

INCORPORAÇÃO COM I¹³¹ POR BIOSÍNTESE E DUPLA TROCA,
IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÉSTER METÍLICO DO ÁCI-
DO β -IODO PALMÍTICO E DO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO
OLÉICO, DA ALGA MARINHA *CENTROCERAS*
CLAVULATUM (MARTIUS, 1870) ¹

ARLETTE TAKAHASHI *

Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO: Com iodo-131 e o emprego do método cromatográfico, foi possível isolar duas substâncias orgânicas lipídicas em uma alga marinha. Os quatro métodos químicos de análise estrutural, foram aplicados e nos deram como resultado, ser uma delas, o éster metílico do ácido oléico e a outra o éster metílico do ácido β -iodo palmítico, substância esta até então desconhecida na literatura científica, como existente em algas marinhas.

O ESTUDO dos fatores que influen-
ciam o metabolismo de plantas
marinhas tem despertado grande in-
teresse entre os biólogos e químicos
contemporâneos.

Grande parte dos conhecimentos
até agora adquiridos resultaram de
experiências de laboratório para as
quais foram utilizados meios de cultu-

ra, tanto que (Campbell, Hellebust e
Watson, 1966) Nitrosocystis Oceanus,
uma bactéria isolada do mar (Watson,
1965), incorpora dióxido de carbono
via exclusivamente ciclo pentose-fos-
fato. Outros estudos foram feitos com
populações naturais no oceano, onde
a matéria viva é muitas vezes respon-
sável pelas variações biológicas, quí-
micas e físicas no mar (Yentsch, 1961).

1 Recebido para publicação em 7 de janeiro de 1975 e aprovado em 2-6-75.

* Professora Assistente de Ensino Superior (Biofísica), do Instituto de Biologia da Uni-
versidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Trabalho feito com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

Algumas contribuições científicas que têm sido realizadas nestes últimos anos, vêm mostrando que praticamente os problemas que surgem na biologia do plancton, têm sido idênticos tanto para a matéria viva do mar, quanto dos lagos e rios. As correntes dos oceanos, podem contribuir para a modificação dos locais de abundância dessas populações e a profundidade em que a luz penetra, isto é, a energia luminosa, é um fator fundamental, que é absorvida nos compostos orgânicos e que flui através da cadeia metabólica, no próprio processo fotossintético (Takahashi e Barth, 1967).

Os ecologistas têm aceito como regra geral que, somente 1% da radiação incidente é que, exatamente balanceia a própria necessidade da planta em seu processo fotossintético (Ketchum, 1963). Em locais ao sul do Estado do Espírito Santo, no Brasil, foram medidas as intensidades de algumas radiações e é bastante provável que por influência das mesmas, por períodos de tempo bastante longos, haja uma modificação da flora (Roser & Cullen, 1962 & Oliveira Filho, 1969).

Igualmente importante como fator para a determinação da fertilidade são os nutrientes. A modificação vertical desses nutrientes provocada pelo fluxo das correntes marítimas não tem influência significativa na velocidade de fotossíntese. "In situ" a reciclagem desses nutrientes é essencial para a manutenção do sistema.

Esse fenômeno da reciclagem, conhecido como ressurgência em águas profundas, ocorre quando o vento sopra com tal incidência, que o fluxo das correntes se deriva por ele produzidas, quando próximo à plataforma continental, afastam as águas, geralmente as superficiais e então essas águas profundas ascendem pelo talude, para substituir as que se afastam carreando os nutrientes, constituídos principalmente por nitratos, fosfatos e halogenetos (Moreira da Silva, 1969).

A capacidade demonstrada por várias algas marinhas de concentrar iodo (halogênio) foi estudada em diversas espécies das divisões Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta (Grimm, 1952). Contudo, existe na literatura científica pouca informação quanto à forma em que este elemento se encontra combinado.

Possivelmente, o iodo se encontra em um vacúolo especial, um ioduto, no interior de células particulares, na forma de iodo livre (Dangeard, 1903), ou ainda ligado a aminoácidos, formando os ácidos aminados iodados (Scott, 1954).

Outros estudos feitos com sessenta espécies de algas coletadas no mar Adriático, Europa, mostraram que o conteúdo de iodo das algas não depende da sua concentração no mar e que de uma maneira geral as algas vermelhas são ricas em iodo, como sucede com a *Sphaerococcus coronopifolius* que contém 0,750%, enquanto que as algas verdes, são muito mais pobres neste elemento (Cmelik, 1948).

A forma de iodo livre pareceu-nos pouco provável, a de um composto lábil, incerta, devendo-se admitir que os métodos empregados nos citados trabalhos seriam considerados modernamente inadequados.

Pareceu-nos, então mais provável, encontrar o iodo ligado a substâncias dessas classes químicas, principalmente a lipídios.

A investigação desta questão, foi escolhida para estudo do Sub-reino das plantas não vasculares, uma Thallophyta, Algae, da divisão Rhodophycophyta (Greulach, 1973), do gênero e espécie *Centroceras clavulatum*; existente na ilha da Boa Viagem, baía de Guanabara, 43°07'52" W e 22°54'36" S.

As experiências que realizamos consistiram em coletar essa espécie de alga durante as quatro estações do ano e pela quantidade mínima existente, tornou-se imprescindível, o emprego de iodo-131 ou seja, iodo radioativo

com alta atividade específica, para o isolamento de compostos orgânicos.

Foi de nosso interesse, repetir por mais duas variações sazonais, as experiências, a fim de que pudéssemos assegurar-nos do controle biológico dessas substâncias químicas isoladas, desta variedade de alga marinha.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material.

As experiências que foram realizadas consistiram em coletar o material no seu "habitat", em baixa-mar, pela manhã, com o valor médio da temperatura da água a 21°C.

Todas as coletas foram realizadas com tempo nublado, a fim de se evitar qualquer efeito destrutivo, nos compostos iodo-orgânicos, ocasionado por luz solar intensa.

Para experiências preliminares, procedemos à coleta de alga durante o período primavera-verão, de 1968, em maré de 0,1 m.

Comumente esta variedade de alga, apresenta uma coloração vermelho-castanha, sendo portanto em nomenclatura vulgar, conhecida como alga vermelha. Sua coleta só se torna difícil em maré de 0,4 m, devido estar presa a pedras e ser de tamanho pequeno.

Para sua classificação correta, só uma amostra foi coletada e conservada em solução de formol 1,6% em água do mar.

Medidas de radioatividade

A maior sensibilidade do método de incorporação de iodo radioativo, por biossíntese, conduziu-nos ao seu uso em todas as experiências subsequentes. Durante a estação de verão, a alga foi coletada três vezes para experiências de incorporação. As coletas foram feitas entre 9-10 horas da manhã, com céu nublado e com a temperatura da água superficial variando entre 20-30°C. Algas presas a pedras pequenas foram coletadas e transferidas, sem demora e sem variação de temperatura, para um

TABELA 1

Valores numéricos de incorporação de I¹³¹, obtidos com onze amostras diferentes, tomando-se duas alíquotas de cada amostra, por experiência.

