

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO

**ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRATOS DE MICROALGAS MARINHAS**

CURITIBA
2011

TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO

**ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRATOS DE MICROALGAS MARINHAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA
2011

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

TERMO DE APROVAÇÃO

Tatiane Winkler Marques Machado

ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE MICROALGAS MARINHAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá – Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascencio
Universidade Federal do Tocantins - UFT



Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Curitiba, 25 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho a minha mãe,
Helena, meus irmãos Margarete e
Valmir, as minhas queridas sobrinhas
Julinha e Manu e ao Marcos, meu
amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter tornado possível este momento. Quanto mais eu estudo mais percebo quão maravilhoso Ele é. Como somos agraciados com o dom da vida, com a perfeita maquinaria bioquímica da vida.

Ao professor Miguel Nosedá, que me acolheu em seu grupo de pesquisa, confiou no meu trabalho e me aceitou por mais 4 anos. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação. Nesses 2 anos sinto que aprendi o equivalente há uns 10 anos pelo menos.

A professora Maria Eugênia Nosedá, minha co-orientadora, também por ter me acolhido no grupo e por toda a disposição em discutir resultados, pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos.

Especialmente a minha família. Minha mãe, Helena, e minha irmã, Margarete, Estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, me ouvindo, me incentivando. A minha sobrinha e afilhada Julinha, tão carinhosa, amável e orgulhosa da tia “cientista”! Ao meu irmão, Valmir e a sua família, mesmo do outro lado do mundo deu pra sentir a energia de vocês! Vocês são parte deste trabalho tanto quanto eu. Muito obrigada, amo vocês!!!

Ao meu Pai, João, mesmo distante eu sei que ele torce pelo meu futuro e se orgulha com as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Marcos, pelo companheirismo, amor, incentivo, dedicação em todos os momentos e principalmente pela compreensão naqueles momentos de total falta de lucidez.

Aos amigos que fiz no departamento: Franciely, Elaine, Aline, Nessa, a amizade de vocês muitas vezes foi o que me fez continuar, não tenho palavras pra descrever o quanto foram meu suporte muitas vezes. Jenifer e Luciana que eu conheci no Lab, Jeni pelas horas de papo arrumando os armários e limpando a geladeira, pela amizade, pelo carinho. Lu pelas conversas, as risadas e o apoio. A Fernanda Simas, querida, sempre dando um “up” na minha moral, me ajudando com a interpretação de resultados, me ouvindo, dando conselhos e principalmente por todo o carinho e ombro amigo que me deu. Arquimedes, Lauro e a Nessana (denovo) que fizeram a bioquímica ser mais descontraída com as festas, churrascos e o barzinho de sexta-feira.

Aos colegas de laboratório: Ju Rizzi, Siliane, Juliana, Pauline, Gilda, André, Taline, Luciano e as mais novas Louise e Ju Teodoro. Obrigada pela convivência, pela ajuda com experimentos, com a mão que me deram em muitos momentos e por me agüentarem mesmo quando eu perturbei por causa da limpeza e organização. Com vocês aprendi muitas coisas da teoria, da prática e de relacionamento.

A Ester, minha estagiária, obrigada por ser sempre tão prestativa e disposta. Pelos vários experimentos que fez pra mim. Pelo apoio, pela torcida, pelo carinho. Por ter me deixado aprender a ensinar com você!

Aos colegas dos demais laboratórios, Lúcia, Rogério, João, Heide, Yanna, Arildo, Paulo Worffel, pelos empréstimos de material e pela convivência sempre agradável.

Aos amigos de antes e sempre: A panelinha da faculdade: Bruna, Glaucia, Georgia, Karin, Letícia, Elisabeth, Alana. Ter a impressão de que vocês estão por perto mesmo quando estão longe é a maior prova de amizade. Raquel, Verônica, Alex, Tissa e Flavio a alegria e amizade de vocês sempre me ouvindo e aconselhando mesmo sem entender direito o que se passava foi muito importante. Obrigada pelas festas e pelas risadas juntos!!!

A prof. Elenice Murate e Suely Amarin, e os técnicos Jair Lima e Lindamir Tulio, da graduação em Nutrição. Obrigada por terem sido o início de tudo isso. Vocês me incentivaram a seguir na pesquisa e isso foi decisivo.

Agradeço com carinho a todos que fizeram parte desse trabalho direta ou indiretamente.

Ao GIA-UFPR pelo cultivo das microalgas.

Ao prof. Roberto Derner da UFSC pela colaboração cedendo a biomassa de *P. cruentum*.

A banca examinadora.

Ao Prof. Miguel, Prof. Guilherme, Prof. Diogo, Luciana, Arquimedes e Prof. Anderson (do departamento de Química) pelas análises de RMN.

