

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

JULIANE BERNARDI

CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (Ulotrichales) DO ATLÂNTICO SUL E
PENÍNSULA ANTÁRTICA: MORFOLOGIA COMPARADA, MAPEAMENTO
LATITUDINAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Pontal do Paraná

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

JULIANE BERNARDI

CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (Ulotrichales) DO ATLÂNTICO SUL E
PENÍNSULA ANTÁRTICA: MORFOLOGIA COMPARADA, MAPEAMENTO
LATITUDINAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos (PGSISCO/CEM) da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Franciane Pellizzari

Pontal do Paraná

2013

“CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (Ulotrichales) DO ATLÂNTICO SUL E PENÍNSULA ANTÁRTICA: MORFOLOGIA COMPARADA, MAPEAMENTO LATITUDINAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE”

POR

Juliane Bernardi

Dissertação n° 107 aprovada como requisito parcial do grau de Mestre(a) no Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Dr(a). Franciane Pellizzari - FAFIPAR
Orientador(a) e Presidente(a)



Dr(a). Pio Colepicolo Neto (IQ-USP)
Membro Examinador(a)



Dr(a). Nair Sumie Yokoya (Ibt-USP)
Membro Examinador(a)

Pontal do Paraná, 25/03/2013.



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS

Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR

Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil

Tel. (41) 3511-8644 - Fax (41) 3511-8648 - www.cem.ufpr.br - E-mail: pgsisco@ufpr.br

TERMO DE APROVAÇÃO

Juliane Bernardi

CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (Ulotrichales) DO ATLÂNTICO SUL E PENÍNSULA ANTÁRTICA: MORFOLOGIA COMPARADA, MAPEAMENTO LATITUDINAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre(a) em em Sistemas Costeiros e Oceânicos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr(a). Franciane Pellizzari - FAFIPAR
Orientador(a) e Presidente(a)

Dr(a). Pio Colepicolo Neto (IQ-USP)
Membro Examinador(a)

Dr(a). Nair Sumie Yokoya (Ibt-USP)
Membro Examinador(a)

Pontal do Paraná, 25/03/2013.

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

B523c Bernardi, Juliane
Clorófitas monostromáticas do Atlântico Sul e Península Antártica: morfologia comparada, mapeamento latitudinal e potencial antioxidante. / Juliane Bernardi. – Pontal do Paraná, 2013. 66 f.; 29 cm.

Orientador: Dra. Franciane Pellizzari.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Macroalgas marinhas. 2. Ulvophyceae. 3. Complexo Monostroma. 4. Clorófitas monostromáticas - distribuição espacial. 5. Clorófitas monostromáticas - morfologia. 6. Compostos bioativos. I. Título. II. César de Castro Martins. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.47

À minha família, amigos e companheiro inseparável.

“Se queres triunfar na vida, se queres conquistar a felicidade, lembra-te de que és tu que deves conquistá-la.”

(Lord Robert Baden Powell)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela oportunidade, pela minha vida e pelo que ainda está por vir.

Aos meus pais, Oscar e Carolina Bernardi, por serem exemplos na minha vida, por acreditarem em mim e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

À minha irmã, Carol, que muita falta faz no meu dia-a-dia.

À minha orientadora, Franciane Pellizzari, pela oportunidade.

À Dra. Cintia Lhullier por ter me orientado de perto nas análises antioxidantes, sem a qual eu não teria conseguido.

À CAPES pela bolsa de estudos cedida.

Ao PROANTAR, Marinha do Brasil (SECIRM, Navio Polar Almirante Maximiano-H41), FAB, MMA, MCTI e CNPq pelo apoio logístico e financeiro para as amostragens.

À Prof. Nair por ter aceitado participar da banca, por ter me ajudado no transporte das algas do Instituto de Botânica, por ter catalogado as minhas algas no herbário e pelas coletas na Antártica.

Ao Pio por ter aceitado participar da banca, pelas coletas na Antártica e pela oportunidade de realizar o Treinamento Pré-Antártico.

Ao Paulo Horta por ter cedido um espaço em seu laboratório para as análises bioquímicas e pelas sugestões no relatório.

Às meninas do Laboratório de Ficologia da UFSC, Thaise, Fernanda Ramlov, Cintia Martins, Manu e Lidiane pela ajuda com as análises bioquímicas.

À Prof. Eunice e Oc. Luana pelas análises químicas a bordo do Navio Polar Almirante Maximiano.

Às colegas de laboratório, Elzi e Michelle, pelo grande auxílio nas coletas.

À Dra. Mariana Cabral de Oliveira e Amanda Medeiros pelas análises de biologia molecular.

Ao Prof. Paulo Lana pelos puxões de orelha, conselhos e incentivo.

Aos professores e servidores do CEM.

Às minhas amigas Dani, Vanessa e Marisa, por estarem comigo nos momentos de dificuldade, aguentando minhas reclamações, e também nos momentos bons, de comemorações. Espero que continuemos assim mesmo estando longe.

Aos meus irmãos bandeirantes, Ana, Tamine e Kaoli, pela amizade eterna que a distância não separa.

Aos colegas que fiz no PGSISCO, pela amizade e convivência durante os dois anos do mestrado.

Aos meus tios e tias que sempre me acolheram em São Paulo, Curitiba e Florianópolis.

Por último, mas não menos importante, ao meu melhor amigo, meu companheiro, meu namorado, meu porto seguro, Edson. Obrigada pelo carinho, pelo amor, pela paciência, pelo incentivo, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei. Pela ajuda nas análises estatísticas e sugestões para a dissertação. Obrigada por estar sempre comigo. Te amo!

RESUMO

As macroalgas marinhas habitam ambientes dinâmicos, com condições físicas e químicas variáveis levando-as a desenvolver várias estratégias de defesa através da síntese de compostos químicos. Estes compostos, chamados de produtos naturais, têm sido amplamente estudados nas últimas décadas, através do isolamento, caracterização e testes de bioatividade de compostos bactericidas, anti-fúngicos, fotoprotetores, anti-herbivoria, anti-incrustação e de ação antioxidante. Clorófitas monostromáticas da ordem Ulotrichales, um grupo de macroalgas verdes alvo de indústrias cosméticas e de fármacos, foram analisadas morfológicamente e quimicamente visando realizar uma varredura de antioxidantes. Este trabalho utilizou material biológico proveniente da Ilha Rei George (Península Antártica) e do Atlântico Sul (Chile, Uruguai e Paraná). As espécies analisadas morfológicamente foram: *Gayralia brasiliensis* (Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya), *Gayralia oxysperma* (Kützing) K. L. Vinogradova ex Scagel *et al.*, *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova; *Monostroma hariotii* Gain, e *Protomonostroma* sp. Para tal, foram avaliados os seguintes caracteres anatômicos: modo de fixação, dimensões e formatos das células, espessura do lúmen celular, forma e localização dos pirenóides e espessura do talo. A ação antioxidante foi testada através do método de inibição do radical DPPH (2,2-difenilpicrilidrazila radical livre), e pela quantificação de substâncias que possuem ação antioxidante (compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais). Dentre as espécies analisadas *Protomonostroma* sp. foi a que apresentou maior potencial antioxidante pelo método do DPPH (77,9%) e maior concentração de compostos fenólicos por grama de biomassa seca (176,07 µg EAG/g). Esta espécie foi coletada na Ilha Rei George, Península Antártica, e seu potencial antioxidante pode estar relacionado à alta incidência de raios UV nesta região, condição que exige mecanismos de defesa eficazes dos organismos fotossintetizantes para sobreviver em altas latitudes.

Palavras-chave: Ulvophyceae, Complexo *Monostroma*, distribuição espacial, morfologia, compostos bioativos.

ABSTRACT

Seaweeds inhabit dynamic environments with variable physical and chemical conditions that lead them to develop several defense strategy through chemical compounds production. These compounds, known as natural products, have been broadly studied in the past decades through isolation, characterization and bioactive tests of compounds with bactericide, antifungal, photo protection, anti herbivory, antifouling and antioxidant actions. Monostromatic chlorophytes, a group of green seaweeds object of cosmetic and pharmacy industries, were morphologically and chemically analyzed willing to perform an antioxidant screening. This work used biological material from King George Island (Antarctic Peninsula) and South Atlantic (Chile, Uruguay and Brazil). The morphologically analyzed species were *Gayralia brasiliensis* (Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya), *Gayralia oxysperma* (Kützing) K. L. Vinogradova ex Scagel *et al.*, *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova; *Monostroma hariotii* Gain and *Protomonostroma* sp. For such, the following anatomic features were evaluated: attachment type, cells dimensions and shapes, cell lumen thickness, pyrenoids shape and position and stalk thickness. The antioxidant potential was evaluated through the DPPH (2,2-difenyl-picrilidrazyl free radical), radical scavenging method and through the quantification of compounds that possess antioxidant action (total phenolic, flavonoids and carotenoids contents). Among the evaluated species, *Protomonostroma* sp. showed the higher antioxidant potential through the DPPH method (77.9% of inhibition) and higher phenolic concentration by gram of dry biomass (176.07 $\mu\text{g EAG g}^{-1}$). This specie was collected in the Antarctic Peninsula and its antioxidant potential could be related to the high UV radiation in this region, condition that requires effective defense mechanisms from the high latitude photosynthetic organisms.

Keywords: Ulvophyceae, *Monostroma* Complex, spatial distributions, morphology, bioactive compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Atividade Antioxidante

AcOH: Ácido acético

CHCl₃: Clorofórmio

DPPH: 2,2-difenil-picrilidrazila

EAG: Equivalente em Ácido Gálico

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

EQ: Equivalente em Quercetina

IC₅₀: Concentração máxima de inibição de 50%

n: número de amostras

Na₂CO₃: Carbonato de Sódio

NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration

OPERANTAR: Operação Antártica

Rf: Fator de retenção

UV: Ultra-Violeta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
HIPÓTESE.....	17
OBJETIVOS.....	17
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>17</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>17</i>
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1: MORFOLOGIA COMPARADA E MAPEAMENTO LATITUDINAL DE CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (ULOTRICHALES) DO ATLÂNTICO SUL E PENÍNSULA ANTÁRTICA	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
<i>Locais de coleta.....</i>	<i>24</i>
<i>Dados abióticos.....</i>	<i>24</i>
<i>Amostragens biológicas e análises morfológicas</i>	<i>24</i>
RESULTADOS.....	25
<i>Habitat e dados abióticos.....</i>	<i>25</i>
<i>Chave dicotômica para identificação de clorófitas monostromáticas Ulotrichales distribuídas entre o Sul do Brasil e a Península Antártica.....</i>	<i>27</i>
<i>Lista taxonômica e descrição das espécies</i>	<i>28</i>
DISCUSSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS	37
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CLORÓFITAS (ULVOPHYCEAE) DO ATLÂNTICO SUL E PENÍNSULA ANTÁRTICA	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
<i>Coletas</i>	<i>46</i>
<i>Preparação dos extratos</i>	<i>46</i>
<i>Ensaio para avaliação de atividade antioxidante</i>	<i>47</i>
<i>DPPH.....</i>	<i>47</i>
<i>Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais.....</i>	<i>47</i>
<i>Carotenóides.....</i>	<i>48</i>
<i>Análises estatísticas</i>	<i>48</i>
RESULTADOS.....	48
<i>DPPH.....</i>	<i>48</i>

<i>Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais</i>	49
<i>Carotenóides</i>	50
DISCUSSÃO	51
AGRADECIMENTOS	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A: PROTOCOLOS METODOLÓGICOS	57
ANEXO B: RESULTADOS NÃO COMPILADOS	60

Introdução Geral

O Filo Chlorophyta, atualmente pertencente ao Reino Plantae (GUIRY & GUIRY, 2012), é o grupo de algas que mais se assemelha às plantas superiores, por apresentar clorofilas *a* e *b* como principais pigmentos fotossintetizantes, armazenar amido em plastídeos, possuir pigmentos acessórios, e apresentar os tilacóides dos cloroplastos agrupados em lamelas (LEE, 1999).

Inseridas neste Filo estão as clorófitas monostromáticas, que são macroalgas verdes de talo foliáceo, com hábito morfológico semelhante à alga verde distromática conhecida vulgarmente como alface do mar, *Ulva* Linnaeus. *Monostroma*, *Gayralia* e *Protomonostroma* possuem talo foliáceo com apenas uma camada de células e estão inseridas no chamado Complexo *Monostroma*, cujas espécies possuem características morfológicas e anatômicas similares, o que dificulta sua identificação no campo (PELLIZZARI, 2005; PELLIZZARI et al. 2008). A taxonomia, filogenia e biogeografia deste grupo ainda não estão bem elucidadas, sendo necessário propor uma chave-taxonômica com base em caracteres morfo-anatômicos e auxiliada por estudos moleculares, estes já em andamento desde Pellizzari (2007).

Algas deste complexo ocorrem em zonas subtropicais, temperadas e polares (BORASO DE ZAIXSO, 2004; OLIVEIRA et al., 2009; PELLIZZARI et al. 2013), e no Brasil possuem biomassas concentradas nas regiões sul e sudeste (PELLIZZARI et al. 2007 e 2008). Possuem ampla importância no segmento alimentício no oriente, e no ocidente estão sendo utilizadas na fabricação de fármacos (BLUNT et al., 2005; PINTO et al., 2012) e cosméticos (KIM et al. 2008). São também utilizadas na indústria de nutracêuticos (WIJESINGHE & JEON, 2011), além de usos na biomedicina (CARDOZO et al., 2006).

Estas algas habitam zonas de médio e litoral infra raso, de ambientes costeiros e estuarinos dinâmicos, com condições físicas e químicas variáveis, estando expostas à ação intensa de herbívoros e radiação UV, como fotoperíodos variáveis e extremos. Como estratégia de defesa, podem ter desenvolvido compostos químicos. Estas estratégias bioquímicas são produzidas pelo metabolismo secundário desses organismos, ou seja, geralmente não afetam seu crescimento ou reprodução. Metabólitos secundários são compostos biologicamente ativos produzidos pelos organismos, a partir de diferentes rotas metabólicas, em resposta a uma variação ambiental (MASCHEK & BAKER, 2008). Estudos sugerem que alguns metabólitos secundários agem prevenindo processos deletérios humanos, *eg.* contra envelhecimento precoce da pele, e são denominados produtos naturais (MASCHEK & BAKER, 2008). Desta forma, devido à gama de ecossistemas distintos que as algas do

Complexo *Monostroma*, dentre outras clorófitas, habitam e em função das relações biológicas interespecíficas a que estão sujeitas, este grupo é promissor na síntese de produtos naturais.

Nas últimas décadas, tem sido isolado e caracterizado um grande número de metabólitos secundários de algas, com ampla variedade estrutural e diversas atividades biológicas (TEIXEIRA & KELECOM, 1991; MARINHO-SORIANO et al., 2011). Um dos produtos naturais mais estudados e patenteados atualmente são os antioxidantes, que podem estar associados tanto à nutracêutica quanto ao uso tópico através de cosméticos.

O Brasil é o terceiro maior produtor e consumidor de cosméticos no mundo (SEBRAE, 2007). Este fato demanda pesquisas visando elucidar novas fontes naturais de moléculas antioxidantes, as quais são produzidas por diversas espécies de macroalgas marinhas.

A pele, mais do que qualquer outro órgão, está exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, os quais induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, ERO (GUARATINI et al., 2007). Os antioxidantes inibem ou previnem a oxidação de uma superfície, como a pele, e protegem os sistemas biológicos contra danos induzidos pelas ERO (HWANG et al., 2010).

Entre as fontes de antioxidantes naturais, as macroalgas marinhas estão sendo consideradas como produtoras promissoras destas substâncias. Por serem organismos fotossintetizantes, as macroalgas encontram-se expostas à grande incidência solar, na forma de raios UV, e à altas concentrações de oxigênio, combinação que origina radicais livres e outros oxidantes (MATSUKAWA et al., 1997). Tais organismos desenvolveram um complexo sistema de defesa contra as ERO, produzindo antioxidantes como carotenóides, tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), glutathione reduzida e compostos fenólicos (ASADA, 1994).

Desta forma, o reconhecimento dos benefícios e do potencial de uso das macroalgas, assim como de suas diversas aplicabilidades industriais e biotecnológicas, e o desenvolvimento de novos produtos, têm estimulado a pesquisa ficológica sobre a distribuição, ciclo de vida, fisiologia, aspectos biológicos e bioquímicos deste recurso marinho (FUJIMURA et al., 2002; CHEN & CHEN, 2003; SMIT, 2003; CARDOZO et al., 2007; HOLDT & KRAAN, 2011; WIJESINGHE & JEON, 2011; MARINHO-SORIANO, et al., 2011).

A Antártica e o Atlântico Sul possuem uma macro-ficoflora com elevadas biomassas, capazes de sintetizar compostos bioativos que poderiam ser utilizados como produtos naturais em diversas indústrias (OLIVEIRA et al., 2009). Estas macroalgas fazem parte de um sistema

biológico influenciado por condições meteorológicas e oceanográficas particulares e extremas, no caso da Antártica. Desta forma, são relevantes estudos que, além de elucidar seu potencial bioativo como fonte de recursos naturais, primariamente descrevam sua morfo-anatomia e avaliem aspectos bioquímicos de alguns componentes da ficoflora destas regiões.

Assim, as clorófitas monostromáticas *Monostroma hariatii* Gain, *Protomonostroma* sp, *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova, *Gayralia oxysperma* (Kützing) K.L.Vinogradova ex Scagel et al. e *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya foram analisadas morfológicamente e bioquimicamente.

