

RODOLFO JOSÉ TÓFOLI

**AVALIAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E COMPOSIÇÃO MINERAL DE
EXTRATOS PROVENIENTES DE DUAS MACROALGAS LÓTICAS DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

ASSIS

2017

RODOLFO JOSÉ TÓFOLI

**AVALIAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E COMPOSIÇÃO MINERAL DE
EXTRATOS PROVENIENTES DE DUAS MACROALGAS LÓTICAS DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientadora: Ivanise Guilherme Branco

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

T644a Tófoli, Rodolfo José
Avaliação de biocompostos e composição numeral
de extratos provenientes de duas macroalgas lólicas do
estado de São Paulo / Rodolfo José Tófoli. Assis, 2017.
58 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e
Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Dr^a Ivanise Guilherme Branco

1. Alga verde. 2. Solventes. 3. Fenóis. 4. Antioxidan-
te. 5. Carotenoides. I. Título.

CDD 589.3

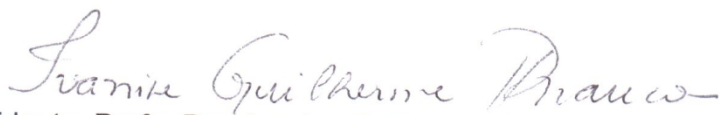
Rodolfo Jose Tofoli

AVALIAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E COMPOSIÇÃO MINERAL
DE EXTRATOS PROVENIENTES DE DUAS MACROALGAS
LÓTICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP/Assis para a
obtenção do título de Mestrado Acadêmico em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 09/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Profa. Dra. Ivanise Guilherme Branco - UNESP/ASSIS



Membros: Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña - UFGD/DOURADOS



Profa. Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer - UNESP/ASSIS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre me abençoou, aos meus pais, minha namorada, familiares e amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram, para que eu nunca desistisse dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais esta etapa concluída, e por todas as bênçãos em minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Ivanise Guilherme Branco e ao Prof. Dr. Ciro Cézar Zanini Branco, por me acolherem no programa, pela orientação, ensinamentos e pelo constante estímulo transmitido durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço a Universidade do Estado de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biociências, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Bioprocessos e de Química, por ceder espaço para que as análises fossem realizadas, bem como aos técnicos e estagiários pela colaboração.

A banca examinadora, Prof. Dr. Eutímio Gustavo Fernández Núñez, Profa. Dra. Cassia Roberta Malacrida Mayer, Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña, pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os amigos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos meus pais, Edlene C. da S. Tófoli e Carlos A. Tófoli, por toda dedicação e empenho, servindo de exemplo para minha formação pessoal e profissional, sempre buscando o melhor para mim.

Ao meu irmão Ricardo José Tófoli, por todo apoio e por dividir comigo a família que Deus nos proporcionou.

A minha namorada Adriana Luiza Ferreira, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando, me fortalecendo durante toda a caminhada, e por fazer parte da minha vida, da minha história.

A minha cunhada, Ana Paula e meu cunhado, Eduardo pelo apoio e conselhos para execução deste trabalho, bem como minha sogra Neusa, por todo incentivo.

“Faz-me saber os teus caminhos, Senhor; ensina-me as tuas veredas. Guia-me na tua verdade, e ensina-me, pois tu és o Deus da minha salvação; por ti estou esperando todo o dia.”

Salmos (25: 4-5)

TÓFOLI, Rodolfo José. **AVALIAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS E COMPOSIÇÃO MINERAL DE EXTRATOS PROVENIENTES DE DUAS MACROALGAS LÓTICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

RESUMO

No Brasil, há uma grande biodiversidade de espécies de algas lótic, Dentre as mais conhecida, encontradas em rios e riachos da região sudeste do estado de São Paulo destaca-se a *Oedogonium sp.* e a *Nitella microcarpa var. wrightii.*, dois gêneros de algas verdes. Entretanto, estudos de caracterização química de extratos destas algas ainda são inexistentes. Por esse motivo destaca-se a importância deste trabalho, o qual encontra-se subdividido em dois estudos. O primeiro teve por objetivo avaliar e quantificar compostos fenólicos e capacidade antioxidante de extratos de diferentes solventes da alga *Oedogonium sp.* Utilizou-se um delineamento experimental de mistura para determinar a influência dos solventes e verificou-se qual desses apresentou melhor rendimento na extração desses compostos da alga em pó. O segundo estudo teve por objetivo realizar a caracterização de duas macroalgas verdes: *Nitella microcarpa var. wrightii.*, e *Oedogonium sp.*, através da obtenção de um extrato, com o melhor sistema de solventes obtidos no primeiro estudo. Desta forma, foi possível quantificar quanto a presença de minerais, flavonoides, umidade, carotenoides, compostos fenólicos e capacidade antioxidante. No primeiro estudo, os resultados sugeriram que a mistura acetona-etanol apresentou melhor rendimento de extração tanto para compostos fenólicos como à capacidade antioxidante. No segundo estudo, a alga *Oedogonium sp.* destacou-se por apresentar uma grande quantidade de carotenoides totais. Já a espécie *Nitella microcarpa var. wrightii.*, obteve altos valores de minerais.

Palavras-chave: Alga lótica. Delineamento experimental. Mistura de solventes.

Oedogonium sp. Nitella microcarpa var. wrightii.

TÓFOLI, Rodolfo José. **EVALUATION OF COMPOUNDS AND MINERAL COMPOSITION OF EXTRACTS FROM TWO FRESHWATER MACROALGAE OF THE STATE OF SÃO PAULO**. 2017. 58 s. Dissertation (Master's Degree in Biosciences) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Assis 2017.

ABSTRACT

In Brazil, there is a great biodiversity of lotic algae species. Among the most well known species found in rivers and streams in the southeast region of the state of São Paulo is *Oedogonium sp.* and *Nitella microcarpa var. Wrightii*, Two genus of green algae. However, studies of chemical characterization of extracts of these algae are still non existent. For this reason the importance of this work is highlighted, which is subdivided in two studies. The first one had the objective to evaluate and quantify phenolic compounds and antioxidant capacity of extracts of different solvents of the algae *Oedogonium sp.* An experimental design of the mixture was used to determine the influence of the solvents and it was verified which of them presented better yield in the extraction of these compounds from the powdered seaweed. The second study aimed to characterize two green macroalgae: *Nitella microcarpa var. Wrightii*, and *Oedogonium sp.*, by obtaining an extract, with the best solvent system obtained in the first study. In this way, it was possible to quantify the presence of minerals, flavonoids, moisture, carotenoids, phenolic compounds and antioxidant capacity. In the first study, the results suggested that the acetone-ethanol-water mixture had a better extraction yield for both phenolic compounds and antioxidant capacity. In the second study, the alga *Oedogonium sp.* was characterized by a large amount of total carotenoids. The other alga, of the species *Nitella microcarpa var. Wrightii*, has achieved high mineral values.

Keywords: Freshwater algae. Experimental design. Mixture of solvents. *Oedogonium sp.* *Nitella microcarpa var. Wrightii*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REFERÊNCIAS.....	16
Capítulo 1. Impacto do sistema de solventes no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos provenientes da alga verde <i>Oedogonium sp.</i>.....	
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1 Introdução.....	20
2 Material e Método	22
2.1 Reagentes químicos.....	22
2.2 Coleta de macroalga e preparo das amostras	22
2.3 Obtenção dos extratos	23
2.4. Compostos Fenólicos Totais	23
2.5. Atividade Antioxidante	24
2.6 Design experimental.....	24
2.7 Análise Estatística.....	25
3 Resultados e discussão.....	26
Tabela 1. Composição do sistema de solventes e correspondentes valores das respostas dos extratos derivados, observadas no delineamento experimental de mistura simplex-centroide.....	26
Tabela 2. ANOVA para o efeito de metanol (M), etanol (E) e acetona (A) sobre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante utilizando modelo especial cúbico.....	28
Figura 1. Superfície de resposta do modelo cubico relativo ao efeito dos solventes sobre os compostos fenólicos.	30
Figura 2. Superfície de resposta do modelo relativo ao efeito dos solventes sobre capacidade antioxidante.....	31
4 Conclusão	33
Referências	34

Capitulo 2. Estudo comparativo da composição química de extratos provenientes de duas macroalgas verdes <i>Oedogonium sp.</i> e <i>Nitella microcarpa var. wrightii</i>.	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 Introdução	40
2 Material e Método	43
2.1 Reagentes químicos	43
2.2 Coleta de macroalga e preparo das amostras	43
2.3 Obtenção dos extratos	44
2.4 Compostos Fenólicos Totais	44
2.5 Atividade antioxidante	45
2.6 Carotenoides totais	45
2.7 Determinação de flavonoides totais	46
2.8 Minerais	46
2.9 Umidade	47
3 Resultados e Discussão	47
3.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante	47
Tabela 1. Teor de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides totais, capacidade antioxidante e umidade dos pós de algas <i>Oedogonium sp.</i> e <i>Nitella microcarpa var. wrightii</i> .	49
3.2 Teor de minerais	50
Tabela 2. Quantificação de minerais das macroalgas <i>Nitella microcarpa var. wrightii</i> e <i>Oedogonium sp.</i>	50
4 Conclusão	53
Referências	54
CONCLUSÕES	58

INTRODUÇÃO

As algas de água corrente, conhecidas como macroalgas lóticás que são constituídas por espécies que apresentam crescimento macroscópico evidente, ou seja, são visíveis e reconhecíveis em campo a olho nu (BRANCO, 1995). Algas aquáticas possuem um papel ecológico muito importante, pois como as plantas em habitat terrestre, exercem no ambiente uma função de produtoras primárias (SILVA, 2009). As taxas de produção primária dessas algas dependem da área do substrato disponível para a colonização, das características desse substrato, das condições físicas e químicas da água, da morfometria dos sistemas aquáticos, dentre outras (MOSCHINI, 1999).