A Elisangela pelas análises de HPSEC e por todo o carinho com as amostras.

A Rosane pelas análises em GC-MS.

A coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica.

Ao Programa REUNI e a CAPES, pelo suporte financeiro e ao PRONEX Carboidratos.

Muito Obrigada!!!

“Quase tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança!”

Autor desconhecido

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de nove espécies de microalgas marinhas além de isolar os polissacarídeos de duas espécies de microalgas também marinhas e determinar sua estrutura química. As espécies utilizadas para os testes antioxidantes foram *Chaetoceros mulleri*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Tetraselmis chuii*, *T. gracilis*, *T. suecica*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Nannochloropsis oculata*, a fim de realizar um screening do potencial antioxidante destas espécies. Entre as espécies testadas neste trabalho apenas a espécie *P. tricorutum* já teve sua atividade avaliada. As espécies que tiveram seus polissacarídeos isolados para caracterização estrutural, *Pavlova lutheri* e *Porphyridium cruentum*, pertencem a duas diferentes divisões taxonômicas, Haptophyta e Rhodophyta, respectivamente, são cultiváveis em larga escala e seus polissacarídeos têm interesse comercial devido as suas potenciais atividades biológicas. Inicialmente, a biomassa microalgal das espécies foi isolada do meio de cultivo através de centrifugação e liofilizada. Para obtenção dos extratos testados para a atividade antioxidante a biomassa seca das nove espécies foi submetida a extração seqüencial com solventes em ordem de polaridade crescente hexano, etanol e água, à 2,5 g%, por 3 h a temperatura ambiente. A biomassa foi separada do extrato por meio de filtração a vácuo ou centrifugação e o solvente evaporado até *secura*; os extratos foram ressolubilizados em etanol ou água nas concentrações de 50, 250 e 500 µg/mL. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada por três métodos distintos: Poder redutor, β-caroteno-ácido linoléico e DPPH. Os resultados obtidos foram comparados aos padrões BHA, BHT e α-tocoferol (100 µg/mL). O resultado do screening realizado não apresentou, por nenhum dos métodos empregados, espécies com potencial atividade antioxidante, visto que de modo geral a atividade antioxidante dos extratos não supera 25% da atividade antioxidante apresentada pelos padrões. Para extração dos polissacarídeos a biomassa seca de *P. lutheri* foi submetida à extração aquosa e alcalina (NaOH 0,5 M) seqüenciais, a 80°C por 2 h. Já a espécie *P. cruentum* foi submetida a extração aquosa a temperatura ambiente por 3 h, seguida de extração aquosa e extração alcalina (NaOH 0,5 M) seqüenciais a 80 °C por 2 h. As análises químicas e espectroscópicas para determinação da estrutura química, sugerem que o polímero extraído de *P. lutheri*, por extração aquosa (PAQ) (3 % de rendimento), e sua parte solúvel no sobrenadante etanólico (PAQ-SE - 5% de rendimento), é constituído por uma β-glucana (1→3) ligada, com pontos de ramificação em C-6, sendo que as cadeias laterais são formadas por apenas uma unidade de glucose ou por dissacarídeos (1→6)-ligados. O polímero obtido por extração alcalina (PAL - 9,5% de rendimento) é constituído por uma β-glucana (1→3)(1→6)-ligada e uma β-xilana (1→4)-ligada. Os polímeros extraídos de *P. cruentum* tanto por extração aquosa a quente (PCAH - 34,6 % de rendimento), como por extração alcalina (PCAL - 18,2 % de rendimento) são constituídos principalmente por uma α-glucana (1→4)(1→6) ligada, semelhante ao amido das florídeas descrito para as macroalgas vermelhas. A fração extraída com água a temperatura ambiente (PCAD - 19,1% de rendimento) apresentou como principais componentes galactose (38,7 mol %), xilose (30,9 mol %) e glucose (24,9 mol %), além de sulfato (14%). Este polissacarídeo constituinte da parede celular foi tratado com KCl 2 M e a fração solúvel em KCl foi submetida a fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel, onde obteve-se as frações FS-w, Fs-1, Fs-2 e Fs-3. Estas frações apresentaram teor significativo de sulfatação (entre 15 e 20 %)

e composição monossacarídica muito similar a fração de origem. A complexidade desta molécula exigirá experimentos adicionais para caracterização química completa deste polímero.

Palavras-chave: Microalgas marinhas, atividade antioxidante, polissacarídeos, caracterização química.

