



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e**  
**Biociências**

Eva Regina de Oliveira Rodrigues

EXTRATOS ALCALINOS DAS ALGAS PARDAS  
*Ascophyllum nodosum* E *Sargassum cymosum* COMO  
BIOESTIMULANTES DE CULTIVARES DE *Oryza sativa*

Florianópolis  
2018

Eva Regina de Oliveira Rodrigues

EXTRATOS ALCALINOS DAS ALGAS PARDAS *Ascophyllum nodosum* E *Sargassum cymosum* COMO BIOESTIMULANTES DE CULTIVARES DE *Oryza sativa*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Doutora em Biotecnologia e Biociências  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues, Eva Regina de Oliveira  
EXTRATOS ALCALINOS DAS ALGAS PARDAS *Ascophyllum nodosum* E *Sargassum cymosum* COMO BIOESTIMULANTES DE CULTIVARES DE *Oryza sativa* / Eva Regina de Oliveira Rodrigues ; orientador, Marcelo Maraschin, 2018.  
119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

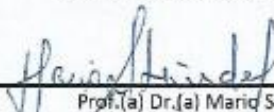
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Algas pardas. 3. Bioestimulantes. 4. *Oryza sativa*. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Extratos alcalinos das algas pardas *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum* como bioestimulantes de cultivares de *Oryza sativa*"**

Por

**Eva Regina de Oliveira Rodrigues**

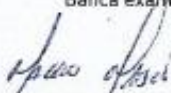
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (020/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



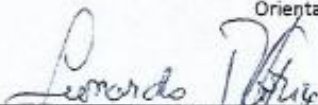
Prof.(a) Dr.(a) Mariq Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

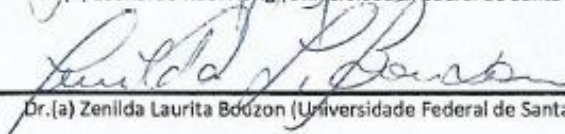
Banca examinadora:



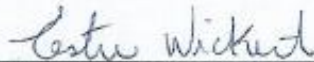
Dr.(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr.(a) Leonardo Rubi Rorig (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Zenilda Laurita Bozon (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Ester Wickert (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina)

Florianópolis, 11 de setembro de 2018.

Este trabalho é dedicado à minha mãe Cloé e à minha filha Évelin, pelo apoio incondicional.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e formação.

Ao meu orientador, por oportunizar minha inclusão em seu grupo de pesquisa e acreditar na minha capacidade de conduzir este projeto.

À minha filha Évelin e minha mãe Cloé pelo apoio incondicional em minhas escolhas.

À grande amiga e tutora Fernanda Ramlov, pelos seis anos de suporte.

À Dra. Ester Wickert, pelo carinho, disponibilidade pessoal, suporte técnico e de sua equipe, que possibilitou a implantação e condução deste trabalho. Agradecimento especial ao integrante da equipe, técnico Samuel Batista dos Santos, supervisor das atividades de campo coordenadas pela Ester. À todas as pessoas da Estação Experimental da EPAGRI Itajaí, pela simpatia com que sempre fui recebida.

Aos meus amigos, mais do que colegas, Rodolfo Moresco, Claudia Bauer, Marília Shibata e Daiane Fiuza pela amizade e toda ajuda, sempre que precisei.

Aos queridos companheiros Ana Voytena, Anabela Pizzatto, Larissa Simão, Heloísa Pitz, Bianca Coelho, Daniela Sousa, Simone Fanan, Bruno Navarro e Virgílio Uarrota pelas boas conversas e inúmeros momentos divertidos.

Às pessoas gentis e formidáveis que foram incansáveis em me auxiliar e dar suporte: Monique Souza, do laboratório de solos da UFSC, e Martina Blanck, do Cebime, nas análises.

À Dra. Beatriz Veleirinho por sua cordialidade e por ter me apresentado a algumas das pessoas mais generosas que já conheci: Ondina Veleirinho, Izil Veleirinho, Maria Elizabeth Jauretta, Norberto Jorge de Oliveira Carvalho, Antônio Carlos Veleirinho e Mônica Domingues Carvalho.

Ao professor João Coutinho, por me receber para estágio na U.A.

À Sônia Ventura, João Santos e Flávia Vieira, pelo suporte inestimável nas atividades do estágio sanduíche e aprendizado de novas abordagens analíticas. À receptividade dos alunos e pesquisadores do Path group – CICECO.

Ao Dr. Eduardo Nunes da EPAGRI, pela pronta disposição em auxiliar sempre que precisei.

À professora Leila Hayashi, do Departamento de aquicultura da UFSC pelo fornecimento de parte da biomassa algal utilizada neste projeto.

Aos funcionários da CIDASC, Vlademir, Goldoni e Antônio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão das Bolsas de doutorado e sanduíche.



*“A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável”*  
Mahatma Gandhi



## RESUMO

Nos últimos anos, o interesse em extratos de algas como promotores de crescimento e bioestimulantes em culturas agrícolas, tem aumentado acentuadamente. Entre as algas marinhas, a mais comumente utilizada para essa finalidade é a parda *Ascophyllum nodosum*. Neste trabalho foram aplicadas técnicas analíticas típicas da metabolômica, na investigação de efeitos bioestimulantes de extratos alcalinos das algas pardas *Sargassum cymosum*, de clima tropical e subtropical e *A. nodosum*, de ocorrência em clima temperado, usando como modelo agrícola plantas de arroz de pericarpos preto (variedade Ônix), vermelho (Rubi) e branco (Marques e EPAGRI106), avaliados por suas sementes, folhas e grãos. Os extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum* foram formulados à base de KOH 1,5 M. Cinquenta sementes de arroz de três das quatro variedades foram dispostas em papéis Germitest® e pulverizadas com 2,5 vezes (o equivalente da massa seca do papel) de água destilada (controle) ou extratos das algas marinhas (nas concentrações de 0,1, 0,5, 0,75 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) em quatro repetições para cada tratamento. As sementes foram mantidas em câmara de germinação por 7 dias a 25°C em fotoperíodo de 12 horas e medidos taxa de germinação e comprimento de plântulas. Plântulas das sementes de arroz tratadas com extratos de *S. cymosum* a 0,75g L<sup>-1</sup> e 0,5g L<sup>-1</sup> e de *A. nodosum* a 0,75g L<sup>-1</sup> tiveram taxas de crescimento maiores (p < 0,05) em relação às do controle. A maior concentração de extrato de *A. nodosum* (1,0 g L<sup>-1</sup>) foi inibitória para o crescimento radicular de plântulas nas três variedades e o extrato de *S. cymosum*, na mesma concentração, para Rubi e Marques. Os resultados mostraram destaque no efeito estimulante dos extratos de algas marinhas sobre o crescimento principalmente em plântulas do arroz preto nas menores concentrações, com desempenho superior de *S. cymosum*. Plantas de arroz das quatro variedades estudadas, foram tratadas por aspersão foliar com extratos a 0,5g L<sup>-1</sup> (concentração T1 – extrato de *A. nodosum*; T2 – extrato de *S. cymosum*) ou com água destilada (T3 – controle) ao longo de três ciclos da cultura em experimentos implantados nos anos de 2015 e 2016. Folhas e grãos foram coletados, para análises bioquímicas e espectroscópicas. Amostras das folhas e grãos e dos extratos de algas, foram analisados, através de ferramentas analíticas (espectrofotometria de UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE, espectroscopia de infravermelho distante FT-IR e próximo – NIR, e espectrometria - RMN e massas por MALDI-TOF) e quimiométricas, gerando conjuntos de informações que, cruzadas, permitiram inferências

como a similaridade de efeitos dos dois extratos, nos arrozos, e a detecção de perfis bioquímicos muito semelhantes entre os extratos das duas algas. Considerando que *A. nodosum* já tem os atributos bastante estudados e estabelecidos na bioestimulação e nutrição de plantas de importância comercial, tais resultados forneceram informações relevantes para o uso da alga tropical *S. cymosum* para este fim.

**Palavras-chave:** Algas pardas. Bioestimulantes. *Oryza sativa*

## ABSTRACT

In recent years, interest in algae extracts as growth promoters and biostimulants in agricultural crops has increased sharply. Among marine algae, the most commonly used for this purpose is the brown *Ascophyllum nodosum*. In this work, typical analytical techniques of the metabolomics were applied in the investigation of the biostimulating effects of alkaline extracts of brown seaweed *Sargassum cymosum*, tropical and subtropical seaweed, and *A. nodosum*, temperate algae, using as a model rice plants of the varieties Ônix (black pericarp), Rubi (red pericarp), Marques and EPAGRI106 (white pericarp), in seeds, leaves and grains. The extracts of *S. cymosum* and *A. nodosum* were formulated with 1.5 M KOH. Fifty rice seeds of three of the four varieties were arranged in Germitest® papers and sprayed 2.5 times (the dry mass equivalent of paper) of distilled water (control) or seaweed extracts (at concentrations of 0.1, 0.5, 0.75 and 1.0 g L<sup>-1</sup>) in four replicates for each treatment. The seeds were kept in germination chamber for 7 days at 25 ° C in photoperiod of 12 hours and measured germination rate and seedling length. Rice seedlings treated with extracts of *S. cymosum* at 0.75g L<sup>-1</sup> and 0.5g L<sup>-1</sup> and *A. nodosum* at 0.75g L<sup>-1</sup> had higher growth rates (p <0.05) in relation to the control group. The highest concentration of *A. nodosum* extract (1.0 g L<sup>-1</sup>) was inhibitory to the growth of the seedlings in the three varieties and the *S. cymosum* extract, in the same concentration, for Rubi and Marques. The results showed a prominent effect on the stimulating effect of seaweed extracts on growth, especially in black rice seedlings at the lowest concentrations, with better performance of *S. cymosum*. In another experiment, rice plants of the four varieties studied were treated by leaf spraying with 0.5g L<sup>-1</sup> extracts (concentration T1 - extract of *A. nodosum*; T2 - extract of *S. cymosum*) or with distilled water (T3 - control) over three crop cycles in experiments implanted in the years 2015 and 2016. Leaves and grains were collected for biochemical and spectroscopic analyzes. Samples of the leaves and grains and algal extracts were analyzed using analytical tools (UV-visible spectrophotometry, high performance liquid chromatography-CLAE, FT-IR far infrared spectroscopy, and near-infrared infrared spectroscopy - NIR, and NMR-mass spectrometry by MALDI-TOF) and chemometrics, generating sets of information that, in cross-section, allowed inferences such as the similarity of effects of the two extracts in the rice fields and the detection of very similar biochemical profiles between the extracts of the two algae. Considering that *A. nodosum*

already has the attributes well studied and established in the biostimulation and nutrition of plants of commercial importance, these results provided relevant information for the use of *S. cymosum* tropical algae for this purpose.

**Keywords:** Brown seaweed. Biostimulants. *Oryza sativa*

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1** – Detalhes das biomassas das algas pardas: (A) *Ascophyllum nodosum*; (B e C) *Sargassum cymosum*. Nota-se a distinção clara de tonalidades entre as espécies em estudo.....37

**Figura 2** – Representação esquemática do corte longitudinal de um grão de arroz (cariopse), com destaque para o pericarpo, camada mais externa, onde se concentram os pigmentos. .... 39

**Figura 3** – Cultivares de arroz: A) Planta de Rubi (vermelho); B) Plantas de Ônix (preto); C) Grãos descascados das cultivares Ônix, Rubi e Marques (branco).....41

### CAPÍTULO II

**Extratos de *Sargassum cymosum* C. Agardh e *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis como estimulantes do crescimento de plântulas das cultivares Rubi, Ônix e Marques de *Oryza sativa* L.**

**Figura 1** – A) Sementes de arroz Ônix e Rubi; B) Sementes de arroz da Marques, envolvidas em papel Germitest® após tratamentos com extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum*. .... 47

**Figura 2** – Plântulas de arroz após sete dias de embebição de sementes em incubadora tipo BOD. .... 47

**Figura 3** - Comprimento de raízes e de parte aérea de plântulas das cultivares de arroz vermelho, Rubi (A-B); preto, Ônix (C-D) e branco, Marques (E-F), tratadas com extrato alcalinos de *A. nodosum* (A-C-E) e de *S. cymosum* (B-D-F), nas concentrações 0,0 (co ntrole); 0,1; 0,5; 0,75 e 1,0 gL<sup>-1</sup>. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão (n = 4). Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey..... 52

**Figura 4** – Espectros de UV-visível dos extratos alcalinos de *A. nodosum* e *S. cymosum* (200 a 800nm) ..... 54

**Figura 5** – Espectros de FT-IR dos extratos alcalinos: (A) *A. nodosum* e (B) *S. cymosum*, na janela espectral 3000cm<sup>-1</sup> - 600cm<sup>-1</sup> ..... 55

### CAPÍTULO III

**Efeitos da aplicação de extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum* em tecido foliar das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) Rubi, Ônix e Marques**

**Figura 1** - (A) Imagem das plantas de arroz aos 20 dias após a semeadura em substrato coletado em quadras de arroz (experimento I - 2015), na Estação Experimental da EPAGRI - Itajaí; (B) detalhe do fenótipo de cada cultivar aos 20 dias após a semeadura. .... 61

**Figura 2** – Detalhes da parte aérea de plantas das variedades EPAGRI106, Ônix e Rubi nos experimentos II e III: (A) Mudanças dos genótipos de arroz semeadas em caixas; (B) Plantas de EPAGRI106 em início de perfilhamento; (C) Plantas de Ônix no estágio vegetativo; (D) Plantas de Rubi no estágio reprodutivo.. .... 63

**Figura 3** - Material colhido no final do experimento: (A) Panículas da cultivar Ônix (preto), colhidas ao final do experimento e grãos após degrana; (B-C) Detalhes dos grãos da variedade Rubi (vermelho) após degrana manual; (D) Grãos descascados das variedades Rubi (acima) e Ônix (abaixo)..... 64

**Figura 4** – Teores (µg.g<sup>-1</sup>) de clorofilas (A) e carotenoides (B) em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.. .... 72

**Figura 5** – Teores (mg.g<sup>-1</sup>) de fenólicos (A) e flavonóides (B) em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes



indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.....73

**Figura 6** – Porcentagem de inibição do radical livre DPPH em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey..... 74

**Figura 7** - Teores ((mg.g<sup>-1</sup>) de açúcares solúveis totais em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.....74

**Figura 8** – Espectros de reflectância na região do infravermelho próximo (3600 a 12500 cm<sup>-1</sup>) de tecido foliar das cultivares de arroz Rubi, Ônix, Marques e EPAGRI106. (A) - experimento II, safra 2016.1 e (B) experimento III, safra 2016.2 ..... 75

**Figura 9** - Espectros de reflectância na região do infravermelho próximo, destacando a região de sinais de maior intensidade (4000 a 9000 cm<sup>-1</sup>), de amostras foliares dos genótipos de arroz em estudo. (A) - experimento II, safra 2016.1 e (B) experimento III, safra 2016.2..... 76

**Figura 10** - Distribuição fatorial dos componentes principais dos espectros de absorvância na região do infravermelho (3600 a 9000 cm<sup>-1</sup>) dos experimentos II (2016.1) e III (2016.2).....77

**Figura 11** – Dendograma dos espectros de reflectância (3600 a 9000 cm<sup>-1</sup>) resultante de análise de cluster hierárquico utilizando a distância euclidiana em relação às safras 2016.1 e 2016.2.....78

## CAPÍTULO IV

**Efeito do tratamento com extratos das algas pardas *A. nodosum* e *S.cymosum* no perfil metabólico de grãos de arroz pigmentados (cultivares Ônix e Rubi) e não pigmentos (cultivar EPAGRI106)**

**Figura 1** - Teores (mg.g<sup>-1</sup>) de fenólicos totais (A) e flavonoides (B) em amostras dos grãos das cultivares Rubi (R), Ônix (O) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos II e III conduzidos em 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey. .... 86

**Figura 2** - Percentual da atividade antioxidante do DPPH (A) e teores (mg.g<sup>-1</sup>) de açúcares solúveis totais (B) em amostras dos grãos das cultivares Rubi (R), Ônix (O) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos II e III conduzidos em 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey. .... 87

**Figura 3** - Perfis cromatográficos obtidos por (CLAE-DAD, 270 nm) dos extratos hidroalcoólicos de grãos da cultivar Ônix, após tratamento com os extratos de (A) *A. nodosum* (T1), (B) *S. cymosum* (T2) e (C) controle (T3).....88

**Figura 4** – Cromatograma de uma amostra do extrato hidroalcoólico de grãos da cultivar Ônix (OT2), acrescida do padrão cianidina-3-O-glucosídeo..... 89

**Figura 5** - Perfis cromatográficos (CLAE-DAD, 270 nm) dos extratos hidroalcoólicos de grãos de arroz da cultivar Rubi, após tratamento com os extratos de (A) *A. nodosum* (T1), (B) *S. cymosum* (T2) e (C) controle (T3). .... 89

**Figura 6** - Espectro de ionização do padrão de cianidina-3-O-glucosídeo, na janela espectral que abrange os picos de ionização da

molécula (200 a 500 m/z). A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras..... 92

**Figura 7** - Espectro de ionização do padrão de cianidina-glicosídeo (A) e das amostras de grãos da cultivar Ônix consoante aos tratamentos: (B) OT1- extrato alcalino de *A. nodosum*; (C) OT2- extrato alcalino de *S. cymosum* e (D) OT3 – controle, coletados no experimento III. A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras.....93

**Figura 8** – Espectro de ionização do padrão de cianidina-3-O-glucosídeo (A) e das amostras de grãos da variedade Rubi, conforme os tratamentos RT1 - extrato alcalino de *A. nodosum* (B); RT2 - extrato alcalino de *S. cymosum* (C) e RT3 – controle (D), coletados no experimento III. A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras ..... 94

**Figura 9** – Espectro de ionização do padrão de peonidina e das amostras de grãos da cultivar Ônix tratada com o extrato alcalino de *S. cymosum* (RT2) dos experimentos II e III, respectivamente. A letra M indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico utilizada na cocristalização das amostras..... 96

**Figura 10** – Espectros de absorvâncias na região do infravermelho próximo (3600 a 12500 cm<sup>-1</sup>) de grãos de arroz colhidos nos experimentos II (safras 2016.1) e III (safra 2016.2) – (A), das variedades Rubi, Ônix e EPAGRI106 - (B)..... 98

**Figura 11** – Espectros de reflectância na região do infravermelho selecionada para as análises quimiométricas (3600 a 9000 cm<sup>-1</sup>) de grãos de arroz: A - experimentos II (safras 2016.1) e III (safra 2016.2) e B - variedades de arroz Rubi, Ônix e EPAGRI106. .... 99

**Figura 12** – distribuição fatorial dos componentes principais dos espectros de absorvância na região do infravermelho próximo (3600 a 9000 cm<sup>-1</sup>) dos experimentos I e II (A) e de amostras sólidas de grãos das cultivares de arroz Rubi, Ônix e EPAGRI106 (B)..... 100

**Figura 13** – Dendograma dos dados espectroscópicos na região de absorvância de compostos fenólicos (3600 a 9000 cm<sup>-1</sup>), utilizando a

distância euclidiana em relação às safras 2016.1 e 2016.2 (A) e às cultivares de arroz (B). ..... 101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos das concentrações de extratos de *A.nodosum* e *S. Cymosum* na taxa de germinação total em sementes de arroz das cultivares Rubi, Ônix e Marques (n=4). Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey (p <0,05)..... 49

Tabela 2 - Desvios químicos de <sup>1</sup>H-RMN (9,4 Tesla), atribuição e multiplicidade de prótons de ressonâncias de metabólitos identificados em extratos alcalinos das algas pardas *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum*. ..... 56

Tabela 3 - Número de panículas por planta das cultivares Rubi, Ônix e Marques colhidas nos experimentos II (2016.1) e Rubi, Ônix e EPAGRI 106 colhidas no experimento III (2016.2). Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey (p <0,05)..... 68

Tabela 4 - Peso de 1000 grãos de cada tratamento das cultivares Rubi e Ônix (experimento II - 2016.1) e Rubi, Ônix e EPAGRI 106 (experimento III - 2016.2). Peso seco de folhas das cultivares Rubi, Ônix, Marques e EPAGRI 106). Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey (p <0,05)..... 69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\alpha$ -CHCA** – ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
- BOD** - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- CCA** – Centro de Ciências Agrárias
- Cebime** – Centro de Biologia Molecular Estrutural
- CG** – Cromatografia gasosa
- Chl** – Clorofila
- CIDASC** – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
- CLAE (HPLC)** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento
- CTs** – Carotenoides totais
- DAD** – Detector de arranjo de diodos
- DMSO** – Dimetil Sulfóxido
- DPPH** – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- EEl** – Estação Experimental de Itajaí
- EPAGRI** – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- FAO** – Food and agriculture organisation of the United Nations
- FT-IR** – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourie
- LMBV** – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
- LNBio** – Laboratório Nacional de Biociências
- MALDI** – Ionização e Dessorção a laser assistida por matriz
- MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MCW** – Methanol, Chloroform and Water
- MS** – Mass spectroscopy (Espectroscopia de massas)
- MS-MS** – Massa – massa

**NIR** – Near Infrared (Espectroscopia de Infravermelho próximo)

**P.A.** – Padrão analítico

**RMN (NMR)** – Ressonância magnética nuclear

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**TMS** – Tetrametilsilano

**ToF** – Time of Fly (Tempo de voo)



## LISTA DE SÍMBOLOS

**°C** – Grau(s) Celsius

**μ** - Micrograma

**μ.g<sup>-1</sup>**- Micrograma por grama

**g L<sup>-1</sup>** – Grama por litro

**μm** -Micrômetro

**m/z** – Relação carga massa

**C18** – Carbono 18

**mM** – Milimolar

**Ø** – Diâmetro

**nm** – Nanômetro

**%** - Percentagem

**v/v** – volume/volume

**rpm** – Rotações por minuto

**g** – Grama

**mAU** – Área de pico

**α** – Alfa

**β** - Beta

**g** – Força G

**A** – Absorbância

**Hz** – Hertz

**M** - Molar

## APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese está dividida em cinco capítulos e os tópicos estão distribuídos da seguinte maneira:

No capítulo I se encontram a Introdução geral, os objetivos e material e métodos. No capítulo II encontra-se o primeiro experimento, descrevendo os ensaios de uso de extratos das algas pardas *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum* aplicados à germinação de sementes de arroz ao longo dos estádios pós-germinação.

Com base nos resultados de um ensaio piloto e dos ensaios com sementes (capítulo II), selecionou-se a concentração de determinação dos efeitos bioestimulantes de aplicações foliares em plantas de arroz. Para isso foram implantados e conduzidos três experimentos (capítulo III), em três safras da cultura. O primeiro experimento consistiu em cultivo com aplicação dos extratos e obtenção de biomassa ao longo do período vegetativo das plantas, enquanto no segundo e terceiro ensaios, que consistiram em condução da cultura por duas safras completas, foram coletadas amostras de biomassas nos estádios vegetativos e de grãos. As análises do material vegetativo coletado nos três experimentos a campo consistiram em detecção, quantificação e/ou identificação de compostos dos metabolismos primário e secundário, com suporte de técnicas quimiométricas.

No capítulo IV foram aplicadas técnicas analíticas na determinação dos perfis metabólicos de grãos coletados das plantas tratadas nos experimentos 2 e 3. As análises consideraram a identificação e quantificação de compostos do metabolismo primário e secundário, bem como a determinação da atividade antioxidante de extratos dos grãos.

O capítulo V consiste nas considerações finais do trabalho, referências bibliográficas.