Diversas atividades biológicas de macroalgas são relatadas na literatura, demonstrando o potencial destes organismos quanto a atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, imunomoduladora, entre outras (SILVA, 2009; JUNTHIP, AMORNLERDPISON, CHIMSOOK, 2013).

As algas são a base alimentar para as cadeias tróficas, são ricas em proteínas, vitaminas e minerais (MOSCHINI, 1999). Os elementos minerais reconhecidos como essenciais para a vida do ser humano são comumente divididos entre macroelementos, como cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio, enxofre; e microelementos, como ferro, cobre, cobalto, manganês, zinco, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, silício. A importância de sua inclusão na dieta humana tem sido amplamente discutida em textos sobre nutrição (SOARES et al., 2004).

Segundo MACHADO et al. (2013), as algas apresentam uma alta diversidade química, e também substâncias ecologicamente ativas com

funções protetoras contra herbívoros, incrustações biológicas e epífitas, bem como contra as constantes mudanças nas condições abióticas experimentadas pela alga.

Dentre as propriedades importantes presentes nas macroalgas, destacam-se também sua rica atividade antioxidante. Segundo MARTINS et al. (2012), muitos tipos de macroalgas contêm uma grande quantidade de compostos bioativos com potencial antioxidante. Esses biocompostos são de extrema importância no organismo do ser humano, pois a falta desses pode levar a muitos problemas de saúde (PANGESTUTI e KIMA, 2011).

Os antioxidantes são geralmente definidos como qualquer substância que pode interagir com os radicais livres e interromper a reação de oxidação de outra molécula, podendo prevenir ou retardar os danos oxidativos no corpo humano. Os compostos antioxidantes inibem os mecanismos oxidativos que podem conduzir a doenças, como: Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral, artrite, inflamações crônicas, câncer e outras doenças degenerativas (SEAL et al., 2014).

Antioxidantes naturais, obtidos a partir de plantas, não induzem a efeitos secundários, enquanto que antioxidantes sintéticos têm apresentado efeitos tóxicos. Nessa direção, tem-se observado nas indústrias a preferência pelo uso de antioxidantes de origem natural tanto em alimentos quanto em produtos farmacêuticos (JUNTHIP, AMORNLERDPISON, CHIMSOOK, 2013).

Nas últimas décadas, tem-se observado um grande esforço no desenvolvimento de cultivo de algas em larga escala, para atender a demanda e diminuir a exploração indiscriminada dos bancos naturais (SILVA, 2009).

O potencial de aplicação das algas na indústria foi evidenciado por FABROWSKA et al. (2016) nos setores de cosméticos, alimentos, farmacêutico e agrícola, devido à variedade de compostos bioativos que possuem.

No Brasil, há uma grande biodiversidade de espécies de algas lólicas. Estas estão associadas como sendo ricas em proteínas, vitaminas, minerais (MOSCHINI, 1999), compostos com potencial antioxidante, antibacteriano e antifúngico, podendo ter aplicação em diferentes segmentos industriais, como alimentício, farmacêutico, nutracêutico, agrícola entre outros (MACHADO et al., 2013).

Recentemente, tem aumentado o número de estudos, principalmente sobre taxonomia, distribuição espacial de comunidades de macroalgas (KRUPKEK, BRANCO, 2014) e florística (ALMEIDA, NECCHI JR, BRANCO, 2011) de macroalgas, em regiões do estado de São Paulo e Paraná, no entanto estudos de caracterização química de extratos destas algas ainda são inexistentes.

Diante desta explanação, apresenta-se a relevância deste trabalho, o qual encontra-se subdividido em dois estudos. O primeiro teve por objetivo avaliar diferentes solventes para obtenção de extratos da alga *Oedogonium sp*, coletadas em dois pontos do Estado de São Paulo, região de Platina - SP e Tarumã – SP. A partir da coleta, foi realizada a triagem do material e a partir da alga em pó obteve-se extratos provenientes desta alga com diferentes misturas de solventes e quantificou-se os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante. Foi utilizado um delineamento experimental simplex centroide para determinar a influência do sistema de solventes, e assim otimizar a melhor mistura de solvente que apresentou maior rendimento na extração dos

compostos fenólicos e antioxidantes. O segundo estudo teve por objetivo realizar a caracterização de minerais, flavonoides, umidade e carotenoides do extrato derivado do melhor sistema de solventes obtidos no primeiro estudo a partir de duas macroalgas verdes: *Nitella microcarpa* var. *wrightii*. e *Oedogonium* sp., também coletadas na região de Platina - SP e Tarumã – SP. Além disso, foi realizada a extração e também a quantificação de compostos fenólicos e a determinação da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. V. R.; NECCHI Jr, O.; BRANCO, L. H. Z. - Flora de comunidades de macroalgas lólicas de fragmentos florestais remanescentes da região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, n. 38, v.4, p. 553-568, 2011.

BRANCO, C. C. Z. *Aspectos florísticos e ecológicos das comunidades de macroalgas de riachos da região oriental de mata atlântica do estado de São Paulo*. 1995. 107 fs. (Dissertação de Mestrado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista UNESP, Rio Claro.

FABROWSKA, J., IBAÑEZ, E., LESKA, B., HERRERO, M. Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae. **Algae Research**, v.19, p. 237-245, 2016.

JUNTHIP, R., AMORNLERDPISON, D., CHIMSOOK, T. Phytochemical screening, antioxidant activit and total phenolic content of *Spirogyra spp.* **Advanced Materials Research**, v.699, p. 693-697, 2013.

KRUPEK, R. A. BRANCO, C. C. Z. Estrutura das comunidades de macroalgas da bacia de drenagem do rio Cascavel, Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, n.41, v.1, p.41-50, 2014.

MACHADO, L. P., MATSUMOTO, S. T., JAMAL, C. M., SILVA, M. B., CENTENO, D. C., NETO, P. C., CARVALHO, L. R., YOKOYA, N. Chemical analysis and toxicity of seaweeds extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. **Society of chemical industry**, v.94, p. 1-6, 2013.

MARTINS, C. D. L., RAMLOV, F., CARNEIRO, N. P. N., GESTINARI, L. M., SANTOS, B. F., BENTO, L. M., LHULLIER, C., GOUVEA, L., BASTOS, E., HORTA, P. A., SOARES, A. R. Antioxidant properties and total phenolic

contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **Springer Science**, p. 1-9, 2012.

MOSCHINI, C. V. Importância, estrutura e dinâmica da comunidade perifítica nos ecossistemas aquáticos continentais. In: Pompêo, M.L.M. (ed.) **Perspectivas da Limnologia no Brasil**, São Luís: Gráfica e Editora União, 1999. cap. 6, p. 1-11.

PANGESTUTI, R., KIMA, S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **J. Funct. Food**, v.3, p. 255-266, 2011.

SEAL, T., HALDER, N., CHAUDHURI, K., SINHA, S. N. Effect of solvent extraction system on the antioxidant activities of algae. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, p. 242-245, 2014.

SILVA, P. M. *Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras. Universidade de São Paulo*. 2009. 76 fs. (Dissertação de Mestrado – Ciências Biológica, Bioquímica) – Universidade de São Paulo USP, São Paulo.

SOARES, L. M. V., SHISHIDO, K., MORAES, A. M. M., MOREIRA, V. A. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.2, p. 202-206, 2004.

Capítulo 1. Impacto do sistema de solventes no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de extratos provenientes da alga verde *Oedogonium sp.*

RESUMO

A macroalga *Oedogonium sp.*, um gênero de alga verde filamentosa da classe das *Chlorophyceae*, é comumente encontrada em riachos da região de Assis – SP e se destaca por apresentar alta produtividade de biomassa. As referências têm utilizado diferentes solventes para extração de compostos de algas, sendo possível verificar que dependendo do solvente utilizado pode variar os resultados encontrados para a extração desses compostos. Porém não existem averiguações desses sistemas de solventes utilizando um delineamento experimental de misturas. Assim, este trabalho teve por objetivo averiguar a influência dos solventes: acetona, metanol e etanol; e suas misturas na quantificação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, a partir de extratos da alga *Oedogonium sp.* Utilizou-se o delineamento experimental de mistura simplex centróide, a fim de otimizar o processo de extração. Os resultados obtidos mostraram que o melhor solvente para a obtenção de extrato da alga *Oedogonium sp.* foi a mistura acetona-etanol, que apresentou maior rendimento para compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Delineamento experimental. *Oedogonium sp.* Compostos fenólicos. Capacidade antioxidante.

ABSTRACT

The macroalga *Oedogonium sp.*, a genus of filamentous green algae of the class of *Chlorophyceae*, is commonly found in streams of the region of Assis - SP and stands out for presenting high productivity of biomass. The references have used different solvents for the extraction of algae compounds, being possible to verify that depending on the solvent used may vary the results found for the extraction of these compounds. However, there are no inquiries of these solvent systems using an experimental design of blends. Thus, this work had as objective to investigate the influence of the solvents: acetone, methanol and ethanol; and their mixtures in the quantification of total phenolic compounds and antioxidant capacity, from extracts of the alga *Oedogonium sp.* The experimental design of a simplex centroid was used to optimize the extraction process. The results obtained showed that the best solvent for extracting *Oedogonium sp.* was the acetone-ethanol-water mixture, in which it presented higher yield for both phenolic compounds and antioxidant capacity.