<i>Tempo decorrido</i>	<i>Número da amostra</i>	<i>Água</i>	<i>Alga</i>	<i>Alga</i>	<i>Alga</i>
		<i>cpm</i>	<i>massa média (g)</i>	<i>cpm</i>	<i>cpm/g*</i>
Zero minutos	1	20 694	—	—	—
15 minutos	2	18 403	0.3323	16 626	49 600
1 hora	3	17 037	0.5447	63 252	157 500
2 horas	4	16 142	0.3098	40 514	131 500
3 horas	5	15 038	0.5941	113 415	210 500
4 horas	6	13 989	0.5421	161 457	355 500
5 horas	7	14 496	0.7086	126 714	201 500
6 horas	8	13 219	0.5842	124 826	208 000
19 horas	9	6 216	0.6208	310 595	522 000
20 horas	10	6 021	0.1719	81 577	500 000
28 horas	11	4 633	0.4684	155 211	413 000

* cpm/g = contagem por minuto, por grama.

aquário contendo 2 litros de água do mar a $100 \mu\text{Ci/l}$, de I^{131} , com alta atividade específica, sob agitação lenta. A aeração foi mantida com oxigênio durante 24 horas.

A Tabela 1, apresenta os valores numéricos de incorporação do I^{131} , obtidos com onze amostras diferentes da mesma experiência, tomando-se duas alíquotas de cada amostra.

Pelo Gráfico 1, verificou-se que com 6 horas, foi obtida uma atividade suficiente para marcação do composto orgânico iodado a ser isolado.

O contador usado foi um aparelho da marca Tracerlab Spectro/Matic, sendo que, as condições de contagem para o I^{131} , foram as seguintes: alta voltagem operacional correspondendo a 265 divisões, equiva-

lente a 1600 V, base 50, janela 50, ganho 16 e ganho fino 1,5.

Métodos de extração.

As algas foram retiradas das pedras, lavadas com água potável, secas ao ar e, em seguida, o material (7g) foi moído e submetido a uma série de extrações sucessivas em extrator de soxlet, respectivamente com hexano (1 litro), metanol (1 litro), n-butanol (1 litro) e água (1 litro) destilados. Todos os extratos com solventes orgânicos e o aquoso foram concentrados a 20 ml. A Tabela 2, apresenta os valores numéricos das contagens por minuto, obtidos com alíquotas de 3 ml da alga marcada com I^{131} .

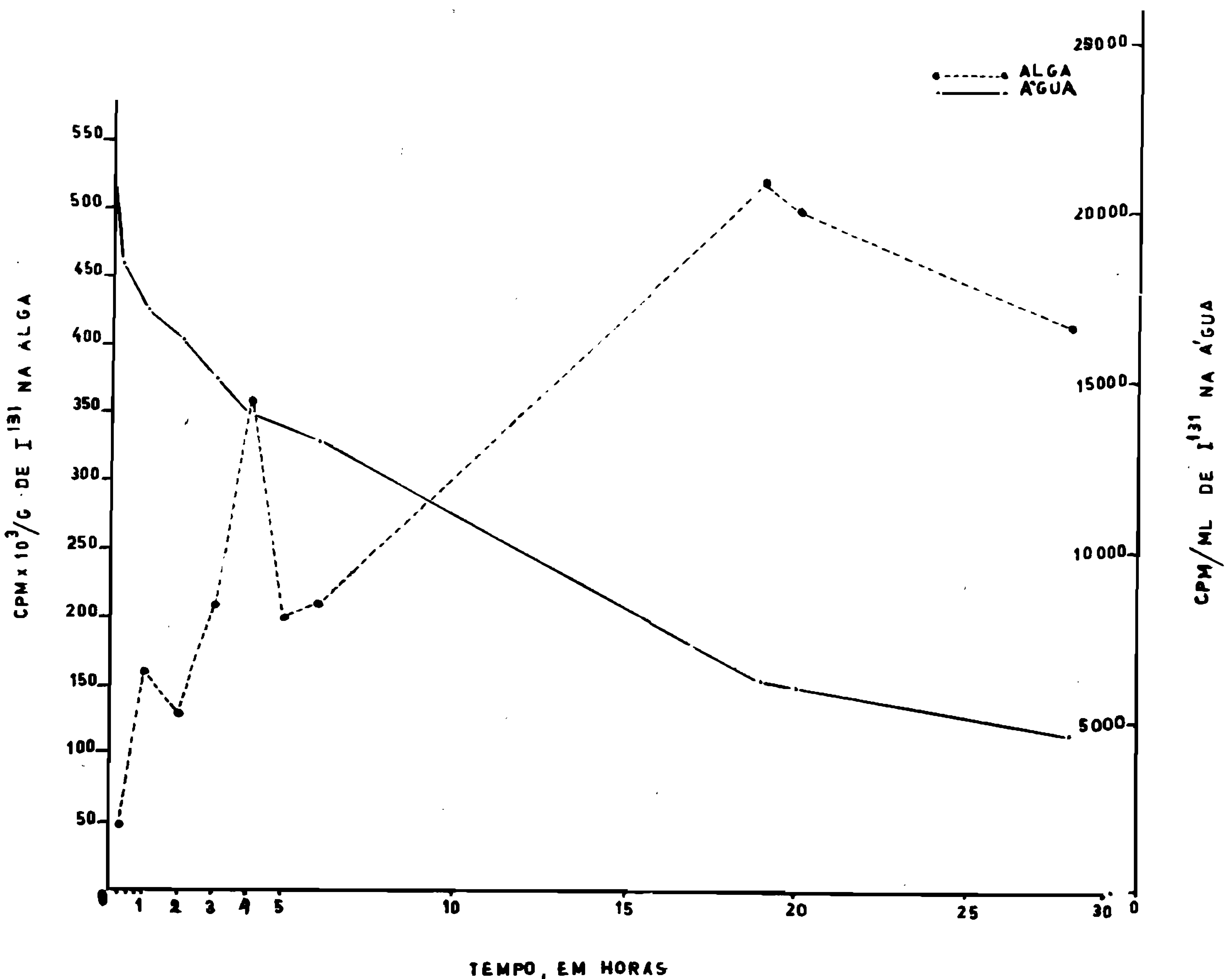


Gráfico n.º 1 — Incorporação por biossíntese com I^{131} , na alga do Gênero e Espécie *Centroceras clavulatum*.

TABELA 2

Valores numéricos de incorporação com I^{131} , nas diversas frações extrativas.