Como apêndice, um esquema descritivo das atividades realizadas durante a tese.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
1.1 ALGAS.....	32
<b>1.1.1 Algas na agricultura.....</b>	<b>33</b>
<b>1.1.2 Algas pardas.....</b>	<b>35</b>
1.1.2.1 <i>Ascophyllum nodosum</i> (Linnaeus) Le Jolis.....	36
1.1.2.2 <i>Sargassum cymosum</i> C.Agardh.....	36
1.2 METABOLISMO VEGETAL.....	37
1.3 <i>Oryza sativa</i> L. – CULTIVO E IMPORTÂNCIA.....	38
1.4 METABOLÔMICA E QUIMIOMETRIA.....	42
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 GERAIS.....	43
2.2 ESPECÍFICOS.....	43
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	43
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS.....	44
3.3 AMOSTRAS DE ARROZ.....	44

### CAPÍTULO II

**Extratos de *Sargassum cymosum* C. Agardh e *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis como estimulantes do crescimento de plântulas das variedades Rubi, Ônix e Marques de *Oryza sativa* L.**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
2.1 TESTES DE GERMINAÇÃO.....	46
2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	47
2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>

3.1 COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS ALCALINOS.....	53
---	----

### CAPÍTULO III

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO E PREPARO DOS EXTRATOS.....	60
2.2 IMPLANTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	60
2.2.1 Experimento I (2015).....	60
2.2.2 Experimentos II e III (2016.1 e 2016.2).....	62
2.2.3 Colheita.....	64
2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	65
2.3.1 Extração e quantificação de clorofilas e carotenoides totais.....	65
2.3.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais .....	65
2.3.3 Extração e quantificação de flavonoides totais....	65
2.3.4 Determinação da inibição do DPPH(%).....	66
2.3.5 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais.....	66
2.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS.....	67
2.4.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR).....	67
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
3.1 DETECÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS POR NIR .....	75
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>

### CAPÍTULO IV

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>82</b>

2.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	82
<b>2.1.1 Quantificações por espectrofotometria de UV- visível.....</b>	<b>82</b>
2.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICA.....	83
<b>2.2.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR) .....</b>	<b>83</b>
2.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	83
2.3.1 CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
2.4 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS.....	84
<b>2.4.1 Espectrometria de massas MALDI-TOF .....</b>	<b>84</b>
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	84
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
3.1 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOÍDES, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E REDUÇÃO DO DPPH.....	85
3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCINAINA POR CLAE.....	87
3.3 IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS – MALDI-TOF.....	91
3.4 DETECÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS POR NIR.....	97
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>102</b>
 <b>CAPÍTULO V</b>	
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE A - Descrição esquemática do conjunto de atividades executadas nos ensaios.....</b>	<b>119</b>



# CAPÍTULO I

---

## 1. INTRODUÇÃO

As possibilidades biotecnológicas contidas em ambientes aquáticos têm sido objeto de interesse crescente em diversos ramos da área científica. Organismos com destaque nesses ambientes são as macroalgas marinhas, que têm atraído a atenção como fonte de compostos bioativos com efetiva aplicação na alimentação, produção de farmoquímicos ou biofertilizantes, ou mesmo ao monitoramento ambiental (ANDRADE *et al.* 2010; PILATTI *et al.* 2016). O domínio na produção e exploração de produtos oriundos de algas marinhas para processamento está em países como China e Japão, que são, atualmente, os principais produtores, seguidos dos EUA, Canadá e Noruega. No Brasil, no tocante à exploração de espécies com fins comerciais, observa-se que a atividade vem crescendo significativamente com a coleta de algas vermelhas dos gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* no litoral do Nordeste, notadamente na faixa litorânea dos Estados do Ceará e Paraíba (VIDOTTI E ROLLEMBERG, 2004).

Na área agrícola, algas marinhas, usadas *in natura* há milhares de anos como fertilizantes, têm gerado crescente interesse, principalmente à formulação de extratos e obtenção de compostos reguladores de crescimento e bioestimulantes, em cultivos de importância comercial como de uva, cevada, trigo, espinafre, tomate, pepino e soja (KHAN *et al.* 2009; KOK, 2010; SIVASANKARI *et al.* 2006). Representantes de algas de todas as classes têm sido estudados e usados na aplicação para crescimento, desenvolvimento e indução de defesa em plantas.

Usualmente os estudos para o desenvolvimento de produtos comerciais funcionais têm sido focados em algas marinhas de ambientes temperados frios, produtoras de grandes quantidades de biomassa. Contudo, algas marinhas tropicais, a despeito da menor produção em termos de biomassa, têm chamado atenção por seu potencial como fonte de compostos bioativos. Assim, este trabalho considerou o estudo do potencial de uso das biomassas das duas algas pardas, *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum*, de climas temperado e tropical, respectivamente, como fontes viáveis à aplicação na área agrícola.

## 1.1 ALGAS

Nas diferentes áreas que constituem o ambiente marinho encontram-se grande parte dos organismos existentes no planeta, entre os quais as algas em sua diversidade. Fundamentalmente aquáticas, as algas são organismos com capacidade de habitar todos os meios que lhes forneçam umidade e luz suficientes, sejam temporárias ou permanentes. Encontradas em águas doces, água do mar, sobre solos úmidos ou mesmo sobre a neve, sejam elas uni- ou pluricelulares, as algas são capazes de retirar do meio onde se encontram, todos os nutrientes de que necessitam. São seres fotossintetizantes, cujos representantes distribuem-se desde organismos planctônicos (MCQUATTERS-GOLLOP *et al.* 2011), até espécimes que podem atingir grandes proporções, e.g., as pardas da ordem Laminariales. As macroalgas (algas bentônicas), espécies que vivem em relação íntima com substratos no ambiente marinho, são constituintes fundamentais dos ecossistemas marinhos, na formação de comunidades dos costões, de ambientes de forrageamento, desova e até mesmo habitat de inúmeras espécies de peixes juvenis e de outros organismos, inclusive algas. Esses ambientes são zonas entremarés, locais de fortes interações biológicas e condições abióticas extremas.

Como estratégia de defesa e de sobrevivência nesses ambientes altamente competitivos, as algas bentônicas são dotadas de estruturas e da capacidade de produção de variado número de compostos metabólicos (TORRES *et al.* 2008; RAMLOV, 2011). Grande parte desses compostos, como esteroides, ácidos graxos, polissacarídeos, pigmentos, aminoácidos tipo micosporinas, compostos halogenados e toxinas, são potencialmente importantes economicamente (HOLDT and KRAAN, 2011).

Os organismos bentônicos e seus produtos são assim, os mais explorados antropicamente. Macroalgas, representantes dos filos Chlorophyta (verdes), Rhodophyta (vermelhas) e Ochrophyta (pardas) são usadas *in natura* ou processadas à alimentação animal ou humana, na forma de espessantes e estabilizantes em alimentos como sorvetes, doces, cremes, molhos e derivados de carne; matérias-primas na elaboração de medicamentos, combustíveis e cosméticos, por exemplo. Neste contexto, destacam-se compostos bioativos e polímeros, como os ficocoloides ágar-ágar, ácido alginico e carragenana, principais constituintes das paredes celulares de algas verdes, pardas e vermelhas, de uso corrente pela indústria (DHARGALKAR & PEREIRA, 2005; GAMAL, 2010; TEIXEIRA, 2013).



### 1.1.1 Algas na agricultura

Nas últimas décadas tem crescido o interesse no processamento de algas para uso na área agrícola, baseado em seus valiosos constituintes químicos, muitos dos quais com múltipla bioatividade (STENGEL *et al.* 2011; VIDOTTI E ROLLEMBERG, 2004).

Correntes contrárias às práticas da Revolução Verde (movimento tecnológico que, em linhas gerais, proporcionou maior eficiência na produção agrícola tendo como uma das bases o uso intensivo de agroquímicos – fertilizantes e pesticidas), têm se destacado nas últimas décadas (ALBERGONI E PELAEZ, 2007). A demanda crescente por alimentos e inevitáveis impactos ambientais globais causados pela conversão de ecossistemas naturais em agricultura, remetem a reflexão para atitudes, técnicas de manejo e produtos, alternativos aos praticados atualmente, buscando reduzir a simplificação de ecossistemas e controle da expansão agrícola (TILMAN *et al.* 2002; ALBERGONI & PELAEZ 2007). Assim, na produção agrícola moderna tem-se buscado práticas de manejo e conjunto de moléculas que reduzam ou substituam fertilizantes sintéticos, diminuindo os impactos ambientais e à saúde, sem perda de produtividade. Para esse fim, cabe destacar os compostos de origem orgânica que atuam como biofertilizantes ou bioestimulantes no crescimento e desenvolvimento vegetal (GARCÍA-FRAILE *et al.* 2015; CALVO *et al.*, 2014).

Uma vasta gama de compostos e estruturas são atribuídos às macroalgas, gerando produtos cujas formulações têm efeitos em todos os estádios fisiológicos das plantas, em substituição parcial aos produtos sintéticos convencionais em diversas culturas, e.g., uva, cevada, trigo, feijões, espinafre, tomate e pimentão (ARTHUR *et al.* 2003). A aplicação de extratos de algas marinhas como fonte de nutrientes vegetais pode reduzir o uso e, conseqüentemente, o impacto causado por fertilizantes químicos convencionais tanto do ponto de vista ambiental, sobre a flora e fauna do solo por exemplo, quanto econômico (PIMENTAL *et al.* 2005; CRAIGIE, 2011; LECHENET *et al.* 2014).

Efeitos positivos às plantas, com a utilização de extratos de macroalgas, têm sido relatados. Por exemplo, o extrato da macroalga vermelha *Gracillaria edulis* otimizou o processo germinativo de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda - LINGAKUMAR *et al.* 2002). Rathore *et al.* (2009), em experimento conduzido na Índia, mostraram incremento na absorção de nutrientes de *Glicine max* (soja) após aplicação foliar do extrato da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. De

forma semelhante, Shah *et al.* (2013) observaram aumento no crescimento e produção de variedade de trigo após aplicações foliares de extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria edulis*. Apesar da grande diversidade de algas encontradas em ambientes tropicais e subtropicais, com potencial como fonte de compostos bioativos, estas são com frequência, pequenas, esparsas e sazonais. Assim, algas de clima temperado, produtoras de grandes volumes de biomassa ao longo do ano, são as mais exploradas para formulação de produtos de aplicação agrícola.

As algas pardas, abundantes em águas de clima frio, são as mais estudadas para fins agrícolas, e dentre elas *Ascophyllum nodosum* (Fucales) é a mais utilizada, especialmente na Europa (BROWN, 2004). Seus extratos quando pulverizados induzem o aumento da absorção de nutrientes, conferem resistência a estresses abióticos (geadas, *e.g.*), prolongam a vida de prateleira às frutas e melhoram a germinação de sementes. Sivasankari *et al.* (2005) comprovaram a eficiência do uso de extratos de *Sargassum wightii*, alga parda de ocorrência predominante na África e em países asiáticos, sobre a germinação de sementes de *Vigna sinensis* (feijão miúdo). De forma similar, o extrato de *Sargassum myriocystum*, também encontrado naquelas regiões, foi efetivo no aumento da taxa de germinação de *Vigna mungo* (feijão-da-índia - KALAIWANAN & VENKATESALU, 2012). Além disso, concorrem à redução da incidência de pragas e doenças, atuando como elicitores da produção de fitoalexinas e indutores de mecanismos de defesa nas plantas. Alguns dos efeitos relatados de fertilizantes líquidos de algas são atribuídos à presença de oligo ou polissacarídeos (PATIER *et al.* 1993). Contudo, são os compostos do metabolismo secundário, especialmente os polifenóis, os mais ativamente envolvidos nos mecanismos de defesa e proteção das plantas, dada à diversidade de estruturas químicas destes compostos.

No Brasil, o uso de produtos a base de extrato de algas na agricultura é regulamentado pelo Decreto nº 4.954, de 2004. No contexto da inserção do país no agronegócio mundial, percebe-se a existência de poucos trabalhos na área afim, citando-se como exemplo o uso do extrato comercial de *A. nodosum* para aumento da produção comercial e no “*fruit set*”, na cultura do café (LABRENZ e DRUSCHEL, 2011) sendo, contudo, esta espécie algal exótica ao ecossistema marinho brasileiro.

Trabalhos concernentes à análise do conteúdo de extratos de macroalgas com ação bioestimulante em espécies de interesse agrícola atribuem as atividades de extratos de algas no aumento de produção de

biomassas e eficiência germinativa, aos micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Mn e Ni, por exemplo), vitaminas, aminoácidos, auxinas (ácido 3-indol-acético - AIA), giberelinas e citocininas, bem como a compostos do metabolismo secundário, i.e., os polifenóis (ZHANG *et al.* 1991; DEMIR *et al.* 2006; RAYORATH *et al.* 2008; WANG *et al.* 2014).

Diferentes formulações têm sido usadas no preparo de extratos algais, entre as quais estão os extratos aquosos, os ácidos e os alcalinos. A natureza da maior parte dos extratos comerciais à base de *A. nodosum* é alcalina (KHAN *et al.* 2009). Por essa razão optou-se por tal formulação para preparo dos extratos aplicados neste trabalho.

### **1.1.2 Algas pardas**

O filo das algas pardas (Ochrophyta), constituído por organismos pluricelulares predominantemente marinhos, marca presença em mares frios. São as algas de maior relevância em águas temperadas e polares, ocorrendo fixadas a substratos, onde formam imensas florestas submersas ou ainda, flutuantes. A este grupo pertencem as algas da ordem Laminariales, entre as quais estão as maiores espécies existentes, podendo atingir mais de 25 metros e formar extensas coberturas a pouca distância da costa, chamadas de *kelps*. Mesmo em regiões tropicais, onde não são predominantes, algas pardas podem formar massas flutuantes. Nessas áreas algumas espécies, como *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, podem apresentar altos níveis de crescimento (STRONG *et al.* 2006).

Algas pardas têm grande importância ecológica, no suporte de ecossistemas, com relevância no monitoramento ambiental. São também desta classe as macroalgas mais exploradas para aplicação em áreas agrícolas (KHAN, 2009). Nesses organismos são encontrados além das clorofilas *a* e *c*, compostos carotenóidicos, sendo em maior quantidade a fucoxantina, uma xantofila que confere aos indivíduos deste grupo a cor característica, entre marrom e verde-oliva. Como substância de reserva dessas algas tem-se o polissacarídeo laminarina, armazenado em vacúolos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Além disto, outra macromolécula importante derivada de algas pardas, em especial aquelas de clima temperado, e constituinte das paredes celulares é o alginato, um polissacarídeo sulfatado utilizado como estabilizante e emulsificante de alimentos e na formulação de tintas (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). De outra forma, quanto ao metabolismo secundário, estudos têm descrito o papel de compostos fenólicos de algas pardas em mecanismos de defesa química contra herbivoria. Dentre os compostos fenólicos, os florotaninos, em especial o florogucinol, são os predominantes e

encontrados apenas neste grupo de algas. Aos florotaninos são atribuídas, juntamente com as fucanas - polissacarídeos sulfatados complexos encontrados na parede celular de algas pardas, propriedades antioxidantes (BALBOA *et al.* 2013). Nestas algas, os compostos fenólicos, polímeros de floroglucinol, localizam-se no interior dos fisoides, vesículas com importante papel funcional na constituição de paredes e em mecanismos de reparo de danos (WIJESEKARA *et al.* 2011 STENGEL *et al.* 2011).

#### 1.1.2.1 *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis

Espécie pertencente ao grupo das algas pardas *A. nodosum* é uma grande alga da classe Phaeophyceae, ordem Fucales, família Fucaceae e única espécie do gênero *Ascophyllum* (Fig. 1A), mais comumente encontrada na costa noroeste da Europa, incluindo o leste da Groenlândia e a costa nordeste da América do Norte.

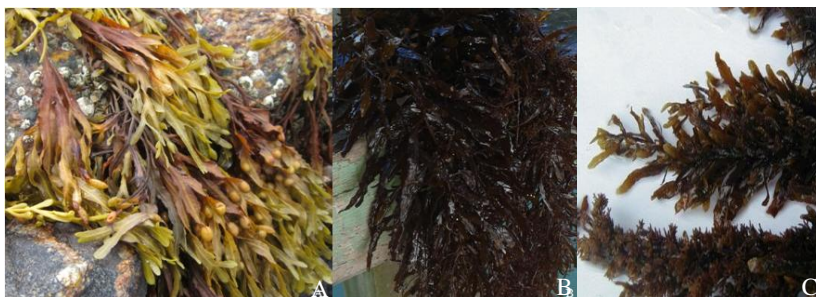
A biomassa de *A. nodosum* é coletada para extração de alginatos, à fabricação de farinha usada na alimentação animal e formulação de extratos usados como fertilizantes. A presença de importantes compostos bioativos, faz de *A. nodosum* a alga mais estudada e explorada comercialmente para fins agrícolas. Para este fim são atribuídos a biomassa dessa alga, macro e micronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Cu, Fe, Zn, etc.), além de moléculas e compostos bioativos como betaínas, manitol, ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas, amplamente utilizados em culturas agrícolas. De fato, a maior parte dos bioestimulantes e fertilizantes à base de algas utilizados em cultivos comerciais consistem em extratos de *A. nodosum* ou associação desta a outras algas ou compostos. Seus produtos promovem incremento ao crescimento das plantas, à qualidade de frutos e à tolerância a estresses bióticos e abióticos, sendo foco de estudos para elucidar seus mecanismos de ação (STASIO *et al.* 2018; CRAIGIE, 2011).

#### 1.1.2.2 *Sargassum cymosum* C.Agardh

As algas pardas, que predominantemente ocorrem em regiões de clima temperado têm, como um de seus representantes tropicais, as do gênero *Sargassum* (Fig. 1B-C), uma das mais importantes algas, em termos de abundância, em determinadas áreas da costa brasileira (DE ESTON & BUSSAB, 1990). De ocorrência tanto em costões rochosos protegidos, na zona intertidal, como em costões expostos à ação das ondas (YONESHIGUE-VALENTIN, 2009), espécies de *Sargassum* exercem importante papel ecológico na composição e distribuição de

comunidades de costões (JACOBUCCI & LEITE, 2002) e na cadeia alimentar marinha, inclusive influenciando a ocorrência de uma diversificada flora e fauna associadas (SZÉCHY *et al.* 2000; 2006). Encontradas ao longo da costa brasileira, a partir do substrato consolidado, espécimes deste gênero são características na produção de metabólitos secundários que reduzem a palatabilidade da biomassa algal aos herbívoros, influenciando assim a estrutura das populações de costões rochosos. Neste gênero, destaca-se a espécie *Sargassum cymosum* C. Agardh e variedades, de ampla ocorrência no território nacional e de relevante importância ecológica nos ecossistemas costeiros (YONESHIGUE-VALENTIN *et al.* 2009).

Algas do gênero *Sargassum* têm sido utilizadas como ingredientes na formulação de rações (HOLDT & KRAAN, 2011) e sua biomassa apresenta capacidade de bioacumulação de compostos e metais pesados (SZÉCHY *et al.* 2006; VIJAYARAGHAVAN *et al.* 2009; ANDRADE *et al.* 2010), e.g., cobre e chumbo (COSTA *et al.* 2016). Além disso, a metabólitos produzidos por espécies de *Sargassum* têm sido atribuída importância farmacológica, e.g., antiobesidade e na proteção cardiovascular (MATANJUN *et al.* 2010).



Fonte: vitalsignsme.org

Fonte: arquivo pessoal

Fontes: A) vitalsignsme.org B e C) Arquivo pessoal

Figura 1 – Detalhes das algas pardas: (A) *Ascophyllum nodosum*; (B-C) *Sargassum cymosum*. Nota-se a distinção clara de tonalidades entre as espécies em estudo.

## 1.2 METABOLISMO VEGETAL

As reações químicas que ocorrem nas células denominam-se metabolismo e, nos vegetais, de acordo com a essencialidade do processo (via de síntese), produtos (metabólitos) e constância de ocorrência (comum ou não a todas as plantas), dividem-se em primário e secundário

(ALMEIDA, 2017). Segundo Kabera *et al.* (2014), os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia enquanto os secundários, em princípio não possuem relação com o crescimento ou desenvolvimento da planta. Contudo, há intersecção entre determinadas funções de metabólitos primários e secundários. É importante realçar que metabólitos primários são os grandes precursores do metabolismo secundário.

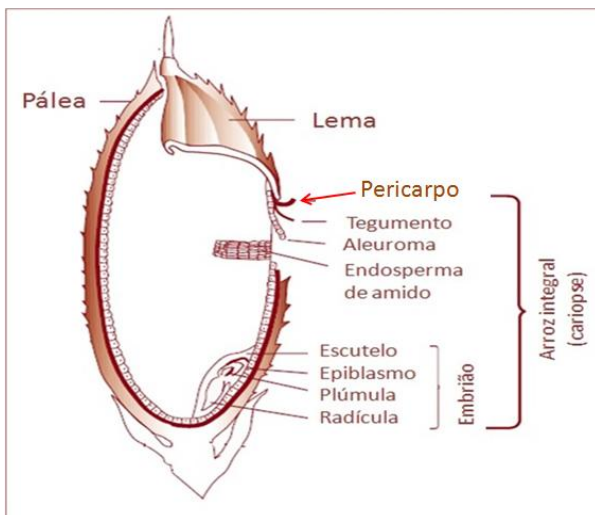
Em linhas gerais, o metabolismo primário compreende os processos químicos essenciais que cada planta desempenha diariamente para sobreviver, desenvolver-se e reproduzir entre os quais a fotossíntese, a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, a síntese de aminoácidos, proteínas e coenzimas, duplicação do material genético, absorção de nutrientes, entre outros. Seus produtos, quimicamente incluídos nas clases dos hidratos de carbono, lípidios, proteínas, ácidos nucleicos ou clorofilas são compostos essenciais como intermediários nas vias catabólica e anabólica e presentes em todas as plantas.

Por outro lado, os metabólitos secundários estão usualmente ligados a eventos ambientais associados a respostas de defesa e reprodutivas, por exemplo, sendo classificados em três grandes grupos, a saber, terpenoides, alcaloides e fenólicos. Estes grupos apresentam subclasses com diversos níveis de complexidade estrutural, que determinam suas funções (KABERA *et al.* 2014; ACAMOVIC & BROOKER, 2005). Elicitados por gatilhos externos, os metabólitos secundários ocorrem em diferentes concentrações e podem diferir de uma planta para outra, ou mesmo entre tecidos ou órgãos de uma mesma planta. As vias de síntese mais comuns dos metabólitos secundários são as do ácido chiquímico (fenóis, taninos e alcaloides aromáticos) e do ácido mevalônico (terpenos, esteroides e alcaloides) (ÁVALOS & ELENA, 2009).

### 1.3 *Oryza sativa* L. – CULTIVO E IMPORTÂNCIA

*Oryza sativa* L. (Poaceae), também conhecida como arroz asiático é uma das duas espécies de arroz cultivadas e a mais plantada no mundo para fins alimentícios. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, desempenhando papel econômico e social estratégico (WALTER *et al.* 2008). Devido à importância do arroz na dieta, sua composição e suas características nutricionais estão diretamente relacionadas à saúde da população. Seus grãos são cariopses constituídas predominantemente de endosperma (89-

94%) formado por grânulos de amido e alguns corpos proteicos (ZHOU *et al.* 2002). Enquanto no endosperma encontra-se a maior concentração de amido, o pericarpo, camada mais externa e delgada, contém maiores concentrações de proteínas, fibras, vitaminas, lipídios e minerais, bem como compostos do metabolismo secundário, com atividades biológicas diferenciadas (Fig. 2). Este cereal é capaz de suprir 20% da energia e 15% da proteína da necessidade diária de um adulto, além de conter vitaminas, lipídios, sais minerais, fósforo, cálcio e ferro, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). No Brasil, o consumo anual é, em média, de 25 kg/habitante (MAPA, 2016). São três os principais tipos de cultivo do arroz, a saber, terras altas, várzeas úmidas e irrigado por inundação sendo este último o sistema mais expressivo, representando cerca de 80% da produção mundial. O Brasil é o nono maior produtor mundial deste cereal e colheu 12,20 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso, para os cultivos irrigado e de sequeiro.



Fonte: sciELO.br

Figura 2 – Representação esquemática do corte longitudinal de um grão de arroz (cariopse) com destaque para o pericarpo, camada mais externa, onde se concentram os pigmentos.

O cultivo do arroz irrigado, praticado na região Sul do Brasil (STEINMETZ, 2001), contribui em média, com 54% da produção

nacional, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro. Em Santa Catarina, o plantio por meio do sistema pré-germinado responde pelo segundo lugar na produção, e produziu 1.100 mil toneladas na safra 2017/2018 (CONAB, 2018). No estado catarinense, a garantia da viabilidade econômica do cultivo do arroz pré-germinado em propriedades familiares resulta de relevantes tecnologias desenvolvidas pela pesquisa pública e esforços da extensão rural, notadamente baseadas nas ações da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Os resultados desse trabalho são observados sob a forma de obtenção de rendimentos muito elevados daquele cereal, atribuídos em grande extensão ao uso de variedades modernas de arroz desenvolvidas por aquela empresa. De fato, estima-se que a maior parte (~ 80%) da área de arroz cultivada em Santa Catarina utiliza variedades desenvolvidas pela EPAGRI.

Recentemente, duas novas variedades de arroz foram lançadas pela EPAGRI com características peculiares que, além dos atributos nutricionais dos grãos tradicionais, caracterizam-se pelo acúmulo de pigmentos de importância nutracêutica no pericarpo. São elas as cultivares SCS 119 Rubi (pericarpo vermelho) e SCS 120 Ônix (pericarpo preto), destinadas ao mercado de tipos especiais de arroz, adequadas ao preparo de pratos elaborados e com maior valor nutritivo em relação aos grãos não pigmentados (WICKERT *et al.* 2014). Estas cultivares vêm atender a demanda crescente por tipos especiais de arroz, denominação dada aos de pericarpo pigmentado, uma das principais características destes grãos e que está vinculada sobretudo ao acúmulo de fenólicos, compostos relacionados a efeitos benéficos à saúde.

Quanto aos atributos de campo, as duas cultivares apresentam arquitetura moderna, média resistência ao acamamento, bom vigor e bom perfilhamento, ciclo biológico médio, grãos longos e finos, bem como bom potencial produtivo, ou seja, características da cultura apreciáveis do ponto de vista agrônômico.