ABSTRACT

The aim of this study was to test the antioxidant activity of extracts from nine species of marine microalgae and also to isolate the polysaccharides of two species of marine microalgae and determine their chemical structure. The species used for testing antioxidants were *Chaetoceros mulleri*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chui*, *T. gracilis*, *T. suecica*, *Thalassiosira fluviatilis* and *Nannochloropsis oculata* in order to perform a screening of the antioxidant potential of these species. Among the species tested in this study, only the specie *P. tricornutum* had already evaluated their activity. The species that had their polysaccharides isolated for structural characterization, *Porphyridium cruentum* and *Pavlova lutheri*, belong to two different taxa, Haptophyta and Rhodophyta, respectively, are cultivated on a large scale and their polysaccharides have a commercial appeal due to their potential biological activities. Initially, the microalgal biomass was isolated from the culture medium by centrifugation and lyophilized. To obtain the extracts tested for antioxidant activity, the dry biomass of the nine species was subjected to sequential extraction with solvents in order of polarity hexane, ethanol and water at 2.5 g%, for 3 h at room temperature. The biomass was separated from the extract by vacuum filtration or centrifugation and, after solvent evaporation to dryness, the extracts were resolubilized in ethanol or water at concentrations of 50, 250 and 500 µg/mL. These solutions were used for evaluation of the antioxidant activity by three different methods: reducing power, β-carotene-linoleic acid system and DPPH. The results were compared to the BHA, BHT and α-tocopherol standards at a concentration of 100 µg/mL. The result of the screening carried out does not present, by any of the methods used, species with potential antioxidant activity, since generally the antioxidant activity of extracts did not exceed 25% of the antioxidant activity presented by the standards. To obtain the polysaccharides the dry biomass of *P. lutheri* was subjected to water extraction and alkaline (NaOH 0.5 M) sequence, 80°C for 2 h. Since the species *P. cruentum* was submitted to aqueous extraction at room temperature for 3 h, followed by water and alkaline extraction (NaOH 0.5 M) sequence at 80 ° C for 2 h. The chemical analysis and spectroscopic techniques to determine the chemical structure, indicated that polymer extracted from *P. lutheri*, by aqueous extraction (PAQ - 3% yield), and its part soluble in ethanol (PAQ-SE - 5% yield), consists of a β-glucan (1 → 3) linked with points branched C-6, and the side chains are formed by only one unit of glucose or disaccharides linked (1 → 6). The polymer obtained by alkaline extraction (PAL - 9.5% yield) consists of a β-glucan (1 → 3)(1→6)-linked and a β-xylan (1 → 4) - linked. The polymer extracted from *P. cruentum* by hot water extraction (PCAH - 34.6% yield), and by alkaline extraction (PCAL - 18.2% yield) constitute mainly of α-glucose (1→4)(1→6)-linked, like starch of floride described to red macroalgae. The fraction extracted with water at room temperature (PCAD - 19.1% yield) exhibited galactose (38.7 mol%), xylose (30.9 mol%) and glucose (24.9 mol%), and sulfate (14%). This polysaccharide consisting of cell wall polysaccharide. was treated with 2 M KCl and the KCl-soluble fraction was subjected to fractionation on ion exchange column DEAE-Sephacel, which delivered fractions FS-w, Fs-1 (25 , 8% yield), Fs-2 (22% yield) and FS-3 (0.3% yield). These fractions showed high concentration of sulfate (between 15 and 20%) and very similar monosaccharide composition of the fraction of origin with only change in the ratio between sugars. The complexity of this molecule, indicates that other experiments will be necessary to complete chemical characterization of this polymer.

Keywords: marine microalgae, antioxidant activity, polysaccharides, chemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FOTO DE <i>Tetraselmis sp.</i>	4
FIGURA 2 -	FOTO DE <i>Thalassiosira fluviatilis</i> (a) <i>Phaedodactylum tricornutum</i> (b) <i>Chaetoceros mulleri</i> (c).....	5
FIGURA 3 -	FOTO DE <i>Nannochloropsis oculata</i>	6
FIGURA 4 -	FOTO DE <i>Pavlova lutheri</i> (a) <i>Isochrysis galbana</i> (b).....	7
FIGURA 5 -	FOTO DE <i>Porphyridium sp.</i>	8
FIGURA 6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS CAROTENÓIDES PRESENTES EM MICROALGAS.....	10
FIGURA 7 -	ESTRUTURA DA UNIDADE DE REPETIÇÃO ÁCIDA DO EXOPOLISSACARÍDEO DE <i>Porphyridium sp.</i>	13
FIGURA 8 -	ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DA DEGRADAÇÃO PARCIAL DO POLISSACARÍDEO DE <i>P. cruentum</i>	14
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS UTILIZADOS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
FIGURA 10 -	COEFICIENTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CLOROFITAS <i>TETRASELMIS SUECICA</i> , <i>TETRASELMIS GRACILIS</i> , <i>TETRASELMIS CHUII</i> , PELO MÉTODO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (β -CAROTENO-ÁCIDO LINOLÉICO).....	36
FIGURA 11 -	COEFICIENTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (β -CAROTENO-ÁCIDO LINOLÉICO) DAS OCROFITAS (a) E DAS HAPTOFITAS (b).....	37
FIGURA 12 -	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH DAS CLOROFITAS.....	39
FIGURA 13 -	FIGURA 13 - PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH DAS OCROPHYTAS (a) E DAS HAPTOPHYTAS (b).....	40