Frações de 3 ml	Contagens em cpm*
Hexânica	58 500
Metanólica	168 500
Butanólica	13 500
Aquosa (extração incompleta)	2 861

Radiação de fundo: 34 cpm.

* cpm = contagens por minuto.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

O processo de identificação da substância orgânica iodada, foi feito por cromatografia, "TLC", em placas de vidro (20 x 20 cm), contendo 17 g de silicagel PF_{254 + 366} (Merck)/34 ml de água destilada, aplicando-se 75 mg dos extratos concentrados das frações metanólicas inativa e radioativa, respectivamente, deixando-se desenvolver em um sistema acetato de etila-metanol 1:1. v/v, por 20 minutos, em ausência de luz.

A auto-radiografia da placa radioativa foi efetuada colocando-a juntamente com uma chapa de raio X (Kodak), em prensa apropriada, por uma semana.

Após esse período, as placas radioativa e inativa foram reveladas com $Ce(SO_4)_2$ 1% em H_2SO_4 2N e aquecidas a 70°C, por 10 minutos.

Uma comparação da chapa fotográfica com a placa cromatográfica permitiu a localização da substância contendo iodo.

O Rf da substância iodada, de coloração roxa, medindo na placa radioativa preparativa correspondente à faixa mais intensamente marcada da auto-radiografia do extrato metanólico, está entre 0,642-0,785 (Fig. 1).

Foram feitas auto-radiografias em número de dez (10), para todas as coletas

realizadas, havendo coincidência entre todas quanto à posição das faixas radioativas.

As placas não radioativas foram repetidas em número superior a trinta (30), tendo a substância com o citado Rf, sido eluída com acetato de etila e seca em dessecador com P_2O_5 . A substância apresenta aspecto oleoso, o que dificulta a determinação do ponto de fusão. Uma única purificação foi feita com benzeno destilado e a evaporação do mesmo foi efetuada por passagem de nitrogênio.

Posteriormente levou-se a substância radioativa igualmente obtida ao contador para nos certificarmos da incorporação com iodo radioativo.

A análise da auto-radiografia do extrato metanólico, mostra outras duas faixas radioativas, cuja identificação química não nos interessou investigar.

Procedeu-se como experiência subsequente, a testes de identificação da substância por cromatografia com as mesmas condições de camada fina preparativa da figura 1, desenvolvida respectivamente nos sistemas acetato de etila-metanol 1:1, hexano-éter etílico-ácido acético glacial 90:10:1 e benzeno-acetato de etila 1:1, v/v.

Padrões de triglicerídeos e de ésteres metílicos foram aplicados paralelamente à substância para comparação. A revelação pela luz ultravioleta, indicou a mesma posição de Rf tanto para a substância extraída com acetato de etila e o padrão do éster metílico do ácido oléico. (Fig. 2).

Procedeu-se como hipótese subsequente, a uma experiência para verificação da possibilidade de ocorrência de uma reação de incorporação por dupla troca e não somente por biossíntese; isto é, a alga já possuiria iodo orgânico trocável por iodo radioativo.

Para isso a amostra obtida (40 mg), viscosa, com coloração amarelada contendo a substância de Rf idêntico ao da amostra radioativa, foi dissolvida em 3 ml de benzeno destilado. Acrescentou-se 0,01 ml de I^{131} , com alta atividade específica, para que a concentração final de iodo fosse de 5,09 $\mu Ci/0,01$ ml/3 ml de benzeno destilado.

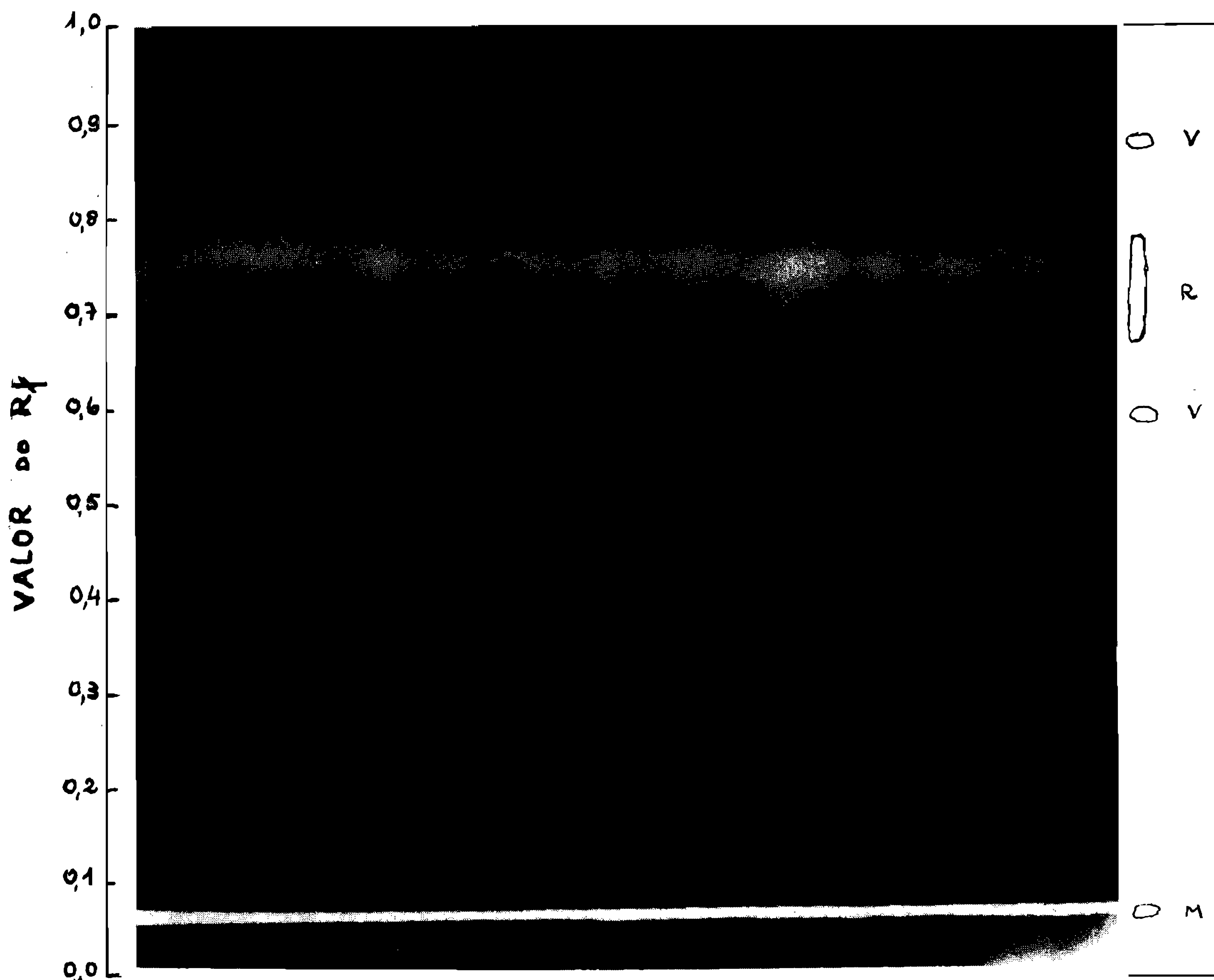


Fig. 1 — Cromatograma e auto-radiografia do extrato metanólico da alga *Centroceras clavulatum* marcada com I^{131} . Suporte: silicagel PF^{254 + 366}. Solvente, acetato de etila-metanol 1:1. Cromatograma revelado com $Ce(SO_4)_2$ 1% em H_2SO_4 2N. (M, marrom; V, verde; R, roxo).