As colorações resultantes têm sido atribuídas à produção e acúmulo de compostos fenólicos, pigmentos com importantes atividades biológicas, em especial antioxidantes e anticarcinogênicas (WALTER, 2009; NAM *et al.* 2005; WALTER *et al.* 2013) (Fig. 3). Embora o potencial de produção das variedades vermelha e preta seja menor em relação às tradicionais, tal fato não reduz sua atratividade comercial.





Fonte: A, B) Wickert *et al.*, 2014; C) Divulgação EPAGRI

Figura 3 – Cultivares de arroz: A) Planta de SCS 119 Rubi (vermelho); B) Plantas de SCS 120 Ônix (preto); C) Grãos descascados das cultivares Ônix, Rubi e ACA 118 Marques (branco).

Diversos compostos fenólicos já foram identificados em genótipos de arroz, sendo os principais os ácidos ferúlico e *p*-cumárico (TIAN *et al.* 2004; ZHOU *et al.* 2004) e as antocianinas cianidina-3-*O*- $\beta$ -D-glucosídeo e peonidina-3-*O*- $\beta$ -D-glucosídeo; estas em variedades de grãos vermelhos e pretos (MORIMITSU *et al.* 2002). Outros compostos fenólicos identificados no arroz incluem os ácidos vanílico, siríngico, caféico, gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico e clorogênico, bem como ésteres derivados, *e.g.*, 6'-*O*-(*E*)-feruloilsacarose, 6'-*O*-(*E*)-sinapoilsacarose e  $\gamma$ -orizanol (TIAN *et al.* 2004; ZHOU *et al.* 2004). Nos arrozes com pericarpos vermelho e preto também foram identificadas procianidinas poliméricas e siringaldeído (HYUN e CHUNG, 2004; NAM *et al.* 2005).

Neste contexto, levando-se em conta as propriedades referidas às algas pardas no incremento à produtividade e estímulo na produção de metabólitos em culturas agrícolas, entre outras, o arroz (*Oryza sativa*) espécie alimentar comercial de importância mundial e no Brasil foi selecionado para este trabalho como modelo agrícola de estudo e determinação da bioatividade dos extratos algais. Para tal, buscou-se investigar o metaboloma parcial das variedades pigmentadas SCS 119 Rubi e SCS 120 Ônix e de duas variedades de pericarpo branco, SCS 118 Marques e EPAGRI106, com interesse especial no incremento à produção de metabólitos benéficos à saúde, após o tratamento com extratos das algas *A. nodosum* e *S. cymosum*. Para tal, ao longo de três ciclos produtivos da cultura as variedades foram avaliadas em seus fenótipos de

natureza bioquímica e metabolômica. Os trabalhos foram conduzidos em parceria com a EPAGRI, Estação Experimental de Itajaí, configurando uma estratégia de melhoramento genético assistido bioquimicamente, contando com o suporte logístico e de recursos humanos daquela empresa. Foram conduzidos ainda, ensaios com a aplicação dos extratos algais, em testes de germinação de sementes dos arroz Rubi (pericarpo vermelho), Ônix (pericarpo preto) e Marques (pericarpo branco).

#### 1.4 METABOLÔMICA E QUIMIOMETRIA

Como todas as ômicas (transcriptômica, genômica, proteômica), a metabolômica é uma ferramenta importante de identificação e quantificação de moléculas através da aplicação de técnicas analíticas, para entender a biologia de organismos e suas respostas a estímulos ambientais ou perturbações fisiológicas, combinando métodos estatísticos uni- e multivariados (quimiometria) na extração e interpretação dos dados coletados (ROESSNER e BOWNE, 2009; DUMANCAS *et al.* 2015). Um número expressivo de tecnologias tem sido desenvolvido e aprimorado nos últimos anos, para maior detalhamento no estudo do metabolismo (ROESSNER e BECKLES, 2008; BALUNAS *et al.* 2005).

Algumas das técnicas analíticas mais utilizadas são as espectroscopias como a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas, que podem ainda ser acopladas às técnicas cromatográficas, i.e., cromatografia gasosa (CG) ou líquida (CLAE). (VOHLAND *et al.* 2014; MARQUETTI *et al.* 2016; SABIR *et al.* 2017).

Devido a grande diversidade de estruturas químicas e ocorrência dos metabólitos a serem analisados em compostos, tecidos e fluidos, bem como o grande número de dados gerados pelas diferentes técnicas analíticas, a metabolômica se vale de abordagens complementares para extração, detecção, identificação e quantificação desses analitos (MARASCHIN *et al.* 2016; MARASCHIN *et al.* 2017).

Basicamente duas abordagens podem ser consideradas no diagnóstico químico de uma planta ou de seus produtos, a análise de um composto marcador e a chamada impressão digital, sendo a primeira restrita a um ou a poucos compostos, enquanto a segunda avalia o máximo possível de compostos, dando uma visão mais abrangente do perfil químico de uma amostra (XIE *et al.* 2006; SABIR *et al.* 2017; WANG *et al.* 2007; 2012).

A fim de investigar bioquimicamente as respostas das plantas de arroz quando expostas aos extratos macroalgais, neste trabalho aplicaram-se técnicas analíticas, típicas de estudos da metabolômica, para

identificação e quantificação de compostos do metabolismo das plantas de arroz e dos extratos algais. Subsequentemente, técnicas estatísticas multivariadas foram aplicadas aos dados metabolômicos, visando a construção de modelos de descrição e classificação derivados das respostas bioquímicas dos genótipos de arrozes em estudo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAIS**

1. Verificar o efeito do extrato alcalino da alga *Sargassum cymosum*, na produção de compostos do metabolismo de estruturas vegetativas e grãos de arroz.

2. Avaliar o efeito de extratos das algas *Sargassum cymosum* e *Ascophyllum nodosum* no processo germinativo de *O. Sativa*.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

1. Mensurar a porcentagem de germinação e o comprimento de plântulas das variedades de arroz Rubi, Ônix e Marques;

2. Quantificar o conteúdo de carotenoides, clorofilas, compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos em folhas e sementes das variedades de arroz estudadas, após tratamento com os extratos macroalgais de interesse;

3. Identificar compostos antociânicos dos grãos através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, i.e., HPLC e MALDI-TOF;

4. Detectar, nos grãos e folhas de arroz, compostos fenólicos e flavonoides por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR);

5. Determinar o perfil metabólico dos extratos macroalgais, por FT-IR e RMN.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Espécimes de *S. cymosum* foram coletados na praia da Armação do Pântano do Sul (Florianópolis, estado de Santa Catarina, sul do Brasil - 27°44'42" S e 48° 30' 27" W, acondicionados e transportados em sacos plásticos escuros ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal – CCA/UFSC. Após remoção manual de epibiontes, o material coletado foi

limpo em água destilada, dessalinizado em formiato de amônio 0,5% (m/v) e seco em estufa à 40°C. A biomassa foi então macerada, acondicionada em frasco hermético escuro e armazenada em freezer a -20°C. A biomassa da alga *A. nodosum* seca e moída, foi obtida comercialmente.

### 3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Extratos comerciais que têm como base *Ascophyllum nodosum*, eficazes no crescimento de plantas são, em geral, alcalinos. Por essa razão os extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum* deste trabalho foram formulados utilizando hidróxido de potássio como extrator. Após filtragem, os extratos resultantes constituíram as soluções estoque (pH 12,8), sendo alíquotados e armazenados em freezer à -20°C.

Diluições a partir da solução estoque, i.e., 0,0 (sem extrato); 0,1; 0,5; 0,75 e 1,0 g.L<sup>-1</sup> foram preparadas em água destilada e foram utilizadas nos ensaios de germinação. Os extratos-estoque foram alíquotados e conservados em freezer (-20°C) até sua utilização.

### 3.3 AMOSTRAS DE ARROZ

As sementes de arroz vermelho (variedade Rubi), preto (variedade Ônix) e brancos (variedades Marques e EPAGRI106), usadas na implantação dos ensaios foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI), Estação Experimental de Itajaí (26° 57' 57" S e 48° 48' 01" W). As amostras de grãos e folhas usadas nas análises foram colhidas ao final dos experimentos. De forma independente, quatro experimentos foram conduzidos, sendo o primeiro com sementes das variedades de arroz vermelho, preto e branco, e segundo experimento com plantas ao longo do estágio vegetativo da cultura (primavera/verão de 2015). Por sua vez, o terceiro e o quarto experimentos foram conduzidos com plantas ao longo do ciclo completo da cultura nas safras verão/outono de 2016 e primavera/verão de 2016.

Para análises dos dados coletados, foi realizada ANOVA e Teste de Tukey, com 0,5% de significância, pelo *software* Statistica versão 13.3 e análise multivariada (PCR e cluster hierárquico), quando necessário, utilizando a linguagem R package versão 3.4.2.

## CAPÍTULO II

---

**Extratos de *Sargassum cymosum* C. Agardh e *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis como estimulantes do crescimento de plântulas das variedades Rubi, Ônix e Marques de *Oryza sativa* L.**

### 1 INTRODUÇÃO

As algas marinhas têm sido utilizadas ao longo dos séculos em várias aplicações de importância econômica, por exemplo, para alimentação humana e saúde (GUPTA & ABU-GHANNAM, 2011), alimentação animal e como biofertilizantes adicionadas ao solo na sua forma natural. Além disso, o uso de algas marinhas para fins biotecnológicos através do processamento de biomassa e protocolos de extração otimizados de compostos bioativos permitiram alcançar o máximo desempenho de suas propriedades estimulantes e estabilidade de compostos (CROUCH & STADEN, 1993; KHAN *et al.*, 2009).

O interesse em extratos de algas marinhas como promotores de crescimento e bioestimulantes em plantas tem aumentado nas últimas décadas. De fato, as algas marinhas têm sido utilizadas visando o incremento da produtividade das culturas, como também pelo uso de seus extratos como estimulantes na germinação de sementes e crescimento de plântulas (SIVASANKARI *et al.*, 2005; DEMIR *et al.*, 2006; GUZMÁN *et al.*, 2011). O uso de produtos de algas marinhas como bioestimulantes tornou-se uma abordagem alternativa para minimizar o impacto ambiental de certas práticas de manejo de culturas, contribuindo à redução ou mesmo substituir alguns fertilizantes químicos e pesticidas (PAL *et al.* 2015).

Atualmente, o efeito dos extratos de algas marinhas como biofertilizante ainda não foi plenamente explorado devido à falta de dados científicos precisos sobre os fatores de crescimento presentes nas algas e seu modo de ação no crescimento e desenvolvimento vegetal (KHAN *et al.*, 2009). Neste sentido, esforços têm sido feitos para caracterizar o perfil metabólico das algas marinhas, permitindo a detecção de fitormônios, como as auxinas, citocininas e o ácido abscísico (STIRK *et al.*, 2003; 2009; YOKOYA *et al.*, 2010).

*Fucus*, *Laminaria*, *Ascophyllum*, *Ecklonia* e *Sargassum* são os gêneros de algas mais comumente utilizados para fins agrícolas, devido à diversidade de compostos bioativos, e.g., aminoácidos, polissacarídeos, polifenóis e carotenoides, bem como micro e macronutrientes, auxinas, ácido abscísico e giberelinas (HONG *et al.*,

2007; STIRK *et al.* 2009; KHAN *et al.* 2009). Além disso, espécies que ocorrem em climas temperados têm sido mais frequentemente utilizadas na preparação de extratos e formulações de produtos comerciais para fins agrícolas, especialmente *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (STIRK & VAN STADEN, 2006) devido à abundância de sua biomassa em bancos naturais. Por outro lado, *Sargassum cymosum* C. Agardh possui ampla distribuição em regiões com climas tropicais e subtropicais, em costões rochosos. No entanto, embora encontrados em menor quantidade comparativamente às espécies de zonas temperadas, seus extratos podem apresentar resultados promissores quando aplicados em sementes, auxiliando no processo germinativo e na emergência das plântulas (MAFRA JR *et al.* 2002; ALMADA *et al.* 2008), representando uma alternativa para uso naquelas regiões.

Desta forma, o efeito bioestimulante de extratos alcalinos das algas pardas *Sargassum cymosum* e *Ascophyllum nodosum* foi avaliado na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial de plântulas de três variedades de arroz vermelho (Rubi), preto (Ônix) e branco (Marques). Além disso, foram realizadas análises em FT-IR e RMN dos extratos macroalgais, para identificar compostos bioativos conhecidos como benéficos às plantas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 TESTES DE GERMINAÇÃO

Sementes das três variedades de arroz, fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), foram colhidas em 2015, na Estação Experimental de Itajaí (26 ° 57'57 " S e 48 ° 48"0"W).

Extratos diluídos (pH8,5) a partir das soluções estoque, foram preparados em água destilada e utilizados à embebição das sementes de arroz nos ensaios de germinação. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Sementes, do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, Florianópolis, SC. Para cada variedade, cinquenta sementes de arroz foram distribuídas (quatro repetições por tratamento) em folhas de papel de germinação (Germitest<sup>®</sup>) e adicionadas de um volume equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, em água destilada, ou extratos das algas de interesse nas concentrações 0,1, 0,5, 0,75, e 1,0 g L<sup>-1</sup>. As sementes foram recobertas com o papel de germinação, formando rolos (Fig. 1), e mantidas em câmara de germinação por sete dias, a 25°C e fotoperíodo de 12h.



Fonte: (A) Divulgação EPAGRI; B) Imagens do experimento  
 Figura 1 - A) Sementes de arroz Ônix e Rubi; B) Sementes de arroz Marques, envolvidas em papel Germitest<sup>®</sup> após tratamentos com extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum*.

As sementes foram consideradas germinadas quando as plântulas apresentaram todas as estruturas essenciais por análise visual, ou seja, coleóptilo, folhas verdadeiras e raízes seminais, desenvolvidas e saudáveis (BRASIL, 2009). Ao final do teste de germinação foram contadas as sementes germinadas e medidos os comprimentos da parte aérea e radicular de 25 plântulas por repetição (Fig. 5).



Figura 2 – Plântulas de arroz após sete dias de embebição de sementes em incubadora tipo BOD.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Extratos alcalinos de *Sargassum cymosum* e *Ascophyllum nodosum* foram caracterizados por espectrofotometria UV-visível, espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN).

De modo a permitir determinar os perfis espectroscópicos indicadores do maior número possível de classes de metabólitos, os

espectros de UV-visível dos extratos foram realizados na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Os valores de absorvância foram registrados espectrofotômetro UV-visível (UV-Vis 53, Gold Spectrum Laboratory, BEL photonics, Brasil) usando uma janela espectral de 280 a 800 nm.

Os espectros de FTIR das amostras foram coletados em equipamento Bruker IFS-55 (Modelo Opus. 5.0, Bruker Biospin, Alemanha) equipado com detector DGTS e sistema de reflexão única (ângulo de incidência de 45°), com acessório de atenuação de refletância ATR (golden gate). Espectros de 5 réplicas por amostra foram coletados em uma janela espectral de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. O processamento dos espectros utilizou o *software* Essential FTIR (v.1.50.282) e considerou a definição da janela espectral de interesse (3000-600 cm<sup>-1</sup>), correção de linha de base, normalização e otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*). A identificação das bandas baseou-se em relatos da literatura em condições semelhantes (LEAL *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2013).

Para o perfil metabólico por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN, os extratos alcalinos liofilizados foram dissolvidos em 700µL de álcool metílico e centrifugados (5000 rpm, 5 min). O sobrenadante (650 µL) foi transferido para um tubo de RMN de 5 mm para posterior análise de espectrometria. Os espectros de <sup>1</sup>H RMN das amostras foram adquiridos em espectrômetro Agilent DD2 (Agilent Technologies Inc.™, Santa Clara, EUA), operando na frequência de 499,72 MHz para <sup>1</sup>H e temperatura de 298 K (25°C). Um total de 256 varreduras foram coletadas, com tempo de aquisição de 4s, janela de largura espectral de 8000 Hz. Foi utilizado um tempo de espera de 1.5s entre as varreduras, durante o qual foi aplicado um campo contínuo de radiofrequência de pré-saturação de água. Tetrametilsilano (TMS, 0,024g%) foi usado como padrão interno e três espectros de <sup>1</sup>H-RMN foram coletados por amostra, para efeito das análises quimiométricas. A partir do conjunto de dados experimentais de <sup>1</sup>H-RMN, foi realizada a atribuição dos sinais de ressonâncias (ppm) utilizando-se base de dados pública *Human Metabolome Database*, de RMN. Adicionalmente, o conjunto de dados de <sup>1</sup>H-RMN foi analisado em *software* dedicado a estudos metabolômicos, i.e., Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx Inc., Canadá), para efeitos de elucidação do perfil metabólico associado às amostras dos extratos de *A. nodosum* e *S. cymosum*.



## 2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, através do *software* Statistica, versão 13.3.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de germinação os resultados das análises foram tomados, considerando o efeito dos tratamentos dentro de cada variedade de arroz. Para ambos os extratos, não houve diferença significativa entre os tratamentos nas taxas de germinação da cultivar Rubi. As sementes de Ônix tiveram as maiores taxas de germinação nos tratamentos com extratos de *S. cymosum*, nas concentrações 0,5 e 0,75g.L<sup>-1</sup>, sem diferença significativa entre as demais concentrações, o mesmo entre todas as concentrações de *A. nodosum*. Já para a variedade Marques, não houve diferença nas menores concentrações (0,1 e 0,5g.L<sup>-1</sup>) de ambos os extratos, e na concentração mais alta dos mesmos (1,0 g.L<sup>-1</sup>) as taxas de germinação foram as menores, sugerindo efeito inibitório nesta cultivar (Tab. 1).

Tabela 1 - Efeitos das concentrações de extratos de *A.nodosum* e *S. Cymosum* na taxa de germinação total em sementes de arroz das cultivares Rubi, Ônix e Marques (n=4). Os valores apresentados são a média ± desvio padrão (n = 4). Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey (p <0,05).

	Tratamentos (g.L <sup>-1</sup> )	Germinação total(%) (variedades)			
		Rubi	Ônix	Marques	
Controle	0.0	93	83±4.4b	88±5.7a	
	0.1	89	84±4.1b	87±1.3a	
	<i>Sargassum</i>	0.5	92	93±3.8a	89±5.7a
	0.75	97	88±4.9ab	78±5.9ab	
	1.0	96	85±1.9b	76±3.7b	
<i>Ascophyllum</i>	0.1	91	84	90±5.7a	
	0.5	96	86	88±4.7a	
	0.75	95	86	85±3.4a	
	1.0	89	85	71±1.9b	

Os resultados dos tratamentos com os extratos alcalinos das macroalgas sobre alongamento de plântulas das três cultivares de arroz são mostrados na figura 3(A-F). O extrato alcalino de *A. nodosum* na concentração 0,75g L<sup>-1</sup> induziu maior crescimento das raízes de plântulas da variedade Rubi, enquanto o maior crescimento de parte aérea foi observado com os tratamentos de 0,1 e 0,5g L<sup>-1</sup> (Fig. 3A). Por outro lado, plântulas daquela variedade tratadas com o extrato alcalino de *S. Cymosum* apresentaram crescimento superior tanto na de parte aérea quanto de sistema radicular nas concentrações de 0,5 e 0,75g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 3B). Assim constatou-se que as concentrações menores dos extratos macroalgais pareceram ser mais efetivas à produção de crescimento das plântulas daquelas cultivares.

Para a cultivar Ônix, as sementes tratadas com extrato de *A. nodosum* a 0,1 e 0,5 g L<sup>-1</sup> foram semelhantes ao controle tanto no comprimento radicular quanto na parte aérea (Fig. 3C). Para as plântulas de Ônix tratadas com extrato de *S. cymosum*, observou-se possível inibição do crescimento na parte aérea, quando submetidas à maior concentração (1,0 g L<sup>-1</sup>) (Fig. 3D).

Considerando as variáveis analisadas, as sementes da cultivar Marques se mostraram mais sensíveis ao efeito de dose dos extratos alcalinos macroalgais, comparativamente aos demais genótipos, exceto raízes de Rubi na maior concentração (1,0 g.L<sup>-1</sup>) com extrato de *A. nodosum*. Assim, um menor crescimento radicular foi observado em Marques, em relação ao controle, com diferença significativa ( $p = 0,05$ ), evidenciando algum efeito inibidor dos tratamentos, determinante da menor *performance* de ganho de biomassa radicular. Para esta cultivar, nas plântulas tratadas nas concentrações 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de *A. nodosum* e *S. cymosum*, não houve diferença em relação ao controle no comprimento radicular. Também para os dois extratos, neste caso em todas as concentrações, não foi observada diferença significativa na parte aérea das plântulas da cultivar Marques em relação ao controle (Fig. 3-E e F).

Atualmente, os produtos comerciais formulados a partir de extratos de algas marinhas apresentam em suas formulações compostos com possível atividade promotora de crescimento. Rodrigues *et al.* (2015) observaram o aumento no comprimento da parte aérea do arroz cultivar Primavera, enquanto as variáveis comprimento de raiz e germinação de sementes (%) não foram afetadas pelos tratamentos com bioestimulante comercial. Estes resultados foram observados também neste trabalho para a germinação de sementes (%) e também sugerem a presença, em extratos de algas marinhas, de compostos com um modo seletivo de ação associado à parte da planta tratada, ou seja, sistema radicular ou parte aérea. Isso pode ser claramente observado nos resultados da variedade Marques, onde concentrações mais baixas (0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>) não diferiram do controle, mas não desencadearam efeito inibidor no crescimento das raízes e as maiores concentrações (0,75 e 1,0 g.L<sup>-1</sup>) causaram o efeito inverso (inibidor). No que se refere à parte aérea, o crescimento desta não se mostrou afetado pelos tratamentos investigados.

De interesse, ressalta-se que a literatura demonstra que os efeitos dos extratos macroalgais sobre o crescimento de sistema radicular e parte aérea não são necessariamente positivos, havendo um conjunto de variáveis determinantes do fenótipo observado. Como exemplo, Kumar & Sahoo (2011), descrevem resultados discrepantes com o uso de extrato aquoso de *Sargassum wightii* em sementes de trigo em relação ao observado por Demir *et al.* (2006), com a aplicação de extratos de algas verde (*Codium tomentosum*), vermelha (*Gracilaria gracilis*) e parda (*Cystoseira barbata*) em sementes de tomate, pimenta e beringela. Assim, assume-se que uma relação dependente de genótipos

(macroalga x planta) parece existir, sendo importante considerar à definição do uso de extratos macroalgais na agricultura não apenas quanto à espécie alvo, como também em relação à variedade desta (ANISIMOV *et al.* 2013; RODRIGUES *et al.* 2015; CARVALHO *et al.* 2013).

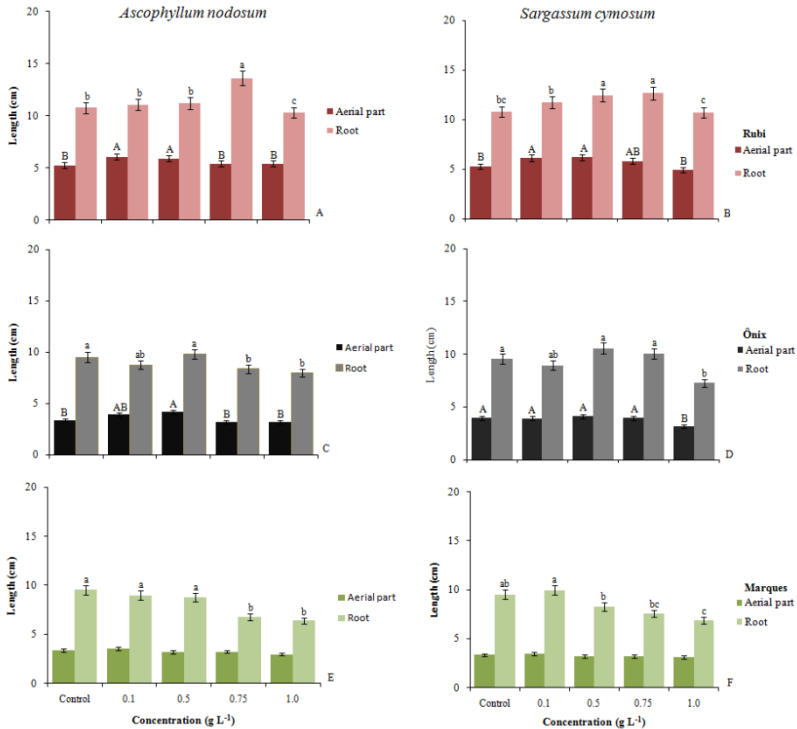


Figura 3 - Comprimento de raízes (letras minúsculas) e de parte aérea (letras maiúsculas) de plântulas das variedades de arroz vermelho, Rubi (A-B); preto, Ônix (C-D) e branco, Marques (E-F), tratadas com extrato alcalinos de *A. nodosum* (A-C-E) e de *S. cymosum* (B-D-F), nas concentrações 0,0 (co ntrole); 0,1; 0,5; 0,75 e 1,0 gL<sup>-1</sup>. Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

Por outro lado, a despeito dos protocolos distintos à extração de biomassa de algas marinhas, Sivasankari *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes para o crescimento radicular de sementes de feijão preto em relação ao observado no presente trabalho, utilizando

extratos aquosos das espécies *Sargassum wightii* (Phaeophyceae) e *Caulerpa chemnitzia* (Chlorophyceae).