FIGURA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR DAS CLOROFITAS (a) OCROFITAS (b) HAPTOFITAS (c).....	42
FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO PAQ (a) e PAQ-SE (b).....	47
FIGURA 16 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO PAL.....	48
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO PAQ (a) FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DA MICROALGA HAPTOPHYTA <i>I. galbana</i> (b) ¹ . SOLVENTE D ₂ O. TEMPERATURA 50°C.....	50
FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C E INSERTO COM DEPT 135 (70-55 ppm) DA FRAÇÃO PAQ-SE. SOLVENTE D ₂ O. TEMPERATURA 50°C.....	52
FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DE UMA β-GLUCANA ISOLADA DE <i>Thalassiosira fluviatilis</i> POR RIZZI (2010) (a) E DA FRAÇÃO PAQ-SE DE <i>P. lutheri</i> (b).....	53
FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO PAL. SOLVENTE D ₂ O. TEMPERATURA 50°C.....	54
FIGURA 21 – MODELO DE ESTRUTURA PROPOSTO PARA O POLÍMERO EXTRAÍDO DA BIOMASSA DE <i>P. lutheri</i> NA CONDIÇÃO ALCALINA – β-XILANA (1→4)-LIGADA.....	55
FIGURA 22 – MODELO DE ESTRUTURA PROPOSTO PARA O POLÍMERO SOLÚVEL NO SOBRENADANTE ETANÓLICO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE <i>P. lutheri</i> - β-GLUCANA (1→3)(1→6)-LIGADA.....	57
FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO PCAH (a) E DA FRAÇÃO PCAL JUNTAMENTE COM INSERTO DE DEPT 135 (70-55 ppm) (b).....	60
FIGURA 24 – AMILOPECTINA.....	61
FIGURA 25 – FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DE <i>P. cruentum</i>	61
FIGURA 26 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO	

PCAD-FS.....	64
FIGURA 27 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES FS-w (a), FS-1 (b) e FS-2 (c).....	64
FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO PCAD-FS. SOLVENTE D ₂ O. TEMPERATURA 70°C.....	66
FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES FS-w, FS-1 E FS-2. SOLVENTE D ₂ O. TEMPERATURA 70°C.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE DIFERENTES GRUPOS DE MICROALGAS.....	12
TABELA 2 - RENDIMENTO DA BIOMASSA EM (g/L) DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	31
TABELA 3 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS HEXANICOS (HEX), ETANÓLICOS (ETN) E AQUOSOS (AQU) DAS NOVE ESPÉCIES DE MICROALGAS PESQUISADAS.....	33
TABELA 4 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>P. lutheri</i>	46
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>P. lutheri</i>	46
TABELA 6 - ASSINALAMENTOS DE ¹³ C DA FRAÇÃO PAQ EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO PAQ-SE.....	52
TABELA 7 - TABELA 6 – ASSINALAMENTOS DE ¹³ C DA FRAÇÃO PAL EM COMPARAÇÃO COM UMA XILANA EXTRAÍDA DO EXSUDATO DE UMA PALMEIRA DA ESPÉCIE <i>Scheelea Phalerata</i>	54
TABELA 8 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA PAQ-SE.....	56
TABELA 9 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>P. cruentum</i>	58
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>P. cruentum</i>	58
TABELA 11 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS FRAÇÕES PCAH E PCAL DE <i>P. cruentum</i> EM COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS.....	59

TABELA 12 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE PCAD.....	62
TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE PCAD.....	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α – denota anomeridade alfa

β – denota anomeridade beta

BaCl₂ – Cloreto de Bário

BSA – soro albumina bovina

BHA - Butil-hidroxianisol

BHT - Butil-hidroxitolueno

CG-EM – Cromatografia Líquida Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

D₂O – água deuterada

DEAE - Dietilaminoetil

DEPT - distortionless enhancement by polarization

DPPH - α, α diphenyl - β - picrylhidrazil

EtOH – etanol

Gal – galactose

Glc – glucose

HPSEC-MALLS – Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Resolução acoplada a detectores de Índice de Refração e Espalhamento de Luz

KCl – Cloreto de Potássio

Me-Gal – Metil galactose

NaBH₄ – boroidreto de sódio

NaIO₄ – metaperiodato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

ppm – partes por milhão

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear - Carbono 13

TFA – ácido trifluoracético

TNR – Terminal não redutor da cadeia polissacarídica

Xil - xilose

CHM – *Chaetoceros mulleri* Lemmermann

ISO – *Isochrysis galbana* Parke

NOC – *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd.