Esta mesma amostra foi levada ao contador com as mesmas condições de contagem que para as demais experiências já então realizadas e o resultado obtido, foi de 951 116 cpm (contagens por minuto). Em prosseguimento, foi acrescentado 3 ml de água destilada. Em funil de decantação, ou melhor separador, após agitar, por 1 hora foi obtida a separação das duas fases. Descontados os valores da radiação de fundo e das atividades dos tubos de contagem por contaminação, o resultado obtido para a fração benzênica foi de 355 630 cpm e para a fração aquosa foi de 453 857 cpm. Quase ou aproximadamente 50% do I^{131} , passou do benzeno para a água. Foram repetidas mais duas extrações com iguais volumes de

benzeno destilado, sendo que, aproximadamente 25% do I^{131} , da 2.^a extração passou para a água, e não tem valor significativo em termos de porcentagem, a quantidade de I^{131} , que passou para a água na última extração.

MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

Os métodos biofísicos de análise até então empregados somente nos permitiram identificar a classe química, porém não pôde ser determinada a estrutura química a que pertence a substância que incorpora iodo radioativo, nem tampouco sua localização na molécula lipídica. Foram então utilizados outros quatro métodos que quan-

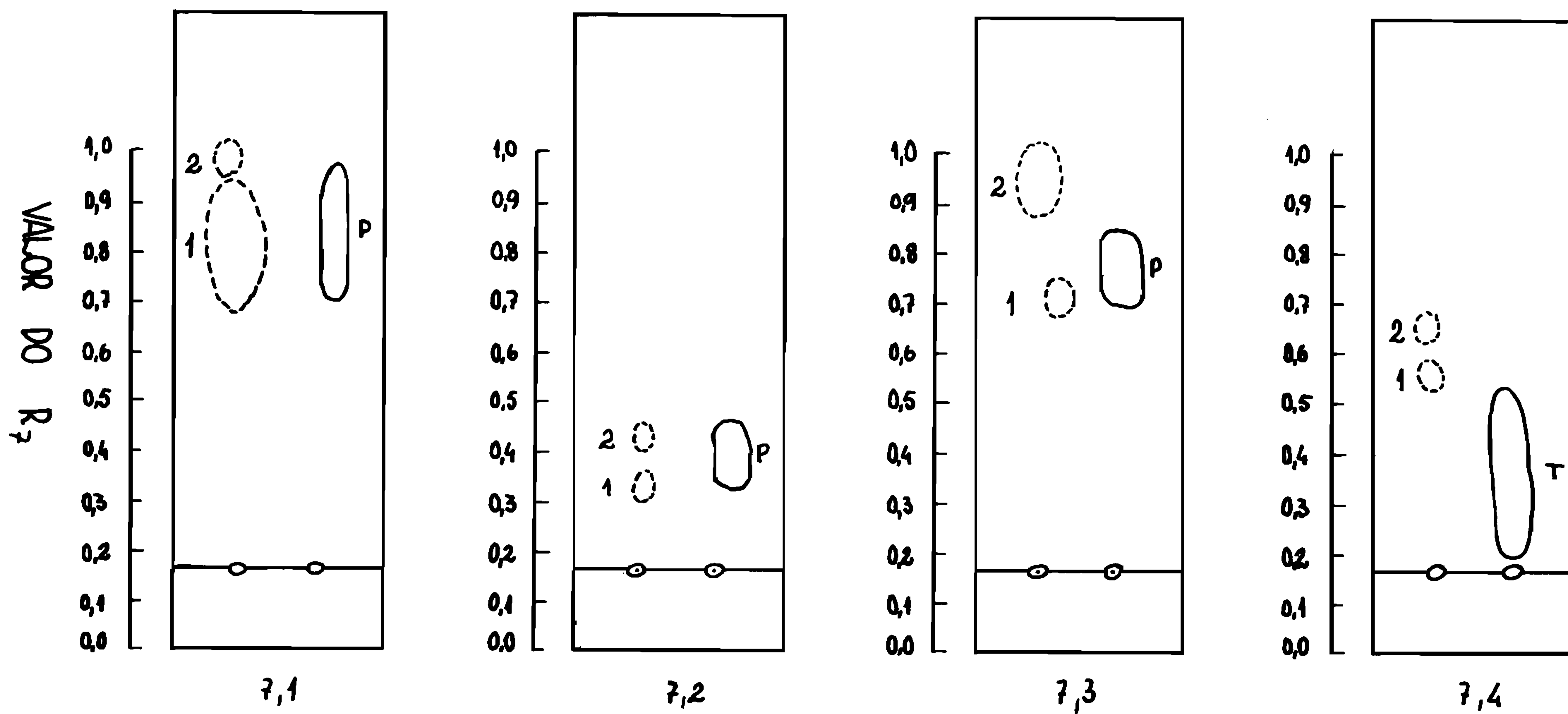


FIG. 2 — Cromatogramas das substâncias radioativas do extrato metanólico extraído com acetato de etila. P, é o padrão do éster metílico do ácido oléico; T, é o padrão do triglicerídeo, trioleína; 1 e 2 são as substâncias a identificar. Suporte: Silica-gel PF_{254 + 366} Revelador: luz ultravioleta.

Solventes: acetato de etila-metanol 1:1, cromatograma 7.1.

hexano-éter etílico-ácido acético glacial 90:10:1, cromatograma 7.2 e 7.4.

benzeno-acetato de etila 1:1, cromatograma 7.3.

do interpretados conjuntamente nos permitiram a elucidação do problema.

1. *Espectrometria no infravermelho, "IR".*

O espectro de infravermelho obtido (Fig. 4), mostra um pico característico forte a $5,71 \mu$, um outro forte a $3,38 \mu$ e dois outros médios em relação aos dois primeiros, a $6,80$ e $7,25 \mu$.

O aparelho usado para obtenção do infravermelho é um Sodium Chloride Spectrophotometer, modelo n.º 137, da Perkin-Elmer Ind. e Com. Ltda. A amostra foi preparada em "film" e com uma pureza de aproximadamente 100%.

