{14}O_6$ | Mannitol |
| | HY2 | 356, 341, 313, 255, 201, 145, 129, 117, 95, 73, 55 | 35.77 | $C_{21}H_{44}O_2Si$ | 2236 | 2240 | $C_{18}H_{36}O_2$ | Octadecanoic acid |
| | HY3 | 451, 361, 337, 217, 204, 147, 103, 73, 59 | 36.64 | $C_{27}H_{69}O_7Si_6$ | 2291 | 2299 | $C_9H_{15}O_7$ | Galactoglycerol |
| <i>Laurencia dendroidea</i> | LD1 | 370, 291, 201, 159, 137, 119, 105, 91, 73, 53 | 32.58 | $C_{22}H_{45}O_2Si$ | 2234 | 2229 | $C_{19}H_{36}O_2$ | Nonadecenoic acid |
| | LD2 | 500, 471, 317, 199, 157, 139, 119, 105, 91, 73, 53 | 41.29 | $C_{26}H_{49}BrO_2Si_2$ | 2685 | NF | $C_{20}H_{31}BrO_2$ | NI |
| | LD3 | 500, 471, 317, 199, 157, 139, 119, 105, 91, 73, 54 | 41.45 | $C_{26}H_{49}BrO_2Si_2$ | 2696 | NF | $C_{20}H_{31}BrO_2$ | NI |
| <i>Ochtodes secundiramea</i> | OC1 | 302, 287, 223, 133, 117, 105, 91, 73, 53 | 21.68 | $C_{13}H_{23}BrOSi$ | 1627 | NF | $C_{10}H_{13}BrO$ | NI |
| | OC2 | 287, 223, 207, 133, 117, 105, 91, 73, 59 | 21.81 | $C_{13}H_{22}O_2Si$ | 1632 | NF | $C_{10}H_{14}O_2$ | NI |
| | OC3 | 328, 313, 129, 117, 73, 55 | 32.31 | $C_{19}H_{40}O_2Si$ | 2043 | 2045 | $C_{16}H_{32}O_2$ | Hexadecanoic acid |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | PT1 | 328, 313, 129, 117, 73, 55 | 32.326 | $C_{19}H_{40}O_2Si$ | 2043 | 2045 | $C_{16}H_{32}O_2$ | Hexadecanoic acid |
| | PT2 | 458, 433, 368, 353, 329, 145, 129, 105, 73, 57 | 48.969 | $C_{30}H_{54}OSi$ | ND | 3151 | $C_{27}H_{46}O$ | Cholesterol |
| | PT3 | 590, 575, 518, 487, 414, 384, 73 | 51.113 | $C_{30}H_{50}O_7Si_5$ | ND | 3170 | $C_{15}H_{10}O_7$ | Quercetin |

ND, not determined due to exceeding mass of n-alkanes standard (C_8-C_{30}); NF, not found in the literature; NI, not identified owing to limitations of the method.

Table 3. Fungal colony growth diameter and inhibition of *Colletotrichum musae* and *Colletotrichum gloeosporioides* treated with organic extracts of different macroalgae ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ diluted on PDA medium)

| Treatment | <i>C. musae</i> | | <i>C. gloeosporioides</i> | |
|-------------------------------|-----------------|----------------|---------------------------|----------------|
| | Diameter (cm) | Inhibition (%) | Diameter (cm) | Inhibition (%) |
| Control | 8.90A | — | 7.35A | — |
| <i>Padina gymnospora</i> | 6.87B | 22.80 | NR | NR |
| <i>Hypnea musciformis</i> | 6.17C | 30.67 | 3.18B | 56.73 |
| <i>Laurencia dendroidea</i> | 1.87E | 78.98 | 0.12C | 98.37 |
| <i>Ochtodes secundiramea</i> | 1.03F | 88.42 | 0.00D | 100.00 |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | 2.65D | 70.22 | 3.02B | 58.91 |

Values in the same column followed by different letters are significantly different (Tukey test, $P \leq 0.05$). NR, not rated.

Table 4. Mitotic and mutagenicity indices observed with treatment with $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ seaweed extracts, a negative control (ethanol/ultrapure water, 19:1 v/v) and a positive control (MMA)

| Treatment | Mitotic index | Mutagenicity index |
|-------------------------------|---------------|--------------------|
| Negative control | 0.025A | 0.004A |
| Positive control | 0.024A | 0.010B |
| <i>Padina gymnospora</i> | 0.000C | 0.003A |
| <i>Hypnea musciformis</i> | 0.004B | 0.011B |
| <i>Laurencia dendroidea</i> | 0.006B | 0.003A |
| <i>Ochtodes secundiramea</i> | 0.000C | 0.003A |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | 0.001C | 0.003A |

Values in the same column followed by different letters are significantly different (Kruskal–Wallis test, $P \leq 0.05$).