PC – *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nagile

PHT – *Phaedodactylum tricornutum* Bohlin

PL – *Pavlova lutheri* Droop

TC – *Tetraselmis chuii* Butcher

TFL – *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt

TG – *Tetraselmis gracilis* Butcher

TS – *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher

FS-1 – Fração eluída com NaCl 0,5 M em DEAE-Sephacel

FS-2 - Fração eluída com NaCl 1 M em DEAE-Sephacel

FS-3 - Fração eluída com NaCl 1,5 M em DEAE-Sephacel

FS-w - Fração eluída com água em DEAE-Sephacel

PAL – *Pavlova* Alcalino

PAQ - *Pavlova* Aquoso

PAQ-SE - *Pavlova* Aquoso Sob. Etanólico

PCAD – *P. cruentum* Aquoso dialisado

PCAD-FS - *P. cruentum* Aquoso Dialisado Fração Solúvel em KCl 2M

PCAH - *P. cruentum* Aquoso “Hot”

PCAL - *P. cruentum* Alcalino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 MICROALGAS	3
2.1.1 Divisão Chlorophyta.....	4
2.1.2 Divisão Ochrophyta.....	4
2.1.2.1 Classe Bacillariophyceae.....	5
2.1.2.2 Classe Eustigmatophyceae	6
2.1.3 Divisão Haptophyta.....	6
2.1.4 Divisão Rhodophyta.....	8
2.2 COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EXTRAÍDOS DE MICROALGAS	9
2.2.1 Carotenóides.....	9
2.2.2 Polissacarídeos de microalgas	11
2.2.2.1 <i>Pavlova lutheri</i> (HAPTOPHYTA)	12
2.2.2.2 <i>Porphyridium cruentum</i> (RHODOPHYTA)	12
2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE MICROALGAS	14
2.3.1 Atividade antioxidante.....	15
2.3.2 Atividade imunoestimulante de glucanas.....	16
2.3.3 Atividade antiviral de polissacarídeos de microalgas.....	17
2.4 APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	17
3 JUSTIFICATIVA	19
4 OBJETIVOS	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 MICROALGAS	21
5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	21
5.3 EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.....	22
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
5.4.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno- ácido linoléico)	23
5.4.2 Poder Redutor.....	24
5.4.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)	24
5.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA MICROALGAL	25
5.5.1 Extração dos polissacarídeos de <i>Pavlova lutheri</i>	25
5.5.2 Extração dos polissacarídeos de <i>P. cruentum</i>	26
5.6 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POLISSACARÍDICOS	26
5.6.1 Tratamento dos polissacarídeos com KCl	26
5.6.2 Purificação por ultrafiltração em membrana.....	27
5.7 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>P. CRUENTUM</i>	27
5.7.1 Cromatografia de troca-iônica.....	27

5.8 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	27
5.8.1 Métodos químicos.....	27
5.8.1.1 Dosagem de açúcares totais	27
5.8.1.2 Dosagem de proteínas totais.....	28
5.8.1.3 Dosagem de grupamentos sulfatos	28
5.8.1.4 Dosagem de ácidos urônicos	28
5.8.1.5 Hidrólise ácida Total	28
5.8.1.6 Metilação	29
5.8.2 Métodos cromatográficos e espectrométricos	29
5.8.2.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	29
5.8.2.2 Cromatografia de exclusão estérica de alto rendimento (HPSEC-MALLS-RID)	30
5.8.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
6.1.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno- ácido linoléico)	35
6.1.2 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)	39
6.1.3 Poder Redutor.....	41
6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE MICROALGAS MARINHAS.....	45
6.2.1 <i>Pavlova lutheri</i>	45
6.2.1.1 Extração dos polissacarídeos.....	45
6.2.1.2 Caracterização estrutural.....	45
6.2.1.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear.....	49
6.2.1.4 Análise de metilação de PAQ-SE	55
6.2.2 <i>Porphyridium cruentum</i>	57
6.2.2.1 Extração dos polissacarídeos.....	57
6.2.2.2 Caracterização química	57
6.2.2.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	59
6.2.3 Fracionamento da fração PCAD	61
6.2.3.1 Análise química das frações obtidas a partir de PCAD	62
6.2.3.2 Análise por HPSEC-MALLS-RID das frações obtidas a partir de PCAD	63
6.2.3.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	66
7 CONCLUSÕES	68
REFERENCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos capazes de desenvolver-se tanto em água doce quanto no ambiente marinho, onde constituem o fitoplâncton e são responsáveis por grande parte da atividade fotossintética, absorvendo CO₂ e liberando O₂ e água (DERNER et al., 2006).