Keywords: Experimental design. *Oedogonium sp.* Phenolic compounds. Antioxidant capacity.

1 Introdução

Dentre as espécies mais conhecidas de macroalgas lólicas encontradas em rios e riachos da região sudeste do estado de São Paulo, Brasil, destaca-se a *Oedogonium sp.*, um gênero de alga verde filamentosa da classe das *Chlorophyceae*, comumente encontrada em riachos da região de Assis - SP (BRANCO, 1995).

É evidente que o gênero de macroalgas lólicas - *Oedogonium sp.* - tem vantagens em sistemas de lagoas abertas, sendo predominantemente competitiva e robusta, com uma ampla gama de aplicações de sua biomassa. A *Oedogonium sp.* é uma boa candidata para o uso na indústria, já que possui produtividade de biomassa elevada comparada à de microalgas (LAWTON et al., 2016).

As Algas verdes apresentam grandes quantidades de compostos fenólicos, e são ricas em minerais e biocompostos com potenciais antioxidante, antimicrobiano, podendo ser aplicadas em diferentes setores industriais (MACHADO et al., 2013). Porém, a composição química de compostos produzidos por algas lólicas é relativamente menos investigada quando comparada com as de algas marinhas (ABDEL-AAL, HAROON, MOFEED, 2015).

Inúmeros procedimentos têm sido propostos para a extração de compostos a partir de algas, tais como: enzimático (WIJESINGHE, JEON, 2012), líquido pressurizado (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2016), micro-ondas, ultrassom (KADAM, TIWARI, O'DONNELL, 2013), solventes orgânicos e

outros. A eficácia de extração de metabolitos secundários, usando solventes, depende da sua natureza química (LONNI et al., 2012).

Extratos obtidos por diferentes solventes podem conter diferentes compostos antioxidantes, com potencial capaz de eliminar os diferentes tipos de radicais livres (GOH, YUSOFF, LOH, 2010). Diferentes solventes tem sido utilizados na extração de compostos de algas, tais como: metanol (MATANJUN et al., 2008; LEE, HIM, LEE, 2012; CHEW et al., 2008; FARASAT et al., 2013; JUNTHIP, AMORNLERDPISON, CHIMSOOK, 2013; CHERNANE et al., 2014), metanol acidificado (SCHMIDT et al., 2012; DONG et al., 2014), etanol (FRIKHA et al., 2011; CHO et al., 2010; PAULERT et al., 2009; SANTOS, SHETTY, MIGLIORANZA, 2014); acetona e metanol (UMA, SIVASUBRAMANIAN, DEVARAJ, 2011) e mistura de diferentes solventes (LÓPEZ et al., 2011; GOH, YUSOFF, LOH, 2010; DONG et al., 2014; SEAL et al., 2014).

Embora na literatura sejam encontrados diversos estudos sobre misturas aquosas de solventes orgânicos puros, não há investigações desses sistemas de solventes que utilizem modelos estatísticos baseados em delineamentos experimentais com misturas. Estes delineamentos tem sido previamente utilizados com o intuito de otimizar processos de obtenção de extratos de material vegetal, para seu estudo e caracterização. Delineamentos de mistura podem ser utilizados com o objetivo de otimizar o processo de extração (LONNI et al., 2012).

Estudos têm mostrado que a extração de biocompostos varia conforme o solvente utilizado. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a influência de diferentes solventes e suas misturas no conteúdo de compostos fenólicos

totais e potencial antioxidante, utilizando o delineamento experimental de mistura simplex centroide.

2 Material e Método

2.1 Reagentes químicos

Os reagentes de 2,2- azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxico (Trolox) e reagente de Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma Chemical Brasil. O ácido gálico e o Cloreto de Alumínio foi obtido da Synth, Brasil. Acetona PA (99,5%), metanol PA (99,8%) e etanol PA (99,9%), da marca Vetec-Sigma Chemical Brasil.

2.2 Coleta de macroalga e preparo das amostras

Alga verde *Oedogonium sp.* foi coletada em um riacho próximo à cidade de Platina- SP (22° 38' 29" S e 50° 12' 13" O) em junho de 2015; e em Tarumã-SP, no riacho Água da Fortuna (22° 40' 11" S e 50° 28' 59" O), em junho de 2016. A escolha desta espécie para este estudo foi devido à disponibilidade de biomassa encontrada na região.

Após coletada, foi feita a triagem das algas em água corrente, separando-as de quaisquer organismos exógenos a elas. Logo em seguida, foram centrifugadas para retirada do excesso de água e secas em estufa de circulação forçada a 50°C, por cerca de 3 horas. O material seco foi triturado em almofariz utilizando nitrogênio líquido para obtenção do pó, o qual foi armazenado em sacos plásticos envolvidos em papel alumínio para proteção da luz, evitando a degradação de compostos.

As análises e preparos das algas foram realizados nos Laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2.3 Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados de acordo com LÓPEZ et al. (2011), com algumas modificações. Para cada 0,5 g de pó de algas, 10 mL de solvente foram adicionados e mantidos sob agitação em mesa agitadora (marca Tecnal TE-141) por 24 horas em temperatura ambiente, em seguida, centrifugados em Centrifuga microprocessada (marca QUIMIS, modelo 022tm216) durante 30 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido e armazenado em frasco âmbar. A partir deste extrato, foram realizadas análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os extratos foram preparados em duplicata para a quantificação dos compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante.

Para o delineamento experimental de misturas simplex centroide, são necessários 14 pontos experimentais por isso, para os ensaios foram preparados 7 (sete) extratos, em duplicata, utilizando diferentes solventes. Os solventes estudados foram: metanol, etanol e acetona. A proporção de solvente / água utilizado foi fixada em 80:20.

2.4. Compostos Fenólicos Totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada, em triplicata, utilizando ensaios colorimétricos segundo SINGLETON e ROSSI (1965). O método baseia-se na reação entre compostos fenólicos presentes na amostra com carbonato de sódio, formando fenolatos, que são capazes de reduzir a mistura do

reagente de Folin-Ciocalteu. A perda da cor azul do radical indicou a reação de compostos antioxidantes, e a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (marca Biospectro Sp220). O teor de fenóis totais foi determinado por meio da interpolação entre as absorbâncias das amostras e uma curva padrão preparada com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de alga seca.

2.5. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio de ABTS, segundo RUFINO et al. (2007). Trinta microlitros (30 μ L) de amostra, em diluições diferentes e em triplicata foram transferidos para tubos de ensaio e misturados com 3 mL de solução de radical ABTS, previamente preparado com persulfato de potássio. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo Sp220) a 734 nm após 6 minutos de reação da mistura como descrito na metodologia. Resultados foram interpolados com uma curva padrão preparada com Trolox, e expressos em μ M de Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (CAET) por g de pó alga.

2.6 Design experimental

Para estudar o efeito de diferentes solventes de extração no teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da macroalga *Oedogonium sp.*, foi utilizado um delineamento simplex centroide (Tabela 1), sem restrição dos componentes da mistura, pois este apresenta tanto as misturas binárias como ternárias, totalizando 7 experimentos, atendendo à definição do planejamento. Os extratos foram obtidos a partir de pó seco de algas utilizando três solventes

orgânicos diferentes: (M) metanol, (E) etanol, (A) acetona, resultando em sete misturas diferentes dos extratos, em duplicata, em todos os pontos. A proporção de solvente / água utilizado foi fixada em 80:20.

No ajuste dos valores de resposta de cada parâmetro experimental foi utilizado o modelo cúbico especial (Eq. 1), onde há presença simultânea de três componentes. A significância estatística das equações foi feita através da análise de variância (ANOVA), no nível de confiança de 95%, utilizando o software DX Expert versão 6 (Stat-Ease Inc. Minneapolis – Mn, USA).

$$Y = \beta_1M + \beta_2E + \beta_3A + \beta_{12}ME + \beta_{13}MA + \beta_{23}EA + \beta_{123}MEA \text{ (Eq.1)}$$

Onde Y é a estimativa das respostas de compostos fenólicos totais ou atividade antioxidante, β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} , β_{123} são os coeficientes do modelo, enquanto M (metanol), E (etanol) e A (acetona) são as variáveis independentes da equação.

2.7 Análise Estatística

Os resultados das determinações analíticas foram expressos como a média $\pm$ do desvio padrão de duas repetições de extração, cada uma das quais foi feita em triplicata. A análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o *software* Origin 8.5 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

Na Tabela 1, é apresentado o delineamento experimental de mistura simplex-centroide, assim como os valores de respostas. Como pode ser observado, os teores de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos variaram de 90-150 mg de EAG / 100g, enquanto que a capacidade antioxidante (CA) variou de 1-8 μ M de CAET / g de alga, indicando que o solvente influencia a extração dos biocompostos.

Tabela 1. Composição do sistema de solventes e correspondentes valores das respostas dos extratos derivados, observadas no delineamento experimental de mistura simplex-centroide.