In *P. capillacea* extract we detected quercetin, which is a common metabolite found in seaweed with antioxidant and antifungal properties.³⁶ The ability of these seaweed bioactive extracts

to inhibit postharvest anthracnose may further be used in the development of new functional foods³⁷ aggregated to crops of banana and papaya.

In conclusion, except for *H. musciformis* extract, all non-polar seaweed extracts we tested demonstrated antifungal activity

Table 5. Median lethal dose (LC₅₀) for organic extracts of seaweed species, a negative control (DMSO) and a positive control (DMSO + K₂Cr₂O₇) obtained from brine shrimp cytotoxicity assay

| Treatment | LC ₅₀ (mg mL ⁻¹) |
|-------------------------------|---|
| Negative control | — |
| Positive control | 0.059 |
| <i>Padina gymnospora</i> | >1 |
| <i>Hypnea musciformis</i> | 0.337 |
| <i>Laurencia dendroidea</i> | >1 |
| <i>Ochtodes secundiramea</i> | >1 |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | >1 |

against postharvest fruit pathogens and were associated with low toxicity levels in the tested organisms. This antifungal action is most likely due to the presence of halogenated monoterpenes and diterpenes in *O. secundiramea* and *L. dendroidea*, quercetin in *P. capillacea* and, to a lesser extent, fatty acids in all species evaluated. The cytotoxicity and mutagenicity detected mainly in *H. musciformis* extract may be due to the higher level of galactoglycerol. Future research efforts will focus on isolating and confirming the identities of these bioactive metabolites.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) for providing the fungi used in the study. This research was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to NSY and by a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to LPM.