Em relação à aparente inibição do crescimento radicular observado em algumas plântulas quando tratadas com extratos na concentração mais alta ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) dos extratos de *A. nodosum*, para todas as variedades estudadas e *S. cymosum*, para Ônix e Marques, embora se afirme que os produtos naturais sejam menos tóxicos que os agroquímicos, deve-se levar em consideração a determinação da faixa de concentrações de uso com efeito bioestimulante, evitando causar danos às plantas ou, ainda, dosagens não efetivas fisiologicamente. Por exemplo, plântulas das três variedades de arroz investigadas apresentaram menor crescimento radicular comparativamente ao controle no tratamento com o extrato de *A. nodosum* a  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Resultado semelhante foi observado para as variedades Ônix e Marques, tratadas com o extrato alcalino de *S. cymosum* naquela concentração. Curiosamente, Kumar e Sahoo (2011) relatam inibição do crescimento com concentrações acima de 20% de extratos de *Sargassum wightii* em plântulas de trigo.

### 3.1 COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS ALCALINOS

Perfis espectrais de varredura UV-vis dos extratos alcalinos de *A. nodosum* e *S. cymosum* evidenciaram picos de absorbância concentrados na janela espectral entre 200 e 400 nm (Fig. 4), típica de compostos fenólicos, como flavonoides e florotaninos. Estes resultados confirmam a predominância destes metabólitos secundários em algas pardas (FARVIN & JACOBSEN, 2013). A tais compostos, de reconhecido efeito na interação de algas e plantas com fatores (a)bióticos, são atribuídas atividades biológicas associadas à ativação de mecanismos de defesa, atividade antioxidante e inibitória de espécies reativas de oxigênio (MIERZIAK *et al*, 2014).

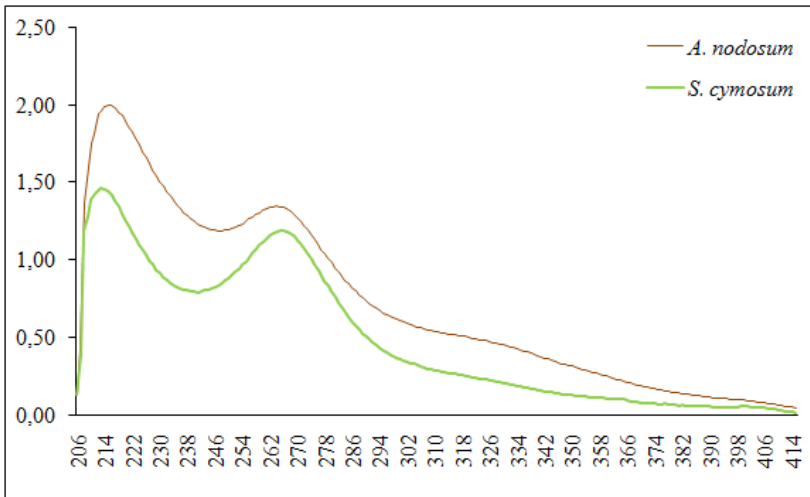


Figura 4 – Espectros de UV-visível dos extratos alcalinos de *A. nodosum* e *S. cymosum*.

Os perfis espectrais de FT-IR dos extratos alcalinos das macroalgas em estudo são apresentados na figura 5, revelando a presença de várias bandas na região de  $3000\text{cm}^{-1}$  -  $600\text{cm}^{-1}$ . Os espectros mostram absorbâncias típicas de alginato e seus grupos carboxila em  $1601\text{--}1605\text{cm}^{-1}$  (alongamento simétrico). A região de  $1042\text{cm}^{-1}$  a  $1059\text{cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de estiramento de CO, porém também é característica do alginato, assim como das bandas de  $1450$  a  $1380\text{cm}^{-1}$ . No espectro visualiza-se uma banda em  $885,2\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração de deformação C-H dos resíduos de ácido  $\beta$ -manurônico daquele polissacarídeo e uma a  $824,7\text{cm}^{-1}$ , que pode ser característica dos resíduos deste ácido, um componente estrutural dos alginatos.

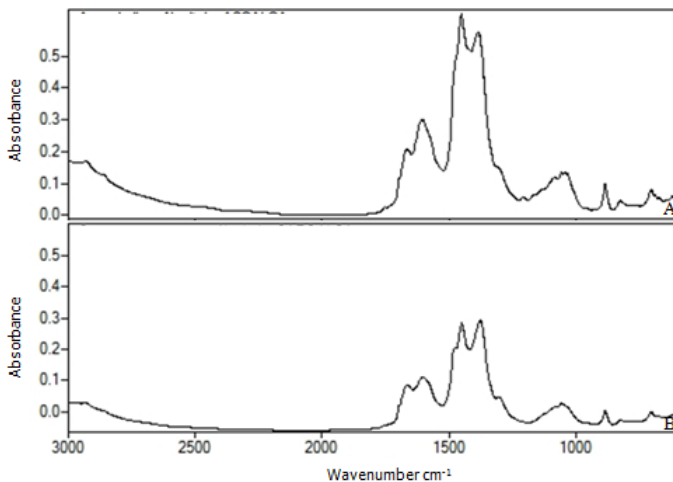


Figura 5 – Espectros de FT-IR dos extratos alcalinos: (A) *A. nodosum* e (B) *S. cymosum*, na janela espectral 3000cm - 600cm<sup>-1</sup>.

Os alginatos, polissacarídeos lineares, são copolímeros constituídos principalmente de resíduos de  $\beta$ -D-manurônico e de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (DAVIS *et al.*, 2004). Os arranjos dessas unidades monoméricas na cadeia conferem diferentes estruturas e atividades ao polímero. Em vegetais aquele polissacarídeo ácido tem apresentado efeitos estimulantes na germinação e nos processos de proliferação e/ou diferenciação celular das plantas (YONEMOTO *et al.*, 1993; HU *et al.* 2004; ZUBIA, 2008).

Os espectros de <sup>1</sup>H-RMN dos extratos alcalinos das algas em estudo permitiram identificar uma série de compostos (Tab. 2). Sinais predominantes na região anomérica (3.0 – 5.0ppm), compatíveis com aminoácidos como betaínas [3. (CH<sub>3</sub>, s); 3.9 (CH<sub>2</sub>, s); 3.2 (CH<sub>3</sub>, s)], prolina [2.2 (CH<sub>2</sub>, m); 3.3 (CH<sub>2</sub>, dt)] e alanina [3.8 (CH, q)] que desempenham importante papel osmótico e na resistência mecânica, recuperação tecidual pós injúria e ativação de metabólitos secundários em plantas (ASHRAF & HARRIS, 2004; BLUNDEN *et al.*, 2009). Sinais compatíveis com fucose [3.65 (CH, dd); 3.49 (CH, dd)] e manitol [3.7 (CH, m); 3.8 (CH, d)], predominantes em algas marrons, com atividades biológicas e papel estrutural importantes e cuja identidade já foi relatada em espécies de *Sargassum* (ZUBIA *et al.*, 2008, JIAO *et al.*, 2011). Estes e outros oligossacarídeos presentes nas algas marrons estão relacionados com a estimulação do crescimento das plantas. Alguns estudos mostram resultados positivos na aceleração da taxa de

germinação e desenvolvimento das raízes, quando os extratos polissacarídicos de algas marinhas são aplicados em culturas como legumes e grãos, por exemplo (KHAN *et al.* 2009, CRAIGIE 2011, MZIBRA *et al.* 2018). Chandía *et al.* (2004) e Pardee *et al.* (2004) já relataram que os carboidratos podem atuar como moléculas sinalizadoras para induzir a produção de compostos fitoquímicos potencialmente ativos em processos de crescimento de raízes e brotos. Embora os experimentos tenham sido feitos com extrato bruto, a análise espectroscópica apontou para a presença de carboidratos, o que nos leva a acreditar que a atividade estimulante para sementes de arroz pode ser atribuída a essas moléculas ou ao seu sinergismo.

Outras ressonâncias foram detectadas na região de compostos alifáticos, aonde ácidos orgânicos foram detectado (e.g., ácido cítrico), os quais contribuem à solubilização de minerais do solo e na mobilização de nutrientes à planta quando presente em exsudatos radiculares (DAVID L. *et al.*, 1994; ANNA POTYSZ *et al.*, 2017). Esses resultados evidenciam a presença de compostos benéficos à fisiologia das plantas, nos extratos alcalinos testados (Tab. 2).

Tabela 2 - Desvios químicos de  $^1\text{H}$ -RMN (9,4 Tesla), atribuição e multiplicidade de prótons de ressonâncias de metabólitos identificados em extratos alcalinos das algas pardas *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum*.



<b><math>\delta_{\text{ppm}}^1\text{H}</math> (atribuição, multiplicidade)</b>		
Compostos	Extrato de <i>A.nodosum</i>	Extrato de <i>S. cymosum</i>
<b>Região alifática</b>		
Acetic acid (HMDB 00042)	1.9 (CH <sub>3</sub> , s)	1.9 (CH <sub>3</sub> , s)
Citric acid (HMDB 00094)	2.5(CH <sub>2</sub> , d)	2.5d
L-Aspartic acid (HMDB 00191)	2.8 (CH, dd)	2.8 (CH, dd)
Pyruvate (HMDB 00243)	2.3 (CH <sub>3</sub> , s)	2.36 (CH <sub>3</sub> , s)
Thymine (HMDB 00262)	1.9 (CH <sub>3</sub> , s)	1.9 (CH <sub>3</sub> , s)
<b>Região anomérica</b>		
L-Alanine (HMDB 00161)	3.8 (CH, q)	3.77 (CH, q)
Betaine (HMDB 00043)	3. (CH <sub>3</sub> , s); 3.9 (CH <sub>2</sub> , s)	3.2 (CH <sub>3</sub> , s)
Choline (HMDB 00097)	3.2 (CH <sub>3</sub> , s)	3.2 (CH <sub>3</sub> , s)
Dimethyl sulfone (HMDB 04983)	3.16 (CH <sub>3</sub> , s)	3.16 (CH <sub>3</sub> , s)
L-Fucose (HMDB 00174)	3.65 (CH, dd); 3.49 (CH, dd)	3.65 (CH, dd); 3.49 (CH, dd)
Glycerol (HMDB 00131)	3.66 (CH <sub>2</sub> , m), 3.74 (CH, tt)	3.66 (CH <sub>2</sub> , m), 3.74 (CH, tt)
Malonic acid (HMDB 00698)	3.11 (CH <sub>2</sub> , s)	3.1 (CH <sub>2</sub> , s)
Mannitol (HMDB 00765)	3.7 (CH, m); 3.8 (CH, d)	3.65 (CH <sub>2</sub> , dd); 3.7 (CH, m); 3.77 (CH, d); 3.84 (CH <sub>2</sub> , dd)
L-Proline (HMDB 00162)	2.2 (CH <sub>2</sub> , m); 3.3 (CH <sub>2</sub> , dt)	3.3 (CH <sub>2</sub> , dt)

Fonte: Software Chenomx Inc. e Human Metabolomic Database

Com base nos resultados, pode-se concluir que os extratos alcalinos de *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum* têm efeito sobre a atividade biológica como promotores do crescimento das plantas. Eles aumentaram a porcentagem de germinação de sementes e o alongamento de plântulas. Observou-se também que o efeito positivo dos extratos alcalinos foi relacionado à concentração dos extratos e à variedade de arroz avaliada.

No geral, o efeito do extrato alcalino de *Sargassum cymosum* na germinação de sementes (cultivar Ônix) e no alongamento de plântulas (nas três cultivares) foi semelhante ao extrato de *Ascophyllum nodosum*, que é uma espécie conhecida por sua atividade bioestimulante. Os resultados obtidos neste trabalho são encorajadores para estudos com o uso de *Sargassum cymosum* na agricultura.

## CAPÍTULO III

---

### **Efeitos da aplicação de extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum* em tecido foliar das variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) Rubi, Ônix e Marques**

## **1 INTRODUÇÃO**

Atualmente a agricultura alimenta mais de 7,5 bilhões de pessoas no mundo. Isso tem levado ao aumento da produção e oferta de alimentos, implicando impacto global, devido ao uso de terras pela expansão agrícola. A ciência, na área agrícola, tem dado passos importantes na busca de novas tecnologias, no manejo e incremento à produção vegetal. Neste contexto, o uso de produtos como bioestimulantes e elicitores tornou-se uma abordagem alternativa para minimizar o impacto ambiental de certas práticas de manejo de culturas baseadas no uso de agroquímicos (PAL *et al.* 2015). Nesta linha encontram-se os biofertilizantes e bioestimulantes, estes últimos compostos por moléculas que ativam ou regulam positivamente mecanismos bioquímicos que contribuem à otimização do crescimento, o desenvolvimento e/ou potencializam eventuais propriedades benéficas dessas plantas, e.g., nutracêuticas (RITIKA, 2014). Diversos trabalhos revelam alguns pontos em comum nas respostas das plantas a diferentes bioestimulantes, tais como aumento do crescimento de raízes, maior absorção de nutrientes e tolerância ao estresse (CALVO *et al.* 2014). Algumas das fontes mais estudadas para fins de aplicações comerciais como biofertilizantes/bioestimulantes são os organismos marinhos, sobretudo as macroalgas e, entre elas, as algas pardas.

Resultados relevantes são observados em culturas de importância comercial agrícola, quando tratadas com extratos de macroalgas. Em ensaios com videiras, por exemplo, detectou-se o aumento na biossíntese e acúmulo de compostos fenólicos e taninos nos frutos, quando da aplicação de extrato da alga parda *A. nodosum* (KOK *et al.* 2010).

As folhas, estruturas fotossintetizantes a partir das quais são translocados os recursos elaborados das plantas, podem servir de porta de entrada para nutrientes e ou fitoprotetores (KERBAUY, 2008; RATHORE *et al.*, 2009). Neste contexto, a adubação foliar, prática de suplementação nutricional utilizada mundialmente em diversas culturas agrícolas, tem papel relevante na correção de deficiências nas plantas,

fornecimento de micronutrientes e no aumento da eficiência de aproveitamento dos fertilizantes, por exemplo (STIRK *et al.* 2004; FAQUIN, 2005).

Em função do exposto, neste estudo buscou-se identificar nas folhas de arroz das cultivares de pericarpos pigmentados (Ônix e Rubi) e brancos (Marques e Epagri106), indícios de efeitos bioestimulantes dos extratos alcalinos das algas pardas *A. nodosum* (Linnaeus) Le Jolis e *Sargassum cymosum* C. Agardh aplicados por aspersão foliar. Para tal, foram conduzidos experimentos ao longo de três safras da cultura, seguido da utilização de técnicas analíticas à detecção e quantificação de compostos do metabolismo primário e secundário em amostras de tecido foliar.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO E PREPARO DOS EXTRATOS

A partir das soluções estoque dos extratos de *S. cymosum* e *A. nodosum* foram preparadas diluições na concentração de  $0,5\text{g L}^{-1}$  (pH 8,5) para aplicações por aspersão foliar, ao longo do ciclo vegetativo de plantas de arroz das variedades em estudo, i.e., Rubi – vermelho, Ônix – preto, Marques e EPAGRI 106 – brancos. As sementes dos quatro genótipos foram fornecidas pela EPAGRI – Estação Experimental de Itajaí.

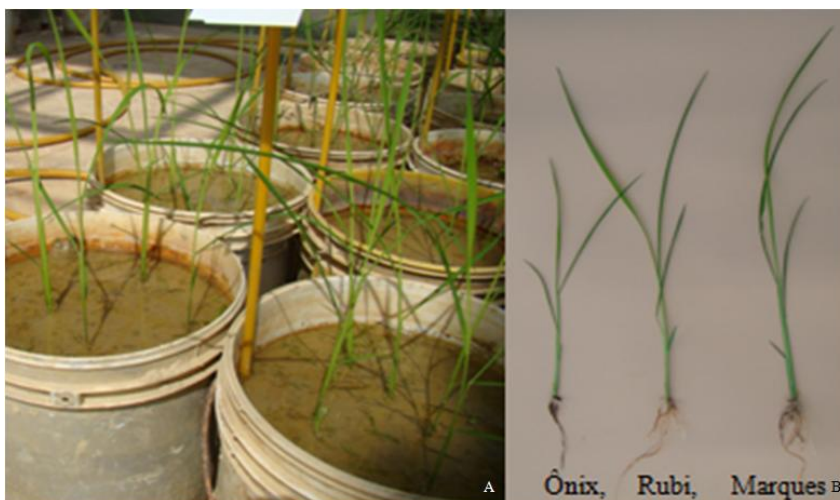
### 2.2 IMPLANTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Três experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Estação Experimental da EPAGRI, em Itajaí (Latitude  $26^{\circ}57'57''\text{S}$ , Longitude  $48^{\circ}48'1''\text{W}$ , Altitude 2m), em épocas correspondentes a três safras da cultura, conforme descrito a seguir.

#### 2.2.1 Experimento I (2015)

Implantado na época do ano equivalente à safra da cultura do arroz em Santa Catarina, o primeiro experimento iniciou em setembro de 2015, com colheita prevista para fevereiro de 2016. Em sistema pré-germinado, sementes das variedades (Rubi, R - pericarpo vermelho, ciclo = 125 dias; Ônix, O, pericarpo preto - ciclo = 125 dias e Marques, (M, pericarpo branco – ciclo = 144 dias) foram semeadas em baldes de

20 litros, contendo solo retirado de quadra de arroz daquela Estação experimental. A partir do vigésimo dia da sementeira, raleios foram efetuados, mantendo-se duas plantas por balde. O desenho experimental consistiu em 36 baldes para cada variedade de arroz, totalizando cento e oito baldes,  $n=12$  (com duas plantas cada) para cada tratamento (Fig. 1). Os tratamentos consoantes aos extratos alcalinos de algas ( $0,5\text{g L}^{-1}$ ) foram codificados como segue: T1 – plantas tratadas com extrato de *A. nodosum*, T2 - plantas tratadas com extrato de *S. cymosum* e T3 - plantas tratadas com água destilada (controle negativo). A partir da quarta folha expandida, aos 44 dias após a sementeira, iniciaram-se as aplicações foliares dos extratos macroalgais por aspersão nas plantas de arroz. Quatro aplicações, em intervalos de 10 dias, foram realizadas ao longo dos estádios vegetativos da cultura. Os procedimentos culturais padronizados pela EPAGRI foram adotados ao longo do ciclo de cultivo das cultivares em estudo.



Fonte: reprodução própria

Figura 1 – (A) Imagem das plantas de arroz Ônix, Rubi e Marques aos 20 dias após a sementeira em substrato coletado em quadras de arroz (experimento I - 2015), na Estação Experimental da EPAGRI - Itajaí; (B) detalhe do fenótipo de cada variedade aos 20 dias após a sementeira.

Dez dias após a última aplicação foram coletadas amostras foliares, acondicionadas em isopor e transferidas ao Laboratório de Morfogenese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA - UFSC), onde foram armazenadas em ultrafreezer (-

80°C) para análises posteriores. A previsão de colheita dos grãos, em fevereiro de 2016, não se confirmou, dada a ocorrência de problemas técnicos que causaram a perda do experimento na segunda semana de janeiro. Desta forma, para o primeiro experimento somente foi possível a obtenção de amostras do ciclo vegetativo das plantas para análises.

As análises bioquímicas focaram na determinação dos conteúdos totais de carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e açúcares solúveis totais, bem como atividade antioxidante dos extratos foliares em solventes específicos à cada análise.

### **2.2.2 Experimentos II e III (2016.1 e 2016.2)**

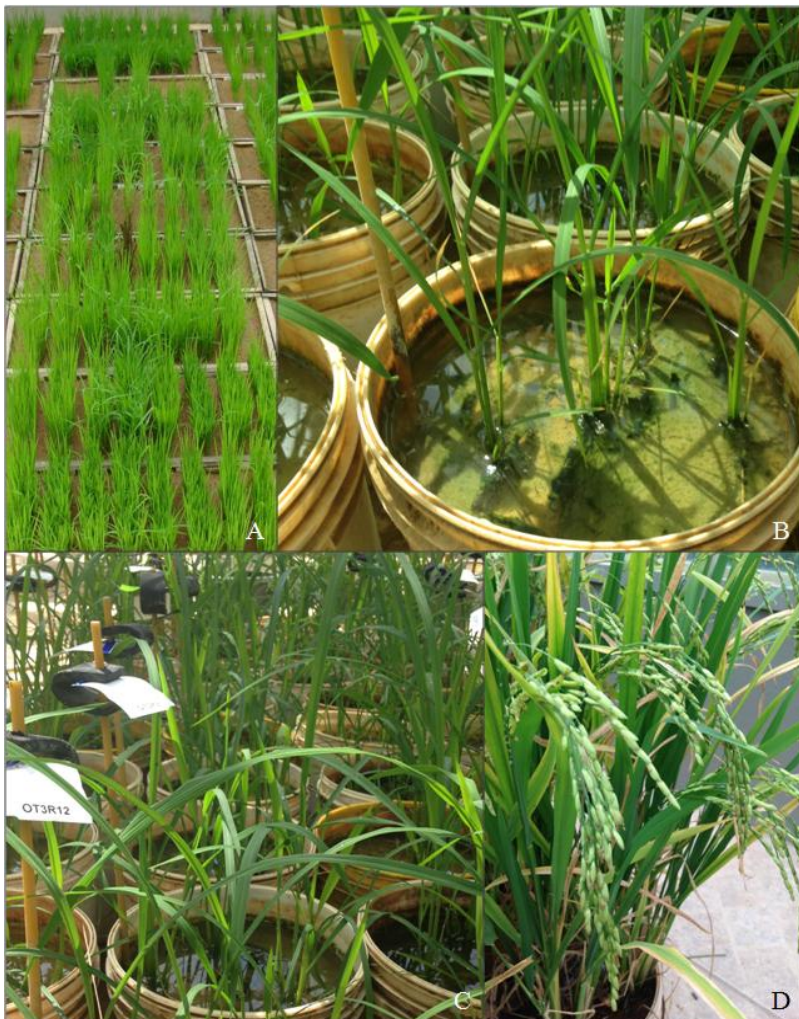
O segundo e terceiro experimentos foram implantados em janeiro de 2016 e setembro do mesmo ano, respectivamente, com semeadura de sementes pré-germinadas. Por recomendação técnica da EPAGRI, nestes ensaios a etapa de semeadura foi realizada em caixas e as plântulas transferidas aos baldes, a fim de garantir maior uniformidade ao stand de plantas (Fig. 2). Os procedimentos culturais foram os mesmos em relação ao primeiro experimento.

O segundo experimento foi conduzido ao longo de um ciclo completo da cultura, com início em janeiro e conclusão em maio de 2016. Neste foram usadas as mesmas cultivares de arroz do primeiro experimento (Ônix, Rubi e Marques). Foram também quatro aplicações foliares, a intervalos de 10 dias, ao longo dos estádios vegetativos. Dez dias após a última aplicação foram coletadas amostras foliares que, acondicionadas em isopor, foram levadas ao LMBV (CCA – UFSC) e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até posterior análise. As panículas foram colhidas ao final do estágio reprodutivo e maturação dos grãos, em maio de 2016. Só foi possível coletar para contagem, as panículas das cultivares Ônix e Rubi, pois não houve enchimento de grãos nas plantas da cultivar Marques.

No terceiro experimento, cuja implantação foi em setembro e colheita em dezembro de 2016, seguiram-se os procedimentos dos experimentos II e III. Neste último manteve-se as cultivares de arroz preto (Ônix) e vermelho (Rubi). Contudo, a fim de prevenir o ocorrido no segundo experimento, quanto ao não enchimento de grãos, a cultivar de arroz branco Marques (ciclo tardio), foi substituída pela cultivar Epagri106 (ciclo médio/curto).

Nos desbastes, feitos 20 após o plantio das mudas, manteve-se 3 indivíduos por balde, visando aumentar a biomassa amostral das estruturas vegetativas e reprodutivas. No estágio de quarta folha

expandida, (~ 23 dias após o plantio), iniciaram-se as aplicações foliares dos tratamentos. A colheita dos grãos nesse terceiro experimento ocorreu em maio de 2016.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2– Detalhes da parte aérea de plantas das cultivares EPAGRI106, Ônix e Rubi nos experimentos II e III: (A) Mudas dos genótipos de arroz sementeadas em caixas; (B) Plantas de EPAGRI106 em início de perfilhamento; (C) Plantas de Ônix no estágio vegetativo; (D) Plantas de Rubi no estágio reprodutivo.

### 2.2.3 Colheita e análises de campo

As panículas da cultivar Ônix foram colhidas em 17 de maio, ao fim do segundo experimento, 126 dias após a semeadura, e as da variedade Rubi no dia 24 de maio, 133 dias após a semeadura. As panículas das plantas da variedade Marques foram coletadas no dia 14 de julho de 2016, 184 dias após a semeadura. Após a colheita, o material amostral (Fig. 3A-C) foi seco em estufa até atingir 13% de umidade (m/m) e acondicionado em sacos de papel, conforme normas de padronização utilizadas pela EPAGRI.