Esses organismos possuem uma grande diversidade de estruturas químicas, de diferentes vias metabólicas que podem ter as mais variadas aplicações como compostos biologicamente ativos, ou essenciais à nutrição humana e animal (GARCIA E GUERRERO, 2008). São ricas em proteínas, polissacarídeos, fibras dietéticas e ácidos graxos, além de metabólitos secundários, como carotenóides e outros pigmentos (CARDOZO et al., 2007).

Os relatos da utilização de microalgas na alimentação humana datam de 2000 anos atrás, com a utilização de *Nostoc*, *Spirulina* e *Aphanizomenon* por chineses e indígenas. A partir de 1950 o conhecimento de sua rica composição química abriu outros campos para utilização da biomassa e de seus extratos, entre eles, a aquicultura, a indústria de cosméticos e alimentos e a produção de suplementos alimentares (SPOLAORE et al., 2006). Atualmente a exploração do potencial biotecnológico de microalgas e seus compostos busca conhecer as propriedades biológicas inerentes aos macro e micronutrientes presentes na biomassa como polissacarídeos e carotenóides. Além disso, também tem sido estudadas devido ao seu alto conteúdo de lipídios - pela possibilidade da produção de biodiesel, e pela presença de PUFA's (ácidos graxos poliinsaturados - ômega 3 e 6) que têm elevado valor comercial.

Muitas propriedades biológicas de microalgas, como imunoestimulante, antiviral e anti-hiperlipidêmica, podem ser derivadas dos polissacarídeos presentes na biomassa (DVIR et al., 2009; TALYSHINSKY et al., 2002; BAO et al., 2001; DVIR et al., 2000; BONH e BeMILLER, 1995). Sabe-se que as propriedades biológicas estão diretamente relacionadas à estrutura química destas moléculas - composição monossacarídica, padrões de ligações glicosídicas, presença de grupos substituintes, tamanho molecular e a conformação. Todos estes são fatores que variam em função da família, gênero e até mesmo espécie a que pertence à microalga, por este motivo elas podem ser ricas fontes de moléculas com propriedades biológicas diferenciadas e o potencial de apresentarem propriedades

biológicas é tão grande quanto sua variabilidade de estruturas (TALYSHINSKY et al., 2002; BAO et al., 2001).

Em relação aos micronutrientes, atualmente na área da saúde há um grande apelo para a utilização de antioxidantes, na forma de suplementos, para combate à peroxidação lipídica que está fortemente associada com doenças degenerativas como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (GARCIA E GUERRERO, 2008). Na tecnologia de alimentos os antioxidantes diminuem a deterioração e aumentam a vida de prateleira dos produtos. Além disso, a indústria de alimentos emprega algas na constituição de seus produtos pelo seu relevante conteúdo de fibras, vitaminas e minerais (CARDOZO et al. 2007).

Vegetais superiores, macro e microalgas em geral são fontes naturais de compostos antioxidantes, pelo simples fato de que os produzem como uma maneira de proteger-se das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) provenientes da ativação do oxigênio endógeno pela radiação ultravioleta UV ou até mesmo pelo calor (GARCIA E GUERRERO, 2008).

Visto que as microalgas possuem uma diversa e rica composição química, estas apresentam alto potencial de gerarem compostos capazes de exercer atividades biológicas como antioxidantes. Neste trabalho o enfoque foi sobre a avaliação da atividade antioxidante de frações extraídas de nove espécies marinhas de microalgas: *Chaetoceros mulleri* (Lemmermann), *Isochrysis galbana* (Parke), *Pavlova Lutheri* (Droop), *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), *Tetraselmis chuii* (Butcher), *Tetraselmis gracilis* (Butcher), *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher, *Thalassiosira fluviatilis* (Hustedt) e *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd.

Além disso, também foram caracterizadas as estruturas químicas dos polissacarídeos de duas espécies marinhas de microalgas *Pavlova lutheri* e *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nageli, com alto potencial de apresentarem atividades biológicas como imunoestimulantes e antiviral respectivamente (HUHEIHEL et al., 2002; TALYSHINSKY et al., 2002; BAO et al., 2001).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

O termo microalgas não possui valor taxonômico e engloba microorganismos com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos (DERNER et al., 2006). Formam um grupo heterogêneo de organismos microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos devido aos seus pigmentos fotossintéticos e fotoautotróficos (OLAIZOLA, 2003). Podem desenvolver-se tanto em ambiente marinho, como em água doce e no solo (CHISTI, 2004).

As microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas; as procarióticas encontram-se no grupo das Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. As eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos) e Cryptophyceae (criptomônadas), além Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (YONEDA, 1999). Estes organismos juntamente com as macroalgas constituem um total de 25 a 30 mil espécies com uma grande diversidade de formas e tamanhos (PLAZA et al., 2008).

Alguns desses organismos são submetidos a condições extremas em seus habitats naturais, como mudanças drásticas de salinidade, temperatura, nutrientes e irradiação UV, por isso tornaram-se capazes de adaptar-se rapidamente às condições do ambiente para sobreviver, produzindo uma grande variedade de metabólitos secundários, biologicamente ativos, os quais não são encontrados em outros organismos (PLAZA et al., 2008). Diversos grupos de algas pertencentes ao fitoplâncton não apresentam relações filogenéticas entre si, exibindo diferenças expressivas que se manifestam em seus produtos de reserva, pigmentos fotossintetizantes acessórios e substâncias constituintes das paredes celulares (LOURENÇO, 2006).

Deve-se levar em conta o grande número de espécies, facilidade de cultivo, crescimento rápido, e a possibilidade de controlar a produção de alguns compostos bioativos pela manipulação das condições de cultivo. Por essas razões as algas em geral, já são consideradas por alguns pesquisadores uma boa alternativa aos compostos químicos sintéticos (PLAZA et al., 2008).

A seguir serão descritas as principais características dos grupos aos quais pertencem as microalgas pesquisadas neste trabalho.

2.1.1 Divisão Clorophyta

A esta divisão pertencem às algas verdes, e a maioria das espécies são unicelulares. As clorófitas estão entre as algas com maior capacidade de variabilidade de habitat, podendo ser encontradas em cinzas vulcânicas e salinas, por exemplo. Entretanto nota-se que 90 % do total de espécies ocorre em água doce (LOURENÇO, 2006).

As clorófitas são dotadas de clorofila *a* e *b* (o que as torna semelhantes aos vegetais superiores), β -caroteno, várias xantofilas como a luteína, a violaxantina, a zeaxantina, a aneraxantina, a neoxantina, a astaxantina, e a cantaxantina, além de amido como material de reserva (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; LOURENÇO, 2006).

A esta divisão pertence o gênero *Tetraselmis* (classe Prasinophyceae). Os organismos desta classe, assim como as espécies do gênero *Tetraselmis* são predominantemente marinhos. Clorófitas como *Tetraselmis chuii*, *T. gracilis* e *T. suecica* apresentam crescimento rápido e alta tolerância às condições de cultivo, sendo muito utilizadas na alimentação de organismos aquáticos (LOURENÇO, 2006).



FIGURA 1 - FOTO DE *Tetraselmis* sp. FONTE: TETRASELMIS (2010).

2.1.2 Divisão Ochrophyta

Esta divisão inclui diferentes grupos de algas, como as diatomáceas, as eustigmatofíceas, as rafidofíceas, entre outras. Ochrophytas refere-se as “plantas

de cor ocre”, e por isso gerou-se uma discordância a respeito do nome deste grupo. Por esse motivo também se encontra na literatura uma denominação alternativa, Heterokontophyta, que valoriza a característica dos flagelos dos membros da divisão para defini-la (LOURENÇO, 2006).

A clorofila a está presente na maior parte das ocrófitas, além de clorofila c e os carotenóides (fucoxantina e vaucheriaxantina), responsáveis pela proteção dos fotossistemas. Neste grupo os materiais de reserva constituem-se de gotículas de gordura no citoplasma e/ou um polissacarídeo constituído por unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligadas – laminarana (LOURENÇO, 2006).

2.1.2.1 Classe Bacillariophyceae

A esta classe pertencem às espécies que tem as células recobertas por uma camada de sílica – as diatomáceas, sendo esta a principal característica morfológica distintiva das bacillariófitas (LOURENÇO, 2006).

As células de diatomáceas variam desde 2 μ m (picoplâncton) a 2 mm de diâmetro (mesoplâncton). Apresentam em sua composição clorofilas a e c, β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina (LOURENÇO, 2006).

Dentre algumas espécies desta classe pode-se citar: *Chaetoceros mulleri*, *Phaedodactylum tricornutum* e *Thalassiosira fluviatilis*. As duas últimas são as que apresentam maior valor nutricional (relacionado a sua utilização na aquicultura) e facilidade de cultivo. O alto valor nutricional de diatomáceas deriva, em parte, da presença de ácidos graxos poliinsaturados, como ácido eicosapentaenóico, em altas concentrações (LOURENÇO, 2006).