Hipótese

Partindo do conhecimento de que as variações ambientais regem a produção de metabólitos secundários nas macroalgas, a hipótese de trabalho pressupõe que as distintas populações de clorófitas monostromáticas coletadas na Península Antártica e Atlântico Sul, apesar de pertencerem à mesma classe taxonômica e, em sua maioria, ao Complexo *Monostroma*, apresentam diferenças na concentração e na qualidade do composto bioativo estudado, ou seja, diferenças no potencial antioxidante.

Objetivos

Objetivo geral

Este trabalho visou descrever e comparar morfológicamente as cinco espécies de clorófitas monostromáticas da Ordem Ulotrichales distribuídas entre o Atlântico Sul e a Península Antártica, e avaliar a atividade antioxidante dos seus extratos.

Objetivos específicos

- Realizar análise de morfologia comparativa das espécies.
- Propor uma chave artificial de identificação de clorófitas monostromáticas da ordem Ulotrichales do Atlântico Sul e Península Antártica.
- Avaliar a atividade antioxidante das espécies testadas através do método do DPPH.
- Avaliar a atividade antioxidante das espécies testadas através da quantificação de compostos bioativos.

Referências

- ASADA, K. (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: FOYER, C. H. & MULLINEAUX, P. M. (eds) **Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants**. CRC Press, Boca Raton, pp 77–104.
- BLUNT, J. W., COPP, B. R., MUNRO, M. H. G., NORTHCOTE, P. T., PRINSEP, M. R., 2005. Marine natural products. **Natural Products Report**, 22, 15–61.
- BORASO DE ZAIXSO, A. (2004). Marine Chlorophyta of Argentina. **Historia Natural** (Segunda Serie) - Vol. III (11): 95-119. Buenos Aires, ISSN 0326-1778.
- 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**, Part C 146. 60–78.
- CHEN, R. H. & CHEN, W. Y. (2003). Skin hydration effects, film formation time, and physicochemical properties of a moisture mask containing *Monostroma nitidium* water-soluble mucilage. **Journal of Cosmetic Science**, 54, 9-20.
- FUJIMURA, T.; TSUKAHARA, K.; MORIWAKI, S.; KITAHARA, T.; SANO, T. & TAKEMA, Y. (2002). Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. **J. Cosmet. Sci.** 53, 1 – 9.
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G. & COLEPICOLO, P. (2007). Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**. Vol. 30, No. 1, 206-213.
- GUIRY, M. D. & GUIRY, G. M. (2012). **AlgaeBase. Listing the World's Algae**. Worldwide Eletronic Publication, Nacional University of Ireland, Galway. Disponível em: <www.algaebase.org>.
- HOLDT, S. L. & KRAAN, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology** 23:543–597.
- HWANG, P. A.; WU, C. H.; GAU, S. Y.; CHIEN, S. Y. & HWANG, D. F. (2010). Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from Seaweed *Sargassum hemiphyllum*. **Journal of Marine Science and Technology**. Vol. 18, No. 1, pp. 41-46.
- KIM, S. K., RAVICHANDRAN, D. Y., KHAN, S. B., KIM, Y. T. (2008). Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 13: 511-523.
- LEE, R. E. (1999). **Phycology**. 3rd Edition. Cambridge: University Press.
- MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P.; TEIXEIRA, V. L. & VALENTIN, Y. Y. (2011). Frontiers on algae bioactive compunds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 21(2).

- MASCHEK, J. A. & BAKER, B. J. (2008). The chemistry of algal secondary metabolism. In: **Algal Chemical Ecology**. © 2008 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 322 p.
- MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKKI, K.; MASUDA, Y. & TAKEUCHI, T. A. (1997) Comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J Journal of Applied Phycology**, v.9, p.29-35.
- OLIVEIRA, E. C., PELLIZZARI, F. M. & M. C. OLIVEIRA. (2009). The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island. **Antarctic Polar Biology** (32): 1639-1647.
- PELLIZZARI, F. M. (2005). **Desenvolvimento das bases biológicas e técnicas para o cultivo de algas verdes de talo monostromático (Chlorophyta) no litoral do Paraná**. Tese. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 202 p.
- PELLIZZARI, F. M. (2007). Cultivo de clorófitas monostromáticas comestíveis no sul do Brasil: descrição, biologia, molecular da(s) espécie(s), estudo de potencial de mercado, recrutamento e crescimento em diferentes sistemas. **Relatório técnico de Pós-doutorado – CNPq**. 70p.
- PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; YOKOYA, N. S. (2008). Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**. Vol. 20:75–82.
- PELLIZZARI, F.M.; OLIVEIRA, M. C; YOKOYA, N. S.; MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. C. (2013). *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ultrichales, Chlorophyta) from Brazil: an ontogenetic, morphological and molecular characterization. **Botanica Marina**. DOI 10.1515/bot-2012-0197.
- PINTO, A. M. V; LEITE, J. P. G.; WILTON, J. F.; CAVALCANTI, D. N.; VILLAÇA, R. C.; GIONGO, V.; TEIXEIRA, V. L.; PAIXÃO, I. C. N. P. 2012. Marine natural seaweed products as potential antiviral drugs against Bovine viral diarrhea virus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.
- SEBRAE (2007). **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**. Agência Sebrae. Disponível em: <http://www.sebrae-sc.com.br/novos_destaquos/oportunidade/default.asp?materia=13629>.
- SMIT, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology** 16: 245–262.
- TEIXEIRA, V. L. & KELECOM, A. (1991). Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**. 14(2).
- WIJESINGHE, W. A. J. P. & JEON, Y. J. (2011). Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. **Phytochem Rev**. 13 p.

CAPÍTULO 1

Morfologia comparada e mapeamento latitudinal de clorófitas monostromáticas (Ulotrichales) do Atlântico Sul e Península Antártica

MORFOLOGIA COMPARADA E MAPEAMENTO LATITUDINAL DE CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS (ULOTRICHALES) DO ATLÂNTICO SUL E PENÍNSULA ANTÁRTICA

COMPARED MORPHOLOGY AND LATITUDINAL MAPPING OF MONOSTROMATIC CHOLOROPHYTES (ULOTRICHALES) FROM SOUTH ATLANTIC AND ANTARCTIC PENINSULA

Juliane Bernardi^{1*}, Franciane Pellizzari²

¹Universidade Federal do Paraná, Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR)

²Universidade Estadual do Paraná, campus FAFIPAR

Revista pretendida: Botanica Marina, ISSN (1437-4323), Fator de impacto: 1,493.

Resumo

Clorófitas monostromáticas e foliáceas da ordem Ulotrichales são um grupo de macroalgas marinhas verdes que apresentam taxonomia controversa e de difícil identificação. *Monostroma*, *Gayralia* e *Protomonostroma* são gêneros do Complexo *Monostroma* que possuem boa representatividade específica no Hemisfério Sul Ocidental e com biomassa concentrada entre o Sul do Brasil e a Ilha Rei George (Antártica Marítima). Este estudo apresenta uma análise morfo-anatômica de duas clorófitas coletadas na Ilha Rei George (Península Antártica) e três clorófitas coletadas em três outros pontos amostrais do Atlântico Sul (Chile, Uruguai e Brasil) durante a OPERANTAR XXIX (2010-2011) e XXX (2011-2012). *Monostroma hariotii* Gain é uma alga de talo vesicular, podendo atingir 30 cm de comprimento, endêmica da Antártica. *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K. L. Vinogradova ex Scagel et al. apresenta talos laminares expandidos, de até 3 cm de comprimento. Esta espécie, coletada em Montevideu e no litoral do Paraná, ocorre em áreas estuarinas de baixas salinidades. *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya, apresenta talo foliáceo delicado, verde claro, de até 10 cm de comprimento. Esta alga foi coletada na costa do Paraná, é uma espécie descrita recentemente e também já foi explorada em bancos naturais durante as décadas de 1980 e 1990. *Protomonostroma* sp. possui talo foliáceo, expandido e delicado, verde oliva, com até 5 cm de comprimento. Esta alga foi encontrada somente em Punta Plaza, na Península Antártica. *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova apresenta talo em forma de fita, verde claro, atingindo até 13 cm de comprimento. Esta espécie foi amostrada em Punta Arenas, no extremo sul do Chile, ocorre em toda a costa da patagônia argentina e chilena e é usada na culinária local destes países. Tendo em vista a importância ecológica e econômica destas populações de clorófitas monostromáticas, esta contribuição propõe uma chave taxonômica e descrição morfológica comparada dessas espécies.

Palavras-chave: Complexo *Monostroma*, Ultotrichales, Baía do Almirantado, Chile, Uruguai Paraná.

Abstract

Monostromatic and leafy chlorophytes from the order Ulvotrichales are a group of green seaweeds that have controversy taxonomy and difficult identification. *Monostroma*, *Gayralia* and *Protomonostroma* are genera of the *Monostroma* Complex that possess good specific representation in South Eastern Hemisphere and with concentrated biomass between South Brazil and Maritime Antarctic. This work reports a morpho-anatomical analysis of two chlorophytes collected in King George Island (Antarctic Peninsula) and three chlorophytes collected in other three sites in the South Atlantic (Chile, Uruguay and Brazil) during the OPERANTAR XXIX (2010-2011) and XXX (2011-2012). *Monostroma hariotii* Gain is a seaweed with distended and vesicular stalk, reaching 30 cm length, endemic of Antarctic. *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K. L. Vinogradova ex Scagel et al. has extended laminar fronds, up to 3 cm length. This species, collected in Montevideo and Paraná coast, occurs in estuary waters of low salinity. *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya has delicate leafy stalk, light green, up to 10 cm length. This seaweed collected in Paraná coast, is a recently described species and was also explored in natural banks during the 1980 and 1990 decades. *Protomonostroma* sp. has leafy stalk, extended and delicate, olive green, reaching 5 cm length. This algae was found only in Punta Plaza, in Antarctic Peninsula. *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova presents an elongated frond, light green, up to 13 cm length. This species was sampled in Punta Arenas, southernmost Chile, occurs all over the Argentine and Chilean Patagonia and is used in the local culinary. Due to the ecological and economic importance of these monostromatic chlorophytes populations, this contribution suggests a taxonomic key and the compared morphology description of these species.

Keywords: *Monostroma* Complex, Ulvotrichales, Admiralty Bay, Chile, Uruguay, Paraná, morpho-anatomical characters.

Introdução

Clorófitas monostromáticas da ordem Ulotrichales são macroalgas marinhas e estuarinas de talo foliáceo, com apenas uma camada de células em corte transversal. Este grupo de algas, inserido no Complexo *Monostroma*, apresenta caracteres morfológicos similares, o que dificulta a identificação em campo (Pellizzari, 2005; Pellizzari et al., 2007 e 2008). Além disso, a filogenia e a distribuição destas espécies ainda não estão elucidadas.

Estas algas habitam diversos ecossistemas, ocorrendo em zonas polares, temperadas e subtropicais (Boraso de Zaixso, 2004; Oliveira et al., 2009a), com características oceanográficas e meteorológicas distintas. Por ocorrerem em ecossistemas com condições químicas e físicas extremas, como a região Antártica, as algas do Complexo *Monostroma* são passíveis de desenvolver uma série de estratégias de defesa através da produção de compostos químicos. Esses compostos químicos, encontrados em diversas espécies de macroalgas marinhas, estão sendo amplamente estudados devido às suas ações antioxidantes (Raymundo et al. 2004; Zubia et al., 2007), antibacterianas (Shanmughapriya et al., 2008), antivirais (Cassolato et al. 2008; Ahn et al., 2002), antifúngicas (Bhosale, Jagtap & Naik, 1999), antitumorais (Folmer et al., 2010; Yuan et al., 2011), anti-incrustantes (Bazes et al. 2009), anti-alérgicas (Samee et al., 2009), dentre outras.

Além disso, estas clorófitas são amplamente cultivadas no Japão, onde são consumidas como alimento direto há séculos devido ao seu alto valor nutritivo (Pellizzari 2007). Já no Ocidente, onde não há tradição no consumo de algas, a maior demanda está na crescente aplicabilidade de compostos algáceos nas indústrias cosmética, nutracêutica, farmacêutica e no uso de ficocolóides (Pellizzari & Reis, 2011).

Devido à lacuna no conhecimento da morfologia e distribuição de clorófitas do Complexo *Monostroma* e à crescente demanda por compostos bioativos extraídos de algas marinhas, o objetivo deste trabalho foi compilar as principais características morfológicas das espécies *Monostroma hariotii* Gain, *Protomonostroma* sp, *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K. L. Vinogradova, *Gayralia oxysperma* (Kützing) K.L.Vinogradova ex Scagel et al. e *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya. Além disso, elucidar o mapeamento latitudinal destas espécies entre o Atlântico Sul e a Península Antártica e propor uma chave de identificação que auxilie na identificação de clorófitas monostromáticas, da ordem Ulotrichales, destas regiões.

Materiais e Métodos

Locais de coleta

A Tabela 1 apresenta as espécies, os pontos amostrais deste estudo, suas respectivas coordenadas geográficas, a data de coleta e o número do voucher de cada espécie depositada no herbário.

TABELA 1: ESPÉCIES COLETADAS, LOCAIS DE COLETA, COORDENADAS GEOGRÁFICAS, DATA DA COLETA E VOUCHER DE IDENTIFICAÇÃO PARA CADA ESPÉCIE DEPOSITADA NO HERBÁRIO DO INSTITUTO DE BOTÂNICA DE SÃO PAULO.

Espécie	Local	Coordenadas	Data	Voucher SP
<i>M. hariotii</i>	Botany Point, Antártica	62°04'49,57''S	Dez/2011	427954
	Marítima	58°18'35,13''W	Jan/2012	
<i>G. oxysperma</i>	Desembocadura do Rio de La Plata, Uruguai	34°56'22,07''S	Set/2011	56197
		56°09'25,85''W		
<i>G. brasiliensis</i>	Baía de Guaratuba, Brasil	25°51'10,92''S	Set/2012	427960
		48°34'13,17''W		
<i>Protomonostroma</i> sp.	Punta Plaza, Antártica	62°05'25''S	Dez/2010	427956
	Marítima	58°24'56''W	Jan/2011	
<i>P. undulatum</i>	Fuerte Bulnes, Chile	53°37'44,22''S	Mar/2012	427957
		70°55'17,92''W		

Dados Abióticos

Durante a OPERANTAR XXIX e XXX foram feitas amostragens de dados abióticos, como temperatura e salinidade da água do mar. A temperatura foi medida com termômetro padrão e os resultados expressos em graus Celsius (°C). A salinidade foi mensurada com refratômetro e os resultados expressos em Unidade Padrão de Salinidade (ups).

Amostragens Biológicas e Análises Morfológicas

As amostragens foram realizadas manualmente na região entremarés e infralitoral raso, por raspagem do substrato com auxílio de espátula. Os exemplares (n=5) de cada população foram fixados com formalina 4% para caracterização morfo-anatômica. Todos os

espécimes, com exceção de *G. oxysperma*, foram depositados no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

A análise da morfologia comparada das espécies de clorófitas monostromáticas foi realizada no Laboratório de Ficologia e Qualidade da Água Marinha (LAQUAMAR/FAFIPAR) com auxílio de microscópios estereoscópicos e ópticos Olympus (Modelo CX31), com captura de imagem. Os caracteres anatômicos avaliados foram: dimensões e formato das células, espessura do lúmen celular (espaço entre a parede celular e a lamela, a qual se une a outra célula), forma e localização dos pirenóides (local de reserva de amido) em vista frontal. A espessura do talo foi medida por microscopia a partir de cortes transversais do talo à mão livre com lâminas histológicas. A identificação foi confirmada e comparada com base em literatura especializada (Papenfuss, 1964; Joly 1965; Cordeiro-Marino et al. 1993; Braga 1997; Braga et al. 1997; Wiencke & Clayton 2002; Pellizzari et al. 2008; Oliveira et al. 2009a; Pellizzari et al. 2013) e atualização nomenclatural segundo Guiry e Guiry (2012). Uma chave taxonômica foi proposta com base nos caracteres observados auxiliados pela literatura pertinente.

Resultados

Habitat e dados abióticos

Monostroma hariotii foi encontrada crescendo abundantemente sobre rochas e seixos de zonas entre-marés e infralitoral raso nas praias de Botany Point, em frente à Estação Antártica Comandante Ferraz e em Steinhouse, localizadas na Enseada Martel, Ilha Rei George (Antártica Marítima). As amostras foram coletadas em dezembro de 2011 e janeiro de 2012, ou seja, somente durante o verão austral.

Protomonostroma sp. foi encontrada somente em Punta Plaza, na Ilha Rei George. A mesma foi extremamente abundante durante o verão de 2010/2011, porém, sua população não foi detectada durante o verão de 2011/2012, sugerindo variações interanuais no recrutamento da espécie, oriundas possivelmente do seu ciclo de vida, ainda pouco elucidado, e ou de oscilações nas variáveis físicas e químicas da água do mar.

Protomonostroma undulatum foi amostrada na praia de Fuerte Bulnes (Punta Arenas, extremo sul do Chile) em março, final do verão austral de 2012, sobre rochas de zonas entre-marés e infralitoral raso.

Gayralia oxysperma foi coletada em zona entre-marés da desembocadura do Rio de La Plata (Uruguai). A espécie é de pequeno porte, quase crostosa, e encontrava-se fixa nas muradas de contenção da zona portuária de Montevideo. *G. oxysperma* também foi amostrada na Baía de Antonina, setor interno do Complexo Estuarino de Paranaguá, onde ocorre em raízes de gramíneas estuarinas e em rampas de embarcações. Suas populações ocorrem somente durante o inverno e início de primavera (Pellizzari et al. 2008; Pellizzari & Oliveira, 2011).