2. *Espectrometria de ultravioleta-visível, "U.V."*

O espectrograma de ultravioleta-visível (Fig. 5), foi obtido em um aparelho da Perkin-Elmer Ind. e Com. Ltda., modelo 402. A amostra analisada 3,8 mg foi dissolvida em 10 ml de álcool etílico especial para ultravioleta. Espectro obtido em velocidade rápida.

3. *Espectrometria de ressonância magnética protônica, "NMP".*

A (Fig. 6) do espectro de ressonância do proton, foi obtida com uma amostra de $1 \mu\text{g}$ dissolvida em CDCl_3 . O aparelho empregado é de fabricação da Varian Ind. e Com. Ltda. O pico obtido a $3,65 \text{ ppm } (\delta)$ confirma a presença de iodo ligado a carbono e identifica a ligação CHI.

4. *Espectrometria de massa, "EM".*

As (Fig. 7) e (Fig. 8) indicam os espectros de massa das duas substâncias químicas obtidas da classe dos lipídios. Tratam-se respectivamente do éster metílico do ácido β -iodo palmítico, com peso molecular, P.M. = 395 e do éster metílico do ácido oléico com peso molecular, P.M. = 298. Os espectrogramas foram obtidos por cortesia do Prof. Dr. Carl Djerassi, do Departamento de Química da Universidade de

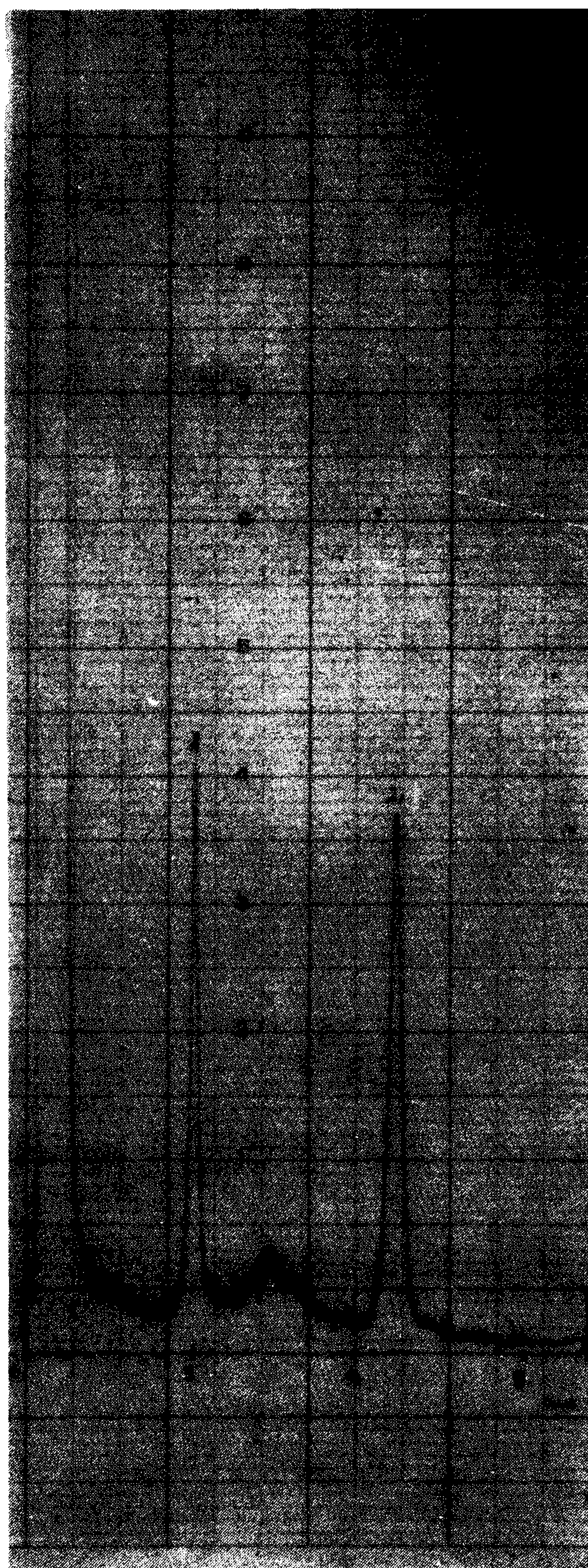


Fig. 3 — Cromatograma de duas substâncias químicas diferentes, respectivamente a 3,0 e 6,4cm da origem. "GLC" obtida em cromatógrafo da Varian Ind. e Com. Ltda. Condições de experiência: coluna DEGS (dietilenoglicolsuccinato). Temperatura da coluna: 140°C . Fluxo de nitrogênio: 100 ml/min. Amostrã injetada, $2 \mu\text{l}$.