Após secagem, as panículas das cultivares Rubi e Ônix foram enviadas ao LMBV (CCA-UFSC), onde procedeu-se a degrana manual. A remoção das cascas em descascador de grãos foi feita na Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), Florianópolis, SC (Fig. 11D).



Fonte: Reprodução própria

Figura 3 – Material colhido no final do experimento: (A) Panículas da cultivar Ônix (preto), colhidas ao final do experimento e grãos após degrana; (B-C) Detalhes dos grãos da cultivar Rubi (vermelho) após degrana manual; (D) Grãos descascados das cultivares Rubi (acima) e Ônix (abaixo).

No terceiro experimento os mesmos procedimentos de coleta e de processamento das amostras de panículas e grãos, descritos anteriormente, foram adotados. As colheitas das cultivares Ônix e EPAGRI106 ocorreram no dia 20 de dezembro/2016, e a da cultivar Rubi no dia 08 de janeiro/2017, 101 e 120 dias após a semeadura, respectivamente.



Dois dos critérios adotados como descritores agronômicos, para a cultura do arroz, em Santa Catarina, foram avaliados nos experimentos II e III (número de panículas por planta e peso de 1000 grãos).

## 2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 2.3.1 Extração e quantificação de clorofilas e carotenoides totais

Amostras de folhas de arroz (100 mg, peso fresco, n= 4) foram incubadas em banho-maria (65°C), com 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), por duas horas. O extrato foi recuperado por filtração e o volume final deste ajustado para 10 mL com DMSO, (Hiscox & Israelstam, 1979). Os valores das absorvâncias a 480, 649 e 665 nm foram obtidos em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53). O cálculo dos conteúdos de clorofilas utilizou as fórmulas de Wellburn (1994), sendo os dados expressos em µg/g de massa seca: [Clorofila a =  $[12,19*(A665) - 3,45*(A649)]$  e clorofila b =  $[21,99*(A649) - 5,32*(A665)]$ . Para quantificação de carotenoides totais no extrato de DMSO, foi aplicada a fórmula  $CTs = [1.000*(A480) - 2,14*(Chl a) - 70,16*(Chl b)] / 220$ , onde CTs = carotenoides totais.

### 2.3.2 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais

Amostras de folhas de arroz (1g, peso fresco, n = 4) foram maceradas em cadinho com N<sub>2</sub> líquido. Ao macerado foram adicionados 10 mL de metanol 80% (v/v), seguido de incubação por 1h, ao abrigo da luz, centrifugação (12000g, 10 min) e recuperação do sobrenadante. Os conteúdos totais de compostos fenólicos foram determinados por método colorimétrico, utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu ( $\lambda = 750$  nm), conforme descrito por Rhandir *et al.* (2002). O cálculo dos teores totais dos analitos baseou-se em curva-padrão externa de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA – 100 - 1250 µg,  $y = 0.0108x$ ,  $r^2 = 0,999$ ). Os resultados, em quadruplicata, foram expressos como valor médio, em mg de equivalente ácido gálico por g de massa seca.

### 2.3.3 Extração e quantificação de flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonoides totais utilizou, com modificações, a metodologia descrita por Zacarias *et al.* (2007). Uma alíquota de 0,5 mL de extrato metanólico 80%, de cada amostra foi utilizada para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, na

presença de 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (2% m/v) e 2,5 mL de etanol p.a. Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2000A, Instrutherm). O cálculo do teor total de flavonoides baseou-se em curva padrão externa de quercetina (10 a 200  $\mu\text{g}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,010x$ ). As análises foram realizadas em quadruplicata e os resultados foram expressos em mg de equivalente quercetina por g de massa seca.

#### 2.3.4 Determinação da inibição do DPPH(%)

O potencial de redução do radical *1,1-difenil-2-picrilhidrazil* - DPPH (%), nos extratos em análise foi determinado conforme descrito por Kim *et al.* (2002), com modificações. Para tal, a absorbância de uma solução metanólica de DPPH (1 mM em metanol 80% v/v) foi medida em comprimento de onda de 530nm, em espectrofotômetro UV-visível (UV-2000A, Instrutherm). Na sequência, um volume de 2,9 mL de solução metanólica de DPPH foi adicionado a 0,1 mL de amostra. A mistura foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz e a absorbância do produto da reação antioxidante medida à 530 nm em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2000A, Instrutherm). A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação: (%) =  $(\text{Abs Controle} - \text{Abs da Amostra}) / \text{Abs Controle} \times 100\%$ , onde Abs Controle é a absorbância do DPPH diluído e Abs da Amostra refere-se à absorbância da reação (DPPH + extrato).

#### 2.3.5 Extração e quantificação de açúcares solúveis totais

A extração de açúcares solúveis foi feita de acordo com a metodologia proposta por Shannon (1968). As amostras de folhas dos arroz foram trituradas em nitrogênio líquido (100 mg – massa fresca) e maceradas com 2 mL da solução MCW (metanol: clorofórmio: água) (12: 5: 3, v/v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm, 4°C, 5 min), o sobrenadante foi coletado e o resíduo novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (5 min, 4000 rpm, 4°C). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e o extrato novamente centrifugado. A fase superior (aquosa) dos extratos foi coletada e utilizada para análise dos açúcares. A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit & Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), agitados em vórtex e aquecidos em

banho-maria (100°C, 3 min). Após, procedeu-se à leitura da absorbância (630 nm) das amostras em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2000A, Instrutherm). O cálculo dos conteúdos de açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glicose (1 a 200 µg -  $r^2= 0,99$ ;  $y = 0,008x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glicose por g de massa seca.

## 2.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

### 2.4.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR)

Devido a relevância de compostos fenólicos em grãos de arroz, sobretudo em variedades pigmentadas, optou-se também por analisar estes metabólitos secundários através de uma abordagem analítica complementar. Assim, amostras liofilizadas e trituradas (~ 5g) de folhas dos genótipos em estudo, coletadas nos experimentos de ciclo completo (II e III), foram analisadas por espectroscopia vibracional de infravermelho próximo (NIR), uma técnica rápida e não destrutiva das biomassas, visando a quantificação de fenólicos totais e flavonoides.

Devido à pequena disponibilidade de biomassa foliar resultante do experimento I, tais amostras não foram consideradas nestas análises espectroscópicas. Os espectros de absorbância foram obtidos em espectrômetro de infravermelho próximo FT-NIR MPA BRUKER, em triplicata, na região espectral 3600 a 12500  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas 64 varreduras para cada amostra sólida, com resolução de 16  $\text{cm}^{-1}$ . A importação e pré-tratamento dos dados utilizaram o *software* Opus Lab Bruker® (v. 7.5).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados de campo, para o descritor agrônômico número de panículas por planta, avaliado nos experimentos II e III, não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das cultivares (Rubi, Ônix e Marques – 2016.1) e (Rubi, Ônix e EPAGRI 106 – 2016.2) (Tab. 3). Para o critério, peso de 1000 grãos, na cultivar Rubi não houve diferença entre os tratamentos no experimento II, contudo no experimento III, observou-se o maior peso médio nos tratamentos T1 ( $24,6\pm 1,2\text{g}$ ) e T2 ( $25,4\pm 0,8\text{g}$ ). Também no II o maior peso médio para a cultivar EPAGRI 106 foi observada em T2 ( $25,36\pm 1,1\text{g}$ ). Na cultivar

Ônix, os grãos de T2 tiveram o maior peso médio entre os tratamentos ( $19,2 \pm 2g$ ) em 2016.1 (Tab. 4).

Tabela 3 - Número de panículas por planta das cultivares Rubi, Ônix e Marques colhidas nos experimentos II (2016.1) e Rubi, Ônix e EPAGRI 106 colhidas no experimento III (2016.2). Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Variedade	Tratamento	Nº panículas/planta	
		2016.1	2016.2
Rubi	RT1	21 $\pm$ 4,9	19 $\pm$ 1.6
	RT2	19 $\pm$ 5,2	18 $\pm$ 2.7
	RT3	18 $\pm$ 6,4	18 $\pm$ 1.3
Ônix	OT1	17 $\pm$ 3,5	16 $\pm$ 0.4
	OT2	17 $\pm$ 3,7	16 $\pm$ 0.6
	OT3	16 $\pm$ 3,3	14 $\pm$ 2.6
Marques	MT1	21 $\pm$ 3,6	x
	MT2	21 $\pm$ 2,8	x
	MT3	21 $\pm$ 3,9	x
EPAGRI 106	ET1	x	20 $\pm$ 2.8
	ET2	x	21 $\pm$ 2.8
	ET3	x	20 $\pm$ 2.4

Tabela 4 - Peso de 1000 grãos de cada tratamento das cultivares Rubi e Ônix (experimento II - 2016.1) e Rubi, Ônix e EPAGRI 106 (experimento III - 2016.2). Peso seco de folhas das cultivares Rubi, Ônix, Marques e EPAGRI 106). Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais ou ausência de letras indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Variedade	Tratamento	Peso – 1000 grãos (g)		Peso médio esperado	Peso seco - folhas (mg.g <sup>-1</sup> )
		2016.1	2016.2		
Rubi	RT1	21,78 $\pm$ 1,9	24.06 $\pm$ 1.2a	26,5	300
	RT2	20,00 $\pm$ 0,7	25.40 $\pm$ 0.8a		200
	RT3	20,70 $\pm$ 1,0	22.80 $\pm$ 0.8b		300
Ônix	OT1	15,70 $\pm$ 0,4b	18.04 $\pm$ 1.1	19.5	290
	OT2	19,25 $\pm$ 1,6a	19.62 $\pm$ 0.6		290
	OT3	15,64 $\pm$ 0,4b	17.78 $\pm$ 1.2		260
Marques	MT1	x	x	x	400
	MT2	x	x		300
	MT3	x	x		300
EPAGRI 106	ET1	x	24.32 $\pm$ 0.5b	27,5	320
	ET2	x	25.36 $\pm$ 1.1a		300
	ET3	x	24.26 $\pm$ 0.6b		300

As análises bioquímicas às quais foram submetidas as amostras foliares coletadas dos ensaios conduzidos em 2015 (experimento I), 2016.1 (experimento II) e 2016.2 (experimento III), estão apresentadas nas figuras 4 a 7. Os resultados para a cultivar Rubi nos três experimentos mostraram que os maiores conteúdos dos metabólitos primários, clorofilas e açúcares solúveis totais, e dos pigmentos acessórios da fotossíntese, carotenoides, foram predominantes nas amostras correspondentes ao controle (T3), exceção ao experimento I, onde clorofilas em T3 não diferiram de T1 (extrato de *A. nodosum*) e no III para açúcares onde não houve diferença entre os tratamentos. Tais achados sugerem que, por esta abordagem, tais analitos não foram afetados pelos tratamentos com os extratos macroalgais. Para os demais pigmentos avaliados, enquanto os maiores teores de flavonoides predominaram em T1, exceto no ensaio II, onde T1 não diferiu de T2 (*S. cymosum*), fenólicos totais não seguiram um padrão. Para este último, T3 apresentou os maiores teores no ensaio II, não diferiu de T1 no ensaio I e não foram observadas diferenças entre os tratamentos no

ensaio III. Para a atividade antioxidante, T2 destacou-se no ensaio II, não diferiu de T1 no I e de T3 no III.

Para as amostras de Ônix o observado foi que T1 predominou com os maiores conteúdos de clorofilas e carotenoides (Fig. 4), não diferindo de T3 nos ensaios I e II para clorofilas e de T2 nos ensaios I e III, para carotenoides. Para açúcares solúveis totais, não houve um padrão nas amostras foliares de Ônix, predominando T1 no ensaio I, T3 no II e sem diferença significativa entre os tratamentos no ensaio III. Para fenólicos totais, T1 destacou-se com as maiores concentrações no ensaio I mantendo-se assim, mas sem diferir de T2 nos ensaios II e III. Para flavonoides, não foi detectada diferença significativa entre T1 e T2 no ensaio II e entre os três tratamentos nos ensaios I e III. Para a atividade de redução do DPPH, não houve diferença significativa entre T1 e T2 nos três ensaios e entre nenhum dos tratamentos no ensaio II. Nas variedades de pericarpo branco, embora avaliadas em épocas diferentes uma da outra, as maiores concentrações de clorofilas e carotenoides foram predominantes nas amostras do controle (T3), sendo que em EPAGRI106 o mesmo foi observado em açúcares solúveis totais. Para este último, Marques não apresentou padrão, tendo os maiores conteúdos em T1 no ensaio I e T2 no II. A exemplo do observado em Rubi, também nos arrozes de pericarpos brancos detectou-se maiores teores de clorofilas e carotenoides nas amostras do controle, denotando que também para esses analitos, os extratos macroalgais não provocaram alterações. Para açúcares esses arrozes diferiram entre os ensaios, i.e., em Marques os maiores teores no ensaio I foram observados em T1 e no II em T2. Em EPAGRI 106, maiores conteúdos foram observados em T3. Para flavonoides não houve diferença significativa entre os tratamentos no ensaio I e T3 apresentou as maiores concentrações no ensaio II (Marques); não houve diferença significativa entre os tratamentos no ensaio III (EPAGRI106). Para teores de fenólicos totais observou-se maiores concentrações nas amostras T3, para ambas as variedades, sendo que no ensaio III não houve diferença significativa entre T2 e T3. Para atividade de redução do radical DPPH, Marques não apresentou diferença significativa entre T1 e T3 e EPAGRI 106 entre T1 e T2.

Assim, avaliando os dados das análises às quais foram submetidas as amostras foliares dos três experimentos os resultados, tomados em conjunto, nos testes bioquímicos mostraram proporcionalidade entre os teores de clorofilas e carotenoides em quase todos os tratamentos para os três experimentos, notadamente nos tratamentos controle (T3). A atividade antioxidante do DPPH, foi

proporcional aos teores de fenólicos e flavonoides apenas no experimento II (2016.1). Resultados mais expressivos em termos destas proporcionalidades eram esperados, visto que estes compostos, presentes em cereais pigmentados, são sabidamente antioxidantes potentes (CAI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2014). Contudo, os resultados obtidos para os teores destes pigmentos sinalizam para possibilidades promissoras na aplicação dos tratamentos propostos, em especial às cultivares pigmentadas (Rubi e Ônix).

Segundo Stirk e van Standen (1997) e Tarakhovskaya *et al.* (2007), embora os efeitos bioestimulantes promovidos pelos extratos de algas sejam atribuídos a presença de moléculas de baixo peso molecular e aos fitormônios, trabalhos como os de Klarzynski *et al.* (2003) e Roux *et al.* (2009) demonstraram que moléculas maiores como polifenóis e polissacarídeos, bem como a associação destas com aquelas têm importante atuação na bioestimulação, aumento de resistência ao estresse ou mesmo como aleloquímicos (FAQUIN, 2005). Tais achados estimulam a abordagem por técnicas mais rápidas e simples para detecção desses compostos de maior peso molecular, como os fenólicos. Razão pela qual iniciou-se, neste trabalho, abordagem de análise das estruturas de arroz utilizando NIR (FASSIO & COZZOLINO, 2004), cujos resultados, submetidos à quimiometria, possibilitam indícios mais claros dos perfis e a interação entre as amostras analisadas.

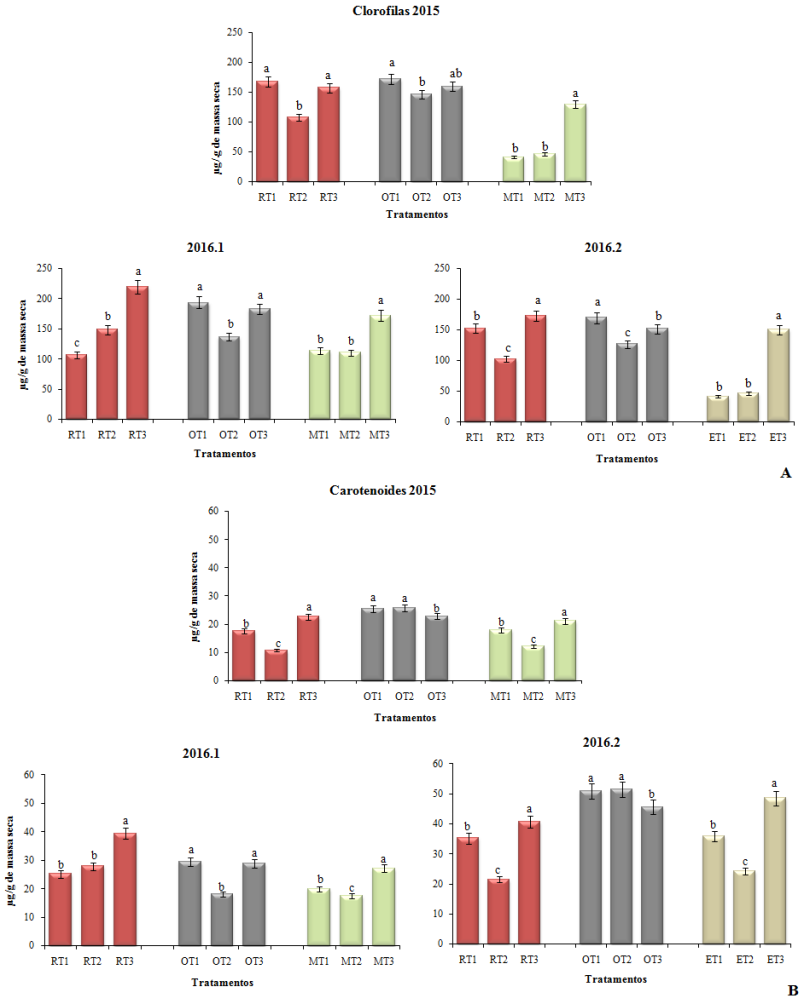


Figura 4 – Teores ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de clorofilas (A) e carotenoides (B) em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T1), *S. cymosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T2) e sem extratos –  $\text{H}_2\text{O}$  (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média ( $n=4$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.



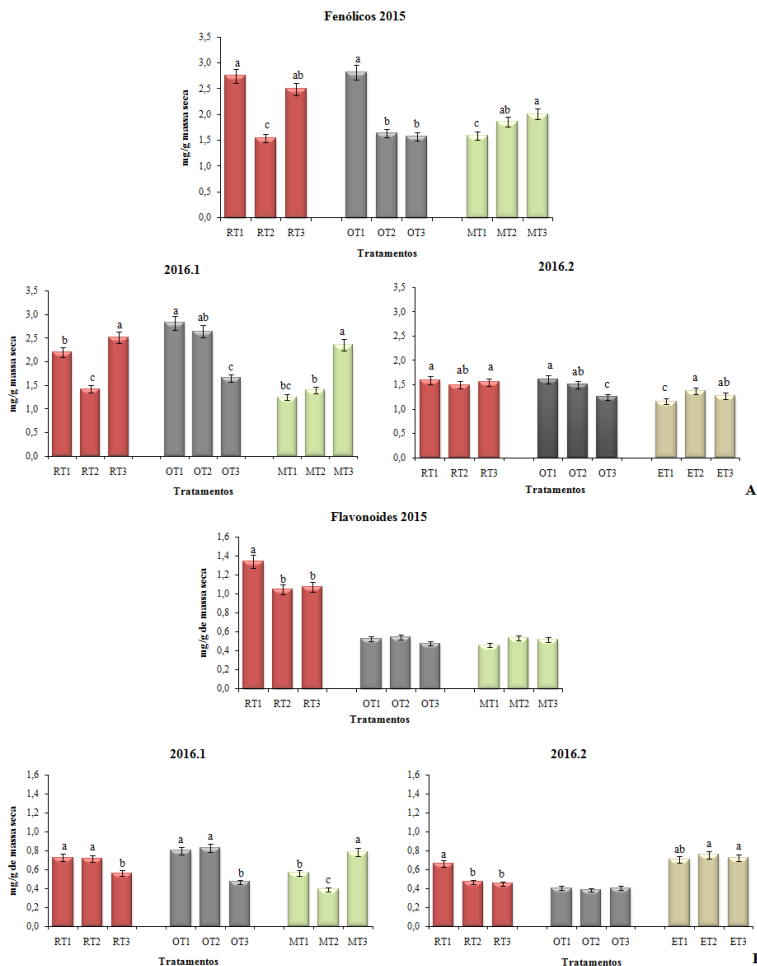


Figura 5 – Teores ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de fenólicos (A) e flavonóides (B) em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T1), *S. cymosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T2) e sem extratos –  $\text{H}_2\text{O}$  (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média ( $n=4$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

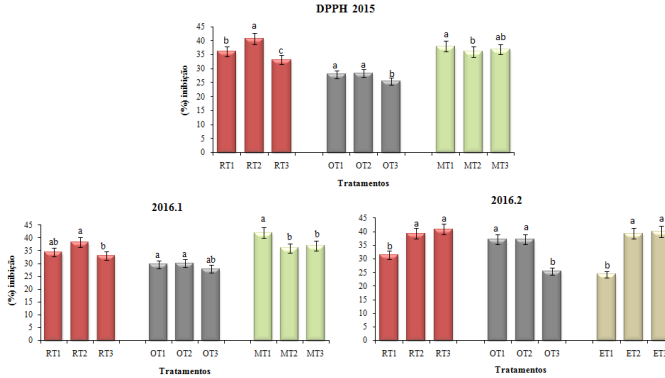


Figura 6 – Porcentagem de inibição do radical livre DPPH em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T1), *S. cymosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T2) e sem extratos –  $\text{H}_2\text{O}$  (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média ( $n=4$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

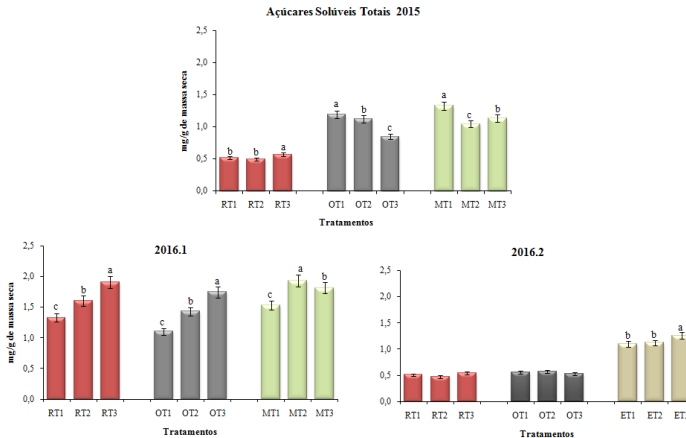


Figura 7 - Teores ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de açúcares solúveis totais em amostras foliares das cultivares Rubi (R), Ônix (O), Marques (M) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T1), *S. cymosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T2) e sem extratos –  $\text{H}_2\text{O}$  (T3). Experimentos I, II e III conduzidos em 2015, 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média ( $n=4$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

### 3.1 DETECÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS POR NIR

Para detecção de compostos presentes nas amostras sólidas foliares, na faixa de absorção correspondente ao infravermelho próximo (NIR), as mesmas foram submetidas a varredura naquela janela espectral (3600 a 12500  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig 8).

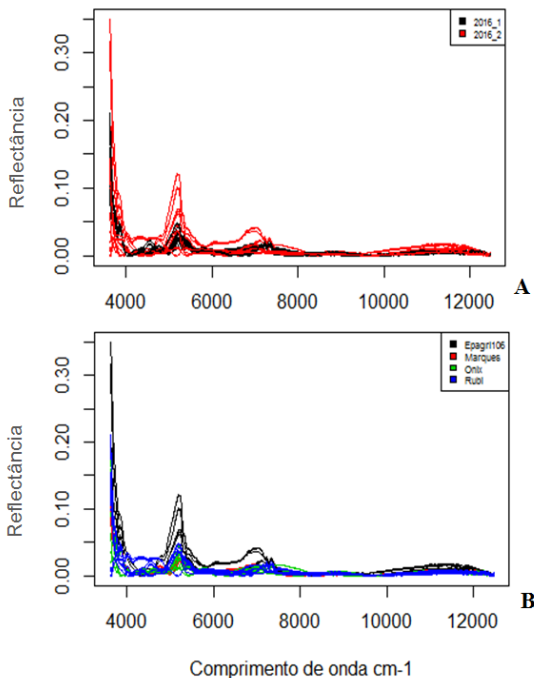


Figura 8 – Espectros de reflectância na região do infravermelho próximo (3600 a 12500  $\text{cm}^{-1}$ ) de tecido foliar das cultivares de arroz Rubi, Ônix, Marques e EPAGRI106. (A) - experimento II, safra 2016.1 e (B) experimento III, safra 2016.2.

Após análise visual preliminar dos espectros e pré-processamento dos dados para otimização da relação sinal/ruído, foram detectados sinais de maior intensidade na janela espectral de 3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$  (Fig.9), região típica de polifenóis (SOUZA, 2017).

Os perfis espectroscópicos das variedades mostraram-se similares entre si e na comparação entre safras. Contudo, foram observadas reflectâncias de maior intensidade nos perfis de amostras

coletadas no experimento III – safra 2016.2 (Fig. 9A), com destaque à cultivar EPAGRI106 (Fig. 9B).