Extrato	Pseudo componentes			Respostas	
	Metanol (M)	Etanol (E)	Acetona (A)	CFT (mg EAG/100g)	CA (μ M CAET/g)
M	1	0	0	91,96 $\pm$ 3,05	2,37 $\pm$ 0,008
E	0	1	0	104,09 $\pm$ 2,29	5,25 $\pm$ 0,018
A	0	0	1	99,39 $\pm$ 9,99	5,31 $\pm$ 0,040
ME	0,5	0,5	0	102,17 $\pm$ 11,00	3,41 $\pm$ 0,008
MA	0,5	0	0,5	96,39 $\pm$ 13,56	1,27 $\pm$ 0,004
EA	0	0,5	0,5	134,45 $\pm$ 6,90	8,05 $\pm$ 0,017
MEA	0,33	0,33	0,33	90,03 $\pm$ 5,77	6,12 $\pm$ 0,011
M	1	0	0	103,28 $\pm$ 5,28	3,48 $\pm$ 0,011
E	0	1	0	93,96 $\pm$ 1,40	5,41 $\pm$ 0,016
A	0	0	1	119,59 $\pm$ 9,83	5,22 $\pm$ 0,042
ME	0,5	0,5	0	119,70 $\pm$ 9,98	4,70 $\pm$ 0,013
MA	0,5	0	0,5	83,15 $\pm$ 5,64	2,42 $\pm$ 0,006
EA	0	0,5	0,5	150,03 $\pm$ 4,12	7,70 $\pm$ 0,021
MEA	0,33	0,33	0,33	93,28 $\pm$ 3,03	5,25 $\pm$ 0,010

CFT: Compostos Fenólicos Totais; CA: Capacidade Antioxidante.

Os maiores resultados obtidos, tanto para compostos fenólicos totais (CFT) Figura 1, como para capacidade antioxidante (CA) Figura 2, foram referentes às extrações realizadas com as misturas binárias etanol-acetona, seguido pelos seus solventes puros (etanol ou acetona). Os extratos obtidos com metanol-água apresentaram os menores teores de antioxidantes e polifenóis. Resultados relatados por CHERNANE et al. (2014), em seu estudo com extratos de diferentes solventes orgânicos, observou que os extratos contendo altos níveis de polifenóis não foram potentes para a remoção de radicais DPPH, ou seja, o polifenol das algas não era o principal constituinte responsável pela propriedade antioxidante dos extratos

Segundo GOH, YUSOFF e LOH (2010), extratos obtidos com diferentes solventes podem conter diferentes capacidades antioxidantes em termos de redução e poder de captura de radicais.

LÓPEZ et al. (2011) relataram que solução aquosa de etanol foi superior ao metanol para extrair compostos fenólicos e atividade antioxidante de algas *Stypocaulon scoparium*. Já em estudo realizado por SEAL et al. (2014), extrato obtido com acetona mostrou ter maior atividade de captura de radicais quando comparado com os extratos de metanol da *Oedogonium globosum*.

A polaridade do solvente pode influenciar diretamente na extração dos compostos com maior afinidade ao solvente. Dependendo da polaridade do solvente a extração de um ou vários biocompostos pode ser favorecida, há polifenóis que são mais polares e outros apolares. Neste estudo, a força de eluição do solvente acetona foi o solvente mais polar aprótico seguido pelos

solventes polares práticos, ou seja, mais polares em ordem decrescente, sendo o etanol < metanol < água.

A análise da variância (ANOVA) para os dois ajustes está apresentada na Tabela 2. Verifica-se que o ajuste com a equação cúbica, representou satisfatoriamente os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, apesar de ter sido verificado baixo coeficiente de correlação do modelo para compostos fenólicos.

Tabela 2. ANOVA para o efeito de metanol (M), etanol (E) e acetona (A) sobre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante utilizando modelo especial cúbico.

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Compostos Fenólicos					
Modelo	3875.65	6	645.94	6.58	0.0128
Perda de ajuste	555,58	2	279,29	2,84	0,1247
Erro puro	687.23	7	98.18		
Total	4562.87	13			
Capacidade Antioxidante					
Modelo	46,94	6	7,82	21,24	0,0004
Perda de ajuste	1,51	2	0,76	2,05	0,1987
Erro puro	2,58	7	0,37		
Total	49,52	13			

R^2 CFT = 0.8494; R^2 CA = 0.9174

Para o delineamento de compostos fenólicos, o nível de significância é confirmado pelo valor de $P < 0,05$ bem como o valor de F de 6,58 implica que o modelo é significativo. Uma chance de 1,28% para que um “Valor de F” possa ocorrer devido ao ruído (incerteza).

Com relação à atividade antioxidante, o delineamento mostrou que o valor de F de 21,24 e valor de P como sendo $P < 0,05$ demonstra que o modelo é significativo.

Existe uma chance de apenas 0,04% que um amplo “Valor de F” possa ocorrer devido ao ruído (incerteza).

Os compostos fenólicos foram representados pela equação cúbica (Eq. 2). Os solventes etanol e acetona apresentaram o mesmo efeito sobre a extração dos compostos fenólicos, com coeficientes da equação iguais, 104,0. Poder ser observado um efeito sinérgico, ou seja, uma interação entre os solventes etanol e acetona, sendo evidenciado pelo coeficiente positivo e de maior valor (152,61) (Eq. 2). A mistura dos três solventes acarretou em efeito antagônico na extração, ou seja, pouca foi a contribuição na extração do biocomposto quando da presença simultânea dos três solventes, podendo isso ser confirmado pelo elevado coeficiente negativo da Eq. 2 (732,24).

$$CFT = 97.29M + 104.13E + 104.04A + 152.61EA^* - 732.24MEA^* \quad (\text{Eq.2})$$

* coeficientes significativos a $p < 0,05$.

A Figura 1 representa a superfície de resposta do modelo cúbico mostrando a influencia dos solventes na extração dos compostos fenólicos

totais. A partir dessa figura pode ser observado a forte interação da mistura dos solventes etanol e acetona.

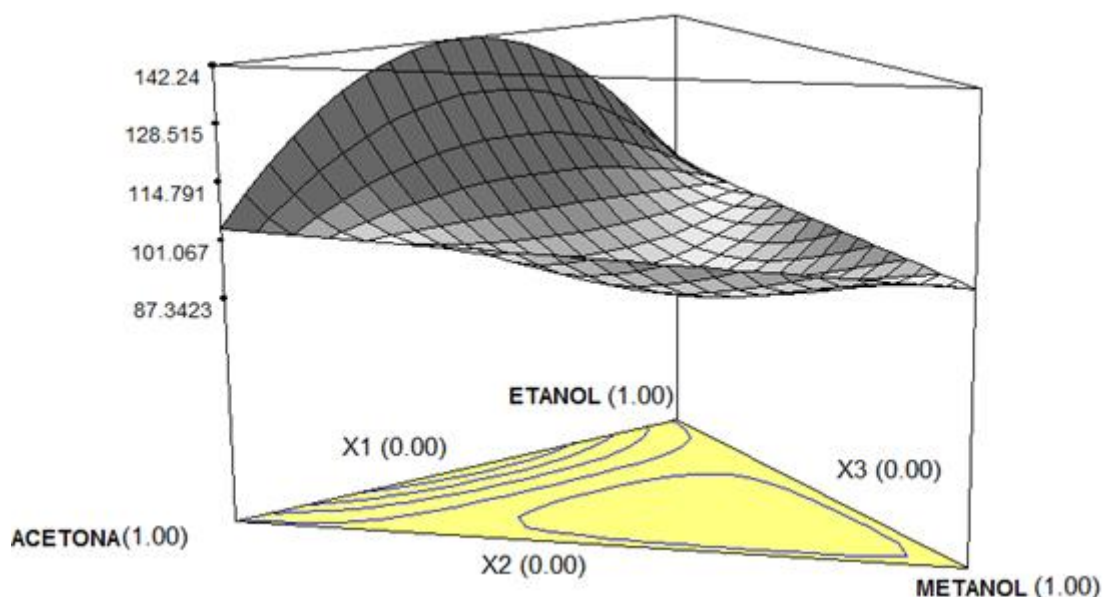


Figura 1. Superfície de resposta do modelo cúbico relativo ao efeito dos solventes sobre os compostos fenólicos.

A capacidade antioxidante foi representada pela equação cúbica (Eq. 3), em termos de pseudo-componentes. Os solventes etanol e acetona apresentaram os mesmos efeitos sobre a extração de composto antioxidante, com coeficientes da equação próximos a 5,0. Similar comportamento dos solventes etanol e acetona foi verificado na extração de compostos fenólicos. Observou-se um efeito sinérgico entre os solventes etanol e acetona, sendo evidenciado o mesmo pelo coeficiente positivo e de maior valor modular da interação etanol-acetona (11,70), apresentado na Eq. 3, e Figura 2. Efeito antagônico na capacidade antioxidante foi verificado com a combinação dos solventes metanol e acetona, podendo ser confirmado pelo coeficiente negativo da equação 3. Portanto, os resultados indicam que a mistura binária de etanol

e acetona tiveram maior efeito na extração de compostos com capacidade antioxidante.

$$CA = 2,96M + 5,36E + 5,19A - 7,62MA^* + 11,70EA^* \quad (\text{Eq.3})$$

* termos significantes no modelo.

Na Figura 2, observa-se a representação do ajuste cúbico da superfície de resposta para a capacidade antioxidante. Pode ser observado que houve um efeito sinérgico na mistura de solventes etanol e acetona. Comparando a Figura 2 com a Figura 1, observamos que na superfície de resposta para capacidade antioxidante não temos uma região côncava, como a observada na Figura 1, isso explica que outros compostos atuaram também como antioxidantes.