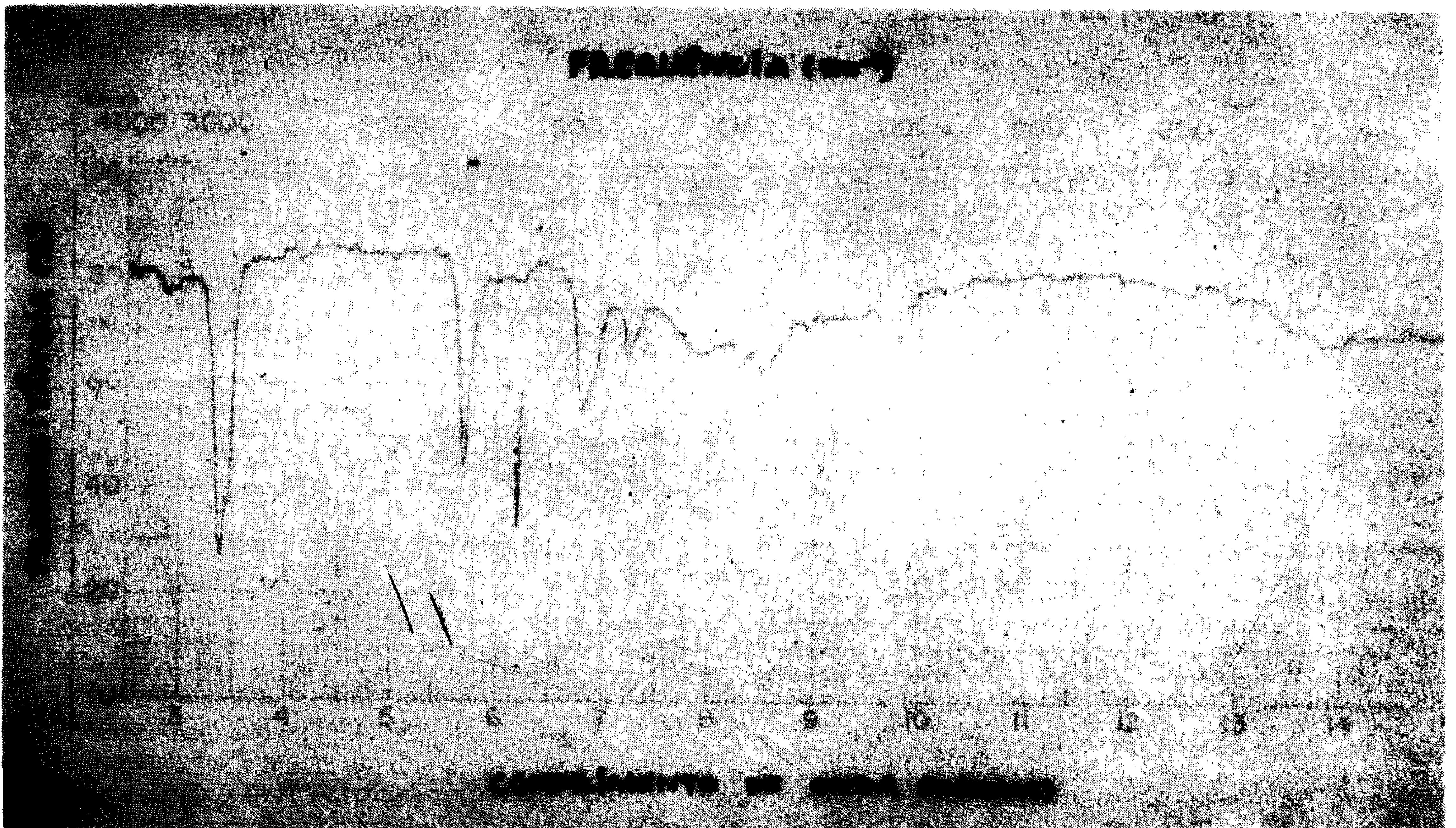


Fig. 4 — Espectrograma de infravermelho da substância isolada, amostra AT₁. Aparelho Sodium Chloride Spectrophotometer, marca Perkin-Elmer, Ind. e Com. modelo 137. Amostra em "film", pureza química ~ 100%.

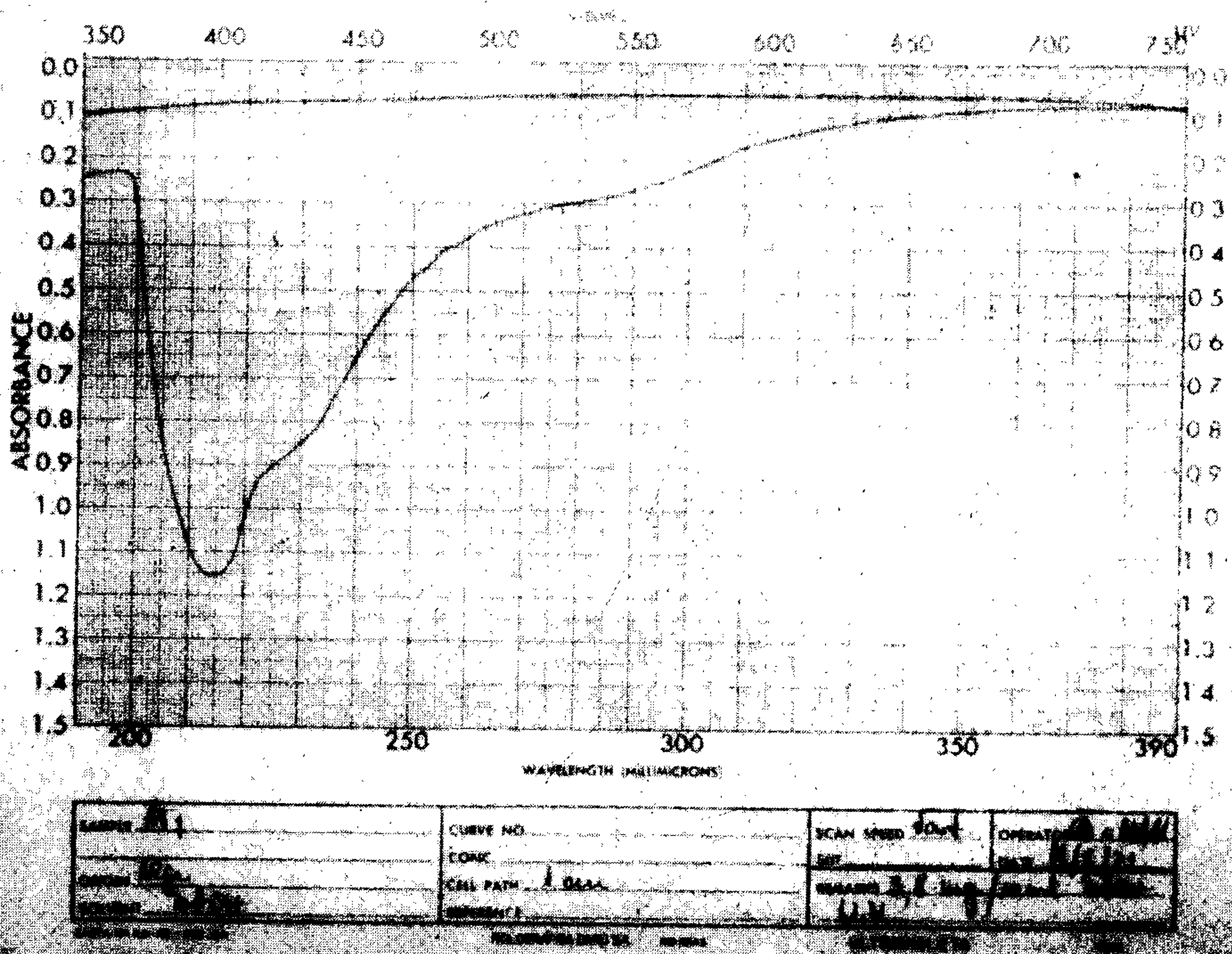


Fig. 5 — Espectrograma de ultravioleta e visível, da substância isolada, amostra AT₁, 3,8 mg/10 ml EtOH. Espectrômetro marca Perkin-Elmer Ind. e Com. Ltda., modelo 402.