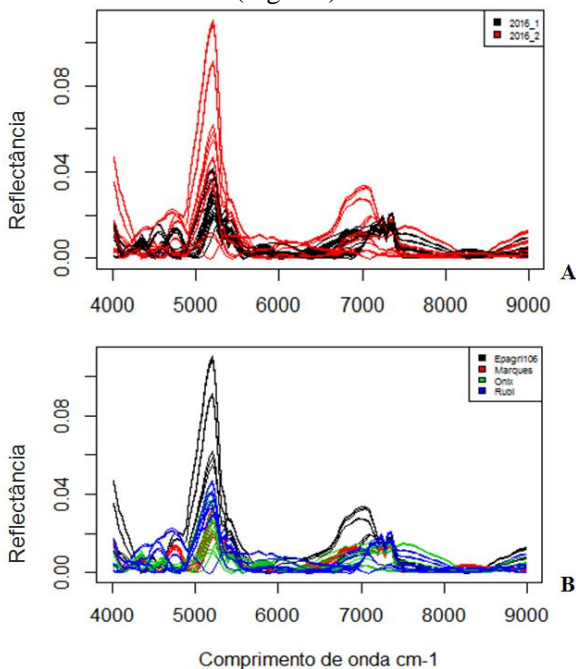


Figura 9 - Espectros de reflectância na região do infravermelho próximo, destacando a região de sinais de maior intensidade (4000 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ ), de amostras foliares dos genótipos de arroz em estudo. (A) - experimento II, safra 2016.1 e (B) experimento III, safra 2016.2.

Numa segunda etapa, dados da região compreendendo as bandas de maior intensidade, i.e., 3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$  foram normalizados e submetidos à análise dos componentes principais (PCA), para melhor visualização das eventuais relações de similaridade/discrepância derivadas de seus perfis de composição química, considerando-se os efeitos de safra (Fig. 10). O modelo descritivo resultante da PCA demonstrou que os dois primeiros componentes contêm mais de 94% da variância dos dados, i.e., PC1 (86,71%) e PC2 (8,24%). No que tange à discriminação das cultivares entre safras no ano de 2016, observou-se que as amostras das variedades Ônix e Marques distribuíram-se ao longo do eixo PC1 e agruparam-se no quadrante PC2 positivo. Os demais genótipos situaram-se em PC2 negativo, com distribuição das variedades Rubi e EPAGRI106 ao longo do eixo do componente

principal 1. Em seu conjunto, a análise de componentes principais sugere maior similaridade de composição química às cultivares Ônix e Marques ao longo das safras, comparativamente às demais cultivares em estudo, i.e., Rubi e EPAGRI106. Tal fato é relevante, uma vez que o modelo de classificação resultante da PCA agrupa cultivares diferentes quanto à coloração do pericarpo.

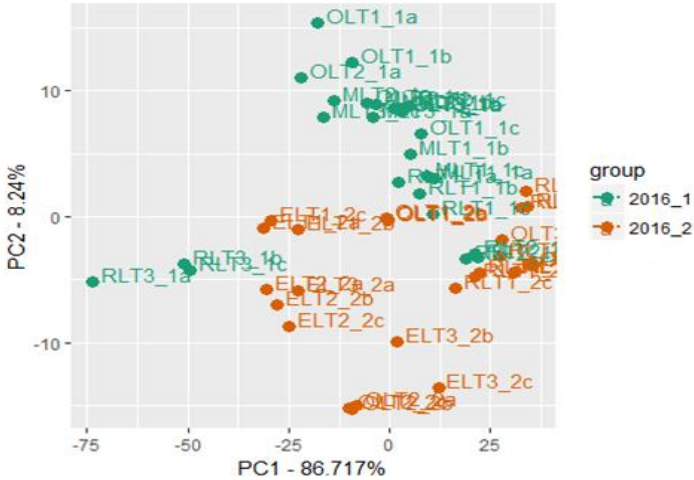


Figura 10 - Distribuição fatorial dos componentes principais dos espectros de absorbância na região do infravermelho ( $3600$  a  $9000\text{ cm}^{-1}$ ) dos experimentos II (2016.1) e III (2016.2).

Em abordagem complementar, os dados da janela espectral de  $3600$  a  $9000\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 9) foram submetidos à análise de *cluster* hierárquico (Fig. 11). Os resultados demonstram que o modelo de descrição se mostrou mais efetivo em detectar eventuais diferenças de composição química nos tecidos foliares dos genótipos ao longo das safras, comparativamente ao observado entre genótipos. De fato, considerando as óbvias distinções fenotípicas das variedades assume-se como de maior relevância o entendimento de eventuais variações do metaboloma ao longo dos ciclos de cultivo, em função das variações climáticas esperadas, por exemplo.

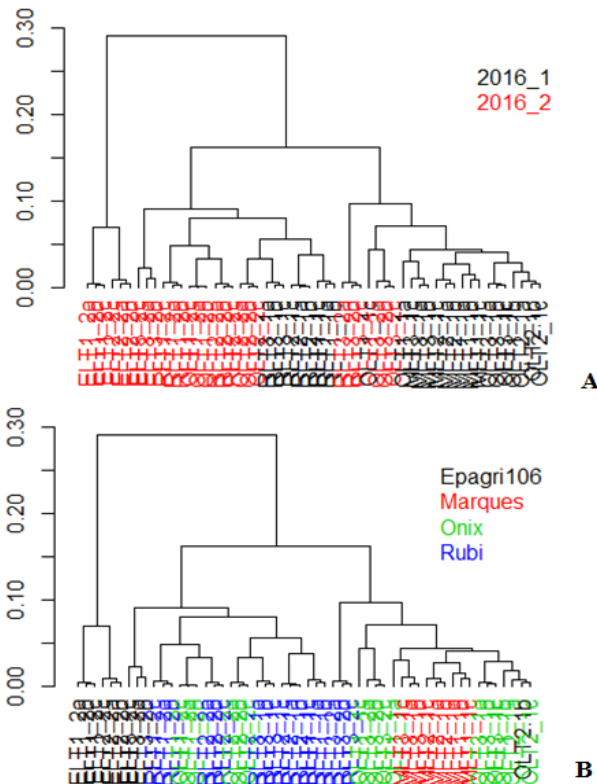


Figura 11 – Dendrograma dos espectros de refletância ( $3600$  a  $9000\text{ cm}^{-1}$ ) resultante de análise de cluster hierárquico utilizando a distância euclidiana em relação às safras 2016.1 e 2016.2.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados, em estruturas vegetativas das quatro cultivares da espécie agrícola estudada neste trabalho, pode ser indicativo de que também a partir de amostras foliares das plantas, pode-se comprovar a qualidade intrínseca dos grãos. Quanto às diferenças de conteúdo observadas entre os metabólitos, pode-se inferir um efeito de safra decorrente da sazonalidade. A literatura traz relatos de trabalhos mostrando resultados bastante positivos com o uso de algas pardas, em especial *A. nodosum*, ao incremento da produção vegetal e, neste trabalho, tomados em conjunto, e sendo o arroz apontado como pouco responsivo a tratos foliares, incluindo-se os genótipos de grãos

pigmentados, os resultados das análises bioquímicas mostraram-se promissores ao uso de extratos alcalinos das algas pardas estudadas, via foliar, não havendo indícios evidentes de fitotoxicidade decorrentes dos extratos nessas formulações. Os resultados obtidos em NIR, especialmente por ser um método alternativo rápido e não destrutivo para detecção de fenólicos totais e flavonoides, pareceram configurar, com alguns ajustes (como curva de calibração, complementar à análises de UV), ferramenta promissora para análise destes compostos.





## CAPÍTULO IV

---

### **Efeito do tratamento com extratos das algas pardas *A. nodosum* e *S. cymosum* no perfil metabólico de grãos de arroz pigmentados (variedades Ônix e Rubi) e não pigmentos (variedade EPAGRI106)**

## **1 INTRODUÇÃO**

A produção global de cereais duplicou, nos últimos 40 anos, impulsionada pela aplicação crescente de insumos, fertilizantes, pesticidas e água, além da criação de novas variedades e tecnologias. No manejo do arroz (*Oryza sativa*), diversos produtos têm sido recomendados visando o incremento da produtividade e a qualidade de grãos, bem como a proteção a patógenos, os quais são aplicados em diversas etapas do ciclo da cultura. Na qualidade de grãos, trabalhos como de Peterson *et al.* (2004), comprovaram a influência de agentes externos e ambientais na qualidade destas estruturas em genótipos de aveia. Neste viés, produtos de origem marinha com potencial de elicitação e incremento da produção vegetal têm chamado a atenção como alternativa à produtividade de culturas de interesse agrícola, com menor impacto ambiental em comparação com os sistemas de manejo tradicionais.

Em grãos, diversos constituintes têm impacto na qualidade alimentar, devido às propriedades funcionais àquela biomassa. Em grãos pigmentados, de forma especial, há o incremento de compostos bioativos adicionais e com atividade antioxidante, entre os quais os carotenoides e os polifenóis (ZHOU *et al.* 2002; HU *et al.* 2003). Compostos do metabolismo secundário vegetal, os polifenóis desempenham importantes funções em plantas, animais e microorganismos. Tais compostos caracterizam-se por uma grande heterogeneidade de estruturas químicas, sendo classificados em três grandes grupos, a saber: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (KING & YOUNG, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2013). Em grãos de arroz, para além dos componentes nutricionais majoritários, e.g., amido, proteínas e lipídios, cujos teores determinam o cozimento e a qualidade da biomassa (ZHO *et al.* 2002), nas variedades pigmentadas compostos nutracêuticos, notadamente polifenóis, flavonoides e antocianinas, são encontrados.

Extratos de macroalgas têm sido utilizado à melhoria do rendimento de várias culturas (CRAIGIE, 2011), assim como diversos estudos demonstram os benefícios da aplicação de tais extratos na germinação de sementes, no aumento no tempo de prateleira e da resistência a estresses bióticos e abióticos (CRAIGIE, 2011; LOLA-LUZ *et al.* 2013; BATTACHARYYA *et al.* 2015). Por estarem relacionados ao aumento da tolerância ao estresse, a aplicação destes extratos de macroalgas estimula o acúmulo de moléculas bioativas, como os polifenóis (FAN *et al.* 2011). Lola-Luz e colaboradores (2013; 2014) verificaram que a aplicação de produtos comerciais a base de extrato de *Ascophyllum nodosum* não aumentou o rendimento das culturas de brócolis e repolho. No entanto, detectaram incrementos no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides em relação às plantas controle. Embora o uso de extratos de *A. nodosum* seja bem documentado na literatura, poucos são os trabalhos que utilizam espécies do gênero *Sargassum* com o propósito de desenvolver um bioestimulante. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi quantificar e identificar compostos do metabolismo primário e secundário em grãos de arroz das variedades pigmentadas Rubi e Ônix e de pericarpo branco EPAGRI106, oriundos de plantas tratadas com extratos das algas *A. nodosum* e *S. cymosum*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de grãos das variedades Rubi e Ônix foram colhidas nos experimentos II e III, enquanto aquelas da variedade EPAGRI106 foram coletadas somente no experimento III, foram descascados, moídos e liofilizados. A partir destas biomassas, foram obtidos extratos organosolventes e realizadas análises espectrofotométricas, para quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e açúcares solúveis totais, bem como da atividade antioxidante. Além disto, análises cromatográficas e de espectrometria de massas buscaram identificar e quantificar as antocianinas nos extratos investigados.

### 2.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 2.1.1 Espectrofotometria UV-visível – compostos fenólicos e flavonoides totais, açúcares solúveis totais e atividade antioxidante

Amostras dos grãos moídos (200mg, peso seco, n = 4) foram maceradas em 8 mL de metanol 80% (v/v), seguido de incubação por 1h, ao abrigo da luz, centrifugação (12000g, 10 min) e recuperação do sobrenadante por filtração sob vácuo. Alíquotas do extrato metanólico foram coletadas à quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e percentual de atividade antioxidante. Para extração e quantificação dos analitos foram seguidos os protocolos descritos no capítulo III (item 2.3).

Por sua vez, os açúcares solúveis totais dos grãos foram extraídos a partir de uma massa amostral de 15mg, a qual foi adicionada de 1 mL de solução metanol:clorofórmio:água (MCW - 12: 5: 3, v/v/v).

## 2.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

### 2.2.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR)

Alíquotas (~5 g) dos grãos moídos e liofilizados das cultivares de arroz Ônix, Rubi e Epagri 106 foram analisadas em espectrômetro de infravermelho próximo (NIR). As análises adotaram o protocolo de preparo das amostras e aquisição dos espectros descritos no capítulo III às biomassas de tecido foliar (item 2.3.2). A importação, pré-tratamento dos dados e a construção de modelos quimiométricos foram feitos com o auxílio do *software* Opus Lab.

## 2.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

### 2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência – perfil de antocianinas

A extração para determinação de antocianinas seguiu protocolo desenvolvido pelo grupo do LMBV. A 12,9g de grãos de arroz moídos e liofilizados das cultivares Ônix e Rubi foram adicionados 100mL de solução extratora (álcool etílico: ácido acético 1% - v/v, pH 3,00±0,05). A extração hidroalcolica utilizou extrator de ultra pressão desenvolvido no LMBV (Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC), cujo protótipo encontra-se sob patenteamento. A mistura resultante foi filtrada, seca em rotaevaporador e liofilizada. Alíquotas do material resultante foram ressuspensas (10mg de biomassa/mL de metanol) e esta solução diluída em

água:metanol:ácido fórmico (75:20:5, v/v/v), na proporção 1:10. Para análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência, Thermo scientific UltiMate 3000, utilizou-se um método isocrático em fase móvel água:metanol:ácido fórmico (75:20:5, v/v/v), fluxo 0,6mL/min, nas seguintes condições: coluna C18, (150mm; Ø interno 4.6 mm; tamanho de partículas 5µm); detector de arranjo de diodos ( $\lambda = 270\text{nm}$ ), injeção automática e termostatização da coluna à 30 °C. A aquisição e o processamento dos espectros para identificação e quantificação dos analitos deu-se através do *software* Chromeleon.

## 2.4 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

### 2.4.1 Espectrometria de massas MALDI-TOF

A fim de identificar as antocianinas presentes nos grãos de arroz das cultivares Rubi e Ônix utilizou-se o espectrômetro de massas com interface de dessorção a laser assistida por matriz e analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF MS; Autoflex III SmartBeam, Bruker Daltonics, Alemanha) para comprovar as identidades dos compostos previamente observados nas análises via CLAE. Alíquotas (1 µL) dos extratos hidroalcoólicos acidificados e do padrão cianidina-3-*O*-glucosídeo (Sigma-Aldrich, MO - USA) foram aplicados em placa metálica de MALDI-TOF e cocristalizadas com 1 µL de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA; 10 mg/mL; 70:30:0.2% ACN:H<sub>2</sub>O:TFA), matriz selecionada à ionização do material. As configurações do espectrômetro à aquisição dos espectros foram: método reflectron positivo, intervalo de massas analisado = 100 a 2500 Da e 1500 pontos amostrais foram acumulados. Os espectros foram analisados no *software* FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Alemanha) tendo sua linha de base subtraída e os picos selecionados. Para confirmação da presença do analito de interesse, espectros de massas da fragmentação dos (MS/MS) picos correspondentes da amostra e do padrão foram obtidos e processados com suporte do programa FlexAnalysis.

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises bioquímicas e do potencial antioxidante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, com grau de significância de 5%, utilizando o *software*

Statistica, versão 13.3. As análises de NIR foram submetidas a testes univariados *scripts* em linguagem R.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E ATIVIDADE REDUTORA**

As análises das três variedades em estudo, em amostras coletadas nos experimentos II e III mostram os maiores teores de fenólicos e flavonoides na variedade de pericarpo preto (Ônix), quando as plantas foram tratadas com extratos das duas algas (Fig.1). O aumento no conteúdo destes compostos após a aplicação de extratos de macroalgas, em especial os produtos comerciais a base de *A. nodosum*, já foram relatados na literatura (LOLA-LUZ *et al.* 2013; 2014; BATTACHARYYA *et al.* 2015). Estes resultados são bastante importantes, uma vez que o aumento no acúmulo destes compostos está relacionado a melhora na qualidade nutricional de plantas e grãos. Além disso, os resultados obtidos para o extrato de *S. cymosum* foram estatisticamente semelhantes aos obtidos para *A. nodosum*, o que abre possibilidades de estudos e aplicações para aquela espécie de clima tropical.

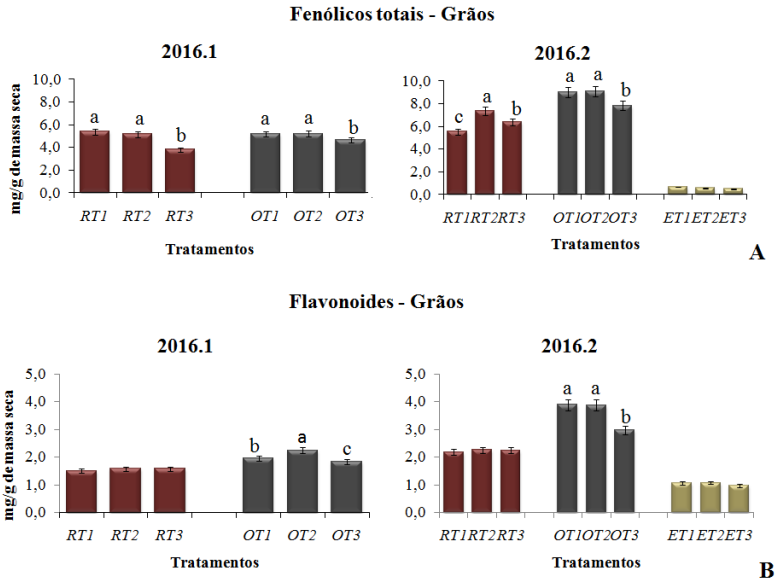


Figura 1 - Teores ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de fenólicos totais (A) e flavonoides (B) em amostras dos grãos das cultivares Rubi (R), Ônix (O) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T1), *S. cymosum* ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (T2) e sem extratos –  $\text{H}_2\text{O}$  (T3). Experimentos II e III conduzidos em 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média ( $n=4$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

Em relação aos resultados obtidos com o DPPH (Fig. 2A), o esperado é que a atividade antioxidante aumentasse nas amostras aos maiores teores de fenólicos (ZHOU, 2002; 2014; WALTER & MARCHESAN, 2011; WALTER, 2013), confirmado nos grãos da variedade Ônix de plantas tratadas com os extratos no experimento II, e nos da cultivar Rubi, tratados com extrato de *S. cymosum*, no experimento III. De curioso, para a atividade antioxidante o extrato da variedade Rubi (experimento II) se mostrou inexpressivo, um fato associado aos menores teores de pigmentos observados. De forma similar, os extratos dos grãos da variedade EPAGRI106 apresentaram conteúdos reduzidos de flavonóides e de compostos fenólicos, bem como baixa atividade antioxidante (Fig. 2A).

Para açúcares solúveis totais (Fig. 2B), os maiores teores foram detectados nos grãos de Rubi de plantas tratadas com extrato de *A.*

*nodosum* no experimento II e com os dois extratos no experimento III. Também nem Ônix as maiores concentrações foram detectadas nos grãos de plantas tratadas com os extratos no experimento II e com *S. cymosum* no experimento III. Nas amostra de EPAGRI106, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

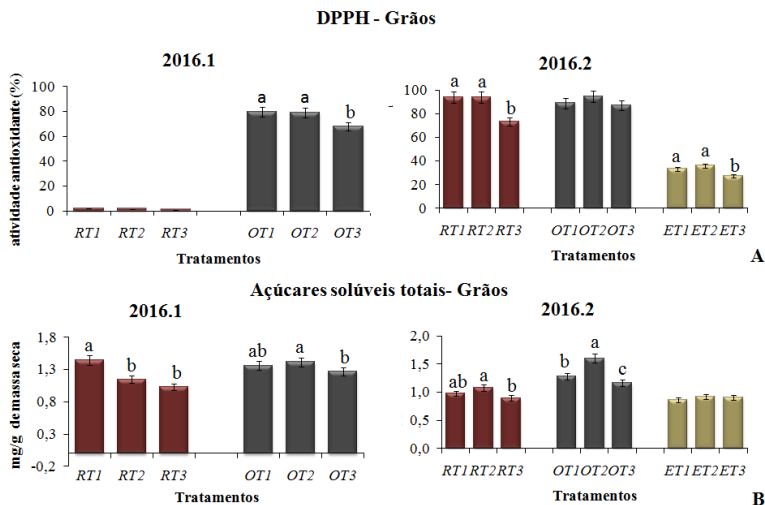


Figura 2 - Percentual da atividade antioxidante do DPPH (A) e teores (mg.g<sup>-1</sup>) de açúcares solúveis totais (B) em amostras dos grãos das cultivares Rubi (R), Ônix (O) e EPAGRI106 (E), tratadas com extratos de *A. nodosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T1), *S. cymosum* (0,5 g L<sup>-1</sup>) (T2) e sem extratos – H<sub>2</sub>O (T3). Experimentos II e III conduzidos em 2016.1 e 2016.2, respectivamente. As barras correspondem a média (n=4) ± desvio padrão. Letras diferentes indicam tratamentos significativamente diferentes segundo o teste de comparação de Tukey.

### 3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CLAE

As amostras dos extratos da cultivar Ônix apresentaram de 0,643±0,03 µg.mL<sup>-1</sup> - OT1(Fig. 3A), 0,534±0,01 µg.mL<sup>-1</sup> - OT2 (Fig. 3B) e 0,222±0,01 µg.mL<sup>-1</sup> – OT3 (Fig. 3C). Para confirmação da identidade do composto nas amostras em questão foi adicionado a estas uma alíquota do padrão de cianidina-3-*O*-glucosídeo, seguido de co-cromatografias nas mesmas condições experimentais (Fig. 4).

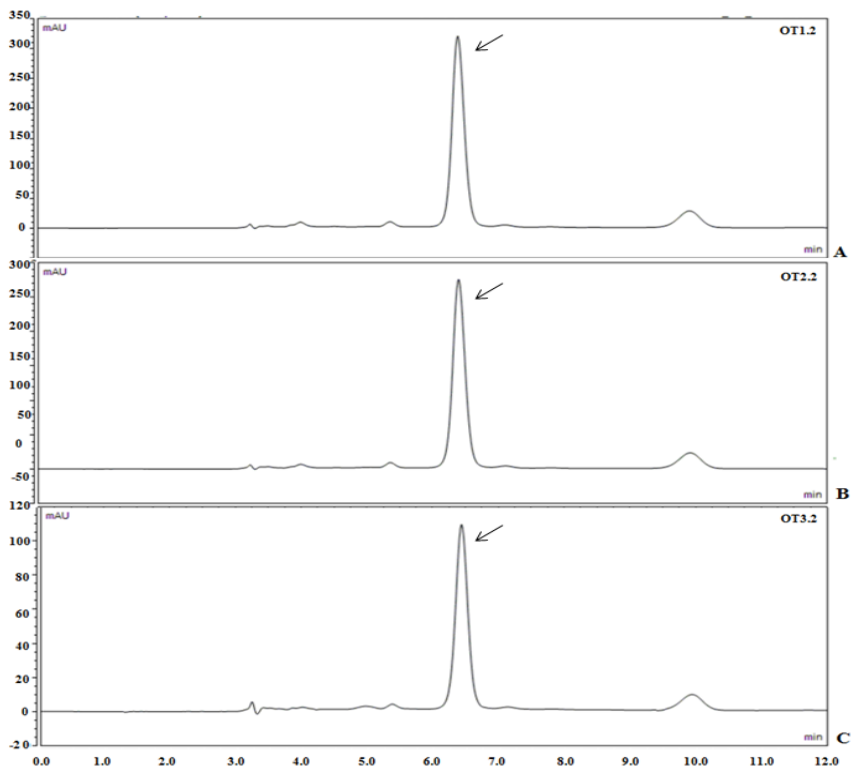


Figura 3 – Perfis cromatográficos obtidos por (CLAE-DAD, 270 nm) dos extratos hidroalcoólicos de grãos da cultivar Ônix, após tratamento com os extratos de (A) *A. nodosum* (T1), (B) *S. cymosum* (T2) e (C) controle (T3).



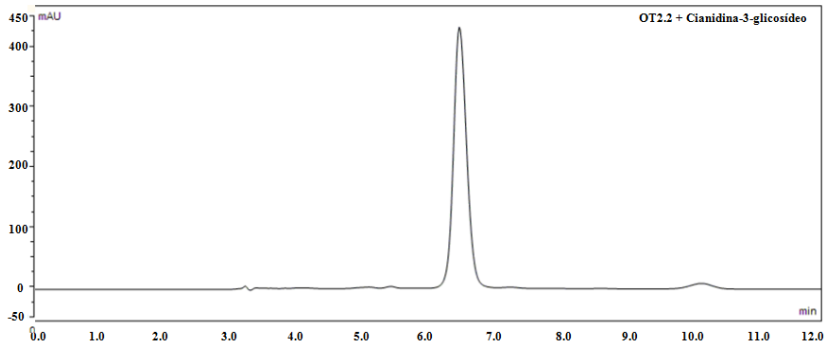


Figura 4 - Cromatograma de uma amostra do extrato hidroalcoólico de grãos da cultivar Ônix (OT2), acrescida do padrão cianidina-3-*O*-glucosídeo.