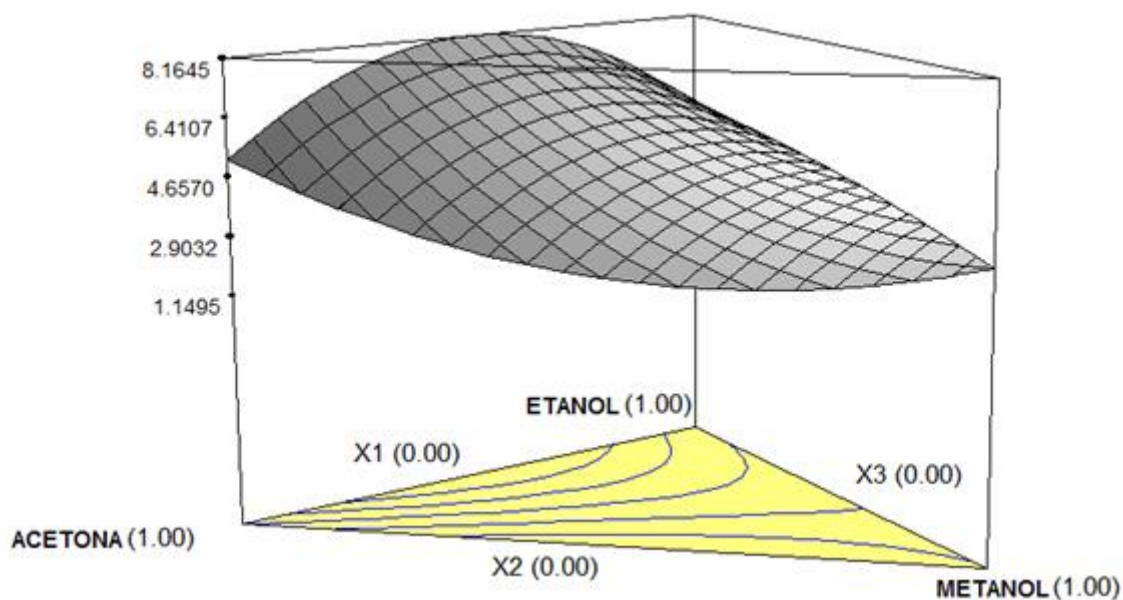


Figura 2. Superfície de resposta do modelo relativo ao efeito dos solventes sobre capacidade antioxidante.

Os solventes puros não se apresentaram tão interessantes na extração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Porém, a mistura binária apresentou valores interessantes em ambas as determinações analíticas (Figuras 1 e 2).

4 Conclusão

Os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos de *Oedogonium sp.* foram afetados pelo solvente de extração. O delineamento experimental com misturas simplex centroide mostrou que os solventes mais eficientes para a extração, tanto de compostos fenólicos quanto para compostos com atividade antioxidante da alga *Oedogonium sp.* foi a mistura binária etanol-acetona, com 50% de etanol e de 50% acetona. Estes resultados são relevantes, já que os solventes etanol e acetona são mais econômicos, além de serem menos poluentes para o meio ambiente.

Referências

ABDEL-AAL, E. I.; HAROON, A. M.; MOFEED J. Successive solvent extraction and GC–MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, p. 1-14, 2015.

BRANCO, C. C. Z. *Aspectos florísticos e ecológicos das comunidades de macroalgas de riachos da região oriental de mata atlântica do estado de São Paulo*. 1995. 107 fs. (Dissertação de Mestrado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista UNESP, Rio Claro.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **Swiss Society of food Science and technology**. v.41, p. 1067-1072, 2008.

CHERNANE, H.; MANSORI, M.; LATIQUE, S.; KAOUA, M.E. Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four maroccan macro algae species. **European Scientific Journal**, n.10, v.15, p 35-48, 2014.

CHO, ML.; KANG, IJ.; WON, M.H.; LEE, HS.; YOU, SG. The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned Fractions from various green seaweeds. **Journal of Medicinal Food**, n.13, v.5, p. 1232-1239, 2010.

DONG, S.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; WANG, S.; LIU, Y. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2014.

FARASAT, M.; KHAVARI-NEJAD, R. A.; NABAVI, S.M.B.; NAMJOOYAN, F. Antioxidant properties of some filamentous green algae (Chaetomorpha Genus). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n.56, v.6, p. 921-927, 2013.

FRIKHA, F.; KAMMOUN, M.; HAMMAMI, N.; MCHIRGUI, R.A.; BELBAHRI, L.; GARGOURI, Y.; MILED, N.; BEN-REBAH, F. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. **Ciencias Marinas**, v. 37, n.2, 2011.

GOH, S.; YUSOFF, F. M.; LOH, S. A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, *Chaetoceros* sp. and a green microalga, *Nannochloropsis* sp. **Journal of Agricultural Science**, n.3, v.2, p. 123-130, 2010.

JUNTHIP, R., AMORNLERDPISON, D., CHIMSOOK, T. Phytochemical screening, antioxidant activit and total phenolic content of *Spirogyra* spp. **Advanced Materials Research**, v.699, p. 693-697, 2013.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Application of novel extraction Technologies for bioactives from marine algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.61, p. 4667-4675, 2013.

LAWTON, R. J.; COLE A. J.; ROBERTS, D. A.; PAUL, N. A.; NYS, R. The industrial ecology of freshwater macroalgae for biomass applications. **Algal Research**, 2016.

LEE, S. M.; HIM, E. H.; LEE, J. H. Bio-gas production by co-fermentation from the brown algae, *Laminaria japonica*. **J. Ind. Eng. Chemical**, v.18, p. 1512-1514, 2012.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catiguá*. **Analytica Chimica Acta**, n.719, p. 57-60, 2012.

LÓPEZ, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; TANGIL, M.S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chemistry**, v.125, p. 1104-1109, 2011.

MATANJUN, P.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M.; MUHAMMAD, K.; MING, C.H. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. **Journal of Applied Phycology**, v.20, p. 367-373, 2008.

MACHADO, L. P.; MATSUMOTO, S. T.; JAMAL, C. M.; SILVA, M. B.; CENTENO, D. C.; NETO, P. C.; CARVALHO, L. R.; YOKOYA, N. Chemical analysis and toxicity of seaweeds extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. **Society of chemical industry**, p. 1-6, 2013.

PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J. E. F.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; SMANIA – JR, A.; STADNIK, M. J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva Fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Plant Dis. Prot.**, v.116, p. 263-270, 2009.

RODRIGUES, M.; IEMMA, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos*. 1ª edição, Campinas-SP Casa do pão, 2005.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado técnico**. Embrapa. 4 p. Fortaleza, 2007.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A.P.; MONTERO, L.; STIGER-POUVREAU, V.; TANNIOU, A.; CIFUENTES, A.; HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. **Food Chemistry**, v.192, p. 67-74, 2016.

SANTOS, R. D.; SHETTY, K.; MIGLIORANZA, L. H. S. Oxidative stability of butter with added phenolics from Lamiaceae herbs and *in vitro* evaluation of potencial cytotoxicity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v.49, p. 768-775, 2014.

SCHMIDT, M.; HORN, S.; FLIEGER, K.; EHLERS, K.; WIHELM, C.; SCHNETTER, R. *Synchroma pusillum* sp. nov. and other new algal isolates with chloroplast complexes confirm the synchromophyceae (Ochrophyta) as a widely distributed group of amoeboid algae. **Protist**, v.163, p.544-559, 2012.

SEAL T.; HALDER N.; CHAUDHURI K.; SINHA S.N. Effect of solvent extraction system on the antioxidant activities of algae. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.6, p. 242-245, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI - JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticult**, v.16, p. 144-158, 1965.

UMA, R.; SIVASUBRAMANIAN, V.; DEVARAJ, S.N. Evaluation of *in vitro* antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, n.2, v.3, p. 82-93, 2011.

WIJESINGHE, W.; JEON, Y. J. Enzyme - assisted extraction (EAE) of bioactive components: a useful – approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. **Fitoterapia**, n. 83, p. 6-12, 2012.

Capítulo 2. Estudo comparativo da composição química de extratos provenientes de duas macroalgas verdes *Oedogonium sp.* e *Nitella microcarpa var. wrightii*.

RESUMO

As macroalgas verdes são as mais comumente encontradas em água doce, sendo diversificadas em termos estruturais e no seu ciclo de vida. Com o objetivo de buscar novas fontes para compostos com potencial aplicação, se tem a necessidade de caracterizar novos materiais. Com isto este trabalho buscou a caracterização química com relação a compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, capacidade antioxidante bem como de alguns minerais presentes nas espécies *Oedogonium sp.* e *Nitella microcarpa var. wrightii*, macroalgas verdes mais comuns em rios e riachos do estado de São Paulo. Os extratos dos pós destas algas foram preparados utilizando a mistura de solventes de melhor resultado de extração obtido a partir do delineamento experimental realizado no estudo prévio no primeiro capítulo, que foi a mistura dos solventes etanol-acetona, na proporção de 50 % etanol e 50% acetona. Foi verificado que a alga *Oedogonium sp.* destacou-se por apresentar uma grande quantidade de carotenoides totais. A alga, da espécie *Nitella microcarpa var. wrightii*, obteve altos valores de minerais, com destaque para o teor de ferro, que é de grande importância na saúde humana, e também altos teores de cobre e manganês, sendo assim, importantes fontes de compostos biodisponíveis.

Palavras-chave: Alga verde. Caracterização química. Minerais. *Oedogonium sp.* *Nitella microcarpa var. wrightii*.