Gayralia brasiliensis foi coletada em zona entre-marés sobre fragmentos de madeira, tijolos e rochas em uma rampa de embarcações na Baía de Guaratuba, no estado do Paraná. Suas populações também são abundantes sobre pneumatóforos de plantas de mangue em todo setor externo do Complexo Estuarino de Paranaguá. *G. brasiliensis* recruta o ano inteiro, mas a biomassa é maior durante o inverno e início de primavera.

Na Tabela 2 estão listadas as espécies, sua distribuição entre a Antártica Marítima e o Atlântico Sul e os dados abióticos registrados durante o pico de biomassa das espécies.

TABELA 2: ESPÉCIES DE CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS AMOSTRADAS, LOCAL DE COLETA, ZONA DE OCORRÊNCIA EQUIVALENTE, DADOS MÉDIOS DE TEMPERATURA E SALINIDADE E PERÍODO DE AMOSTRAGEM.

Espécie	Local	Zona de ocorrência	Temperatura (°C)	Salinidade (ups)	Período
<i>M. hariotii</i>	Antártica Marítima	Polar	1±2	37±1,5	Verão
<i>G. oxysperma</i>	Uruguai	Subtropical	21±2	16±3	Inverno
<i>G. brasiliensis</i>	Brasil	Subtropical	20±4	20±4	Inverno
<i>Protomonostroma</i> sp.	Antártica Marítima	Polar	1±2	37±1,5	Verão
<i>P. undulatum</i>	Chile	Temperada	6±4	28±5	Inverno

A seguir, com base nos caracteres analisados, encontra-se uma proposta de chave de identificação para clorófitas monostromáticas do Atlântico Sul e Antártica.

Chave dicotômica para identificação de clorófitas monostromáticas Ulotrichales distribuídas entre o Sul do Brasil e a Península Antártica.

- Algas verdes frondosas com o talo constituído por apenas uma camada de células em corte transversal..... 1
- 1a Talo emergindo de filamentos eretos e aderido ao substrato por rizóides..... 2
- 1b Talo formado a partir de células em um disco prostrado que dará origem a um apressório circular diminuto..... 3
- 2a Plantas agregadas por muco gelatinoso..... *Protomonostroma* sp.
- 2b Plantas não agregadas, com talos de pequeno porte (± 3 cm de diâmetro), expandido e prostrado ao substrato..... *Gayralia oxysperma*
- 3a Plantas com talos em forma de saco, globoso - vesicular, com espessura em torno de 30 μm em corte transversal..... *Monostroma hariotii*
- 3b Plantas com frondes expandidas circulares, mas não em forma vesicular. Espessura do talo em torno de 16 - 25 μm em corte transversal..... 4
- 4a Plantas com frondes alongadas, em forma de fita. Espessura do talo em torno de 44 μm *Protomonostroma undulatum*
- 4b Plantas com frondes de 3 a 8 cm de comprimento. Espessura do talo em torno de 24 μm *Gayralia brasiliensis*

Visando facilitar a comparação entre as espécies identificadas, foram compilados na Tabela 3 os caracteres morfológicos observados nas populações de clorófitas monostromáticas analisadas.

TABELA 3: MORFOMETRIA COMPARADA DE ESPÉCIES DE CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS DO ATLÂNTICO SUL E ANTÁRTICA MARÍTIMA. OS VALORES ESTÃO EXPRESSOS EM MÍNIMO E MÁXIMO E/OU EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO (N=3).

	<i>Monostroma harioitii</i>	<i>Protomonostroma</i> sp.	<i>Protomonostroma undulatum</i>	<i>Gayralia oxysperma</i> *	<i>Gayralia brasiliensis</i>
Comprimento do talo (cm)	5 a 30	2 a 5	3 a 15	Máx. 3	3 a 10
Largura do talo (cm)	2 a 4	2 a 4	0,5 a 3	NA	2 a 8
Aspecto do talo	Saco-vesicular, globoso	Expandido, de consistência gelatinosa	Lanceolado ou em forma de fita	Expandido	Expandido
Espessura do talo em corte transversal da região marginal (μ m)	28,1 \pm 5,1	39 \pm 8,1	44,1 \pm 15,2	18 \pm 4,2	24 \pm 5,1
Comprimento médio das células basais (μ m)	7,4 \pm 3,3 a 25 \pm 8,8	12,5 \pm 2,5 a 36,6 \pm 11,5	8,3 \pm 3,8 a 36,6 \pm 3,8	NA	NA
Diâmetro médio das células marginais (μ m)	4,5 \pm 2,25 a 6,8 \pm 2,3	8,36 \pm 3 a 9,7 \pm 2,5	10,8 \pm 1,4 a 10,8 \pm 3,8	11 \pm 2	5,2 \pm 1,3 a 6,8 \pm 2,3
Lúmen (μ m)	22,5 \pm 3,5	30 \pm 7,2	33,3 \pm 15,2	12 \pm 4	18 \pm 4
Pirenóides	1	2 ou mais	1	1	1, raramente 2
Estrutura de fixação	Apressório	Rizoides	Apressório	Rizoides	Apressório

NA = MEDIDAS NÃO AVALIADAS.

*Os caracteres de *G. oxysperma* foram compilados dos trabalhos de Pellizzari et al. 2008 e Pellizzari & Oliveira 2011.

Lista taxonômica e descrição das espécies

A classificação (segundo Guiry & Guiry, 2012), descrições morfológicas das espécies coletadas e analisadas, assim como pranchas contendo imagens do aspecto geral do macrotalo, detalhes morfoanatômicos e peculiaridades específicas em vista microscópica, apresentam-se abaixo.

Filo Chlorophyta

Classe Ulvophyceae

Ordem Ulotrichales

Família Gomontiaceae

Monostroma hariotii Gain

(Voucher: SP 427954)

Fronde simples monostromáticas verde escuras, em formato de saco ou vesícula (Figura 2A), podendo chegar, na maturidade, até 30 cm de comprimento e 5 cm de largura na região mediana do talo. São aderidas ao substrato por apressório circular. A ontogenia da lamina envolve a germinação de esporos para gerar uma base prostrada filamentosa, a qual se subleva para formar um estágio em forma de saco que abre para produzir a lâmina. Possui ciclo de vida heteromórfico com lâminas gametofíticas haploides e uma fase codiolum esporofítica. As lâminas produzem os gametas em células vegetativas diferenciadas, com talos masculino e feminino separados. A reprodução assexuada é por zoósporos tetrásporos produzidos na região prostrada ou nas lâminas eretas (Guiry & Guiry, 2012). Células basais poligonais organizadas em duas ou quatro células (Figura 2B) na região marginal e mediana da fronde. Espessura do talo em corte transversal medindo $25 \pm 8,8 \mu\text{m}$ (Figura 2C), células da margem isodiamétricas medindo de $4,5 \pm 2,25$ a $6,8 \pm 2,3 \mu\text{m}$. Células tornam-se alongadas em direção à base com lúmen medindo $24,1 \pm 5,2 \mu\text{m}$. Células com cloroplasto único contendo um ou dois pirenóides. A primeira citação para a espécie foi feita por Gain, L. (1911), e a espécie tipo do gênero *Monostroma* é *Monostroma bullosum* (Roth) Thuret.

Distribuição: Ilha Rei George, Ilha Elefante, Ilha Deception, Ilha Livingston (Península Antártica), Ilhas Malvinas (Guiry & Guiry, 2013).

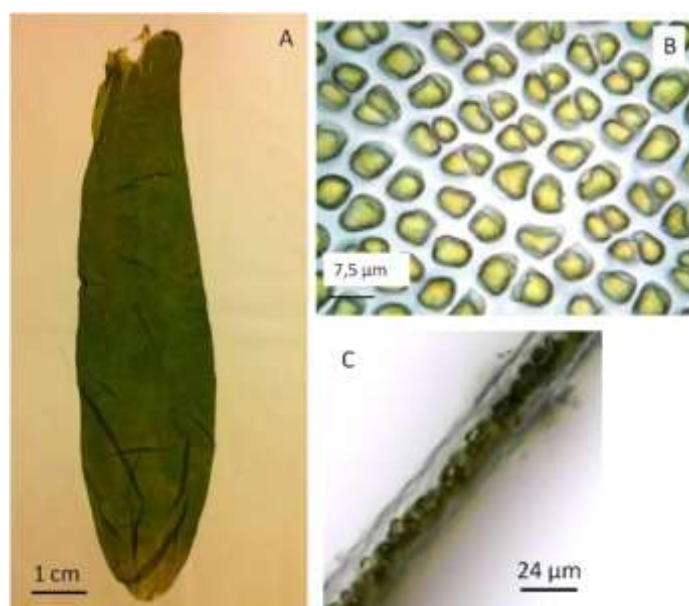


FIGURA 1: *Monostroma hariotii*. A: aspecto do talo em forma globosa-vesicular. B: Vista superficial das células marginais. C: Corte transversal do talo mostrando única camada de células e espessura em corte transversal.

Gayralia oxysperma (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagel et al.
(Voucher: SPF 56197)

Plantas de coloração verde claro, com talos laminares expandidos e lobados, monostromáticos. Os tamanhos de fronde encontrados não ultrapassaram 3 cm (Figura 3A). Rizóides presentes, deixando-a prostrada sobre o substrato. Reprodução assexuada por esporos natatórios biflagelados formados na diferenciação dos esporângios das células vegetativas. Os esporos germinam de um filamento unisseriado que se torna saciforme e abre-se então, em um talo de forma de lâmina (Guiry & Guiry, 2012). Em vista superficial, as células da margem, região mediana e basal são poligonais e isodiamétricas, tornando-se mais alongadas em direção à região basal. As células são de formato irregular, com tamanhos entre 9 e 11 μm de diâmetro. Células uninucleadas em grupos de dois ou quatro (Figura 3C), com cloroplasto parietal e um único pirenóide arredondado. A espessura do talo (Figura 3D) na região marginal e mediana variou de 18 a 21 μm , sendo aproximadamente 8 μm correspondentes ao lúmen da parede e aproximadamente 11 μm para o tamanho celular. A primeira citação para a espécie foi feita por Scagel et al. (1989), e a espécie tipo do gênero *Gayralia* é *Ulva oxysperma* Kützinger.

Distribuição: Setores estuarinos internos no litoral do Paraná e Santa Catarina (Brasil) e desembocadura do Rio de La Plata (Uruguai). Europa (França, Itália, Espanha, Irlanda, Portugal, Noruega, Holanda, Grã-Bretanha), Marrocos, Austrália, Nova Zelândia, América do Norte, México, Ilhas Caribenhas, Brasil, Ilhas Atlânticas, Japão, Vietnã, Myanmar, Ilhas Pacíficas (Guiry & Guiry, 2012).

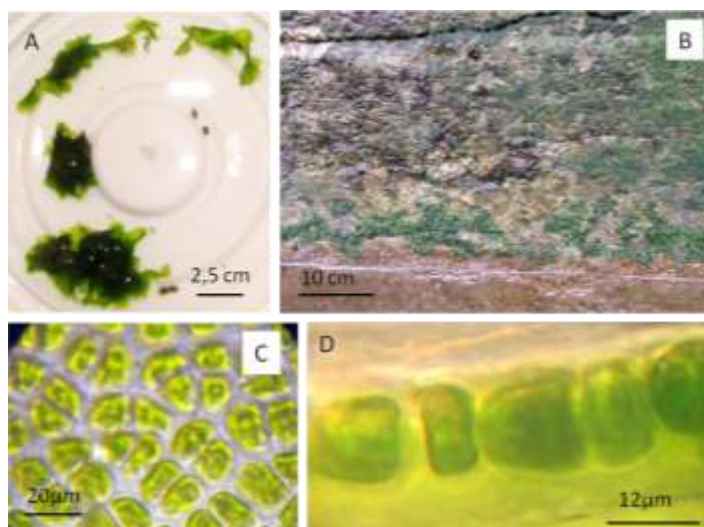


FIGURA 3: *Gayralia oxysperma*. A: hábito geral da planta. B: Zoneamento das algas em murada de contenção no Rio de La Plata, com *G. oxysperma* ocupando o estrato inferior do substrato na região entre marés. C: vista frontal das células da região mediana do talo. D: Corte transversal do talo com única camada de células. Fonte: Pellizzari & Oliveira (2011).

Gayralia brasiliensis Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya
(Voucher: SP 427960)

Plantas delicadas, de talo foliáceo expandido e monostromático, verde claro (Figura 4A), medindo de 4 a 10 cm de comprimento, e 2 a 5 cm de largura. Liberação de zoóides da lâmina ocorre pela desintegração da parede zooidangial, liberando quatro células biflageladas. Após fixação dos zoóides, as divisões celulares originaram filamentos unisseriados que se desenvolveram em lâminas em forma de leque (Pellizzari et al., 2013). Células marginais poligonais com tamanhos irregulares (Figura 4C), medindo de $5,2\pm 1,3$ a $6,8\pm 2,3$ μm de comprimento. Lúmen das células da margem com 18 ± 4 μm . Espessura do talo (Figura 4B) na região mediana de $25\pm 1,8$ μm . Células uninucleadas. Cloroplasto parietal alongado e único. A maioria das células contendo um pirenóide, podendo conter até dois.

Distribuição: Biomassa concentrada entre o litoral do Paraná e sul do Estado de São Paulo (Cananéia). Populações também foram identificadas em SC, RJ, ES, BA e PE (Pellizzari et al. 2013).

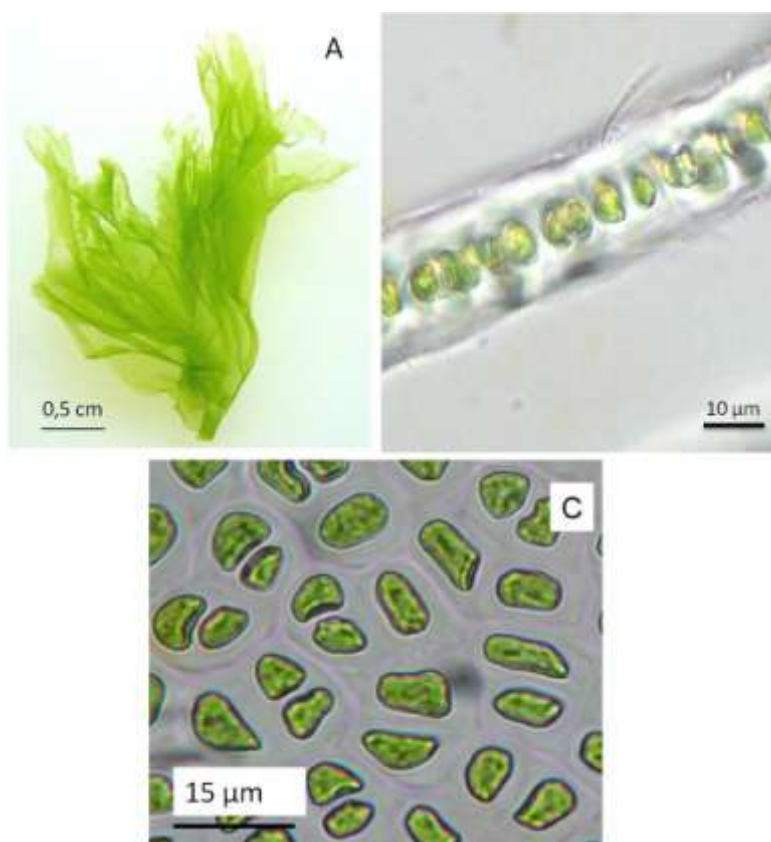


FIGURA 4: *Gayralia brasiliensis*. A: Aspecto geral do talo. B: Corte transversal do talo demonstrando única camada de células, *i.e.* monostromático. C: Vista superficial das células poligonais com tamanhos irregulares da região mediana do talo.

Família Ulotrichaceae

Protomonostroma sp.

(Voucher: SP 427956)

Plantas de talo foliáceo, monostromático, expandido e delicado (Figura 5A). Os espécimes analisados apresentaram textura gelatinosa (Figura 5B), agregando-se facilmente e sendo de difícil separação após coletados. Talos verde oliva escuro, de até 5 cm de altura e de 2 a 4 cm de largura. Células basais alongadas medindo de $12,5\pm 2,5$ a $36,6\pm 11,5$ μm de comprimento (Figura 5C). Células marginais poligonais menores, de $8,3\pm 3$ a $9,7\pm 2,5$ μm (Figura 3D). Lúmen medindo $30\pm 7,2$ μm (Figura 5D, seta 2). Talo com espessura de $39\pm 8,1$ μm na região marginal. Cloroplasto único. A maioria das células possui dois pirenóides, mas podem conter mais de três (Figura 5D, seta 1).

Distribuição: Punta Plaza (Enseada Martel, Ilha Rei George, Antártica Marítima).