A figura 5 mostra os cromatogramas das amostras da cultivar Rubi, onde se observa conteúdos de  $0,096 \pm 0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para RT1 (5A),  $0,056 \pm 0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para RT2 (5B) e  $0,032 \pm 0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para RT3 (5C).

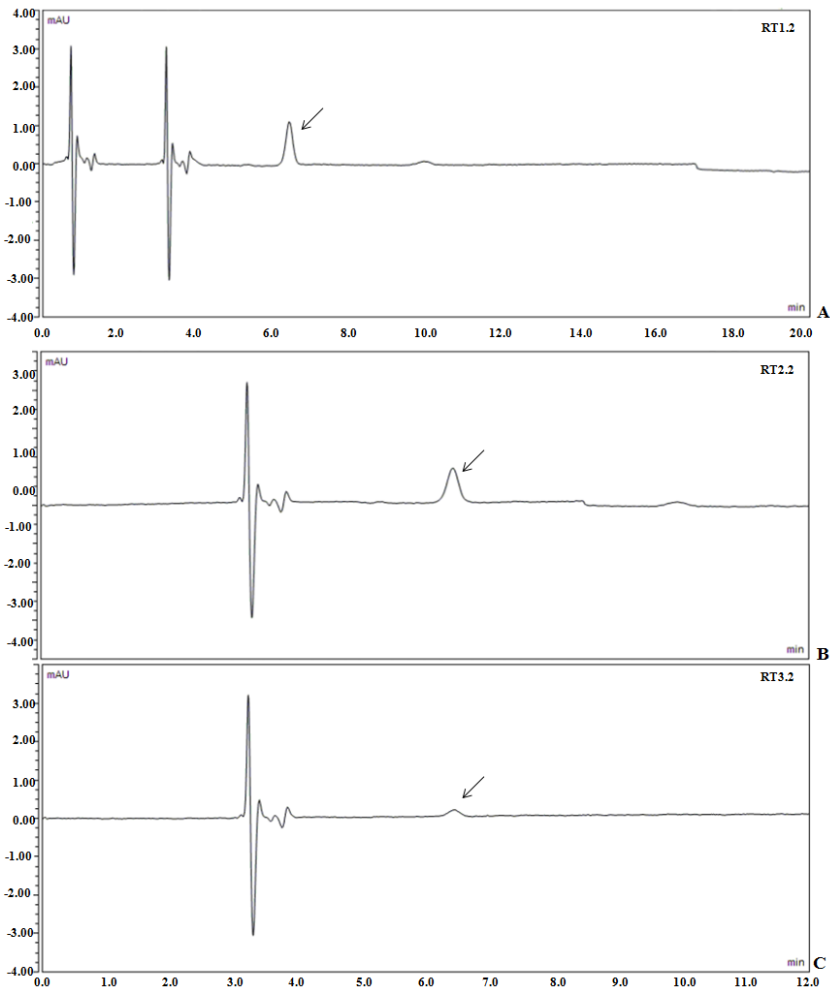


Figura 5 - Perfis cromatográficos (CLAE-DAD, 270 nm) dos extratos hidroalcoólicos de grãos de arroz da cultivar Rubi, após tratamento com os extratos de (A) *A. nodosum* (T1), (B) *S. cymosum* (T2) e (C) controle (T3).

Os teores da antocianina em estudo nos grãos das cultivares Rubi e Ônix tratadas com extrato de *A. nodosum* (T1) foram superiores seguido do tratamento com extrato de *S. cymosum* (T2). Além disto, destaca-se que os conteúdos de antocianinas nas amostras de grãos da cultivar Ônix foram consideravelmente superiores ao observado no genótipo Rubi (Figuras 3 e 5, respectivamente). De fato, nesta última,

os valores detectados correspondem a 10-15% daqueles encontrados na variedade Ônix. Diversos trabalhos já comprovaram a presença de antocianinas, majoritariamente cianidina, em grãos pigmentados de arroz, com maiores concentrações em grãos de pericarpo preto (ABDEL-AAL *et al.* 2006; HIEMORI *et al.* 2009; HOU *et al.* 2013). A detecção de maiores concentrações de antocianinas nos grãos de plantas tratadas com os extratos alcalinos das macroalgas pardas em investigação, dá suporte à tese de que tais matrizes quimicamente complexas têm efeito estimulante da biossíntese e acúmulo destes metabólitos secundários. Tal fato não foi observado nas amostras de grãos da variedade EPAGRI106, de pericarpo branco.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS – MALDI-TOF

A figura 6 mostra o espectro de massas da cianidina-3-*O*-glucosídeo, detectada em MALDI-ToF. A figura 7 apresenta os espectros do padrão analítico detectado em MALDI-ToF e reanalisado por MS-MS (Fig. 7A e 8A). Além disto, os espectros de MS-MS das amostras dos extratos das variedades Ônix (Fig. 7B-C-D) e Rubi (Fig. 8B-C-D), coletadas no experimento III, confirmaram a identidade do composto, com fragmentos típicos, e.g., de 286,9 *m/z* e 449 *m/z*.

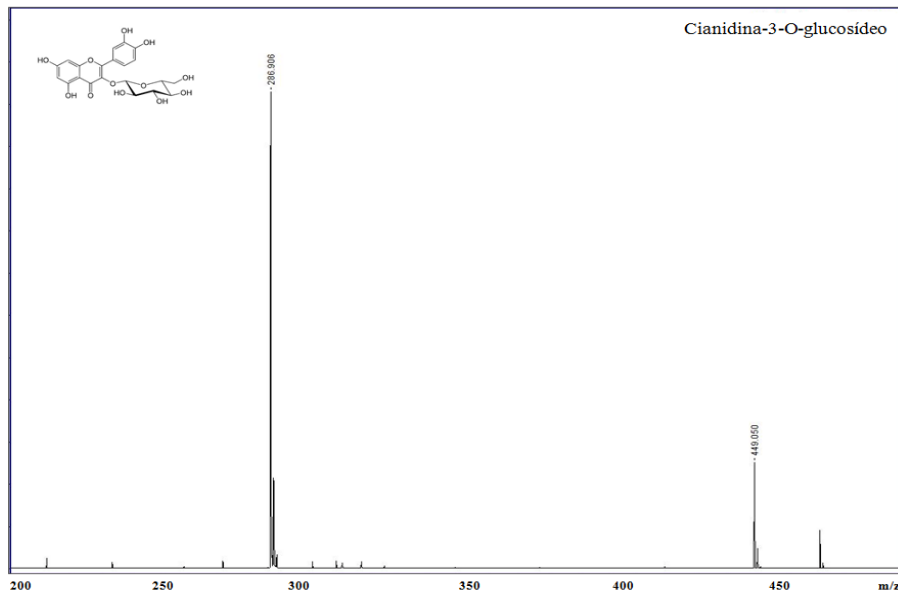


Figura 6 – Espectro de ionização do padrão de cianidina-3-O-glucosídeo, na janela espectral que abrange os picos de ionização da molécula (200 a 500  $m/z$ ). A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras.

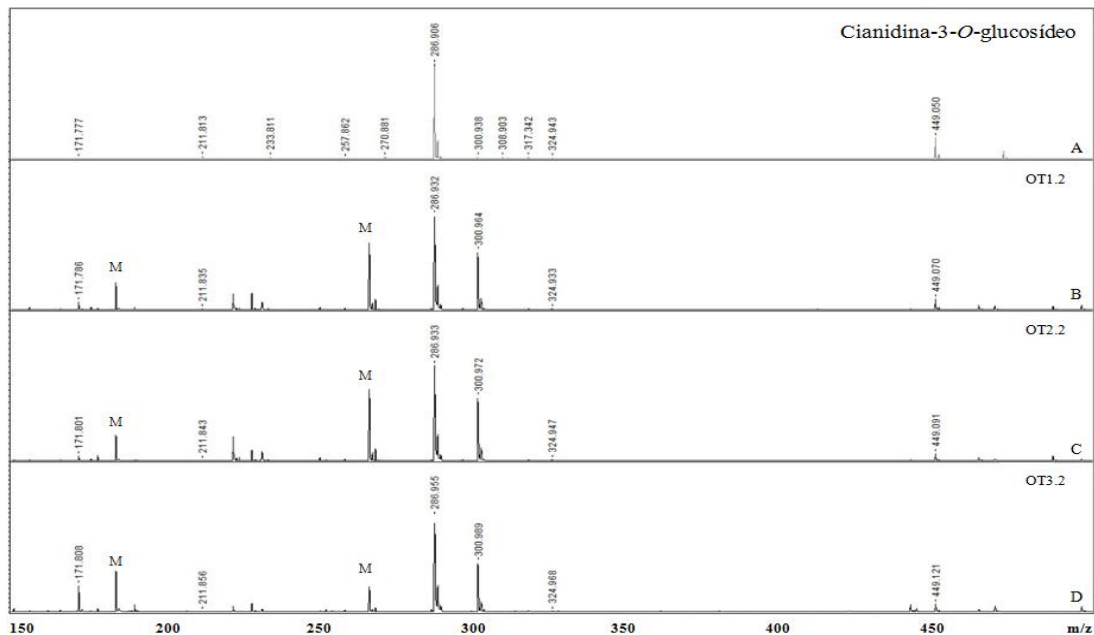


Figura 7 – Espectro de ionização do padrão de cianidina-3-*O*-glucosídeo (A) e das amostras de grãos da cultivar Ônix consoante aos tratamentos: (B) OT1- extrato alcalino de *A. nodosum*; (C) OT2- extrato alcalino de *S. cynosu* e (D) OT3 – controle, coletados no experimento III. A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras.

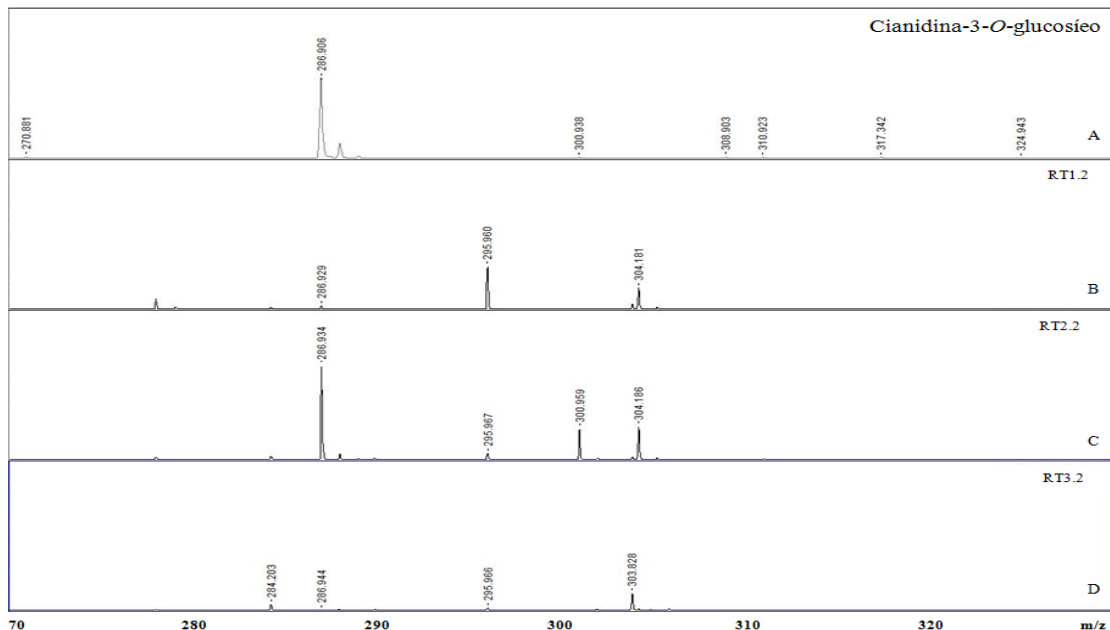


Figura 8 – Espectro de ionização do padrão de cianidina-3-*O*-glucosídeo (A) e das amostras de grãos da cultivar Rubi, conforme os tratamentos RT1 - extrato alcalino de *A. nodosum* (B); RT2 - extrato alcalino de *S. cymosum* (C) e RT3 – controle (D), coletados no experimento III. A letra “M” indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, utilizada na cocristalização das amostras.

Os resultados destas análises corroboram com o já descrito na literatura quanto ao composto antociânico majoritário em grãos pigmentados de arroz (HYUN *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2005). A cianidina-3-O-glicosídeo é a mais ocorrente em grãos pigmentados de arroz (PEREIRA-CARO *et al.* 2013). Embora a abordagem da análise realizada não tenha sido quantitativa, picos em 286,9  $m/z$  mais intensos nas amostras OT1 e OT2 foram detectados (Fig. 7B e C), sugerindo maiores teores desse pigmento naquelas amostras. Por outro lado, para as amostras da variedade Rubi, o sinal de ionização para cianidina foi detectado, contudo com baixíssima intensidade quando comparado com o padrão (Fig. 8), sugerindo menores teores daquele analito nos grãos vermelhos de arroz. Os resultados obtidos por MALDI-ToF corroboram os achados da CLAE-DAD, onde foram detectados maiores concentrações do analito nas amostras da variedade Ônix em relação à Rubi.

Outra antocianina, referida como predominante em grãos pigmentados de arroz é a peonidina (CHEN *et al.* 2005). Nos espectros de MALDI-ToF das amostras da variedade Ônix foram detectados outros sinais, menos intensos em relação à cianidina-3-O-glicosídeo e um de maior intensidade (301,5  $m/z$ ), sugerindo a ocorrência de peonidina. Nas amostras de Rubi não foram detectados sinais daquela antocianina. Contudo, devido à não fragmentação da molécula de peonidina-3-O-glucosídeo, em MS-MS, não foi possível sua confirmação inequívoca nos extratos investigados (Fig. 9).

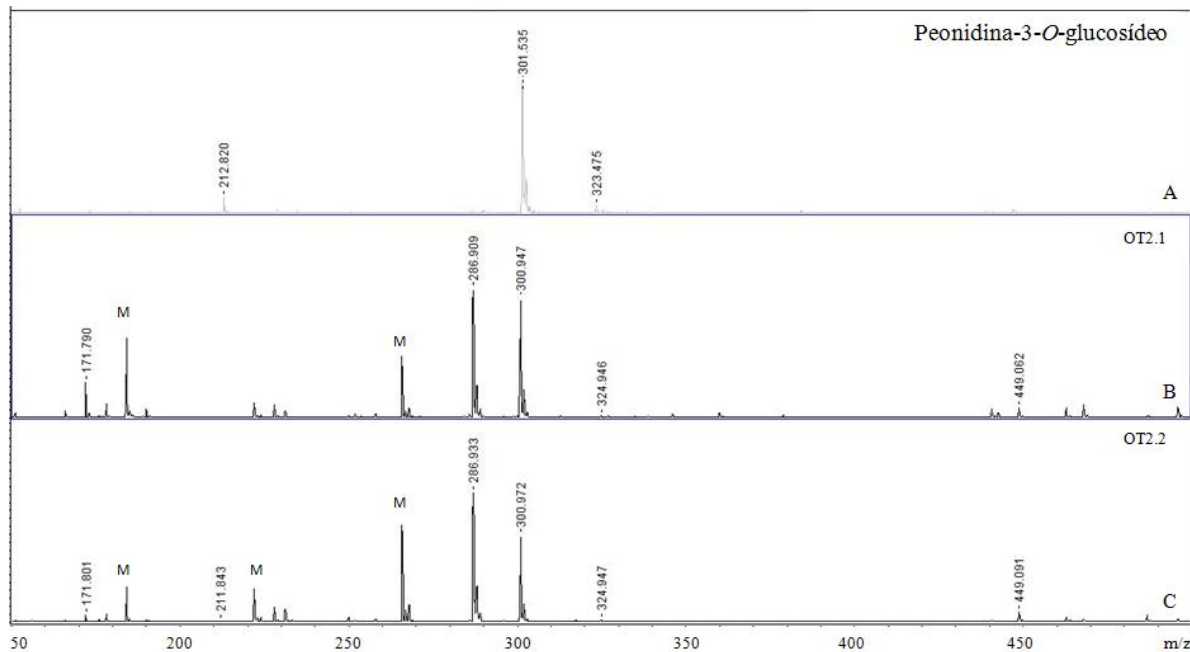


Figura 9 – Espectro de ionização do padrão de peonidina e das amostras de grãos da cultivar Ônix tratada com o extrato alcalino de *S. cymosum* (RT2) dos experimentos II e III, respectivamente. A letra M indica picos da matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico utilizada na cocristalização das amostras.



Hyun *et al.* (2004), detectaram além da cianidina-3-*O*-glicosídeo, também a malvidina em grãos de arroz roxo escuro. Nas amostras de arroz analisadas neste experimento esta antocianina não foi detectada. Todavia, estudos revelam que tais diferenças são possíveis, uma vez que as antocianinas mudam de conformação diferindo nas cores e intensidades conforme alguns fatores como número de hidroxilas ligadas aos anéis, metilações dos grupos hidroxila, acilação com um grupo alifático ou aromático, podendo esta última causar deslocamento batocrômico para a extremidade mais azul do espectro (GLOVER & MARTIN, 2012). Tais interações e alterações, explicam as diferenças em tipos e/ou teores de antocianinas em indivíduos de mesma espécie, o que pode explicar também as diferenças acentuadas nos teores de cianidina-3-*O*-glucosídeo entre os arrozes de pericarpo preto e aqueles de pericarpo vermelho, observados neste experimento, bem como a possível detecção de peonidina em uma variedade e a não detecção em outra.

#### 3.4 DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Para detecção de compostos presentes nas amostras sólidas dos grãos dos arrozes, na faixa de absorção correspondente ao infravermelho próximo (NIR), as mesmas foram submetidas a varredura naquela janela espectral (3600 a 12500  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 10).

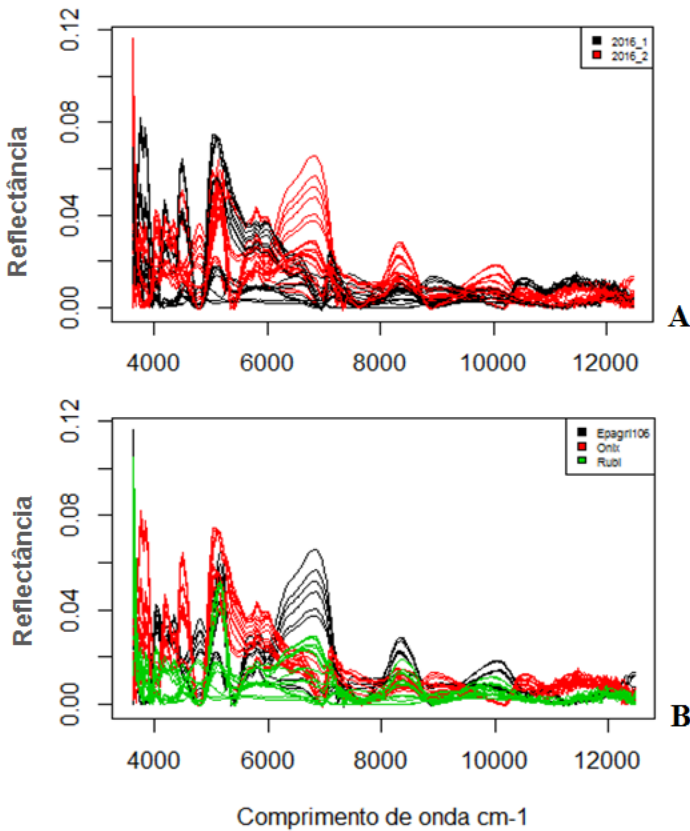


Figura 10 – Espectros de absorvâncias na região do infravermelho próximo (3600 a 12500  $\text{cm}^{-1}$ ) de grãos de arroz colhidos nos experimentos II (safras 2016.1) e III (safra 2016.2) – (A), das cultivares Rubi, Ônix e EPAGRI106 - (B).

Após normalização dos dados e observada a ocorrência de sinais mais intensos, foi selecionada a janela espectral de 4000 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ , área correspondente a detecção de compostos fenólicos em NIR (SOUZA, 2017) (Fig. 11). Na figura 11A é possível observar picos de reflectância com destaque às safras 2016.1 e 2016.2, e a figura 11B mostra sinais relevantes associados a compostos fenólicos para as amostras das três variedades em estudo.

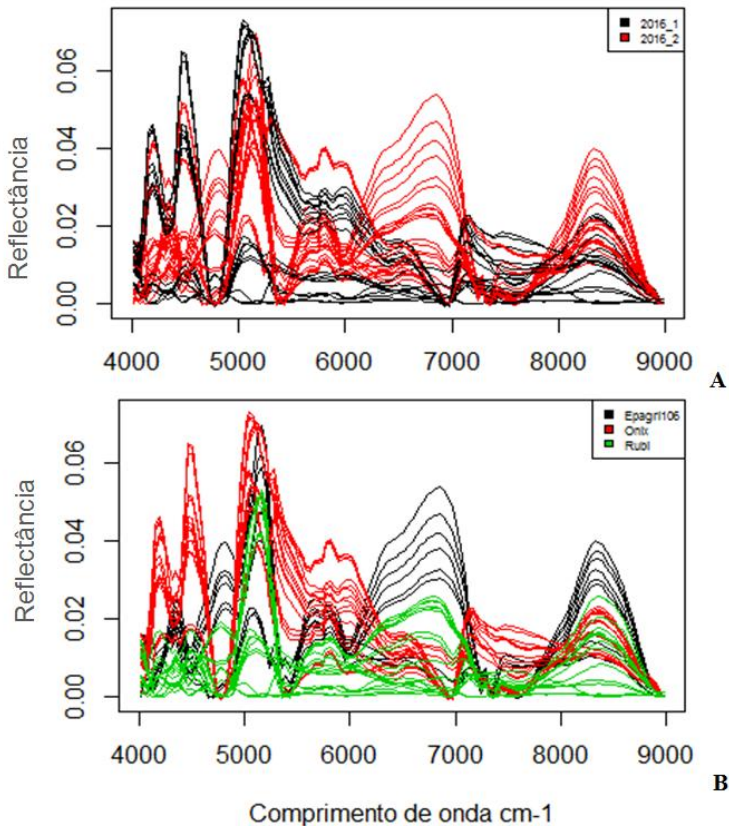


Figura 11 – Espectros de refletância na região do infravermelho selecionada para as análises quimiométricas (3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ ) de grãos de arroz: A - experimentos II (safras 2016.1) e III (safra 2016.2) e B - cultivares de arroz Rubi, Ônix e EPAGRI106.

Os dados espectroscópicos da região de *fingerprint* de compostos fenólicos (3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ ) foram submetidos à análise de componentes principais (Fig. 12). Os resultados da distribuição fatorial revelam a existência de dois grupos amostrais entre safras, sugerindo que a sazonalidade observada ao longo dos ciclos de produção é fator relevante na determinação dos perfis bioquímicos dos genótipos em estudo. No que se refere ao efeito dos genótipos, como esperado, e em concordância com as análises bioquímicas anteriores, constatou-se que o modelo de classificação derivado das PCAs discriminou as amostras em três grupos, ratificando as discrepâncias de composição química

dos grãos dos arraoses em estudo. As componentes PC1 e PC2 explicaram mais de 98% da variação entre os dados analisados, sendo PC1 87,1 % e PC2 11,4%.

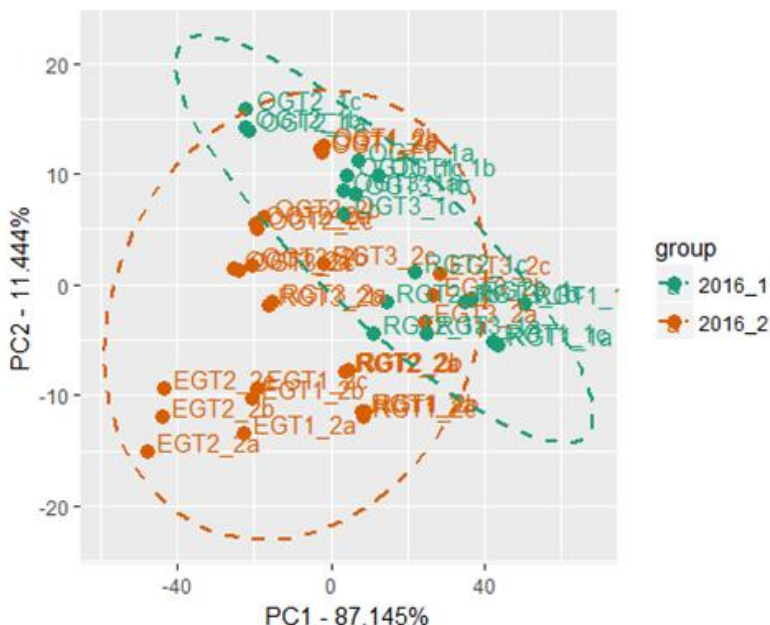


Figura 12 – Distribuição fatorial dos componentes principais dos espectros de absorvância na região do infravermelho próximo (3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ ) dos experimentos I e II (A) e de amostras sólidas de grãos das cultivares de arroz Rubi, Ônix e EPAGRI106 (B).