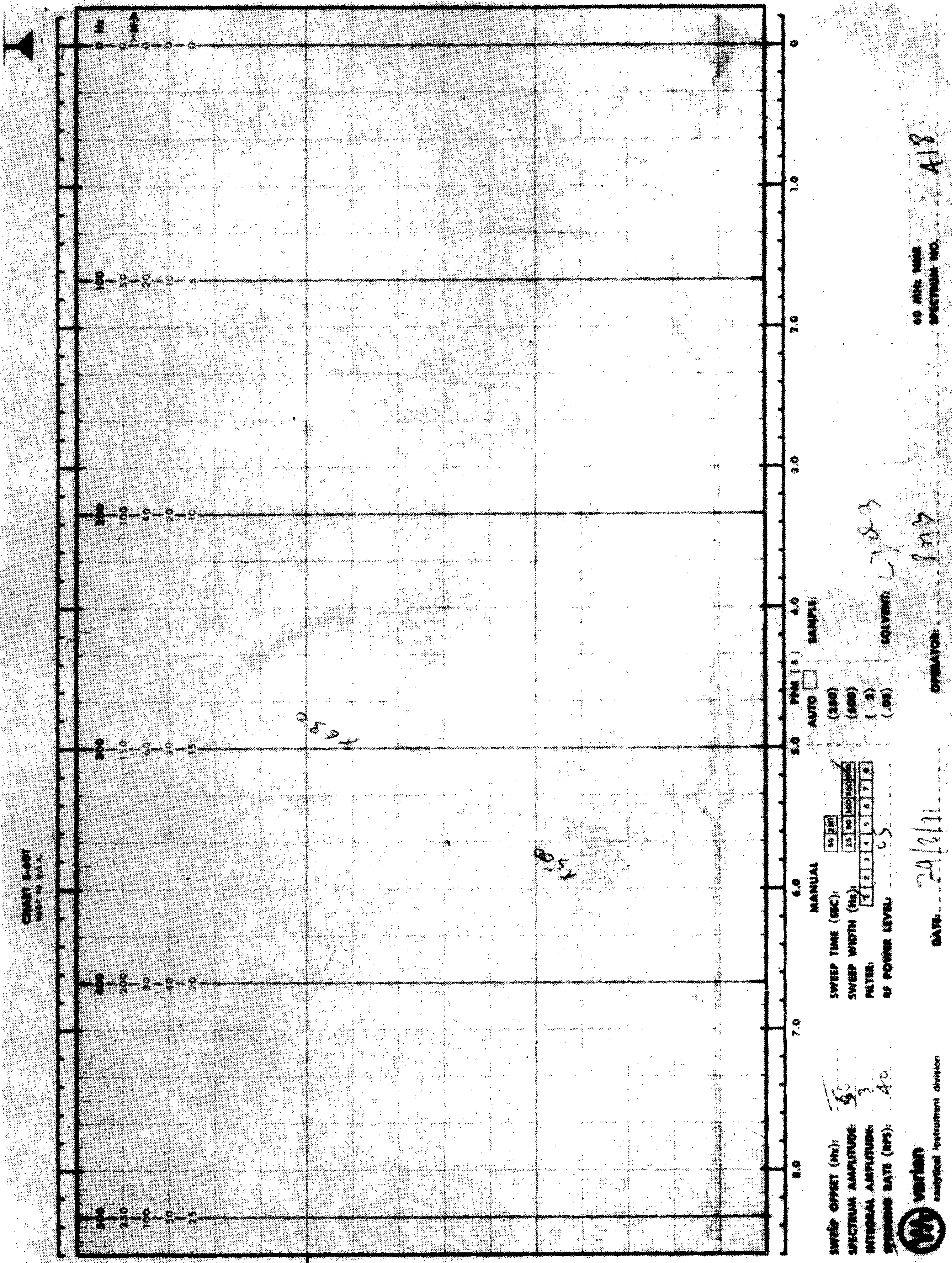


Fig. 6 — Espectrograma de ressonância magnética protônica. Amostra AT₁, 1 μg dissolvido em CDCl₃. Espectrômetro modelo T-60, da Varian Ind. e Com. Ltda.

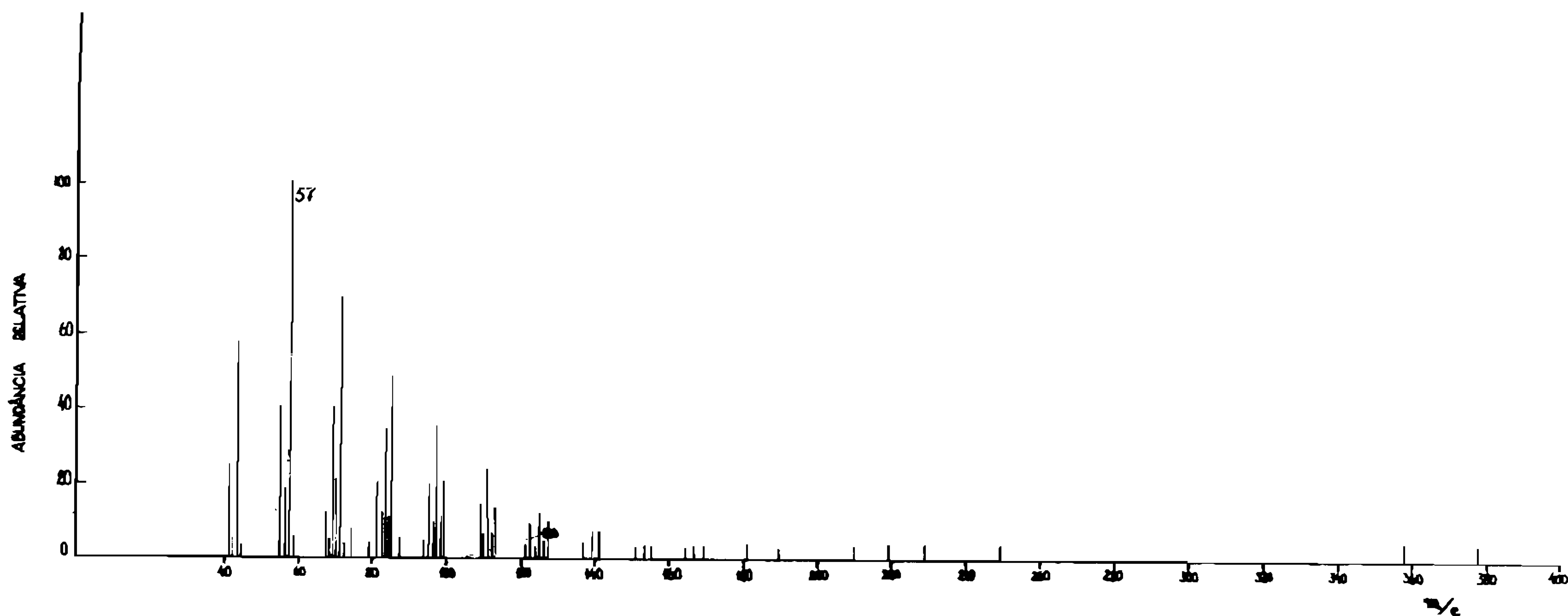


Fig. 7 — Espectro de massa do éster metílico do ácido β -iodo palmítico.