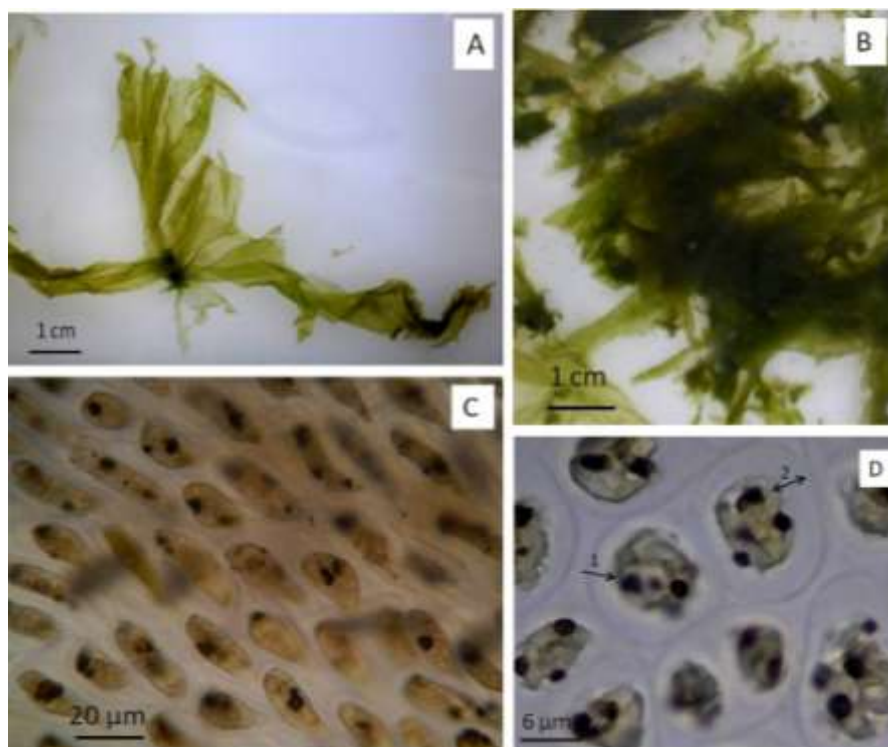


FIGURA 5: *Protomonostroma* sp. A: Aspecto geral do talo. B: Aspecto gelatinoso das plantas agregadas. C: Vista superficial das células basais alongadas. D: Vista superficial das células marginais poligonais; detalhe de um pirenóide (seta 1); detalhe do lúmen (seta 2).

Protomonostroma undulatum (Wittrock) K. L. Vinogradova
(Voucher: SP 427957)

Plantas monostromáticas de lâminas alongadas, em formato de fita ou lanceoladas (Figura 6A), atingindo até 13 cm de altura, e de 0,5 a 3 cm de largura. Lâminas verde claro quando isoladas com 3 ou 4 lâminas em mesmo apressório. Plantas com ciclo de vida heteromórfico aparentemente assexuado. Células vegetativas na diferenciação da lâmina em esporângio com liberação de esporos por fragmentação da área fértil da fronde e dissolução das paredes celulares. Esporos tetraflagelados das lâminas assentam e originam a fase codiolum, que também libera zoósporos tetraflagelados. Esses esporos germinam para formar um filamento que se desenvolve em uma lâmina sem um estágio saciforme (Guiry & Guiry, 2012). Células basais alongadas (Figura 6D) medindo $8,3\pm 3,8$ de largura e $36,6\pm 3,8$ μm de comprimento. Células marginais poligonais com tendências isodiamétricas, com $10,8\pm 3,8$ μm de comprimento. Lúmen (Figura 6C, seta) das células basais medindo 15 ± 5 μm , e marginais com $33,3\pm 15,2$ μm . A espessura do talo é de $44,1\pm 15,2$ μm na região marginal. Células com único cloroplasto parietal, um ou nenhum pirenóide visível superficialmente. A primeira citação para esta espécie foi feita por Vinogradova, K.L. (1969), e a espécie tipo do gênero *Protomonostroma* é *Protomonostroma undulatum* (Wittrock) K.L. Vinogradova.

Distribuição: Patagônia chilena e argentina. Atlântico Norte, Oceano Pacífico do Norte.

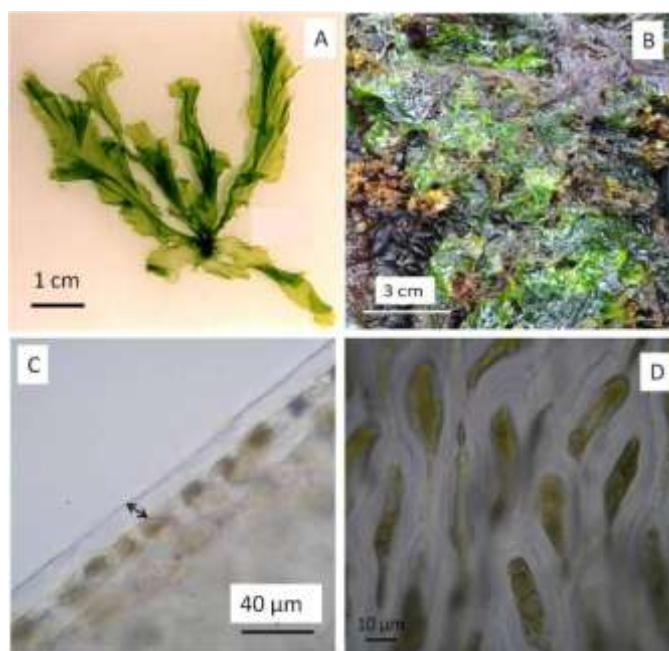


FIGURA 6: *P. undulatum*. A: Aspecto do talo. B: Aspecto das plantas no ambiente. C: Corte transversal mostrando uma camada de células; detalhe do lúmen celular (seta). D: Vista superficial das células basais alongadas.

Discussão

Este trabalho apresentou as principais características morfológicas de cinco espécies de clorófitas monostromáticas da ordem Ulotrichales distribuídas entre a Península Antártica e o Atlântico Sul: *Monostroma hariotii*, *Protomonostroma* sp., *Protomonostroma undulatum*, *Gayralia oxysperma* e *Gayralia brasiliensis*.

Monostroma e *Protomonostroma* são os dois gêneros do Complexo *Monostroma* que ocorrem na Antártica (Oliveira et al., 2009a). *M. hariotii*, coletada na Ilha Rei George, também foi encontrada em outras ilhas da Antártica Marítima, como Elefante, Nelson e Deception (Pellizzari et al. no prelo). Ramírez (2010), em estudo sobre levantamento da flora marinha bentônica da região sul da América do Sul e da Antártica, encontrou esta espécie nas Ilhas Malvinas e na Antártica. Há uma citação para a Patagônia argentina (Boraso de Zaixso et al. 2003), porém, a identificação não foi acompanhada de voucher depositado em herbário e tampouco de análises de biologia molecular, necessitando confirmação. Desta forma, a espécie continua com populações concentradas na Península Antártica, ilhas subantárticas e Antártica Marítima, continuando na categoria de endêmica para esta região.

A espécie do gênero *Protomonostroma* citada para a Península Antártica (Ilha Rei George) até recentemente era *P. undulatum*, a mesma espécie listada para a Patagônia chilena e argentina. Porém, estudos moleculares recentes demonstram uma sequência gênica distinta para a população da Patagônia e da Antártica (Oliveira et al. 2009b), sugerindo que a espécie da Antártica trata-se de um novo táxon, o qual está sendo descrito e possivelmente também endêmico desta região.

P. undulatum é uma espécie comum da Patagônia argentina e chilena (Santelices 1980; Boraso de Zaixso 2004), identificada até a década de 1990 como *Monostroma undulatum*. Esta espécie sazonal é comestível, possível de ser cultivada e forma bancos naturais em costões rochosos na costa da Patagônia (Boraso de Zaixso, 2004).

G. oxysperma, é uma espécie que ocorre em salinidades inferiores a 20 (Pellizzari et al. 2008) e ocorre, além do Paraná, em setores internos de estuários de Santa Catarina e no setor externo do Rio de La Plata, em Montevideo, no Uruguai (Pellizzari & Oliveira 2011). O ecossistema costeiro do Uruguai é afetado por variações sazonais e episódicas no escoamento do Rio de La Plata, o qual forma pluma de material particulado em suspensão de grande extensão, influenciado pela convergência subtropical formada pelas correntes quente do Brasil e fria das Malvinas (Coll & Oliveira 1999). Coll & Oliveira (1999), em estudo de levantamento da ficoflora marinha da região de Montevideo, concluíram que o Uruguai

possui uma flora marinha pobre e transicional, a qual inclui membros da flora subtropical do Brasil e a flora temperada da Argentina, junto com algumas espécies cosmopolitas.

As espécies de clorófitas monostromáticas previamente referidas para o litoral do Brasil foram *Ulvaria oxysperma* Kützing (Bliding), e *Monostroma oxyspermum* Kützing (Doty), de acordo com Joly (1965); Cordeiro-Marino et al. (1993); Braga (1997) e Braga et al. (1997). Pellizzari et al. (2008) estudaram a ontogenia e caracteres morfológicos de duas populações de clorófitas monostromáticas encontradas em manguezais e setores estuarinos do litoral do Paraná, e concluíram que ambas as populações apresentam distintas ontogenias do talo e que se tratavam possivelmente de duas espécies distintas de *Gayralia*. Recentemente, Pellizzari et al. (2013), através de sequenciamento genético, concluíram que uma das espécies em questão trata-se de um novo táxon, o qual foi descrito como *Gayralia*.

A distribuição dos táxons parece acompanhar as zonas transicionais de médias para altas latitudes, fato observado nas diferenças de termohalinas nos locais de coleta (Tabela 1). Foi possível mapear a ocorrência das clorófitas monostromáticas de acordo com a salinidade e a temperatura da água do mar entre zona subtropical, zona temperada e zona polar. *G. brasiliensis* e *G. oxysperma* são espécies ocorrentes em zonas subtropicais, do sul do Brasil até o Uruguai. Na zona temperada, Patagônia argentina e chilena, ocorre a espécie *P. undulatum*. Já na zona polar, Península Antártica, ocorrem as espécies *M. hariotii* e *Protomonostroma* sp.

O observatório Aquarius/SAC-D (NASA 2012), no ano de 2011, registrou salinidades da água do mar variando de 34 a 35 para a zona subtropical, 33 a 32 para a zona temperada e 30 a 32 para a região polar. Apesar disso, salinidades inferiores a 30 foram registradas (NASA 2012) para áreas com grande aporte de água doce, como é o caso do Rio de La Plata, no Uruguai e do escoamento continental e degelo na Patagônia chilena (Antezana, 1999). *G. oxysperma* habita setores internos de estuários e desembocaduras de rios, com salinidades em torno de 19, enquanto *G. brasiliensis* ocorre em setores externos de estuários e zonas costeiras com salinidade superiores a 26 (Pellizzari et al. 2008; Pellizzari & Oliveira 2011). *P. undulatum* ocorre em zonas entre marés e infralitoral raso da Patagônia argentina e chilena, com salinidades entre 25 e 35 (Boras de Zaixso, 2004). Esta distribuição foi observada no presente estudo, sendo que *G. oxysperma* foi encontrada em setores internos de estuários do Paraná (sul do Brasil) até desembocaduras de rios no estuário do Rio de La Plata, no Uruguai e *G. brasiliensis* foi encontrada em sistemas estuarinos ou em áreas costeiras protegidas na desembocadura da Baía de Guaratuba e nos setores externos do Complexo Estuarino de Paranaguá.

O satélite NOAA (NASA 2012), no ano de 2009, registrou temperaturas superficiais dos oceanos, sendo que, para o Oceano Atlântico, as temperaturas médias variaram entre 20 e 24°C na zona subtropical, 6,8 e 4°C na zona temperada e -1,8°C na zona polar, dados de acordo com os registrados no presente estudo.

A distribuição biogeográfica dos táxons foi marcada por estas diferenças na salinidade e na temperatura superficial da água do mar fazendo com que haja pouca diversificação da ficoflora marinha, dentre as clorófitas monostromáticas da Ordem Ulotrichales, entre as áreas estudadas.

A ficoflora da Antártica é distinta das regiões temperadas e tropicais, com alta biomassa (Zielinski, 1981) e alto grau de endemismo (Oliveira et al. 2009a), não apresentando alta diversidade como a das regiões mais quentes (Papenfuss, 1964). A Antártica esteve unida ao extremo sul da América do Sul desde o Mesozóico e sua separação ocorreu nos últimos 30 milhões de anos (Crame 1992; Clayton 1994). Esta separação isolou totalmente a Península Antártica, e as ilhas adjacentes da Antártica Marítima, da América do Sul, com a consequente evolução de uma flora marinha peculiar e adaptada a águas frias (Ramírez 2010). Esta teoria pode explicar o fato de que algumas espécies encontradas na região antártica e subantártica sejam endêmicas.

No presente trabalho, as espécies *M. hariotii* e *Protomonostroma* sp. foram registradas apenas para a Ilha Rei George (Antártica Marítima), sugerindo que estes táxons estão restritos e adaptados ao ecossistema polar em comparação com as outras espécies analisadas.

De acordo com Hommersand et al. (2009), a Antártica, as Ilhas Shetland do Sul, as Orcadas do Sul e a Georgia do Sul formam uma província biogeográfica, por incluir gêneros e espécies que estão distantes dos elementos florísticos presentes na Nova Zelândia e Tasmânia, África do Sul e Namíbia, o sul da América do Sul, ilhas Malvinas e outras ilhas subantárticas. Por outro lado, a alta similaridade (60%) encontrada por Ramírez (2010) entre a flora marinha das ilhas Malvinas com a flora da região da Patagônia chilena, pode ser consequência do número de espécies de origem subantártica compartilhada entre ambas as áreas, o qual a autora atribuiu à dispersão desta flora pela Corrente Circumpolar Antártica, o Vento de Deriva Oeste. O presente estudo, por sua vez, obteve resultados de acordo com Hommersand et al. (2009), pois as clorófitas monostromáticas estudadas ocupam latitudes e, assim, zonas biogeográficas distintas.

Além da descrição morfológica específica e da elucidação da distribuição das espécies entre o Atlântico Sul e a Península Antártica, este trabalho propôs uma chave artificial de identificação das clorófitas monostromáticas que ocorrem nestas localidades. A

relevância desta contribuição atribui-se a formação de uma base de dados sobre clorófitas monostromáticas da Ordem Ulotrichales entre o Atlântico Sul e a Antártica, auxiliando em futuros estudos taxonômicos, ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e de conservação.

Agradecimentos

As autoras agradecem ao PROANTAR, Marinha do Brasil (SECIRM, Navio Polar Almirante Maximiano-H41), FAB, MMA, MCTI e CNPq pelo apoio logístico e financeiro para as amostragens. À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos (PGISCO/UFPR) pela bolsa de estudos cedida. À Elzi Manoelle Silva e Michelle C. Silva pelo auxílio nas amostragens biológicas do Chile e Antártica Marítima.

Referências

- Ahn MJ; Yoon KD; Kim CY; Min SY; Kim Y; Kim HJ, Kim JH, Shin CG; Lee CK; Kim TG; Kim SH; Huh H & Kim J (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*. 14: 325–329, 2002.
- Antezana T (1999) Hydrographic features of Magellan and Fuegian inland passages and adjacent Subantarctic waters. *Scientia Marina*. 63: 23-34.
- Bazes A; Silkina A; Douzenel P; Faÿ F; Kervarec N; Morin D; Berge JP & Bourgougnon N (2009) Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology*. 21:395–403.
- Bhosale SH; Jagtap TG & Naik CG (1999) Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 147: 133–138.
- Boraso de Zaixso A; Rico A; Perales S; Perez L; Zalazar H (2003) *Algas Marinas de La Patagonia: una guía ilustrada*. UNPSJB – CONICET. Buenos Aires. pp. 67.
- Boraso de Zaixso A (2004) Chlorophyta marinas de La Argentina. *Historia Natural*. Vol III (11): 95-119. Buenos Aires.
- Braga MR; Fujii MT & Cordeiro-Marino M (1997) Monostromatic green algae (Ulvales, Chlorophyta) of São Paulo and Paraná states (Brazil): distribution, growth and reproduction. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo 20: 197-203.
- Braga MRA (1997) Recruitment of two species of monostromatic blade-like chlorophytes, *Monostroma* sp. and *Ulvaria oxysperma* (Ulvales, Chlorophyta), in São Paulo State, Brazil. *Phycological Research*. 45: 153-161.

Cassolato JEF; Nosedá MD; Pujol CA; Pellizzari FM; Damonte EB & Duarte MER (2008) Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydrate Research*. 343: 3085–3095.

Clayton M (1994) Evolution of the Antarctic marine benthic Algal flora. *Journal of Phycology*. 30: 897-904.

Coll J & Oliveira EC (1999) The benthic marine algae of Uruguay. *Botanica Marina*. Vol. 42, 1999, pp. 129-135.

Cordeiro-Marino M; Braga MRA; Fujii MT; Guimarães SMPB & Mitsugui EM (1993) Monostromatic green algae from Espírito Santo state: life - history, growth and reproduction in culture. *Revista Brasileira de Biologia*. 53:285-293.

Crame JA (1992) Evolutionary history of the Polar regions. *Historical Biology*. 6:37-60.

Folmer F; Jaspars M; Dicato M & Diederich M (2010) Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews*. 9:557–579.

Gain L (1911) Une nouvelle espèce de *Monostroma* provenant de la région antarctique sud-américaine. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences*. Paris. 152: 724-726.

Guiry MD & Guiry GM (2012) *AlgaeBase*. Listing the World's Algae. World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <www.algaebase.org>.

Hommersand MH; Moe RL; Amsler CD; Fredericq S (2009) Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. *Botanica Marina* 52:509-534

Joly AB (1965) Flora marinha do litoral norte de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências*. 21: 1-393.

NASA (2012) National Aeronautics and Space Administration http://www.nasa.gov/mission_pages/aquarius/multimedia/gallery/pia14786.html/. Acesso em 10 de novembro de 2012.

Oliveira EC; Pellizzari FM & Oliveira MC (2009a) The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island. *Antarctic Polar Biology* (32): 1639-1647.