ABSTRACT

Green macroalgae are the most commonly found in freshwater, being diversified in structural terms and in their life cycle. In order to find new sources for compounds with potential application, it is necessary to characterize new materials. This work aimed at the chemical characterization with respect to phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, antioxidant capacity as well as some minerals present in these two species of green macroalgae most common in rivers and streams of the state of São Paulo, the studied algae were *Oedogonium sp.* and *Nitella microcarpa var. Wrightii*, and the powder extracts of these algae were prepared using the solvent mixture of the best extraction result obtained from the experimental design carried out in the previous study in the first chapter, which was the mixture of ethanol-acetone-water solvents (80/20), in the proportion of 50% ethanol and 50% acetone. It was verified that the algae *Oedogonium sp.* was characterized by a large amount of total carotenoids. The other alga, of the species *Nitella microcarpa var. Wrightii*, obtained high values of minerals, with emphasis on the iron content, which is of great importance in human health, as well as high levels of copper and manganese, thus being important sources of bioavailable compounds.

Keywords: Green algae. Chemical characterization. Minerals. *Oedogonium sp.* *Nitella microcarpa var. Wrightii*.

1 Introdução

Dentre as algas verdes, incluem-se 17000 espécies que são diversificadas em suas estruturas e no ciclo de vida. Embora a maioria das algas verdes seja de habitat aquático, muitas se encontram em diversos outros ecossistemas, superfície da neve, tronco de árvores e em associações simbióticas tais como: fungos (líquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001).

Em sua maioria, as algas verdes são encontradas em água doce, mas muitos grupos são microscópicos, e outras espécies são marinhas e podem atingir até 8 metros de comprimento, como no caso da *Codium Magnum* (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001).

Algumas características das clorofíceas assemelham-se com as plantas, como por exemplo, elas contêm clorofilas a e b e armazenam amido dentro dos plastídeos, como produto de reserva, sendo algumas das razões pela qual as algas verdes são consideradas o reino protista a partir do qual as plantas evoluíram (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001). Dentro desse grupo, as algas do gênero *Oedogonium* vivem e se fixam nos mais distintos substratos. A identificação deste gênero de alga, que inclui cerca de 400 espécies, é relativamente complicada, porque é preciso contar com material fértil, zigosporos maduros e com todas as fases de seu ciclo de vida (BICUDO, MENEZES, 2006).

Já as Charophyceae possuem um sistema de raiz flagelar, sendo este caráter importante para a taxonomia, e possuem estrutura em multicamadas, sendo muito semelhante ao encontrado em anterozoides de briófitas e de algumas plantas vasculares, além de semelhanças bioquímicas e moleculares,

o que faz da Charophyceae o grupo de algas verdes atualmente mais próximo do ancestral das briófitas e de plantas vasculares (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2001). Dentro desse grupo encontra-se a alga macroscópica *Nitella sp.* que geralmente mede entre 5-50 cm de altura, podendo chegar a 1-2 m, considerada de habito sésstil, com ramos e râmulos verticilados em nós e entrenós, sendo delicada devido a total ecorticação e pela falta de incrustações calcárias. O gênero da *Nitella sp.* é geralmente encontrado em ambientes mais profundos, associados a águas mais ácidas, porém algumas espécies podem ser encontradas em águas mais rasas e semicobertas pela lama do fundo (BICUDO, MENEZES, 2006).

As algas lólicas são consideradas como um recurso promissor de compostos bioativos. Dentre os compostos químicos produzidos por algas, incluem-se lipídios, ésteres, esteróis e hidrocarbonetos, derivados de tocoferóis, carotenoides, terpenos, quininos, derivados de pirrole, por exemplo, a clorofila, terpenóides, compostos fenólicos, derivados halogenados, cetonas, alcenos cíclicos e polissulfuretos (ABDEL-AAL, HAROON, MOFEED, 2015).

Pigmentos, como os carotenoides, são amplamente encontrados em plantas e algas e possuem uma função biológica nestes organismos que atuam como antioxidantes, estabilizadores de membrana e coletores de luz em organismos fotossintetizantes (GUARATINI et al., 2009).

No Brasil, as algas são pouco exploradas comercialmente, sendo restritas as explorações a alguns gêneros de algas vermelhas. São consideradas ricas fontes de polissacarídeos e minerais, porém têm sido pouco empregadas como alimentos. A constatação de seus potenciais antioxidantes poderia elevar seu valor como alimento e aditivo expandindo sua

comercialização (RAIMUNDO, HORTA, FETT, 2004). As macroalgas são consideradas como parte da dieta de diferentes países e como recurso de muitos nutrientes benéficos, tais como: vitaminas, minerais, lipídios e amino ácidos, (ANDRADE et al., 2013), pela sua alta quantidade de fibras dietéticas, proteínas, ácidos graxos polinsaturados, baixo teor de gordura saturada, além de suas propriedades funcionais biológicas como antifúngica, antioxidante e antiviral. Na busca de ingredientes funcionais, as macroalgas são consideradas excelentes candidatas como alimentos funcionais (QUIRÓZ, YUSTY, HERNANDEZ, 2010).

A parede celular de algas é uma barreira contra a bioabsorção de íons de metais pesados. Polissacarídeos e proteínas presentes na parede celular de algas têm a maioria dos sítios de ligação de metais. Efluentes industriais podem ser considerados um meio enriquecido para cultivar cepas de algas altamente produtivas com alta bioabsorção e capacidade de remoção de íons de metais pesados. Contudo, a presença de alguns íons de metais pesados em efluentes pode interferir no crescimento de algas, embora sua influência possa ser moderada com a diluição ou mistura de compostos orgânicos (ZERAATKAR et al., 2016).

Por isso, a importância deste estudo se dá para o conhecimento destes novos biocompostos para futuras aplicações e utilização em diversos setores da indústria, como novos medicamentos e produtos em geral. Portanto, o objetivo desse estudo foi quantificar e caracterizar extratos derivados de duas macroalgas lólicas verdes *Oedogonium sp* e *Nitella microcarpa var. wrightii*, quanto à compostos fenólicos, atividade antioxidante, carotenoides, flavonoides e minerais, já que não existem estudos sobre essas algas na literatura.

2 Material e Método

2.1 Reagentes químicos

Os reagentes de 2,2- azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxico (Trolox) e reagente de Folin-Ciocalteu foram adquiridos da

Sigma Chemical Brasil. O ácido gálico e o cloreto de alumínio foram obtido da Synth - Brasil. Acetona PA (99,5%), metanol PA (99,8%) e etanol PA (99,9%), da marca Vetec-Sigma Chemical Brasil.

2.2 Coleta de macroalga e preparo das amostras

As Algas verdes *Oedogonium sp.* e a *Nitella microcarpa var. wrightii* foram coletadas em um riacho, próximo a cidade de Platina-SP, (22° 38' 29" S e 50° 12' 13" O) em junho de 2015, e em Tarumã-SP, no riacho Água da Fortuna (22° 40' 11" S e 50° 28' 59" O) em junho de 2016. Para a escolha dessas algas, foi levada em consideração a biomassa presente nessa região.

Posteriormente à coleta, foi realizada a triagem das algas em água corrente, centrifugação e secagem das amostras em estufa de circulação forçada a 50°C, por aproximadamente de 3 horas. Em seguida, as algas secas foram trituradas em almofariz, foi utilizado nitrogênio líquido para congelamento da alga seca, facilitando a moagem do material, o pó obtido foi armazenado em embalagens plásticas envoltas em papel alumínio para proteção da luz, evitando a degradação de compostos.

2.3 Obtenção dos extratos

O preparo dos extratos de ambas as algas foi realizado em duplicata, de acordo com o método de LÓPEZ et al. (2011), com algumas modificações. Os solventes utilizados na extração foram acetona e etanol (1:1). A escolha desses solventes foi estabelecida a partir do melhor resultado obtido no estudo prévio de extração: “Avaliação de diferentes solventes na extração e quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da alga verde *Oedogonium sp.*”. Portanto, para cada 0,5 g de pó de algas, foram adicionados 10 mL de solvente, e mantido sob agitação em mesa agitadora da marca Tecnal TE-141 durante 24 horas em temperatura ambiente. Logo após, foram centrifugados em Centrifuga microprocessada marca QUIMIS modelo 022tm216 durante 30 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante obtido, ou seja o extrato bruto, foi transferido e armazenado em um frasco âmbar. Este extrato foi utilizado para as análises de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e flavonoides totais.

2.4 Compostos Fenólicos Totais

As análises de compostos fenólicos totais foram realizadas por ensaios colorimétricos, em triplicata, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo SINGLETON e ROSSI (1965) e a absorbância foi medida a 765 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação entre valores de absorbância de uma curva padrão, preparada com ácido gálico e da absorbância das amostras. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalentes (EAG) por 100 g de pó de alga.

2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio de radical ABTS^{•+} preparado com persulfato de potássio, segundo RUFINO et al. (2007). Foram transferidos 30 µL de amostra (preparadas em 5 diluições diferentes) misturadas com 3 mL de da solução de radical ABTS^{•+}. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos da mistura, como descrito nesta metodologia. Resultados obtidos das absorbâncias das amostras foram interpolados com os valores obtidos em uma curva padrão preparada com Trolox e foram expressos em µM de Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (CAET) por g de pó alga. A análise foi realizada em triplicata.