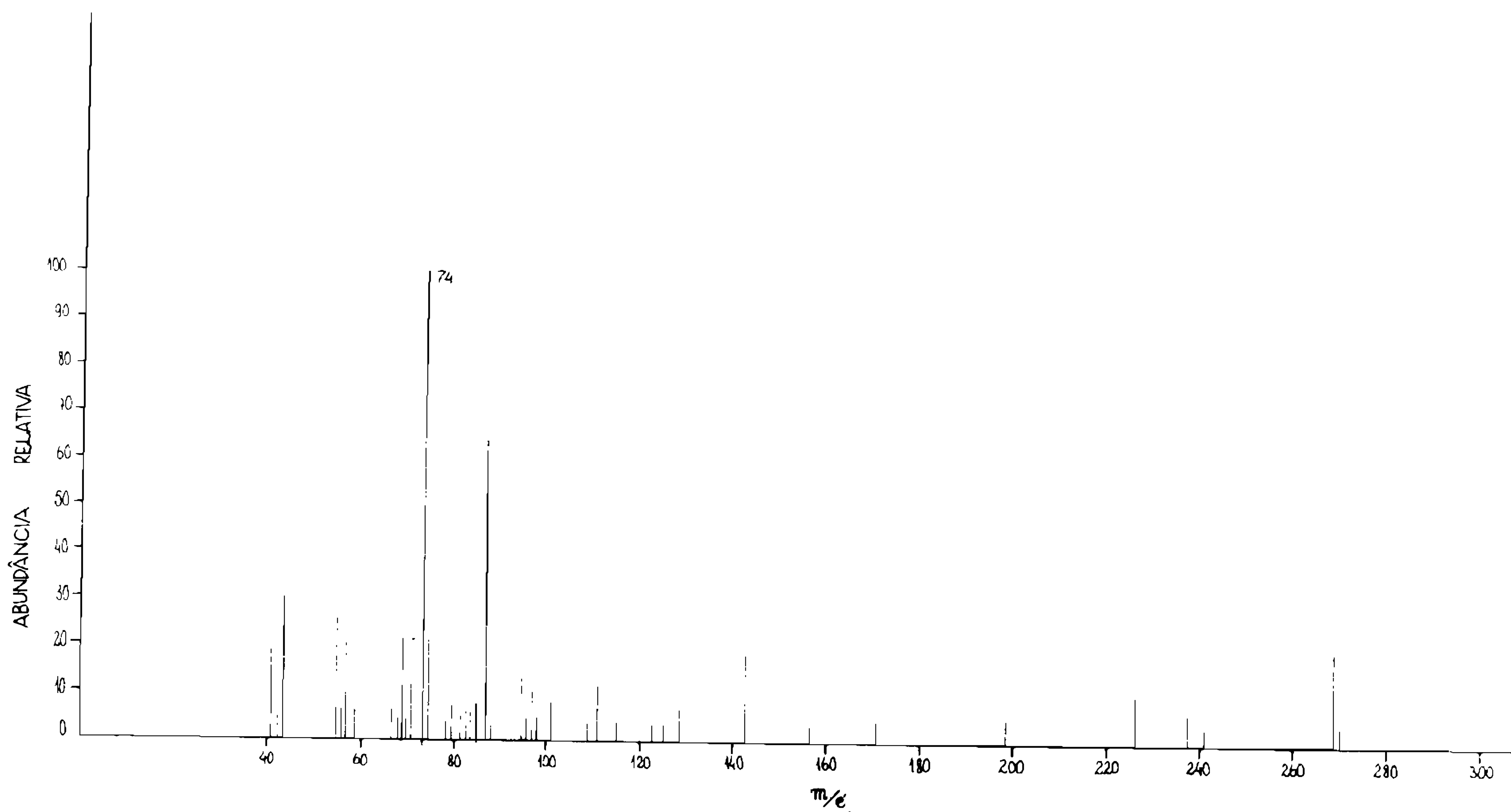


Fig. 8 — Espectro de massa do éster metílico do ácido oléico.

- 5 — GOTTLIEB, O.R., 1968, Introdução à Espectrometria de Ressonância Magnética Protônica. *Ed. da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*
- 6 — GOTTLIEB, O.R., 1968, Introdução à Espectrometria de Massa das Substâncias Orgânicas. *Ed. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*
- 7 — GREULACH, V.A., 1973, Plant Function and Structure. I st ed. *The Macmillan Company, New York.*
- 8 — CRIMM, M.R., 1952, Yodine Content of Some Marine Algae. *Pacific Science*, 6: 318-323.
- 9 — KAMEN, M., 1962. Isotopic Tracers in Biology. 3 st ed. *Academic Press, Inc., New York.*
- 10 — KETCHUM, B.H., 1963, Some Biological Characteristics of Marine Environment. Publ. n.º 010, Great Lakes Research Division. *The University of Michigan. United States of America.*
- 11 — MOREIRA DA SILVA, P.O., 1968, Dinâmica da Ressurgência e Aplicações. *Instituto de Pesquisas da Marinha, Ministério da Marinha. Publ. 12.* 1-31, incl. 22 fig. + 4 tabs.
- 12 — OLIVEIRA FILHO, E.C., 1968. Algas marinhas do sul do Estado do Espírito Santo (Brasil), L. Ceramiales. *Bol. Fac. Fil. Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. Botânica* 26: 1-278. Incl. 1 mapa + 34 pr.
- 13 — ROSER, X.F. & CULLEN, L.T., 1962, Radiation Levels in Selected Regions of Brasil. *An. Acad. Bras. Ci.*; 34 (1): 23-35.
- 14 — RUCK, T.C. & PATTON, H.D., 1965, Physiology and Biophysics. *Saunders Company, Philadelphia e London.*
- 15 — SCOTT, R., 1954, Observations on the Iodo-Amino-Acids of Marine Algae using Iodine-131. *Nature* 173: 1083-1089.
- 16 — SILVERSTEIN, R.M. & BASSLER, G. C., 1967, Identification of Organic Compounds. 2nd ed. *J. Wiley & Sons, Inc. New York.*
- 17 — TAKAHASHI, A. & BARTH, R., 1967, Estudos sobre produtividade primária por C¹⁴, na corrente do Brasil. *Instituto de Pesquisas da Marinha, Ministério da Marinha, Brasil. Publ. 10,* 1-2, Incl. 2 gráf., 2 tabs., 4 map.
- 18 — WATSON, S.W., 1965, Characteristics of a marine nitrifying bacterium *Nitrosocystis oceanus* sp.p. *Limnol. Oceanogr.*, 10. (Suppl., Alfred Redfield Volume) 274-289.
- 19 — YENTSCH, C.S., 1961, Biological Instrumentation Proceedings Government — Industry Oceanographic Instrumentation Symposium. *Washington.*