Oliveira M, Oliveira EC, Pellizzari FM, Medeiros A, Miura RYH (2009b). What taxa of monostromatic green algae are present in the Southwestern Atlantic and in the Antarctic Peninsula? A panorama based on ribosomal internal transcribed spacers (ITS) sequences In: V th Asian Pacific Phyological Forum, Wellington, New Zealand.

Papenfuss G (1964) Catalogue and bibliography of Antarctic and Sub- Antarctic benthic marine algae. American Geophysical Union, Antarctic Research Series. 1:1–76.

Pellizzari FM (2005) Desenvolvimento das bases biológicas e técnicas para o cultivo de algas verdes de talo monostromático (Chlorophyta) no litoral do Paraná. Tese. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 202 p.

Pellizzari FM (2007) Cultivo de clorofíceas monostromáticas comestíveis no sul do Brasil: descrição, biologia, molecular da(s) espécie(s), estudo de potencial de mercado, recrutamento e crescimento em diferentes sistemas. Relatório técnico de Pós-doutorado – CNPq. 70p.

Pellizzari FM; Oliveira EC; Yokoya NS (2008) Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 20:75–82.

Pellizzari FM & Oliveira MC (2011) Primeira ocorrência da clorofícea monostromática *Gayralia oxysperma* (Lützing) K.L. Vinogradova ex Scagel et al. (Ulvales) para o Uruguai: descrição morfo-anatômica e sequenciamento molecular. In: Cavallet, LE Revista Científica da FAFIPAR/UNESPAR p.57-66 (ISSN: 2238-2372), publicação em meio eletrônico (CD).

Pellizzari FM & Reis RP (2011) Seaweed cultivation on the southern and southeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21:305-313.

Pellizzari, FM; Oliveira, MC; Yokoya, NY; Oliveira, EC (2013). *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from Brazil: an ontogenetic, morphological and molecular characterization. *Botanica Marina*. DOI: 10.1515/bot-2012-0197.

Ramírez ME (2010) Flora marina bentónica de la región austral de Sudamérica y La Antártica. *Anales Instituto Patagonia (Chile)*, 2010. 38(1):57-71

Raymundo MS, Horta PA & Fett R (2004). Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 40, n. 4.

Samee H; Li Z; Lin H; Khalid J & Guo Y (2009) Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10(2):147-153.

Santelices B (1980) Phytogeographic characterization of the temperate coast of Pacific South America. *Phycologia*. Vol. 19, No. 1, pp. 1-12. doi: <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-19-1-1.1>

Shanmughapriya S; Manilal A; Sujith S; Selvin J; Kiran GS & Natarajaseenivasan K (2008) Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*, 58 (3) 535-541.

Vinogradova KL (1969) K. sistematike poryadka Ulvales (Chlorophyta) s.l. *Botanicheskij Zhurnal SSSR* 54: 1347-1355, Scheme.

Wiencke C & Clayton MN (2002) Synopses of the Antarctic benthos (Ed. Wägele JW) Vol. 9 In: *Antarctic Seaweeds*. ARG Gantner Verlag KG Ruggell/Lichtenstein.

Yuan H; Song J; Li X; Li N & Liu S (2011) Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *Journal of Applied Phycology*. 23:59–65.

Zielinski K (1981) Benthic macro-algae of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands) and circulation of algal matter between the water and the shore. *Polish Polar Research*. 2:71–94.

Zubia M; Robledo D & Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19:449–458.

CAPÍTULO 2

Atividade antioxidante de clorófitas (Ulvophyceae) do Atlântico Sul e Península Antártica

Atividade antioxidante de clorófitas (Ulvophyceae) do Atlântico Sul e Península Antártica

Antioxidant activity of chlorophytes (Ulvophyceae) from South Atlantic and Antarctic Peninsula

Juliane Bernardi^{*1}, Cintia Lhullier², Thaise Gerber², Franciane Pellizzari³

¹ Universidade Federal do Paraná, Centro de Estudos do Mar. *julianebernardi@ufpr.br

² Universidade Federal de Santa Catarina

³ Universidade Estadual do Paraná, campus FAFIPAR

Revista Pretendida: Revista Brasileira de Farmacognosia (*Brazilian Journal of Pharmacognosy*), ISSN (0102-695X), Fator de impacto: 3,462, Qualis CAPES = Estrato B1.

Resumo

Seis espécies de clorófitas coletadas entre a Antártica Marítima (*Monostroma hariotii*, *Protomonostroma* sp. e *Ulva bulbosa*) e o Atlântico Sul (*Gayralia brasiliensis*, *Protomonostroma undulatum* e *Ulva fasciata*) foram testadas quanto a sua atividade antioxidante através do método de inibição do radical DPPH, quantificação de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais. Dentre as espécies analisadas, *Protomonostroma* sp. e *U. bulbosa* foram as que apresentaram maior potencial antioxidante pelo método do DPPH (77,9±2,8 e 53,1±15%, respectivamente) e maior concentração de compostos fenólicos por biomassa seca (176,1±6 e 144,7±8,9 µg EAG g⁻¹, respectivamente). Estas espécies foram coletadas na Ilha Rei George, Península Antártica, e seu potencial antioxidante pode estar relacionado à alta incidência de raios UV nesta região, condição que exige mecanismos de defesa eficazes dos organismos fotossintetizantes de altas latitudes. Além disso, todas as espécies apresentaram valores considerados elevados de compostos fenólicos (de 58,3±2 a 144,7±8,9 µg EAG g⁻¹), flavonóides (de 15±1,7 a 248,7±25,9 µg EQ g⁻¹) e carotenóides (de 23,4±0,2 a 51,5±0,1 µg β-caroteno g⁻¹), destacando-se *G. brasiliensis* pela elevada concentração de flavonóides. Estes compostos são conhecidos por atuarem como antioxidantes, sugerindo que as algas testadas podem apresentar elevado potencial antioxidante, mesmo que não evidenciado pelo método do DPPH. Sugere-se ainda que a atividade antioxidante esteja relacionada ao local onde estas macroalgas ocorrem e não à ordem ou grupo taxonômico a que elas pertencem, e ainda, que as clorófitas da Antártica podem ser fontes promissoras de compostos bioativos.

Palavras-chave: Antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, Ulvotrichales, Ulvales, Antártica.

Abstract

Six species of chlorophytes collected between Maritime Antarctic (*Monostroma hariatii*, *Protomonostroma* sp. and *Ulva bulbosa*) and Southern Atlantic (*Gayralia brasiliensis*, *Protomonostroma undulatum* and *Ulva fasciata*) were tested for their antioxidant activity through the DPPH radical scavenging method and through quantification of phenolic, flavonoids and carotenoids total contents. Among the evaluated species through the DPPH method, *Protomonostroma* sp. and *U. bulbosa* showed higher antioxidant potential (77.9 ± 2.8 and $53.1 \pm 15\%$, respectively) and higher phenolic content per dry biomass (176 ± 6 and $144.7 \pm 8.9 \mu\text{g EAG g}^{-1}$, respectively). This species were collected in Antarctic Peninsula, and their antioxidant potential may be related to the higher UV radiation in this region. Furthermore, all tested seaweeds showed considerably high values of phenolic (from 58.3 ± 2 to $144.7 \pm 8.9 \mu\text{g EAG g}^{-1}$), flavonoids (from 15 ± 1.7 to $248.7 \pm 25.9 \mu\text{g EQ g}^{-1}$) and carotenoids contents (from 23.4 ± 0.2 to $51.5 \pm 0.1 \mu\text{g } \beta\text{-carotene g}^{-1}$), standing out *G. brasiliensis* by the high flavonoids content. These compounds are known for acting as antioxidants, suggesting that the target seaweeds could have high antioxidant potential, although not shown by the DPPH method. We also suggest that the antioxidant activity could be associated with the occurrence area of the species instead that with order or taxonomic group that they belong. Antarctic chlorophytes might be promising source for bioactive compounds.

Keywords: Antioxidants, reactive oxygen species, Ulotrichales, Ulvales, Antarctic.

Introdução

Clorófitas monostromáticas da ordem Ulotrichales são macroalgas verdes de talo foliáceo, com apenas uma camada de células em corte transversal. *Monostroma*, *Protomonostroma* e *Gayralia* são gêneros amplamente distribuídos no Hemisfério Sul com biomassa concentrada entre o Atlântico Sul, Península Antártica e arquipélagos adjacentes. Estes ecossistemas apresentam condições físico-químicas variáveis e, no caso da Antártica, extremas. Por serem sésseis e fotossintetizantes estas algas estão expostas à intensa radiação ultravioleta (UV), herbivoria e incrustações. Desta forma, é possível que tenham desenvolvido estratégias de defesa através da produção de compostos químicos, associadas ao metabolismo secundário (Verpoorte, 2000; Hartmann, 2007).

O interesse pelo isolamento e caracterização química de metabólitos secundários é grande, uma vez que muitos destes compostos, conhecidos como produtos naturais (Maschek & Baker, 2008), apresentam atividade biológica contra envelhecimento precoce e patologias humanas. Um dos produtos naturais mais estudados e patenteados atualmente são os antioxidantes, os quais inibem ou previnem a oxidação de superfícies, como a pele, e protegem sistemas biológicos contra danos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Guaratini et al., 2007; Hwang et al., 2010).

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante em plantas terrestres (Hayase & Kato, 1984), e nas algas marinhas estão envolvidos principalmente na proteção contra a radiação UV, defesa anti-herbivoria, resistência a patógenos e defesa contra o crescimento de epífitas (Amsler & Fairhead, 2006). Além disso, as algas marinhas possuem aminoácidos do tipo micosporinas que são moléculas importantes na absorção de raios UV e supressores de ERO (Dunlap & Yamamoto, 1995). Segundo Shahidi & Naczki (2006) os compostos fenólicos podem ser divididos em seis subclasses baseado na sua estrutura química, sendo a maior delas a dos flavonóides.

Os flavonóides estão presentes nos organismos fotossintetizantes protegendo-os de danos produzidos por agentes oxidantes, como os raios UV e a poluição ambiental (Martínez-Flórez et al. 2002). Flavonóides são, portanto, compostos com atividade antioxidante. Outros compostos que possuem ação antioxidante são os carotenóides (Naguib, 2000), uma classe de pigmentos comuns em plantas e algas, os quais protegem as células contra as ERO (Olson, 1999).

Ecossistemas polares estão entre os mais extremos do planeta, e os organismos que habitam esses ambientes, inclusive as macroalgas, apresentam elevado nível de adaptabilidade

(Dummermuth, 2003). As macroalgas das regiões polares precisam tolerar baixas temperaturas, longos períodos de cobertura de gelo, escassez de iluminação durante o inverno e alta incidência solar durante o verão. Além disso, a depleção do ozônio estratosférico, o qual protege os organismos das radiações UV nocivas, ocorre principalmente sobre a Antártica, embora sazonalmente (Felício, 2007). Por estas razões, o interesse sobre as adaptações das macroalgas destas regiões em sintetizarem substâncias de defesa contra os elevados níveis de UV e a flutuação dos níveis de ozônio nos polos vem aumentando (Dummermuth, 2003).

Não há estudos sobre a ação antioxidante de compostos extraídos de algas verdes monostromáticas em ilhas da Antártica Marítima. Por outro lado, uma varredura da atividade antioxidante das enzimas de 30 fungos filamentosos associados às macroalgas, isolados na região Antártica (Ilha Livingston), foi realizado por Tosi et al. (2009) e elevada atividade (18 a 48 unidades de enzimas superoxidase por mg de proteína) foi registrada em seis espécies. Paudel et al. (2007) testaram a atividade antioxidante de cinco espécies de líquens da Ilha Rei George, através do método de inibição do radical DPPH, e duas espécies apresentaram elevada atividade (IC_{50} de 302,4 e 409,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Bhattarai et al. (2008) analisaram a atividade antioxidante de líquens polares pelo método do DPPH e encontraram de 33 a 50% dos principais compostos dos extratos testados com propriedades antioxidantes. Além destes, estudos da atividade antioxidante da gramínea *Deschampsia antarctica* (Zamora et al., 2010) foram realizados na Antártica.

Ortiz et al. (2009) avaliaram os valores nutricionais de algas chilenas (*Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* e *Macrocystis pyrifera*) e detectaram altas concentrações de macro e micronutrientes, corroborando o potencial nutricional e bioativo das algas testadas. Cruces et al. (2012) correlacionaram positivamente a atividade antioxidante de duas algas pardas subantárticas em resposta ao aumento da radiação UV. Raymundo et al. (2004) encontraram eficiência acima de 70% de atividade antioxidante em extratos das clorófitas *Enteromorpha intestinalis* e *Chaetomorpha antennina* coletadas no sul do Brasil. Sousa et al. (2008) testaram o potencial antioxidante em 32 espécies de macroalgas marinhas como fonte de α e β -caroteno, e α -tocoferol (vitamina E), obtendo maiores concentrações nas algas verdes, seguidas pelas pardas e vermelhas.

Devido à importância meteorológica da região Antártica, promovendo influência na circulação de massas de ar e de água em todo o Atlântico Sul, e da carência de estudos que avaliem compostos bioativos em macroalgas, em especial de clorófitas da Península Antártica e Atlântico Sul ocidental, este trabalho visou analisar a atividade antioxidante de duas espécies do Complexo *Monostroma* do Atlântico Sul (*Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.

Oliveira et N.S. Yokoya e *Protomonostroma undulatum* Wittrock K.L. Vinogradova), e duas espécies, também inseridas neste Complexo, endêmicas da Península Antártica (*Protomonostroma* sp. e *Monostroma hariotii* Gain).

Materiais e Métodos

Coletas

As amostragens dos exemplares macroalgais foram realizadas manualmente na região entremarés e ou infralitoral raso, por raspagem do substrato com auxílio de espátula. O material foi inicialmente lavado com água do mar do local e posteriormente com água destilada. Após assepsia das frondes o material foi triado para retirada de sedimentos e microorganismos associados, e congeladas para posterior análise. Na Tabela 1 estão listadas as espécies analisadas, o local e data de coleta e o número do voucher do depósito das espécies no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

TABELA 1: ESPÉCIES DE CLORÓFITAS MONOSTROMÁTICAS AMOSTRADAS, LOCAL DE COLETA, ZONA DE OCORRÊNCIA EQUIVALENTE, DADOS MÉDIOS DE TEMPERATURA E SALINIDADE E PERÍODO DE AMOSTRAGEM.

Espécie	Local	Coordenadas	Data	Voucher SP
<i>M. hariotii</i>	Botany Point, Antártica	62°04'49,57''S	Dez/2011	427954
	Marítima	58°18'35,13''W	Jan/2012	
<i>G. brasiliensis</i>	Baía de Guaratuba, Brasil	25°51'10,92''S	Set/2012	427960
		48°34'13,17''W		
<i>Protomonostroma</i> sp.	Punta Plaza, Antártica	62°05'25''S	Dez/2010	427956
	Marítima	58°24'56''W	Jan/2011	
<i>P. undulatum</i>	Fuerte Bulnes, Chile	53°37'44,22''S	Mar/2012	427957
		70°55'17,92''W		
<i>U. fasciata</i>	Matinhos, Brasil		Set/2012	427958
<i>U. bulbosa</i>	Punta Plaza, Antártica	62°05'25''S	Dez/2010	427959
	Marítima	58°24'56''W	Jan/2011	

Preparação dos extratos

Para obtenção dos extratos brutos das clorófitas, as algas foram descongeladas e secas em capela de exaustão, por ca. de 48h. Depois da secagem as algas foram trituradas com

nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana. Este material foi pesado e calculado o volume de solventes a serem adicionados, sendo que para cada 10 g de algas foram adicionados 50 ml de distintos solventes. A primeira extração foi realizada com Metanol PA, sendo que este solvente foi adicionado ao erlenmeyer com as algas trituradas, permanecendo refrigerado e em extração por dois dias para evitar a evaporação do solvente e a degradação dos metabólitos (ou constituintes químicos). Após este procedimento, o extrato foi filtrado com auxílio de funil de vidro e algodão. O solvente filtrado foi colocado em um becker para facilitar a evaporação, a qual foi feita em capela de exaustão. A fração de algas restantes no erlenmeyer sofreu nova extração com Diclorometano PA no mesmo volume utilizado para o Metanol. O uso desses solventes na preparação dos extratos seleciona dentre todas as substâncias presentes nas macroalgas aquelas com média polaridade ou apolares (lipofílicas). A segunda extração também foi realizada por 48h em câmara refrigerada. O extrato foi novamente filtrado e deixado evaporar por completo em capela de exaustão.

Ensaio para avaliação de Atividade Antioxidante

DPPH

O ensaio para verificar as propriedades antioxidantes em macroalgas utilizando-se a inibição do radical livre DPPH (2,2-difenil-picrilidrazila) foi descrito por Kim et al. (2002). Uma alíquota de 2,9 mL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida a 0,1 mL da amostra (em metanol 80%). Todos os extratos foram solubilizados com metanol 80% e avaliados em três concentrações diferentes (1,0; 0,5 e 0,16 mg mL⁻¹). O branco utilizado foi preparado com metanol 80%. O decréscimo da absorvância em 517 nm foi medido em espectrofotômetro de UV com leitor de microplaca após 30 minutos de incubação da amostra. A porcentagem de inibição, ou seja, a Atividade Antioxidante (AA) foi calculada através da equação: $\%AA = \{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})/Abs_{controle}\} \times 100$. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais dos extratos foi determinado a partir da metodologia descrita por Rhandir et al. (2002) e adaptada por Ramlov (2010). Soluções compostas por 3,16 mL de água destilada, 40 µL de amostra, 200 µL do reativo de

Folin-Ciocalteu e 600 μL de Na_2CO_3 (20% em água) foram agitadas e deixadas no escuro por 2 horas para posterior leitura a 750 nm. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (EAG). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em μg de EAG por g de massa seca.