REFERENCES

- Guimarães SMPB, Uma análise da diversidade da flora marinha bentônica do estado do Espírito Santo, Brasil. *Hoehnea* **30**:11–19 (2003).
- Pereira HC and Gama BAP, Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities, in *Algal Chemical Ecology*, ed. by Amstler CD. Springer, Berlin, pp. 25–49 (2008).
- Vinayak RC, Sudha SA and Chatterji A. Bio-screening of a few green seaweeds from India for their cytotoxic and antioxidant potential. *J Sci Food Agric* **91**:2471–2476 (2011). DOI: 10.1002/jsfa.4490.
- Mendes GS, Yokoya NS, Yoneshigue-Valentin Y, Bravin IC and Romanos MTV, Anti-HSV activity of *Hypnea musciformis* cultured with different phytohormones. *Rev Bras Farmacogn* **22**:789–794 (2012).
- Lima Filho JVM, Carvalho AFFU, Freitas SM and Melo VMM, Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz J Microbiol* **33**:311–314 (2002). DOI: 10.1590/S1517-83822002000400006.
- Davyt D, Entz W, Fernandez R, Mariezcurrera R, Mombrú AW, Saldaña J, et al., A new indole derivative from the red alga *Chondria atropurpurea*. Isolation, structure determination, and antihelmintic activity. *J Nat Prod* **61**:1560–1563 (1998). DOI: 10.1021/np980114c.
- Stein FM, Colepicolo P, Afonso FAK and Fujii MT, Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiiales, Rhodophyta). *Rev Bras Farmacogn* **21**:290–295 (2011).
- Lhullier C, Horta P and Falkenberg M, Avaliação de extratos de macroalgas béticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn* **16**:158–163 (2006).
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, et al., Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C* **146**:60–78 (2007). DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.
- Arunkumar K, Sivakumar SR and Rengasamy R, Review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): a special emphasis on bioactivity of seaweeds against plant pathogens. *Asian J Plant Sci* **9**:227–240 (2010). DOI: 10.3923/ajps.2010.227.240.
- FAO, Agricultural data, agricultural production – 2010. [Online]. Available: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [15 June 2012].
- Silveira NSS, Michereff SJ, Silva ILS and Oliveira SMA, Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patógenese e controle. *Rev Caatinga* **18**:283–299 (2005).
- Paulert R, Talamini V, Cassolato JE, Duarte ME, Nosedá MD, Smânia Jr A, et al., Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Plant Dis Protect* **116**:263–270 (2009).
- Abreu GF, Talamini V and Stadnik MJ, Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. *Summa Phytopathol* **34**:78–82 (2008).
- Peres JCF, Carvalho LR, González E, Berian LOS and Felício JD, Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Cienc Agrotec* **36**:294–299 (2012).
- Machado LP, Bispo WMS, Matsumoto ST, Santos RB, Reis FO and Oliveira Jr LFG, Triagem de macroalgas com potencial antifúngico no controle *in vitro* da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Agrociências* **17**:463–467 (2011).
- Melo VMM, Medeiros DA, Rios FJB, Castelar LIM and Carvalho AFFU, Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. *Bot Mar* **40**:281–284 (1997).
- Fujii MT, Cassano V, Stein EM and Carvalho LR, Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiiales, Rhodophyta) from Brazil. *Rev Bras Farmacogn* **21**:268–282 (2011).
- Maliakal S, Cheney DP and Rorrer GL, Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet cultures of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Cryptonemiales). *J Phycol* **37**:1010–1019 (2001). DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.00120.x.
- Kornprobst J-M and Al-Easa H-S, Brominated diterpenes of marine origin. *Curr Org Chem* **7**:1181–1229 (2003). DOI: 10.2174/1385272033486530.
- Bixle HJ and Porse H, A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol* **23**:321–335 (2011). DOI: 10.1007/s10811-010-9529-3.
- Silva TMA, Alves LG, de Queiroz KCS, Santos MGL, Marques CT, Chavante SF, et al., Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Braz J Med Biol Res* **38**:523–533 (2005). DOI: 10.1590/S0100-879X2005000400005.
- Maciel MAM, Pinto AC and Veiga Jr VF, Plantas medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. *Quim Nova* **25**:429–438 (2002).
- Kitinoja L, Saran S, Roy SK and Kader AA, Postharvest technology for developing countries: challenges and opportunities in research, outreach and advocacy. *J Sci Food Agric* **91**:597–603 (2011). DOI: 10.1002/jsfa.4295.
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC and Marin-Morales MA, Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent – Trifluralin herbicide. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**:1680–1686 (2009). DOI: 10.1016/j.jecoen.2009.03.014.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE and McLaughlin JL, A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* **45**:31–34 (1982).
- Paul VJ, Hay ME, Duffy JE, Fenical W and Gustafson K, Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): effects of its monoterpene components upon diverse coral-reef herbivores. *J Exp Mar Biol Ecol* **114**:249–260 (1988). DOI: 10.1016/0022-0981(88)90141-4.
- Fuller RW, Cardellina JH, Kato Y, Brinen LS, Clardy J, Snader KM, et al., A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria homemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Med Chem* **35**:3007–3011 (1992). DOI: 10.1021/jm00094a012.
- Mihopoulos N, Vagias C, Mikros E, Scoullou M and Roussis V, Prevezols A and B: new brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett* **42**:3749–3752 (2001). DOI: 10.1016/S0040-4039(01)00538-X.

- 30 Vatan O, Celikler S and Yildiz G, *In vitro* antigenotoxic and anti-oxidative capacity of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux extract in human lymphocytes *Afr J Biotechnol* **10**:484–490 (2011).
- 31 Plouguerné E, Ioannou E, Georgantea P, Vagias C, Roussis V, Hellio C, *et al.*, Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Mar Biotechnol* **12**:52–61 (2010). DOI: 10.1007/s10126-009-9199-9.
- 32 Liu Y, Jung JH, Ji H and Zhang S, Glycerolipids from a *Sarcotragus* species sponge. *Molecules* **11**:714–719 (2006). DOI: 10.3390/11090714.
- 33 Ospina GS, López OJ and Márquez FM, *In vitro* antimitotic effect of methanolic extracts of seaweeds species from the Colombian Caribbean coast. *Vitae* **14**(2):22–27 (2007).
- 34 Das UN, Essential fatty acids – a review. *Curr Pharmaceut Biotechnol* **7**:467–482 (2006). DOI: 10.2174/138920106779116856.
- 35 Walters D, Raynor L, Mitchell A, Walker Rand Walker K Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia* **157**:87–90 (2004). DOI: 10.1023/B:MYCO.0000012222.68156.2c.
- 36 Yoshie-Stark Y, Hsieh YP and Suzuki T, Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J Tokyo Univ Fish* **89**:1–6 (2003).
- 37 Ibañez E and Cifuentes A, Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *J Sci Food Agric* **93**:703–709 (2013). DOI: 10.1002/jsfa.6023.