2.6 Carotenoides totais

Carotenoides totais foram determinados utilizando-se o método que se baseia na extração dos carotenoides a partir do pó da alga por meio de maceração com acetona, em seguida foi realizada a transferência e armazenagem das substâncias extraídas pela acetona para o éter de petróleo através de um funil de separação de fases e lavagem com água destilada para arraste e eliminação da acetona. Realizou-se a leitura da absorbância do extrato obtido em espectrofotômetro (marca Biospectro Sp220) na absorbância de 450 nm, descrito por SÁ (2001), e os resultados foram expressos em µg de β-caroteno/g de alga.

2.7 Determinação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada através do método descrito por CHANG et al. (2002), sendo a curva padrão feita a partir de solução de Quercetina preparada em etanol 80%, e o preparo das soluções dos extratos foram em diferentes concentrações, misturados a solução de cloreto de alumínio 10%, acetato de potássio 1M e etanol 95%, então os frascos foram acondicionados em lugar escuro e deixado reagir por 30 minutos. Foi então efetuada a leitura da absorbância destas soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de mg de quercetina (EQ) por 100g de alga em pó, a quantificação de flavonoides foi realizada em triplicata.

2.8 Minerais

As análises de minerais contidos em amostras de pó das algas *Oedogonium sp.* e *Nitella microcarpa var. wrightii* foram realizadas no laboratório de Ciências Agrárias da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de São Paulo (USP, Pirassununga / SP), segundo NOGUEIRA e SOUZA (2005). Cálcio, manganês, magnésio, cobre, ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (modelo AA240FS / 280FS, Agilent Technologies, CA, EUA). O potássio foi determinado por um fotômetro de emissão de chama (modelo B462, Micronal, São Paulo, Brasil) e fósforo, enxofre e boro em espectrofotômetro (modelo 650 Plus, Femto, São Paulo, Brasil).

2.9 Umidade

A determinação de umidade das algas secas e frescas foi realizada pelo método de secagem em estufa de circulação forçada (105°C), por aproximadamente 4 horas até a estabilização do peso da amostra. A análise foi realizada em triplicata, segundo AOAC (2000).

3 Resultados e Discussão

3.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos para a macroalga *Oedogonium sp.* foi de 142 mg EAG/100g de pó da alga, valor este superior quando comparado a alga *Nitella microcarpa var. wrightii* que apresentou valor de 120,31 mg EAG/100g de pó de alga (Tabela 1).

Segundo SEAL et al. (2014) verificaram valores para a alga verde *Oedogonium globosum* de 982 mg EAG/100g. Ambos os autores encontraram valores superiores para compostos fenólicos em relação às algas em estudo.

Entretanto, LÓPEZ et al. (2011), para a alga marinha marrom *Stypocaulon scoparium* encontraram valores inferiores ao da alga *Oedogonium sp* em estudo e valores próximos quando comparados a outra alga em estudo *Nitella microcarpa var. wrightii*.

Observou-se que o teor de flavonoides (Tabela 1), para os extratos da macroalga *Nitella microcarpa var. wrightii* foi de 249,80 mg EQ/100g, valor inferior ao teor encontrado nos extratos da alga *Oedogonium sp.*, de 457,81 mg EQ/100g alga seca. Porém, ambos os valores encontrados para as algas em estudo foram inferiores em comparação ao encontrado por SEAL et al. (2014) para a alga *Oedogonium globosum* (4519 mg EQ/100g alga seca).

Segundo SEAL et al. (2015), compostos como flavonoides e flavonóis são os responsáveis nas algas pelo efeito de eliminação de radicais livres. Estes autores encontraram em extratos com solvente acetona e metanol para macroalga *Nitella flagelliformis*, valores de 9397,0 - 9894,0 mg EQ/100g alga seca, respectivamente. O alto teor de flavonoides explica sua alta atividade antioxidante, desta forma a baixa atividade antioxidante das algas encontradas neste estudo, pode estar diretamente relacionada com os baixos teores de flavonoides.

Dentre os compostos, a *Oedogonium sp.* destacou-se por apresentar elevado teor de carotenoides totais quando comparado ao valor encontrado para a *Nitella microcarpa var. wrightii* (Tabela 1). Segundo RAIMUNDO; HORTA e FETT; (2004) a alga verde *Enteromorpha spp.* contém quantidades de β -caroteno maiores do que a de vegetais amarelo-esverdeados que variam de 22 a 25 mg/100 g, verifica-se que ambas as algas apresentaram valores bem superiores (*Oedogonium sp* 1589,59 $\mu\text{g/g}$ e *Nitella microcarpa var. wrightii* 632,39 $\mu\text{g/g}$ de pó de alga respectivamente). Sendo assim de extrema importância à caracterização e os estudos desses materiais, visando futuras aplicações e possível utilização em diversos setores industriais.

A capacidade antioxidante para a espécie de alga *Oedogonium sp.* foi de aproximadamente 8,0 $\mu\text{M CAET/g}$ de pó de alga, sendo então maior as substâncias antioxidantes presentes nesta alga quando comparada a *Nitella microcarpa var. wrightii*. na qual o valor obtido foi de 7,0 $\mu\text{M CAET/g}$ de pó de alga (Tabela 1).

A reduzida capacidade antioxidante das algas pode estar relacionada com a baixa quantidade de compostos bioativos obtidos de acordo com a

metodologia de extração utilizada bem como os solventes. Estudos relacionados a extratos da *Sargassum siliquastrum*, um tipo de alga marinha marrom, mostraram que as quantidades de compostos fenólicos não estão correlacionadas com a atividade antioxidante, estes resultados implicam que não apenas os compostos fenólicos, mas outros compostos, tais como a clorofila e carotenoides podem afetar a atividade antioxidante dos extratos da alga (CHO et al., 2011).

O teor de água presente na *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, fresca foi maior, em relação à quantidade de água presente na alga *Oedogonium* sp. fresca, bem como foi menor a umidade no material seco desta mesma alga. O baixo teor de água no material seco de ambas as algas é importante para a estocagem, evitando assim a perda de compostos presentes neste material.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides totais, capacidade antioxidante e umidade dos pós de algas *Oedogonium* sp. e *Nitella microcarpa* var. *wrightii*.

	<i>Oedogonium</i> sp.	<i>Nitella microcarpa</i> var. <i>wrightii</i> .
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/100g de pó de alga)	142,24 ± 5,51	120,31 ± 0,0023
Flavonoides (mg EQ/100g)	457,81 ± 0,0167	249,80 ± 0,0301
Carotenoides Totais (µg /g de pó de alga)	1589,59	632,39
Capacidade Antioxidante (µM CAET/g de pó de alga)	7,88 ± 0,0189	6,93 ± 0,0311
Teor de Umidade (% Umidade p/p)	Alga seca 5,05 Alga fresca 85,82	Alga seca 4,63 Alga fresca 90,13

EAG: Equivalentes Ácidos Gálico; EQ: Equivalente Quercetina; CAET: Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox.

3.2 Teor de minerais

A Tabela 2 apresenta os elementos minerais das duas macroalgas estudadas a *Oedogonium sp.* e a *Nitella microcarpa var. wrightii*.

Tabela 2. Quantificação de minerais das macroalgas *Nitella microcarpa var. wrightii* e *Oedogonium sp.*

Identificação	Macronutrientes mg/Kg						Micronutrientes mg/Kg				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Nitella microcarpa var. wrightii	24800	1200	11300	8900	2800	900	30	290	3413	765	153
Oedogonium sp.	35200	1000	13300	8700	2700	2800	0,5	66	1796	544	39
Enteromorpha spp. ¹	-	-	26960	4890	9570	-	-	31	1710	40	32
Ulva lactuca ¹	-	-	33420	4580	22520	-	-	3	830	18	9
Caulerpa lentillifera ²	-	-	11427	18747	10286	-	-	1	214	-	35
Sargassum polycystum ²	-	-	83712	37921	4878	-	-	0,3	682	-	22
Ulva clathrata ³	-	-	-	18800	-	-	-	14	4172	-	17
Ulva lactuca (Linnaeus) ⁴	-	-	5156	-	791	-	-	3	464	15	16
Enteromorpha intestinalis (Linnaeus) Nees ⁴	-	-	5893	-	617	-	-	4	254	13	21
Capsosiphon fulvescens ⁵	-	-	12	4450	6290	-	-	5	300	9	0,0116
Ulva lactuca ⁶	-	-	24140	27821	-	-	-	15	1995	21	-
Gracilaria salicornia ⁶	-	-	113801	9485	-	-	-	6	674	42	-

¹FLORES et al. 2015, ²MATANJUN et al. 2009, ³ PEÑA-RODRÍGUEZ et al 2011, ⁴ ROHANI-GHADIKOLAEI; ABDULALIAN; WING-KEONG, 2012, ⁵ HWANG; AMANO; PARK, 2008, ⁶TABARSA et al. 2012.

A macroalga *Nitella microcarpa var. wrightii* apresentou maior riqueza de minerais quando comparados ao da *Oedogonium sp.*, principalmente em relação aos micronutrientes, sendo que apenas os macronutrientes nitrogênio, potássio e sulfato foram ligeiramente superiores para *Oedogonium sp.* O teor de potássio encontrado para ambas macroalgas lóticicas foi inferior comparado a estudos de outros autores, com as algas marinhas *Enteromorpha spp*, *Ulva*

lactuca, e *Sargassum polycystum* (Tabela 2). Segundo MATANJUN et al. (2009) e PEÑA-RODRÍGUEZ et al. (2011), os valores de cálcio encontrados para *Caulerpa lentillifera*, *Sargassum polycystum* e *Ulva clathrata* foram superiores aos valores obtidos neste estudo para as macroalgas lólicas.