Numa segunda abordagem, os dados normalizados da janela espectral de reflectância de compostos fenólicos (Fig. 11) foram submetidos à análise de cluster hierárquico (Fig. 13). Uma clara separação das amostras foi observada para o efeito das safras (Fig. 13A), corroborando a influência da sazonalidade na composição química dos grãos de arrozes. Similarmente, o modelo descritivo identificou três *cluster* no universo amostral, claramente discriminando as variedades de arrozes (Fig. 13B), como anteriormente observado na análise de componentes principais.

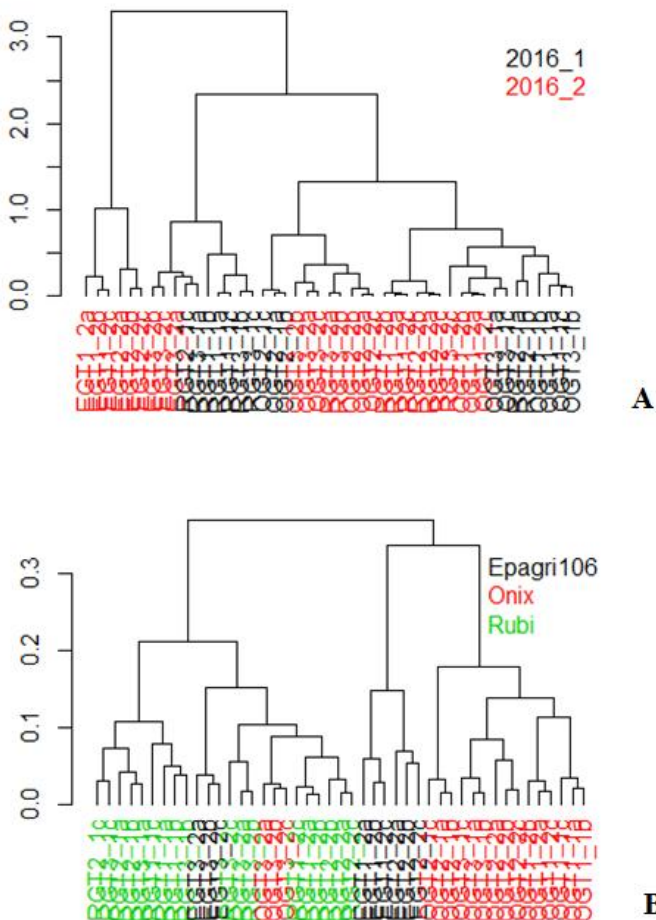


Figura 13 – Dendrogramas dos dados espectroscópicos na região de absorvância de compostos fenólicos (3600 a 9000  $\text{cm}^{-1}$ ), utilizando a distância euclidiana em relação às safras 2016.1 e 2016.2 (A) e às cultivares de arroz (B).

Os resultados corroboram com trabalhos como de Que *et al.* (2006), Sompong *et al.* (2011) e Shao *et al.* (2014) que confirmaram a predominância destes metabólitos secundários naquele tecido, sendo este resultado positivo à qualidade dos grãos do ponto de vista nutricional.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com este trabalho evidenciaram que a aplicação de extratos das algas *Ascophyllum nodosum* e *Sargassum cymosum* em plantas de arroz, foram capazes de aumentar o acúmulo de compostos bioativos característicos de seus grãos, *i.e.*, compostos fenólicos, em especial as antocianinas. Estes resultados são bastante promissores, pois abrem possibilidades para a aplicação destes extratos em culturas orgânicas ou em programas que visem melhorar a qualidade nutricionais de produtos agrícolas. Além disso, estes resultados apontam para maiores investigações acerca de *S. cymosum*, espécie de ampla ocorrência no Brasil, uma vez que os resultados obtidos com este estudo se mostraram semelhantes aos encontrados para *A. nodosum*, espécie amplamente utilizada na formulação de bioestimulantes (BATTACHARYYA *et al.*, 2015).

Este trabalho também utilizou técnicas analíticas que geraram um conjunto bastante interessante de dados e, associadas à quimiometria possibilitaram a confirmação e inferências de informações relevantes sobre o efeito da influência dos extratos de algas aplicados neste experimento, sobretudo nos genótipos de arroz pigmentado.

## CAPÍTULO V

---

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao período de condução da tese, a despeito de alguns ensaios e pilotos que não lograram êxito, em especial no primeiro ano do doutorado, os resultados atingidos a partir do segundo ano permitiram a condução e conclusão desta, com desfecho bastante promissor.

No estudo sobre os efeitos benéficos das algas pardas *Sargassum cymosum* e *Ascophyllum nodosum* no metabolismo de plantas de interesse agrícola, representadas aqui por *Oryza sativa*, foi estabelecida relação de comparação entre elas e constatou-se respostas semelhantes nos efeitos produzidos pelas duas espécies. Os resultados gerados das análises no extrato de *S. cymosum*, confirmaram os mesmos constituintes presentes em *A. nodosum*, espécie sabidamente benéfica às plantas e a mais estudada para fins agrícolas, com efeitos comprovados em diversas culturas (BATTACHARYYA *et al.*, 2015). Sob este aspecto, os resultados obtidos neste trabalho dão indícios bastante promissores para o uso de *S. cymosum*, alga tropical abundante no território nacional e portanto mais disponível para uso local na bioestimulação de plantas de interesse agrícola, considerando a formulação aqui proposta (extrato alcalino).

Quanto às estruturas de arroz utilizadas para análises dos efeitos bioestimulantes, chegou-se a cogitar nos primeiros experimentos, que os resultados estavam sendo bastante “tímidos”, uma vez que se esperava diferenças expressivas após os tratamentos à base de algas, nas plantas e sementes. No entanto, em consulta a artigos e boletins técnicos, obteve-se informações de que o arroz é tido como uma espécie pouco responsiva a tratamentos foliares, prática pouco utilizada para a cultura. Mas isto já está sendo revisto, até mesmo com alguns estudos para biofertilização complementar à adubação tradicional. De qualquer sorte, tal informação deu novo ânimo com os resultados obtidos até então. E os efeitos observados passaram a ter importância adicional também por tratar-se de resultados ainda não obtidos para as variedades de arroz estudadas aqui.

Pode-se afirmar que os resultados das análises em plântulas (pós embebição de sementes com os extratos) e em folhas e grãos de plantas tratadas, configuraram abordagem adequada para obtenção de cenário geral dos efeitos dos tratamentos nas plantas. Concluiu-se

ainda que a análise, através das técnicas neste trabalho para detectar, identificar e quantificar compostos e eventos do metabolismo de plantas e algas, consistiram em ferramentas precisas, robustas e recomendáveis, sobretudo quando associadas a métodos quimiométricos. Deste modo, estabelecidos alguns parâmetros para investigação metabólica de uma planta tratada, na sequência pode-se concentrar as análises em apenas uma ou duas técnicas, para chegar a resultados seguros até mesmo quanto a outras plantas da mesma espécie. Em algumas etapas deste trabalho a associação de técnicas analíticas fizeram a diferença, em especial devido a alguns resultados obtidos em uma técnica e não detectado em outra, para um mesmo analito.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, El S.M.; YOUNG, J. C.; RABALSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4696–4704, 2006.

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 03, p. 403–412, 2005.

ALBERGONI, L.; PELAEZ, V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v. 33, n. 1, p. 31–53, 2007.

ALMADA, C. H. B. A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; GOMES, Cristina Aparecida. Aspectos populacionais de *Sargassum vulgare* C. Agardh (Ochrophyta , Fucales ) Na Ponta do Arpoador - Rio de Janeiro. v. 12, n. 1977, p. 291–298, 2008.

ALMEIDA, D.F. L. S., Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais. **Tese** Universidade Fernando Pessoa, 2017.

ANDRADE L.R.; LEAL R.N.; NOSEDA, D. M.; E.R. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p. 1482–1488, 2010.

ANISIMOV, M. M., CHAIKINA, E. L., KLYKOV, A. G., & RASSKAZOV, V. A. Effect of seaweeds extracts on the growth of seedling roots of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) is depended on the season of algae collection. **Agriculture Science Developments**, v. 2, p. 67-75, 2013.

ARTHUR, G. D.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Effect of a seaweed concentrate on the growth and yield of three varieties of *Capsicum annum*. *South African Journal of Botany*, v. 69, n. 2, p. 207–211, 2003.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, n. 1, p. 3–16, 2004.

ÁVALOS, A.; ELENA, G. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119–145, 2009.

BALBOA, E. M. *et al.* In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1764-1785, 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.

BRASIL,. Regras para análise de sementes. Brasília, DF: **Mapa/ACS**. 2009.

BROWN, M. A. The use of marine derived products and soybean meal in organic vegetable production. **Tese de Doutorado**. Thesis (Master in Science)–Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, 94 p. 2004.

CAI, Y. Z. *et al.* Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 9940–9948, 2005.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1–2, p. 3–41, 2014.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C.; NOVEMBRE, A. D. C. & CHAMMA, H. M. C. P. Seaweed extract improves the vigor and provides the rapid emergence of dry bean seeds. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, p. 1104-1107, 2013.

CHANDÍA, Nancy P. *et al.* Alginic acids in *Lessonia vadosa*: Partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 2, p. 127–133, 2004.

CHEN, P.-N. *et al.* Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress

tumor growth in vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 232–243, 2005.

CONAB - Acomp. safra bras. grãos,— Quarto Levantamento, **Companhia Nacional de Abastecimento**, – Safra 2014/15, v. 2, n. 4, 2015.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Companhia Nacional de Abastecimento**, p. 1–34, 2018.

COSTA, Giulia Burle et al. Effects of copper and lead exposure on the ecophysiology of the brown seaweed *Sargassum cymosum*. **Protoplasma**, v. 253, p. 111–125, 2016.

CRAIGIE, James S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011.

CROUCH, I. J., & VAN STADEN, J. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. **Plant growth regulation**, v. 13, p. 21–29, 1993.

DAVIS, T. A. et al. Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum* spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 275–284, 2004.

DE ESTON, V. R.; BUSSAB, W. O. An experimental analysis of ecological dominance in a rocky subtidal macroalgal community. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 136, n. 3, p. 179–195, 1990.

DEMIR, N.; DURAL, B.; YILDIRIM, K. Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. **Journal of Biology Science**, v. 6, n. 6, p. 1130–1133, 2006.

DHARGALKAR, V. K.; PEREIRA, N. Seaweed : Promising Plant of the Millennium. **Source**, v. 71, p. 60–66, 2005.

DI STASIO, E. *et al.* *Ascophyllum nodosum*-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–12, 2018.

DUMANCAS, G. G. *et al.* Chemometric regression techniques as emerging, powerful tools in genetic association studies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 79–88, 2015.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. RICE INTERNATIONAL COMMODITY PROFILE Prepared by Concepción Calpe Markets and Trade Division. **Markets and Trade Division**, n. December, 2006.

FAQUIN, Valdemar. Solos E Meio Ambiente Nutrição Mineral De Plantas. **Universidade Federal de Lavras-UFLA**, FAEPE, v. 3, 186 p., 2005.

FASSIO, A.; COZZOLINO, D. Non-destructive prediction of chemical composition in sunflower seeds by near infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 3, p. 321–329, 2004.

GAMAL, Ali A. El. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–25, 2010.

GARCÍA-FRAILE, P.; MENÉNDEZ, E.; RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 183–205, 2015.

GLOVER, B. J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, v. 22, n. 5, p. 147–150, 2012.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 600–609, 2011.

HIEMORI, Miki; KOH, Eunmi; MITCHELL, Alyson E. Influence of Cooking on Anthocyanins in Black Rice ( *Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1908–1914, 2009.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, vol. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed : functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 543–597, 2011.

HONG, D. D.; HIEN, H. M. & SON, P. N. Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 817-826, 2007.

HOU, Zhaohua et al. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 691–697, 2013.

HU X., JIANG X., HWANG H., *et al.* Promotive effects of alginate-derived oligosaccharide on maize seed germination. **J Appl Phycol**, v. 16, p 73–76, 2004.

HYUN, J.W.; CHUNG, H.S. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2213-2217, 2004.

ICHIKAWA H, *et al.*, Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. **Jornal of Medicinal Food**, v. 4, p. 211-218, 2001.

ISHIDA, Y.; KIMURA, A.; MURATA, K. Promotion of Germination and Shoot Elongation of Some Plants by Alginate Oligomers Prepared with Bacterial Alginate Lyase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 68–70, 1993.

JACOBUCCI, G.B. Distribuição vertical e flutuação sazonal da macrofauna vágil associada a *Sargassum cymosum* C . Agardh , na praia do Lázaro , Ubatuba , São Paulo , Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 19, p. 87–100, 2002.

JIAO G.; YU G.; ZHANG J.; EWART H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Mar Drugs**, v. 9, p. 196–233, 2011.

KABERA, J. N. *et al.* Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377–392, 2014.

KALAIIVANAN, C.; VENKATESALU, V. Utilization of seaweed *Sargassum myriocystum* extracts as a stimulant of seedlings of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 2, p. 466-470, 2012.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> ed. 431p., 2008.

KHAN, W.; RAYIRATH; U. P., SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M. & PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Plant Growth Regul**, v. 28, p. 386-399, 2009.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KLARZYNSKI, O. *et al.* Sulfated Fucan Oligosaccharides Elicit Defense Responses in Tobacco and Local and Systemic Resistance Against Tobacco Mosaic Virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 115–122, 2003.

KOK, D. *et al.* The influences of different seaweed doses on table quality characteristics of cv. trakya ilkeren (*Vitis vinifera* L.). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 16, n. 4, p. 429–435, 2010.

KUMAR, G. & SAHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. **Journal of applied phycology**, v.23, p. 251-255, 2011.

KUMARI, R.; KAUR, I. & BHATNAGAR, A. K. Enhancing soil health and productivity of *Lycopersicon esculentum* Mill. using

*Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner as a soil conditioner and fertilizer. **Journal of applied phycology**, v. 25, p. 1225-1235, 2013.

LABRENZ, Z. M.; DRUSCHEL, G. K. **BIOLOGY**, Section. 1 , v. 7, p. 147–157, 2011.

LECHENET M, BRETAGNOLLE V, BOCKSTALLER C, BOISSINOT F, PETIT MS, *et al.* Reconciling Pesticide Reduction with Economic and Environmental Sustainability in Arable Farming. **Plos one** v.9, 2014.

LEAL, D.; MATSUHIRO, B.; ROSSI, M. & CARUSO, F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 308-316, 2008.

LINGAKUMAR, K. *et al.* *Gracilaria edulis* and effective alternative source as a growth regulator for legume crops. **Seaweed Res. Utiln**, v. 24, n. 1, p. 117-123, 2002.

LOLA-LUZ, Theodora; HENNEQUART, Franck; GAFFNEY, Michael. Enhancement of phenolic and flavonoid compounds in cabbage (*Brassica oleraceae*) following application of commercial seaweed extracts of the brown seaweed, (*Ascophyllum nodosum*). **Agricultural and Food Science**, v. 22, n. 2, p. 288–295, 2013.

LOLA-LUZ, Theodora; HENNEQUART, Franck; GAFFNEY, Michael. Effect on yield, total phenolic, total flavonoid and total isothiocyanate content of two broccoli cultivars (*Brassica oleraceae* var *italica*) following the application of a commercial brown seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*). **Agricultural and Food Science**, v. 23, n. 1, p. 28–37, 2014.

MAPA: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acessado em 21 agosto 2016

MARASCHIN, M.; ZEGGIO, A.; TOMAZZOLI, M.; OLIVEIRA, S.; RAMLOV, F.; VELEIRINHO, M. & ROCHA, M. Metabolômica e Quimiometria como ferramentas para análises quimio(bio) diversas. In **Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria**, Blucher, p. 17–49 2017.

MARASCHIN, M *et al.* Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 2016.

MARQUETTI, I. *et al.* Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 121, p. 313–319, 2016.

MATANJUN, P. *et al.* Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds, *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*, on high-cholesterol/high-fat diet in rats. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 4, p. 792–800, 2010.

MCQUATTERS-GOLLOP, A. *et al.* Is there a decline in marine phytoplankton? **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 591–596, 2011.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, 2014.

MORIMITSU, Yasujiro *et al.* Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. **International Congress Series**, v. 1245, n. C, p. 503–508, 2002.

MZIBRA, A. *et al.* Polysaccharides extracted from Moroccan seaweed: a promising source of tomato plant growth promoters. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–10, 2018.

NAM, S.H. *et al.* Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 3, p. 816–822, 2005.

NAM, S. H. *et al.* Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 613–620, 2006.

PARDEE K.I.; ELLIS P.; BOUTHILLIER M.; TOWERS G.H.; FRENCH C.J. Plant virus inhibitors from marine algae. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 304–309, 2004.



PATIER, P. *et al.* Seaweed liquid fertilizer from *Ascophyllum nodosum* contains elicitors of plantd-glycanases. **Journal of applied phycology**, v. 5, n. 3, p. 343-349, 1993.

PEREIRA, L.; GHEDA, S.F.;RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic Industries. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, p. 1-7, 2013.

PEREIRA-CARO, Gema *et al.* Phytochemical profile of a Japanese black-purple rice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2821–2827, 2013.

PETERSON, David M. *et al.* Relationships among agronomic traits and grain composition in oat genotypes grown in different environments. **Crop Science**, v. 45, n. 4, p. 1249–1255, 2005.

PILATTI, F.K. *et al.* In vitro exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline–Biochemical and morphological alterations. **Chemosphere**, v. 156, p. 428-437, 2016.

PIMENTAL, D. *et al.* Enviromental, Energetic, and Economic Comparisons or Organic and Conventional Farming. **Bio Sci** **581**, v. vol 5, n. 7, p. 10, 2005.

RAMLOV, F. *et al.* Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kützing.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 255–261, 2011.

RANDHIR R.; PREETHI S., KALIDAS S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochem**, v. 37, v. 1247-1256, 2002.

RATHORE, S. S. *et al.* Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 2, p. 351–355, 2009.

RAYORATH, P. *et al.* Extracts of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* induce gibberellic acid (GA3)-independent amylase activity in barley. **Journal of plant growth regulation**, v. 27, n. 4, p. 370-379, 2008.

RITIKA, Bhattacharjee; UTPAL, Dey. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 8, n. 24, p. 2332–2343, 2014.

RODRIGUES, L. A. *et al.* Avaliação Fisiológica De Sementes De Arroz Submetidas a Doses De Bioestimulante. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 207–214, 2015.

ROESSNER, U.; BOWNE, J. What is metabolomics all about? **BioTechniques**, SPEC. ISSUE, v. 46, n. 5, p. 363–365, 2009.

SABIR, A; RAFI, M; DARUSMAN, L K. Discrimination of red and white rice bran from Indonesia using HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1717–1722, 2017.

SHAH, M.T. *et al.* Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. **Journal of plant nutrition**, v. 36, n. 2, p. 192-200, 2013.

SHAO, Yafang *et al.* Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 2, p. 211–218, 2014.

SIVASANKARI, S. *et al.* Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 14, p. 1745-1751, 2006.

SOMPONG, R. *et al.* Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 132–140, 2011.

SOUZA, M. Desempenho agrônômico e estudo fitoquímico de plantas de cobertura em sistema de plantio direto agroecológico de cebola. **Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina**,

Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 210 p. 2017.

STENGEL, D.B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity : Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.

STEINMETZ, Silvio. Zoneamento de arroz irrigado por épocas de semeadura nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina Zoning of paddy rice by sowing dates in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina , Brazil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 429–438, 2001.

STIRK, W. A. *et al.* Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 1, p. 31–39, 2004.

STIRK, W. A., & VAN STADEN, J. Seaweed products as biostimulants in agriculture. World seaweed resources: an authoritative reference system. ETI **Bioinformatics**, Amsterdam, 2006.

STIRK, W. A.; NOVÁK, O.; HRADECKÁ, V.; PĚNČÍK, A.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M. & VAN STADEN, J. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Dictyota humifusa* (Phaeophyta): towards understanding their biosynthesis and homeostasis. *European Journal of Phycology*, v. 44, p. 231-240, 2009.

STIRK, W. A.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. & VAN STADEN, J. Cytokinins in macroalgae. *Plant growth regulation*, 41, 13-24, 2003.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 327–330, 1997.

SZÉCHY, MARIA TERESA M. DE; PAULA, ÉDISON J. DE. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São

Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 2, p. 121–132, 2000.

SZÉCHY, M. T. M. D. E.; GALLIEZ, M.; MARCONI, M. I. Quantitative variables applied to phenological studies of *Sargassum vulgare* C. Agardh ( Phaeophyceae - Fucales ) from Ilha Grande Bay , State of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 27–37, 2006.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre, Editora Artmed, 918 p., 2013.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163–170, 2007.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas Marine Natural Products from Seaweeds. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n 3, 2013.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4808-4813, 2004.

TILMAN, D. *et al.* Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671–677, 2002.

TORRES, M. A. *et al.* Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 1–15, 2008.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIJAYARAGHAVAN, K. *et al.* Application of *Sargassum* biomass to remove heavy metal ions from synthetic multi-metal solutions and urban storm water runoff. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1019–1023, 2009.

VOHLAND, M. *et al.* Determination of soil properties with visible to near- and mid-infrared spectroscopy: Effects of spectral variable selection. **Geoderma**, v. 223–225, n. 1, p. 88–96, 2014.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; DE AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 54, n. 2, p. 371–377, 2011.

WALTER, M. *et al.* Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 698-703, 2013.

WANG, Pei *et al.* Chromatographic fingerprinting and quantitative analysis for the quality evaluation of Xinkeshu tablet. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 6, p. 422–430, 2012.

WANG, S. *et al.* Fingerprint quality control of Angelica sinensis (Oliv.) Diels by high-performance liquid chromatography coupled with discriminant analysis. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 434–436, 2007.

WANG, X. *et al.* Quantitative profiling method for phytohormones and betaines in algae by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 2, p. 275-280, 2014.

WIJESEKARA, I. *et al.* Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 12, p. 2219–2224, 2011.

WICKERT, Ester *et al.* Exploring Variability: New Brazilian Varieties SCS119 Rubi and SCS120 Onix for the Specialty Rices Market. **Open Journal of Genetics**, v. 4, n. April, p. 157–165, 2014.

XIE, Peishan *et al.* Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 171–180, 2006.

YOKOYA, N. S.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J.; NOVÁK, O.; TUREČKOVÁ, V. & STRNAD, M. Endogenous Cytokinins, Auxins, and Abscisic Acid in Red Algae from Brazil1. **Journal of Phycology**, v. 46, p. 1198-1205, 2010.

ZHANG, W. *et al.* identification of cytokinins in *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Porphyra perforata* (Rhodophyta) 1. **Journal of Phycology**, v. 27, n. 1, p. 87-91, 1991.

ZHOU, Z. *et al.* Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 849–868, 2002.

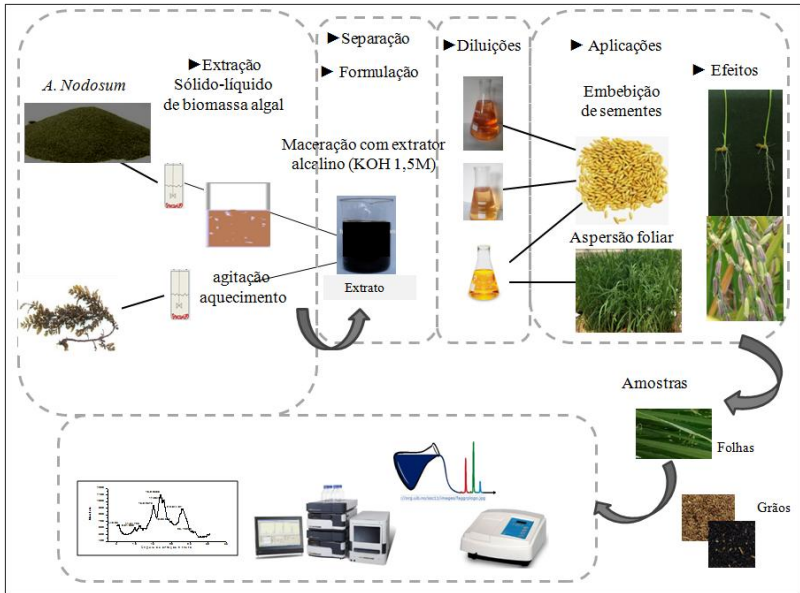
ZHOU, Z. *et al.* The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 401-406, 2004.

ZHOU, Z. *et al.* Phenolics, flavonoids, proanthocyanidin and antioxidant activity of brown rice with different pericarp colors following storage. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 120–125, 2014.

ZUBIA, M.; PAYRI, C.; DESLANDES, E. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 6, p. 1033–1043, 2008.

# APÊNDICE

## Apêndice A



Descrição esquemática do conjunto de atividades executadas nos ensaios.