Os níveis de flavonóides totais foram estimados segundo Ramlov (2010), sendo a solução composta por 2,5 mL de etanol, 0,5 mL do extrato e 0,5 mL de cloreto de alumínio (2% em metanol), lida no comprimento de onda de 420 nm. A quantificação dos flavonóides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (EQ). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em μg de EQ por g de massa seca.

Carotenóides

A quantificação de carotenóides, segundo Ramlov (2010), foi feita utilizando-se 3 mg de extrato bruto de cada amostra solubilizado em 3 mL de Hexano PA e lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Cada leitura foi realizada em triplicata e as médias das absorbâncias encontradas foram inseridas na equação de regressão obtida a partir da curva padrão de β -caroteno ($y = 0,0856x + 0,0074$; onde x são as médias e y são as concentrações). Os resultados foram expressos em μg de β -caroteno por g de massa seca.

Análises estatísticas

Para comparar a AA dos extratos das diferentes espécies de clorófitas foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) unifatorial, quando os pressupostos foram atendidos. Para tal, foi testada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Cochran, e a distribuição normal dos dados foi observada a partir do histograma. O teste post-hoc de Tukey foi utilizado quando os dados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Quando os pressupostos da ANOVA não foram atendidos, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram feitas no Software Statistica versão 07 (StatSoft 2004) e o gráfico confeccionado no Programa Microsoft Office Excel 2007.

Resultados

DPPH

Os valores médios de AA dos extratos de clorófitas monostromáticas nas três concentrações obtidos pelo método do DPPH estão apresentados na Tabela 2. Todos os resultados superiores a 60% foram considerados como potencial para a AA (Martins et al., 2012). As porcentagens de inibição do radical DPPH variaram de $3,5 \pm 2,1\%$ em *Ulva fasciata* a $77,9 \pm 2,8\%$ em *Protomonostroma* sp. A concentração de 1 mg mL^{-1} foi a que apresentou os resultados mais satisfatórios, sendo que a espécie *Protomonostroma* sp., coletada na Península Antártica, apresentou AA acima de 60% (Figura 1). As espécies *Protomonostroma undulatum*, *Gayralia brasiliensis*, *Monostroma hariatii* e *Ulva fasciata* não diferiram estatisticamente (Teste *post-hoc* de Tukey, $p < 0,05$), apresentando potencial antioxidante considerado baixo (Tabela 2). Por outro lado, os extratos de *Protomonostroma* sp. e *Ulva bulbosa* foram estatisticamente distintos entre elas e entre as demais espécies ($p < 0,05$).

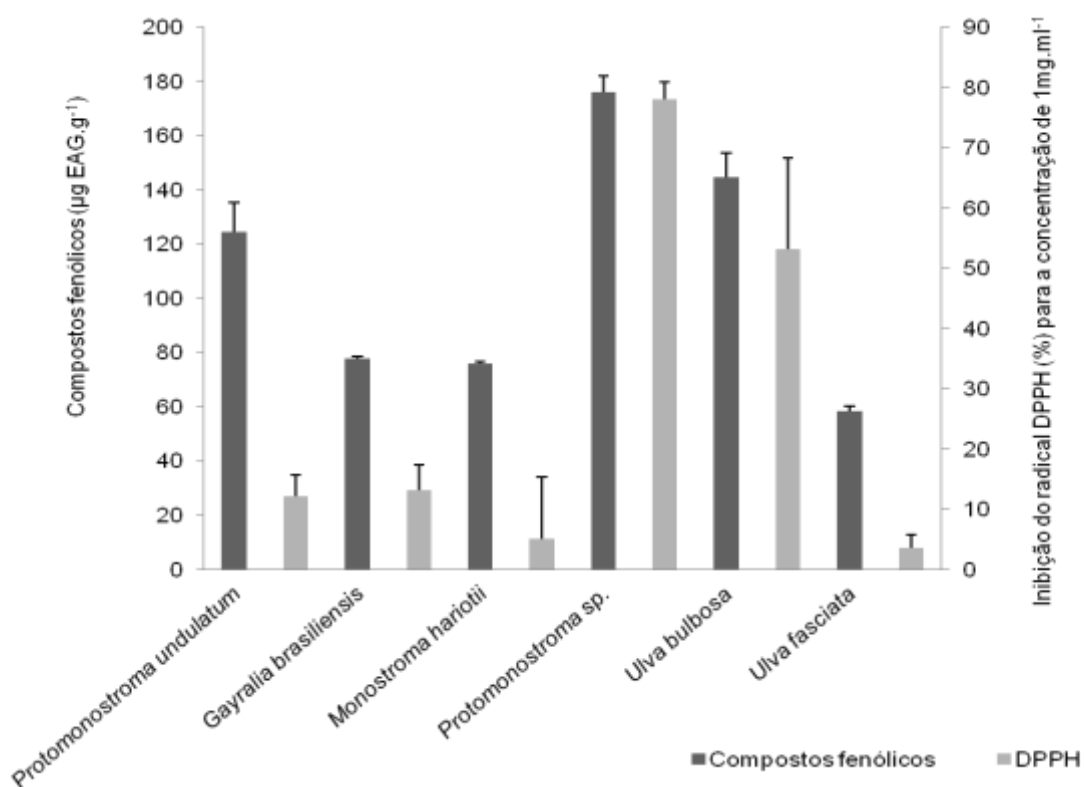


FIGURA 1: Conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos brutos de clorófitas da Península Antártica e Atlântico Sul, expressos em equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$) comparados com a porcentagem de inibição do radical DPPH para a concentração de 1 mg mL^{-1} (% AA). Os pontos correspondem aos valores das médias e as barras os desvios padrões ($n=3$).

Compostos Fenólicos e Flavonóides Totais

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios das concentrações de compostos fenólicos totais expressos em Equivalente de Ácido Gálico ($\mu\text{g EAG}$) detectados para as

espécies testadas. A menor concentração de compostos fenólicos foi obtida por *Ulva fasciata* ($58,3 \pm 2 \mu\text{g EAG g}^{-1}$), e a maior concentração foi obtida por *Ulva bulbosa* ($144,7 \pm 8,9 \mu\text{g EAG g}^{-1}$). Nesta análise a única comparação entre as variâncias interespecíficas que apresentou diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$) foi entre *Protomonostroma* sp. e *Ulva fasciata*. A Figura 1 apresenta os resultados comparativos para o conteúdo de compostos fenólicos juntamente com as porcentagens de inibição do radical DPPH na concentração de 1 mg mL^{-1} . Em geral, os compostos fenólicos acompanharam as taxas de inibição.

Os valores médios de flavonóides foram expressos em Equivalente de Quercetina (EQ) para os extratos brutos das clorófitas analisadas neste estudo (Tabela 1). Os valores encontrados variaram de $15 \pm 1,7 \mu\text{g EQ g}^{-1}$ em *Protomonostroma* sp. a $248,7 \pm 25,9 \mu\text{g EQ g}^{-1}$ em *Gayralia brasiliensis*. A comparação entre as variâncias destas espécies foi a única que apresentou diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). Isto ocorreu, possivelmente, devido à *Protomonostroma* sp. ter apresentado as menores concentrações de flavonóides e *G. brasiliensis* as maiores.

TABELA 2: Espécies de clorófitas, locais de amostragem, resultados da porcentagem de inibição do radical DPPH para diferentes concentrações dos extratos, concentração de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais dos extratos, visando avaliar a AA. Valores são expressos em média \pm desvio padrão.

Espécies	Locais	Inibição do radical DPPH (%)			Fenólicos Totais ($\mu\text{g EAG g}^{-1}$)	Flavonóides Totais ($\mu\text{g EQ g}^{-1}$)	Carotenóides Totais ($\mu\text{g } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$)
		1 mg mL^{-1}	$0,5 \text{ mg mL}^{-1}$	$0,16 \text{ mg mL}^{-1}$			
<i>Protomonostroma undulatum</i>	Chile	$12,1 \pm 3,5$	$10,7 \pm 2,9$	-	$124,5 \pm 10,8$	$136,5 \pm 8$	$25,2 \pm 0,6$
<i>Gayralia brasiliensis</i>	Brasil	$13,1 \pm 4,1$	$15,8 \pm 5,2$	-	$77,5 \pm 1,0$	$248,7 \pm 25,9$	$32,2 \pm 0,08$
<i>Monostroma hariotii</i>	Antártica	$5,1 \pm 10,2$	-	-	$75,7 \pm 0,8$	$115,4 \pm 5,6$	$36,3 \pm 0,2$
<i>Protomonostroma</i> sp.	Antártica	$77,9 \pm 2,8$	40 ± 6	14 ± 1	176 ± 6	$15 \pm 1,7$	$29,6 \pm 0,04$
<i>Ulva bulbosa</i>	Antártica	$53,1 \pm 15$	$38,9 \pm 3,4$	$8,4 \pm 2$	$144,7 \pm 8,9$	$139,4 \pm 32,1$	$51,5 \pm 0,1$
<i>Ulva fasciata</i>	Brasil	$3,5 \pm 2,1$	-	-	$58,3 \pm 2$	$33 \pm 2,4$	$23,4 \pm 0,2$

- Valores não detectáveis.

Carotenóides

Os valores médios encontrados para a concentração de carotenóides nas clorófitas analisadas, expressos em μg de β -caroteno por g de massa seca, estão apresentados na Tabela 1. Os valores variaram de $23,4 \pm 0,2 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$ em *Ulva fasciata* a $51,5 \pm 0,1 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$ em *Ulva bulbosa*, cuja comparação entre as variâncias diferiu significativamente (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). Dentre as espécies de clorófitas monostromáticas analisadas, a

que apresentou maior concentração de carotenóides foi *Gayralia brasiliensis*, com biomassa concentrada no litoral sul e sudeste do Brasil.

Discussão

As seis espécies de clorófitas coletadas entre a Antártica Marítima (*Monostroma hariatii*, *Protomonostroma* sp. e *Ulva bulbosa*) e o Atlântico Sul (*Gayralia brasiliensis*, *Protomonostroma undulatum* e *Ulva fasciata*) foram testadas quanto a sua AA através do método de inibição do radical DPPH, quantificação de compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides totais. As espécies com maiores potenciais antioxidantes foram *Protomonostroma* sp. e *U. bulbosa*, ambas coletadas na Ilha Rei George, Antártica Marítima. Este resultado sugere que a AA pode estar associada à área de ocorrência das espécies analisadas e não necessariamente à ordem ou grupo taxonômico que elas inserem-se.

Com base em resultado anteriormente descrito para o extrato de *Ginkgo biloba*, com 80% de AA (Martins et al., 2012), pode-se inferir que o extrato de *Protomonostroma* sp., espécie possivelmente endêmica da Península Antártica, possui elevada AA. Dummermuth (2003) quantificou a ação antioxidante em extratos de macroalgas marinhas do Ártico e as algas verdes foram as que apresentaram maiores AA comparadas com algas vermelhas e pardas, sendo a espécie *Monostroma grevillei* var. *arcticum* a de maior potencial.

A efetividade antioxidante de produtos naturais foi relacionada por diversos autores à presença de compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (Hayase & Kato, 1984). No presente estudo, a maior porcentagem de AA foi obtida pelo extrato metanólico da espécie *Protomonostroma* sp., cuja biomassa continha a maior concentração de compostos fenólicos totais, corroborando com os dados reportados em literatura. *U. bulbosa*, também coletada na Ilha Rei George, apresentou concentrações elevadas de compostos fenólicos, e foi a segunda espécie com maior AA.

Apesar de outras espécies apresentarem elevadas taxas de conteúdos fenólicos, como *P. undulatum* e *M. hariatii*, a efetividade antioxidante dos extratos metanólicos dessas espécies não apresentou resultados satisfatórios (<60% de inibição). Este resultado pode inferir distinções na composição química entre os compostos fenólicos das algas testadas, diferenças na solubilidade desses compostos pelo solvente utilizado ou, ainda, a influência na efetividade da AA presente nos extratos algais de outros compostos antioxidantes em associação, como os de carotenóides e flavonóides.

Estudando a variação sazonal na AA de *Ulva rigida*, Trigui et al. (2012) concluíram que a variação na atividade corresponde à variação observada no conteúdo total de compostos fenólicos. Os autores afirmam ainda que estas diferenças podem ser atribuídas às mudanças sazonais nos fatores abióticos como clima, salinidade, temperatura, nutrientes, poluição, epifitismo e também aos diferentes estágios metabólicos da planta.

Os flavonóides são compostos fenólicos encontrados nas folhas de plantas superiores, responsáveis pela fase dependente da luz na fotossíntese. Esses metabólitos secundários desempenham papel fundamental na proteção do vegetal contra raios UV e poluição (Martínez-Flórez et al., 2002). Apesar de vários estudos relatarem a ocorrência de flavonóides em macroalgas marinhas, alguns autores discutem a existência dessas substâncias em organismos marinhos. Dentre as espécies analisadas neste estudo, a que apresentou maior concentração de flavonóides foi *G. brasiliensis*.

As elevadas concentrações de flavonóides detectadas nos extratos brutos das clorófitas analisadas não correspondem aos baixos resultados de AA observados nas espécies. Este fato sugere que, possivelmente, os flavonóides não estão atuando como antioxidantes nas espécies analisadas. Um exemplo disto é o fato de que a espécie que apresentou maior potencial antioxidante pelo método do DPPH (*Protomonostroma* sp.) foi a que apresentou menor concentração de flavonóides. Desta forma, é possível que outras substâncias com propriedades antioxidantes atuem nesta espécie, e que os flavonóides devem ser responsáveis, neste caso, por outros mecanismos e ou atividades metabólicas.

Carotenóides são conhecidos por atuar como antioxidantes (Naguib, 2000). Sousa et al. (2008) encontraram α e β -caroteno em todas as espécies de algas verdes testadas. É amplamente documentado (Bendich & Olson, 1989; Grune et al., 2010) que vegetais verdes e amarelos contém elevadas concentrações de carotenóides, e.g. a cenoura ($33 \mu\text{g g}^{-1}$) e a abóbora ($53 \mu\text{g g}^{-1}$) (Rodrigues-Amaya et al., 2008). Dados na literatura relatam que espécies da clorófita *Enteromorpha* podem apresentar concentrações de β -caroteno superiores a de vegetais amarelo-esverdeados, com concentrações de até $250 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ito & Hori, 1989), corroborando as maiores concentrações encontradas em *Ulva* (previamente *Enteromorpha*) *bulbosa* coletada na Península Antártica. Com base nesses valores, pode-se inferir que, dentre as espécies analisadas, *U. bulbosa*, *M. hariatii* e *G. brasiliensis* apresentaram elevadas concentrações de carotenóides (Tabela 1).

Desta forma, a elevada AA verificada para a espécie *Protomonostroma* sp. parece estar relacionada mais à presença de compostos fenólicos e de carotenóides, do que da concentração de flavonóides. Tanto os compostos fenólicos quanto os carotenóides estão

diretamente relacionados à proteção contra raios UV nos vegetais e nas algas marinhas. Uma hipótese para o maior potencial antioxidante ter sido registrado em uma espécie da Antártica é que esta alga está mais exposta à radiação solar neste ambiente, durante o verão, produzindo concentrações superiores destas substâncias como mecanismo de defesa. *U. bulbosa*, também coletada na Península Antártica, foi a segunda espécie com maior AA.

Portanto, estes resultados sugerem que clorófitas da Antártica contém uma gama de constituintes químicos, principalmente compostos fenólicos e carotenóides, que podem efetivamente apresentar AA, e que estas concentrações são maiores quando comparadas a algas do mesmo grupo, coletadas em zonas temperadas ou subtropicais.

Este trabalho reporta em caráter inédito a AA de clorófitas Ulvophyceae do Brasil e da Antártica Marítima. O elevado potencial antioxidante da espécie *Protomonostroma* sp., possivelmente endêmica da Ilha Rei George, adjacente à Península Antártica, corrobora a relevância em elucidar a ação de compostos algais de altas latitudes como possível nova fonte de princípios ativos de ampla aplicação na indústria cosmética, nutracêutica e de fármacos pelo seu efeito anti-estresse oxidativo.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Marinha do Brasil (SECIRM, Navio Polar Almirante Maximiano - H41), FAB, MMA, MCTI e CNPq pelo apoio logístico e financiamento das amostragens. À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos (PGISCO/UFPR) pela concessão da bolsa de estudos. Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, coordenador do projeto “Biodiversidade, distribuição e histórico de vida de macroalgas e fungos algícolas associados ao monitoramento de indicadores abióticos, bioquímicos e microbiológicos na Península Antártica e arquipélagos adjacentes” (PROANTAR, Edital MCT/CNPq - Nº 23/2009). À Dra. Fernanda Ramlov (UFSC) e Msc. Cintia D. L. Martins (UFSC) pelo auxílio nas análises químicas e ao Prof. Dr. Paulo A. Horta pelo espaço cedido no Laboratório de Ficologia da UFSC.

Referências

Amsler CD & Fairhead VA 2006. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43:1–91.

Bendich A & Olson JA 1989. Biological actions of carotenoids. *The FASEB Journal*. Vol. 3: 1927-1932.

Bhattarai HD, Paudel B, Hong SG, Lee HK, Yim JH 2008. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica. *Journal of Natural Medicines*. 62: 481-484.

Cruces E, Huovinen P & Gómez I 2012. Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Marine Biology*. DOI 10.1007/s00227-012-2049-8.