Os valores relatados para magnésio referentes às algas *Enteromorpha spp*, *Ulva lactuca*, *Caulerpa lentillifera*, *Sargassum polycystum* e *Capsosiphon fulvescens* foram maiores comparados ao das algas estudadas *Oedogonium sp* e a *Nitella microcarpa var. wrightii* conforme apresentado na Tabela 2.

Comparando resultados obtidos para ambas as algas lólicas em relação a cobre e manganês, verifica-se que foram superiores a todas às quantidades destes micronutrientes relatados para algas marinhas dos estudos citados na Tabela 2. O valor obtido para ferro da alga *Oedogonium sp*. foi próximo ao relatado por FLORES et al. (2015), para a alga *Enteromorpha spp*. , assim como o teor de ferro obtido para a alga *Nitella microcarpa var. wrightii* com relação ao teor encontrado por PEÑA-RODRÍGUEZ et al (2011) para a *Ulva clathrata*. Para ambas as algas em estudo o valor médio do teor de ferro (2604,5 mg/kg), foi próximo ao valor médio obtido no estudo de CARCEA et al. (2015) para algas verdes do gênero *Spirulina* (2807,0 mg/Kg).

Tem se intensificado a busca por métodos alternativos para remoção de íons de metais pesados em águas residuais e o uso de algas para este propósito oferece benefícios econômicos e ambientais. Sendo ecologicamente mais seguras e mais eficientes, as algas podem ser utilizadas como uma alternativa para auxiliar na absorção de metal tóxico e radioativo e também para recuperar íons metálicos como ouro e prata (ZERAATKAR et al., 2016).

Ambas as algas estudadas se apresentaram como uma importante fonte para obtenção de ferro como mostra os valores apresentados para este mineral na Tabela 2, podendo ser uma alternativa para indústrias alimentícias e farmacêuticas, na busca por enriquecer alimentos ou desenvolver medicamentos que possam ser utilizados, por exemplo, para auxiliar na deficiência de ferro no organismo, visto que a deficiência ou má absorção deste nutriente é um dos principais problemas de saúde pública. Estas algas lólicas, também poderiam ser aplicadas na industrial agrícola na produção de fertilizantes e nutrientes para lavoura, pois apresentam grande quantidade de nitrogênio, fósforo e potássio além de serem ricas fontes de cobre e manganês biodisponíveis. No entanto, são necessários estudos para se conhecer a toxicidade destas algas para possibilitar seu consumo e aplicação destes compostos derivados.

4 Conclusão

Conclui-se que as algas lólicas têm potencial para fornecer biocompostos, com possíveis utilizações nas áreas química, farmacêutica, agrícola, alimentícia entre outras. A espécie *Oedogonium sp.* destacou-se por apresentar grande quantidade de carotenoides totais. A espécie *Nitella microcarpa var. wrightii* apresentou valores maiores de micronutrientes, tais como ferro, cobre, manganês e zinco mostrando ser uma alternativa como fonte de minerais. Estas algas mostram que podem ser uma alternativa como potencial aplicação na remoção de metais em tratamento de águas residuais. Desta forma, é de extrema importância a caracterização e estudos para futuras aplicações desses materiais, como fonte de compostos biodisponíveis.

Referências

ABDEL-AAL, E. I.; HAROON, A. M.; MOFEED J. Successive solvent extraction and GC–MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, p. 1-14, 2015.

ANDRADE P. B.; BARBOSA, M.; MATOS R. P.; LOPES G.; VINHOLES J. Valuable compounds in macroalgae extrats. **Food chemistry**, v.138, p. 1819-1828, 2013.

AOAC (2000). Official Methods of Analysis, 17a Ed., AOAC Internacional: Gaithersburg, MD.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil*. 2º edição, São Carlos – SP, Editora RiMa, 502p., 2006.

Boletim Técnico, 100, IAC. *Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*. 2º edição, Campinas-SP, 1997.

CARCEA, M.; SORTO, M.; BATELLO, C.; NARDUCCI, V.; AGUZZI, A.; AZZINI, E.; FANTAUZZI, P.; FINOTTI, E.; GABRIELLI, P.; GALLI, V.; GAMBELLI, L.; MAINTHA, K. M.; NAMBA, F.; RUGGERI, S.; TURFANI, V. Nutritional characterization of traditional and improved dihe, alimentary blue-green algae from the lake Chad region in Africa. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 753-763, 2015.

CONTADO, E. W. N. DA F.; PATTO, L. S.; ROCHA, D. A.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. DOS S. Estudo dos métodos de extração de carotenoides em cenoura por fluido supercrítico (efs) e convencional. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, Edição Especial, p. 1617-1623, 2010.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, p. 178-182, 2002.

CHO, ML.; KANG, IJ.; WON, M.H.; LEE, HS.; YOU, SG. The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned Fractions from various green seaweeds. **Journal of Medicinal Food** 13, 5, p. 1232-1239, 2010.

CHO, M.; LEE, H.; KANG, II-J.; WON, M.; YOU, S. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. **Food chemistry**, v.127, p. 999-1006, 2011.

FLORES, S. R.L.; DOBBS, J.; DUNN M.A.; Mineral nutrient content and iron bioavailability in common and Hawaiian seaweeds assessed by an in vitro digestion/Caco-2 cell model. **Journal of Food Composition and Analysis**. V 43, p. 185–193, 2015.

GUARATINI, T.; CARDOZO, K. H. M.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Comparison of Diode Array and Electrochemical Detection in the C30 Reverse Phase HPLC Analysis of Algae Carotenoids. **J. Braz. Chem. Soc.**, n. 9, v.20, p. 1609-1616, 2009

HWANG, E. K.; AMANO, H.; PARK, C.S. Assessment of the nutritional value of *Capsosiphon fulvescens* (Chlorophyta): developing a new species of marine macroalgae for cultivation in Korea. **J. Appl. Phycol.** v. 20, p.147–151, 2008.

JUNTHIP, R., AMORNLERDPISON, D., CHIMSOOK, T. Phytochemical screening, antioxidant activit and total phenolic content of *Spirogyra spp.* **Advanced Materials Research**, v.699, p. 693-697, 2013.

LÓPEZ, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; TANGIL, M.S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chemistry** v.125, p. 1104-1109. 2011.

MATANJUN, P.; MOHAMED S.; MUSTAPHA N.MM; MUHAMMAD, K. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. **J. Appl Phycol** . v. 21, p.75–80, 2009.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2005. 313p.

PEÑA-RODRÍGUEZ A.; MAWHINNEY, T. P.; RICQUE-MARIE, D.; CRUZ-SUÁREZ, L.E. Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. **Food Chemistry** v.129, p. 491–498, 2011.

QUIRÓZ, A. R. B.; YUSTY, M. A. L.; HERNANDEZ, J. L. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. **Food Chemistry**, v.121, p. 634-638, 2010.

RAIMUNDO, M. S; HORTA P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil), **Revista Brasileira Científica Farmacêutica**, n.4, v.40, p. 495-503, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*, 6^a. ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2001.

ROHANI-GHADIKOLAEI, K.; ABDULALIAN, E.; WING-KEONG, NG. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. **J Food Sci Technol**. V. 49, p.774–780, 2012.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado técnico**. Embrapa. 4 p. Fortaleza, 2007.

SÁ, M. C. *Carotenóides em alimentos preparados para consumo: Comparação de análise direta e cálculo pelos dados de retenção*. 2001. 121 fs. (Dissertação de Mestrado - Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SEAL T.; HALDER N.; CHAUDHURI K.; SINHA S.N. Effect of solvent extraction system on the antioxidant activities of algae. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.6, p. 242-245, 2014.

SEAL, T.; HALDER, N.; CHAUDHURI, K.; SINHA, S. N. Evaluation of antioxidant activities of algae and effect of solvent extraction system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, p. 1273-1278, 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI - JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticult.** v.16, p. 144-158, 1965.

TABARSA, M.; REZAEI, M.; RAMEZANPOUR, Z.; WAALAND, J. R. Chemical compositions of the Marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **J Sci Food Agric**; V. 92, p. 2500–2506, 2012.

ZERAATKAR, A. K.; AHMADZADEH, H.; TALEBI, A. F.; MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of Environmental Management**, v.181, p. 817-831, 2016.

CONCLUSÕES

O delineamento experimental foi de extrema importância na busca de uma extração ótima para a quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante *in vitro*, visto que os extratos foram afetados pelo solvente. O solvente mais eficiente para a extração tanto de compostos fenólicos como compostos com capacidade antioxidante da macroalga verde *Oedogonium sp.* foi a mistura de etanol-acetona. A melhor proporção encontrada foi de cerca de 50% de etanol e de 50% acetona.

Assim sendo, a partir do melhor solvente em estudo foi possível quantificar e caracterizar duas espécies de algas verdes. A primeira alga em estudo, *Oedogonium sp.* apresentou uma grande quantidade de carotenoides totais. Já a alga da espécie *Nitella microcarpa var. wrightii.* obteve altos valores de minerais, em destaque para o teor de ferro, cobre zinco e manganês podendo ser considerada uma boa fonte de minerais biodisponíveis, para aplicação em diversos segmentos industriais. Portanto, foi de extrema importância a caracterização e estudos dessas macroalgas para futuras aplicações dos recursos que estas podem oferecer.