Dummermuth A 2003. *Antioxidative properties of marine macroalgae from the Arctic*. Bremerhaven, Alemanha. Tese de Doutorado, Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research.

Dunlap WC & Yamamoto T 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine–glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B 112, 105–114.

Felício R 2007. Antártida. A geografia do continente gelado e as operações brasileiras. *Confins Revista Franco-Brasileira de Geografia*. Disponível em: <<http://confins.revues.org/122>>.

Guaratini T, Medeiros MHG & Colepicolo P 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*. Vol. 30, No. 1, 206-213.

Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin S, Biesalski HK 2010. *The Journal of Nutrition*. β-Carotene is an important vitamin A source for humans. DOI:10.3945/jn.109.119024.

Hartmann T 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.

Hayase F & Kato H 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.30, p.37-46.

Hwang PA, Wu CH, Gau SY, Chien SY, Hwang DF 2010. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from Seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *Journal of Marine Science and Technology*. Vol. 18, No. 1, pp. 41-46.

Ito K & Hori K 1989. Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International*, v.5, n.1, p.101- 144.

Kim YK, Guo Q & Packer L 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172: 149–156.

Martins CDL, Ramlov F, Carneiro NPN, Gestinari LM, Santos BF, Bento LM, Lhullier C, Gouvea L, Bastos E, Horta PA, Soares AR 2012. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s10811-012-9918-x.

Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. XVII (6) 271-278.

Maschek JA & Baker BJ 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. In: *Algal Chemical Ecology*. © 2008 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 322 p. 2008.

Naguib YMA 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1150- 1154.

Olson JA 1999. Carotenoids and human health. *Archivos Latino Americanos de Nutricion*, v. 49, p. 7S-11S.

Ortiz J, Uquiche E, Robert P, Romero N, Quiral V, Llantén C 2009. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Volume 111, Issue 4, pages 320–327.

Paudel B, Bhattarai HD, Lee JS, Hong SG, Shin HW, Yim JH 2008. Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*. 31:605–608.

Pellizzari FM, Oliveira MC, Yokoya NS, Oliveira EC (2013). *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from Brazil: an ontogenetic, morphological and molecular characterization. *Botanica Marina*. DOI 10.1515/bot-2012-0197.

Ramlov F, Souza JMC, Faria AVF, Maraschin M, Horta PA, Yokoya NS 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. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21 (2): 255-261.

Raymundo MS, Horta PA & Fett R 2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Brazilian Journal of Pharmacological Science*. Vol. 40, n. 4.

Randhir R; Preethi S & Kalidas S 2002. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry* 37: 1247-1256.

Rodrigues-Amaya DB, Kimura M, Amaya-Farfan J (autores); Coradin L & Pombo V B. (Orgs.) 2008. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: *Ministério do Meio Ambiente/ Secretaria de Biodiversidade e Florestas*, 100 p.

StatSoft Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em: <www.statsoft.com>.

Shahidi F & Naczk M 2006. Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC Press, London*, 566 p.

Sousa MB, Pires KMS, Alencar DB, Sampaio AH, Saker-Sampaio S 2008. α - e β -caroteno, e α -tocopherol em algas marinhas in natura. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*. Campinas, 28(4): 953-958.

Tosi S, Kostadinova N, Krumova E, Pashova S, Dishliiska V, Spassova B, Vassilev B, Angelova M 2010. Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica. *Polar Biology*. 33:1227–1237.

Trigui M, Gasmi L, Zouari I, Tounsi S 2012. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-012-9866-5

Verpoorte R 2000. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, 1ed. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, p. 1- 9.

Zamora P, Rasmussen S, Pardo A, Prieto H, Zúñiga GE 2010. Antioxidant responses of in vitro shoots of *Deschampsia antarctica* to Polyethylene glycol treatment. *Antarctic Science*. 22: 163-169.

ANEXO A**Protocolos metodológicos**

Cromatografia de Camada Delgada

Cromatografia é um método de análise na qual uma fase móvel passa por uma fase estacionária de tal forma que uma mistura de substâncias é separada em componentes. As substâncias ou misturas de substâncias a serem analisadas devem ser solúveis em um solvente ou em uma mistura de solventes (Deinstrop, 2007).

A análise de Cromatografia de Camada Delgada teve como principal objetivo determinar o perfil químico dos extratos obtidos. Num sistema onde a fase estacionária é polar (sílica) e a fase móvel é apolar, as substâncias mais apolares avançam mais rapidamente do que as substâncias mais polares, sendo possível então a identificação das suas polaridades. Esta diferença na velocidade resultará em uma separação dos componentes da amostra, dependendo dos grupos funcionais presentes na sua estrutura (COLLINS *et al.*, 2006). A partir das cores desenvolvidas e do fator de retenção (Rf) das bandas formadas pela eluição das cromatoplas, é possível inferir a quais classes químicas as substâncias presentes nos extratos pertencem.

Para verificar a presença dos pigmentos antioxidantes (clorofilas e carotenóides) nas amostras, foi utilizada a fase móvel apolar composta por uma mistura de 68 ml de Hexano e 32 ml de Acetato de Etila. A fase estacionária polar utilizada foi uma cromatoplasa de sílica gel/UV₂₅₄ e a análise foi feita em uma cuba cromatográfica de vidro fechada (Camag) para evitar a evaporação dos solventes.

Para analisar a presença de fenóis e ácidos fenólicos nas amostras, foi utilizada a fase móvel apolar composta por 45 ml de Clorofórmio e 5 ml de Ácido Acético. A fase estacionária foi a mesma utilizada para analisar clorofilas e carotenóides anteriormente. Para revelar a coloração na cromatoplasa, foi borrifado um revelador universal (Ce(SO₄)₂, H₂SO₄ e H₂O) com auxílio de algodão. A placa foi então aquecida com ar quente ($\pm 70^{\circ}\text{C}$) e as colorações correspondentes à presença de fenóis e ácidos fenólicos ficaram visíveis.

Ensaio de inibição do radical DPPH

O ensaio para verificar as propriedades antioxidantes em macroalgas utilizando-se DPPH (2,2-difenil-picrilidrazila radical livre) fundamenta-se na propriedade deste radical em extrair prótons de moléculas doadoras, através de reação de redução. O radical DPPH apresenta absorção no comprimento de onda de 517 nm no espectrofotômetro e, após reação com moléculas antioxidantes, esta absorção diminui, ou seja, é observada uma mudança na

coloração, de violeta intenso para amarelo claro (Molineux, 2003). Desta forma, com a adição do extrato das clorófitas alvo à solução de DPPH, esperou-se observar diminuição no espectro de absorção.



FIGURA 1: Esquema demonstrativo do processo de reação com o radical DPPH.

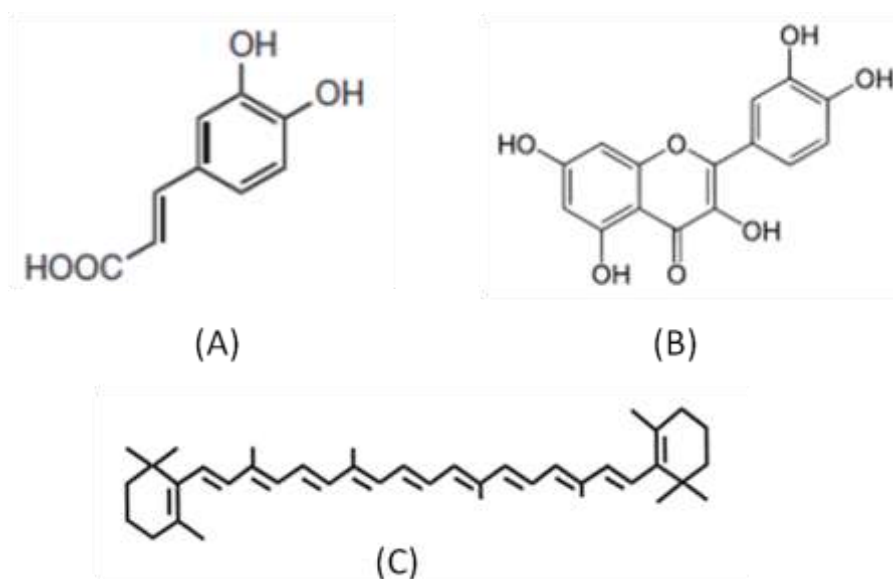


FIGURA 2: Estrutura química dos compostos analisados, (A) Fenólicos; (B) Flavonóides; (C) β -caroteno.

ANEXO B**Resultados não compilados**

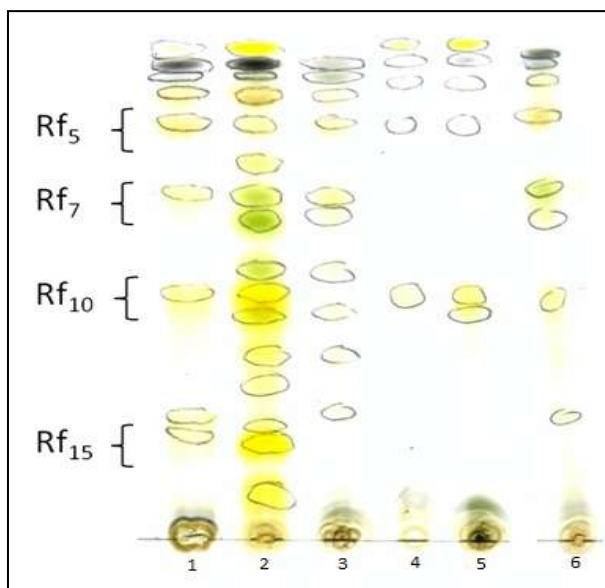


FIGURA 1: Cromatoplaca (eluída em hexano e acetato de etila 2:1) correspondente às algas *Protomonostroma undulatum* (1), *Gayralia brasiliensis* (2), *Monostroma hariotii* (3), *Protomonostroma* sp. (4), *Ulva bulbosa* (5) e *Ulva fasciata* (6). A coloração amarelada marcada com o Rf₅ é característica de presença de carotenóides. Estes pigmentos são mais apolares, por isso distanciaram-se mais do ponto de aplicação. A coloração esverdeada marcada nos Rfs 7 a 10 é característica da presença de clorofilas. A partir desta cromatoplaca, fica evidente a presença deste pigmento em todos os extratos testados, porém com maior intensidade nos extratos de *Gayralia brasiliensis* (Paraná) e *Protomonostroma undulatum* (Chile). Outras colorações (marrom e preta) foram observadas na cromatoplaca, as quais indicam a presença de outras substâncias não caracterizadas nestes extratos.

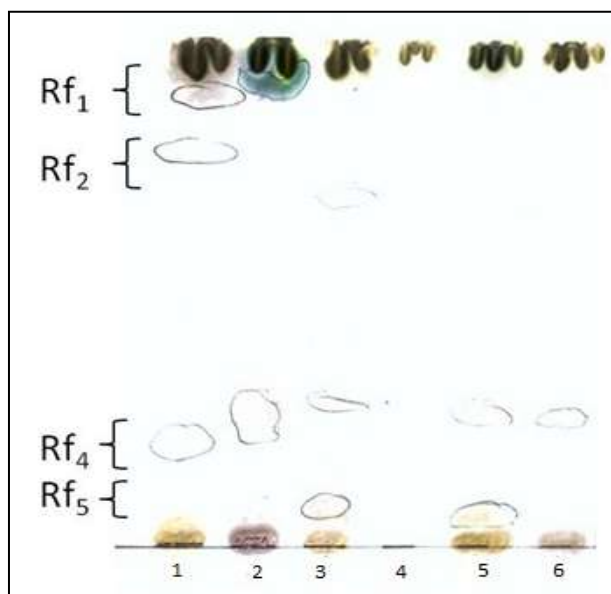


FIGURA 2: Cromatoplaca (eluída em CHCl₃ e AcOH 9:1) correspondente às algas *Protomonostroma undulatum* (1), *Gayralia brasiliensis* (2), *Monostroma hariotii* (3), *Protomonostroma* sp. (4), *Ulva bulbosa* (5) e *Ulva fasciata* (6). A visualização das colorações correspondentes a essas substâncias só foi possível com a aplicação de um solvente universal. Ainda assim, as colorações em tons de marrom não ficaram muito evidenciadas, sugerindo baixas concentrações (Rfs 1 a 5) e até mesmo ausência de fenóis e ácidos fenólicos nos extratos das macroalgas analisadas.

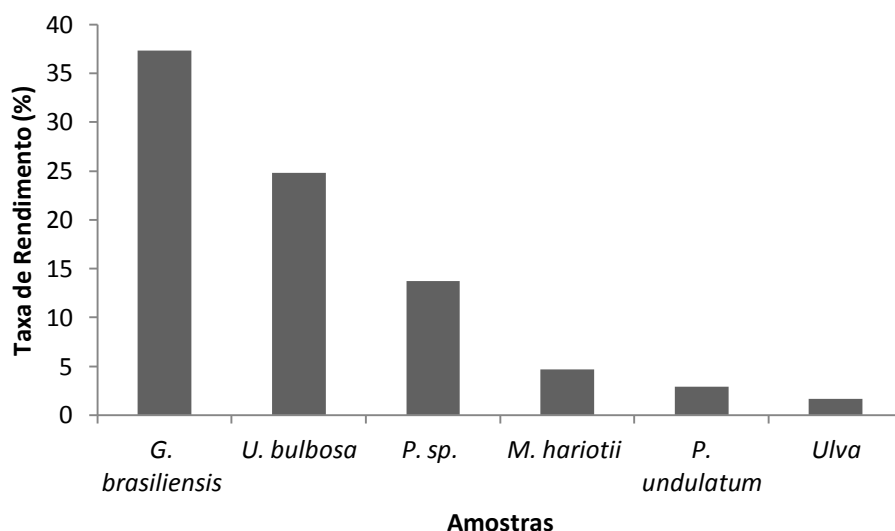


FIGURA 3: Taxa de Rendimento (%) dos extratos brutos de espécies de clorófitas analisadas, calculado a partir do peso inicial de amostra seca (massa inicial x rendimento = massa final x 100%). As espécies que obtiveram maiores rendimentos foram *G. brasiliensis* (37,3%), *Ulva bulbosa* (previamente reportada como *Enteromorpha bulbosa*) (24,7%) e *Protomonostroma* sp. (13,7%). Em estudo similar em Santa Catarina, Martins (2008) encontrou valores semelhantes em extratos de algas verdes, *Codium taylorii*, com 20%, *Codium decorticatum*, com 18,03% e *Caulerpa mexicana*, com 10% de rendimento. *M. hariotii* apresentou rendimento de 4,7%. As menores taxas de rendimento foram obtidas pelas espécies *Protomonostroma undulatum* e *Ulva fasciata*, com 2,8 e 1,6%.

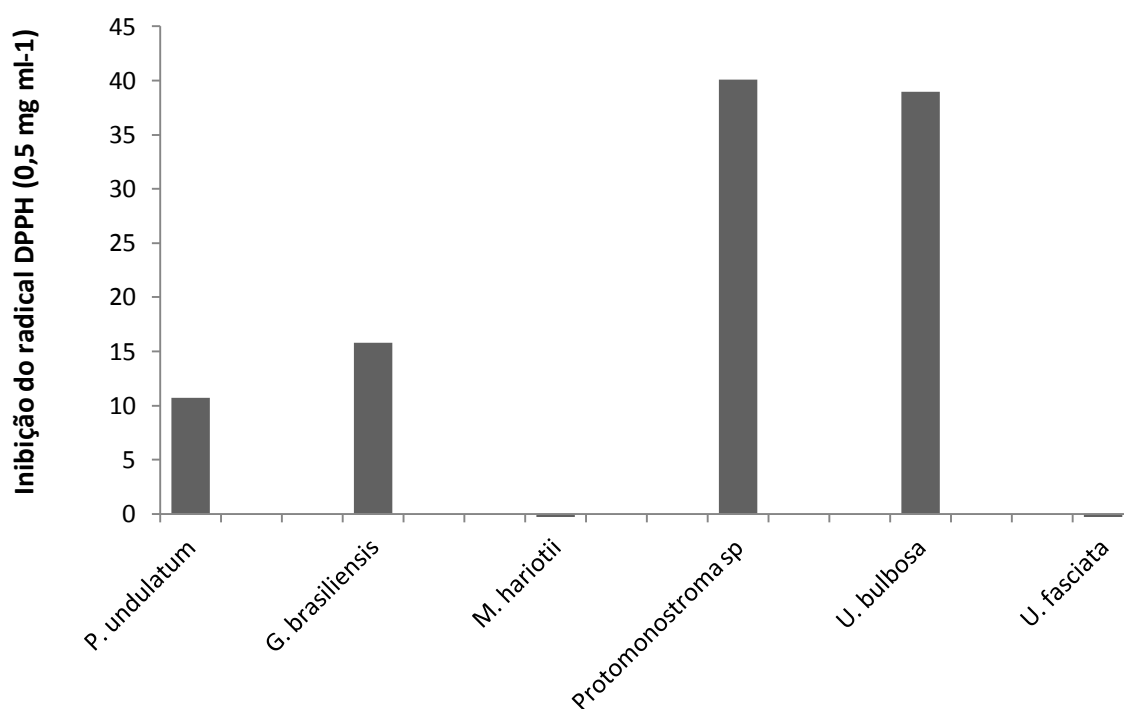


FIGURA 4: Valores médios de Atividade Antioxidante (AA) dos extratos de clorófitas monostromáticas na concentração de 0,5 mg/ml dados em porcentagem de inibição pelo método do DPPH. Os valores com letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

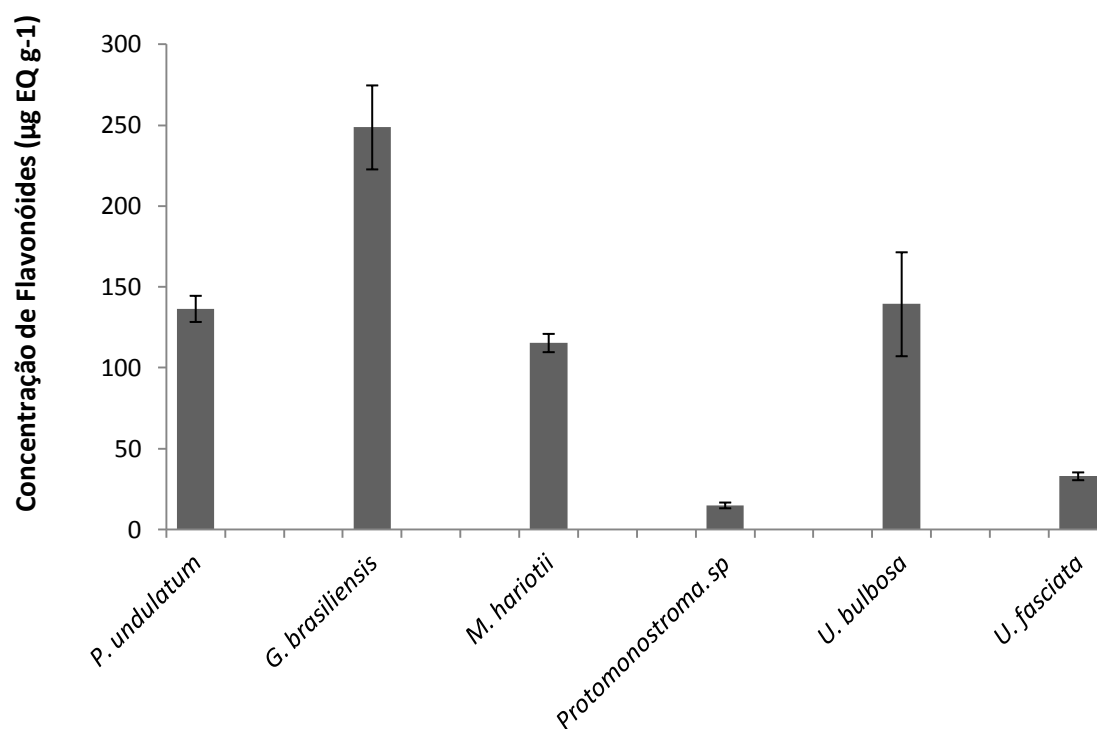


FIGURA 5: Valores médios e DP de concentração de flavonóides expressos em µg do equivalente em quercetina (EQ) por g dos extratos brutos de clorófitas marinhas coletadas na Península Antártica e Atlântico Sul.

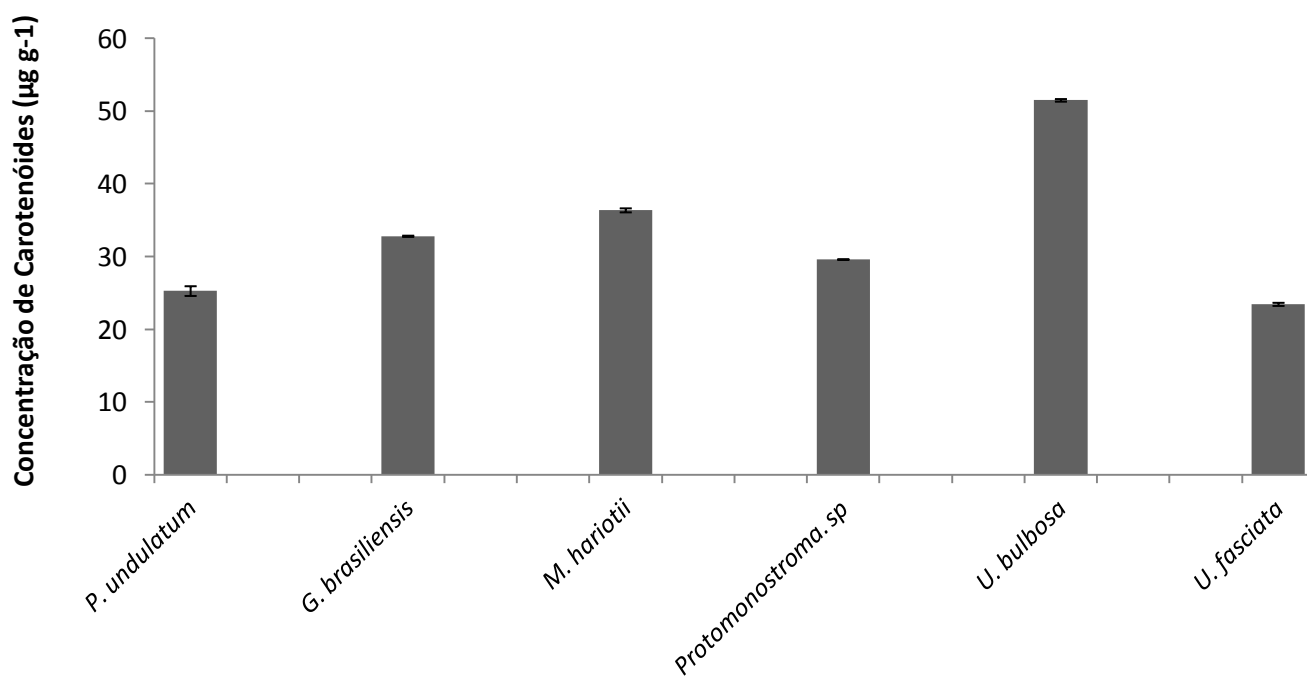


FIGURA 6: Valores médios \pm DP da concentração de carotenoides nos extratos brutos de clorófitas marinhas coletadas na Península Antártica e Atlântico Sul. Os valores do eixo vertical são expressos em µg de carotenoides por g de extrato bruto seco.

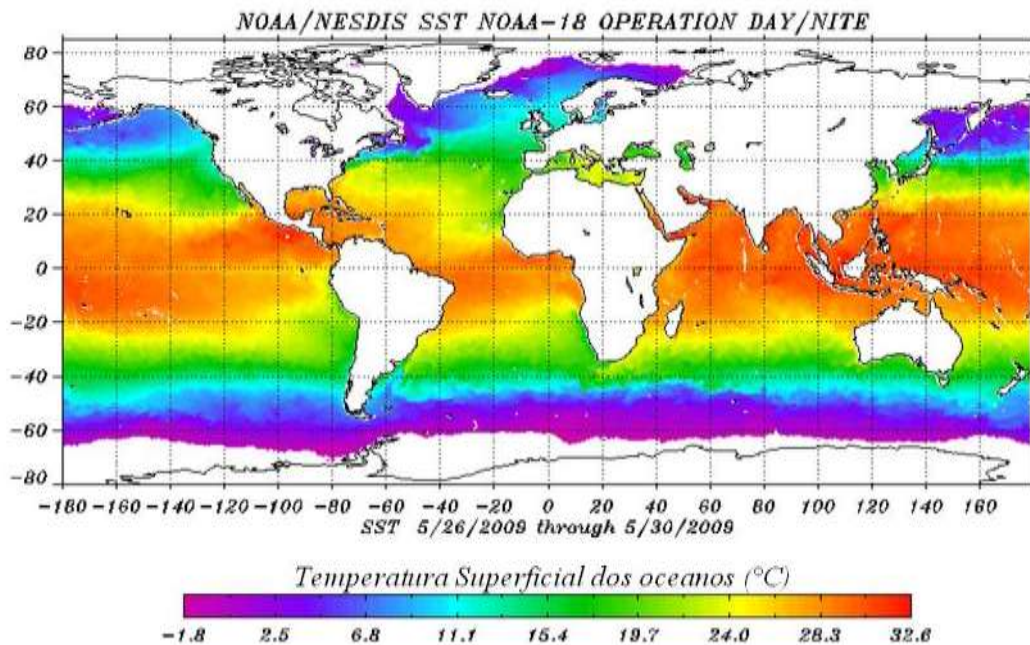


FIGURA 7: Imagem do satélite NOAA (NASA 2012), no ano de 2009. Registro das temperaturas médias superficiais dos oceanos, sendo que, para o Oceano Atlântico, as temperaturas médias variaram entre 20 e 24°C na zona subtropical, 6,8 e 4°C na zona temperada e -1,8°C na zona polar. O mapeamento latitudinal das clorófitas acompanhou a divisão em três zonas, de acordo com a salinidade e a temperatura, sendo elas: zona subtropical (Brasil), zona temperada (Chile) e zona polar (Península Antártica).

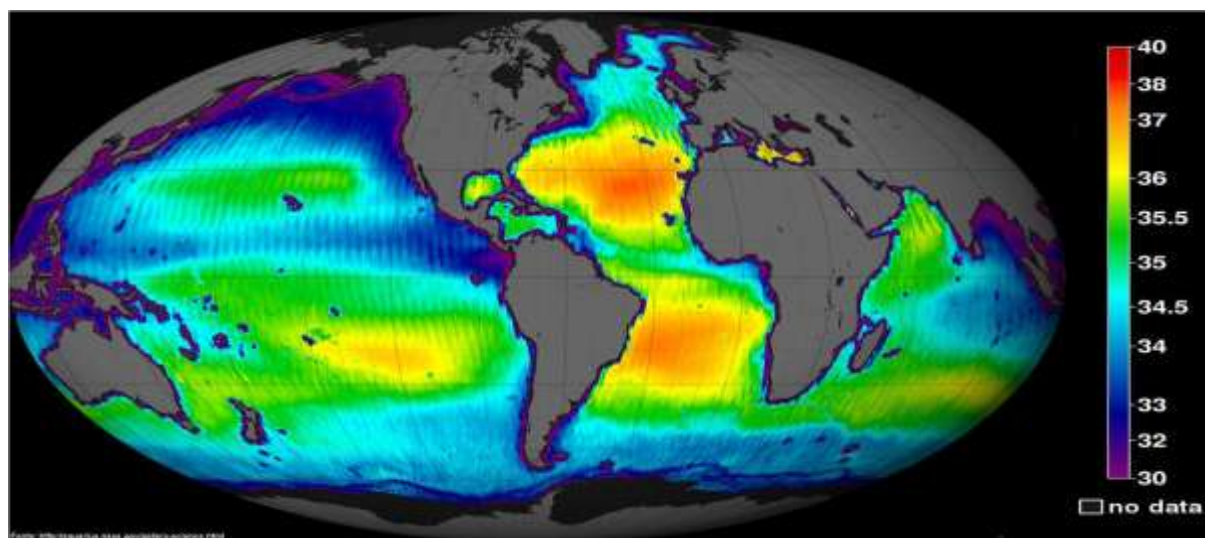


FIGURA 8: Imagem do observatório Aquarius/SAC-D (NASA 2012), no ano de 2012. Registro das salinidades médias da superfície da água do mar, variando de 34 a 35 para a zona subtropical, 33 a 32 para a zona temperada e 30 a 32 para a região polar. O mapeamento latitudinal das clorófitas acompanhou a divisão em três zonas, de acordo com a salinidade e a temperatura, sendo elas: zona subtropical (Brasil), zona temperada (Chile) e zona polar (Península Antártica).

TABELA 1: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) UNIFATORIAL PARA A ANÁLISE DE DPPH NA CONCENTRAÇÃO DE 1mg/ml DE EXTRATOS DE CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Efeito	SS	Grau de liberdade	MQ	F	<i>p</i>
Intercept	13625,60	1	13625,60	217,2935	0,000000
Amostras	14160,71	5	2832,14	45,1654	0,000000
Erro	752,47	12	62,71		

Diferenças significativas: $p < 0,05$.

TABELA 2: RESULTADOS DO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY PARA A ANÁLISE DE DPPH NA CONCENTRAÇÃO DE 1mg/ml DE EXTRATOS DE CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as médias de cada espécie (Tukey) para a análise de DPPH (1 mg/ml)	<i>p</i>
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	0,999983
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	0,880190
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000159
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000527
<i>P. undulatum</i> - <i>Ulva</i>	0,766628
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	0,811223
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000160
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000629
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Ulva</i>	0,680564
<i>M. hariatii</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000159
<i>M. hariatii</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000229
<i>M. hariatii</i> – <i>U. fasciata</i>	0,999848
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	0,022298
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	0,000159
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	0,000208

Diferenças significativas: $p < 0,05$.

TABELA 3: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) UNIFATORIAL PARA A ANÁLISE DE DPPH NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg/ml DE EXTRATOS DE CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Efeito	SS	Grau de liberdade	MQ	F	p
Intercept	5076,481	1	5076,481	290,0575	0,000000
Amostras	5428,239	5	1085,648	62,0312	0,000000
Erro	210,020	12	17,502		

Diferenças significativas: $p < 0,05$.

TABELA 4: RESULTADOS DO TESTE *POST-HOC* DE TUKEY PARA A ANÁLISE DE DPPH NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg/ml DE EXTRATOS DE CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as médias de cada espécie (Tukey) para a análise de DPPH (0,5 mg/ml)	p
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	0,678185
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	0,021321
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000168
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000175
<i>P. undulatum</i> - <i>U. fasciata</i>	0,022700
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	0,001950
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000273
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000348
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. fasciata</i>	0,002059
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,000159
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000159
<i>M. hariatii</i> - <i>U. fasciata</i>	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	0,999479
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	0,000159
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	0,000159

Diferenças significativas: $p < 0,05$.

TABELA 5: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NÃO PARAMÉTRICA DE KRUSKALL-WALLIS PARA A ANÁLISE DE DPPH NA CONCENTRAÇÃO DE 0,16 mg/ml DE EXTRATOS DE CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as variâncias de cada espécie (Kruskall-Wallis) para a análise de DPPH (0,16 mg/ml)	Z calculado	p
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	1,147079	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	1,911798	0,838532
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	1,529438	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,841191	1,000000
<i>P. undulatum</i> - <i>U. fasciata</i>	0,458831	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	0,764719	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	2,676517	0,111588
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	1,988270	0,701728
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. fasciata</i>	0,688247	1,000000
<i>M. hariatii</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	3,441236	0,008686
<i>M. hariatii</i> – <i>U. bulbosa</i>	2,752989	0,088581
<i>M. hariatii</i> - <i>U. fasciata</i>	1,452966	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	0,688247	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	1,988270	0,701728
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	1,300022	1,000000

H (5, N= 18) =16,05067 p =,0067

TABELA 6: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NÃO PARAMÉTRICA DE KRUSKALL-WALLIS PARA A CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as variâncias de cada espécie (Kruskall-Wallis) para a análise de Compostos Fenólicos.	Z calculado	p
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	0,764719	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	1,376494	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	44757828	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,611775	1,000000
<i>P. undulatum</i> - <i>U. fasciata</i>	2,102978	0,532016
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	0,611775	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	2,102978	0,532016
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	1,376494	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. fasciata</i>	1,338258	0,584212
<i>M. hariatii</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	2,714753	0,099488
<i>M. hariatii</i> – <i>U. bulbosa</i>	1,988270	0,701728
<i>M. hariatii</i> - <i>U. fasciata</i>	0,726483	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	0,726483	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	3,441236	0,008686
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	2,714753	0,099488

H (5, N= 18) =16,44801 p =,0057

TABELA 7: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NÃO PARAMÉTRICA DE KRUSKALL-WALLIS PARA A CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS EM CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as variâncias de cada espécie (Kruskall-Wallis) para a análise de Flavonoides Totais	Z calculado	p
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	1,147079	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	0,688247	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	2,294157	0,326722
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,000000	1,000000
<i>P. undulatum</i> - <i>U. fasciata</i>	1,605910	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	1,835326	0,996861
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	3,441236	0,008686
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	1,147079	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. fasciata</i>	2,752989	0,088581
<i>M. hariatii</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	1,605910	1,000000
<i>M. hariatii</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,688247	1,000000
<i>M. hariatii</i> - <i>U. fasciata</i>	0,917663	1,000000
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	2,294157	0,326722
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	0,688247	1,000000
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	1,605910	1,000000

H (5, N= 18) =15,31579 p =,0091

TABELA 8: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA NÃO PARAMÉTRICA DE KRUSKALL-WALLIS PARA A CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM CLORÓFITAS MARINHAS DA PENÍNSULA ANTÁRTICA E ATLÂNTICO SUL.

Comparação entre as variâncias de cada espécie (Kruskall-Wallis) para a análise de Carotenoides	Z calculado	p
<i>P. undulatum</i> – <i>G. brasiliensis</i>	1,376494	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>M. hariatii</i>	2,064742	0,584212
<i>P. undulatum</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,688247	1,000000
<i>P. undulatum</i> – <i>U. bulbosa</i>	2,752989	0,088581
<i>P. undulatum</i> - <i>U. fasciata</i>	0,688247	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>M. hariatii</i>	0,688247	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	0,688247	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. bulbosa</i>	1,376494	1,000000
<i>G. brasiliensis</i> – <i>U. fasciata</i>	2,064742	0,584212
<i>M. hariatii</i> – <i>Protomonostroma</i> sp.	1,376494	1,000000
<i>M. hariatii</i> – <i>U. bulbosa</i>	0,688247	1,000000
<i>M. hariatii</i> - <i>U. fasciata</i>	2,752989	0,088581
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. bulbosa</i>	2,064742	0,584212
<i>Protomonostroma</i> sp. – <i>U. fasciata</i>	1,376494	1,000000
<i>U. bulbosa</i> - <i>U. fasciata</i>	3,441236	0,008686

H (5, N = 18) = 16,59607 p = 0,0053