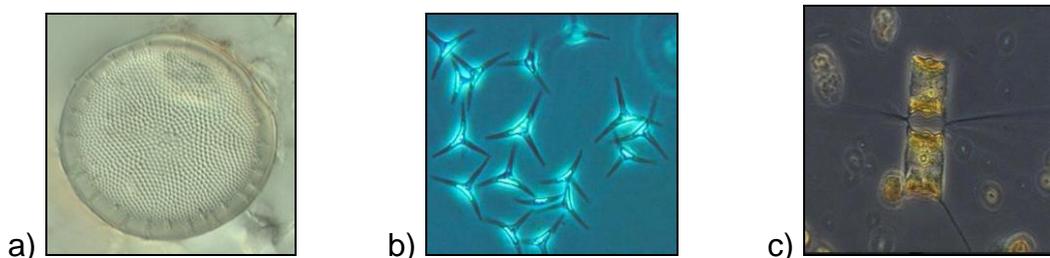


FIGURA 2 - FOTO DE *Thalassiosira* sp. (a) *Phaedodactylum tricornutum* (b) *Chaetoceros mulleri* (c)
 FONTE: a) GREAT LAKES WATER LIFE PHOTO GALLERY ALGAE DIATOMS *THALASSIOSIRA* SP. (2010) b) *PHAEDODACTYLUM TRICORNUTUM* (2010) c) *CHAETOCEROS MULLERI* (2010).

2.1.2.2 Classe Eustigmatophyceae

O nome do grupo deriva de uma mancha circular alaranjada ou avermelhada fora dos plastos na porção anterior das células flageladas, que atua como um marcador morfológico desta classe. Outra característica peculiar deste grupo é a ausência de clorofila *c* e fucoxantina (LOURENÇO, 2006).

As células variam de 2-32 μm de diâmetro, com parede celular rígida. De modo geral todas as espécies contidas nesta classe são unicelulares, cocóides ou coloniais (LOURENÇO, 2006).

Nesta classe uma das espécies mais cultivadas é *Nannochloropsis oculata*, em decorrência de seu tamanho pequeno, facilidade de cultivo, velocidade de crescimento acentuada e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (LOURENÇO, 2006).

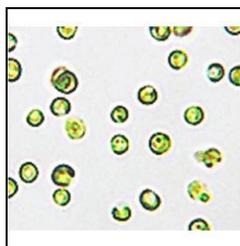


FIGURA 3 - FOTO DE *Nannochloropsis oculata* FONTE: NANNOCHLOROPSIS OCULATA (2010)

2.1.3 Divisão Haptophyta

Nesta divisão encontram-se organismos unicelulares que possuem flagelos. A característica mais importante do grupo é a presença de uma estrutura em forma de fio, conhecida como haptonema, situada entre os flagelos. Ainda não se tem conhecimento de sua função celular exata, sendo considerada por alguns autores como estrutura vestigial e por outros poderia atuar orientando o movimento das células na busca por alimentos (LOURENÇO, 2006).

As haptophytas são pequenas e em sua maioria pertencem ao nanoplâncton. Suas células são comumente recobertas por escamas, as quais podem ser mineralizadas (LOURENÇO, 2006).

Os pigmentos em geral são: clorofila *a*, clorofila *c1*, clorofila *c2*, e carotenóides como fucoxantina (e seus derivados), β -caroteno, diadinoxantina, diatoxantina. A grande concentração de carotenóides confere aos membros desse grupo uma coloração amarelada em tons de dourado ou marrom. Entretanto, algumas espécies podem não apresentar fucoxantina. A presença de clorofila *c* deve estar diretamente relacionada com sua via biossintética diferenciada da clorofila *a* e *b*, apresentando-se como um intermediário na transferência de energia entre clorofila *a* e carotenóides. O produto de reserva descrito para este grupo, assim como nas ocrófitas, é a laminarana (LOURENÇO, 2006). No entanto, RIZZI (2010) recentemente isolou da haptophyta *Isochrysis galbana* um polissacarídeo com estrutura diferente da laminarana, sendo uma β -glucana (1 \rightarrow 6) ligada com ramificações em C-3.

A divisão Haptophyta possui duas classes: a Prymnesiophyceae, representada principalmente pelo gênero *Isochrysis* e a Pavlovophyceae, representada principalmente pelo gênero *Pavlova*, seguido dos gêneros *Diacronema*, *Exanthemachrysis* e *Rebecca* (REVIERS, 2006). O gênero *Isochrysis* tem recebido crescente interesse devido a sua habilidade de produzir e acumular o ácido graxo poliinsaturado DHA (Ácido docosa-hexaenóico), em que se acredita fornecer benefícios à saúde, associados ao consumo de certos peixes marinhos e seus óleos (LIU e LIN, 2001). BROWN et al. (1997) observaram que a primnesiofícea *Isochrysis* sp é também rica em riboflavina.

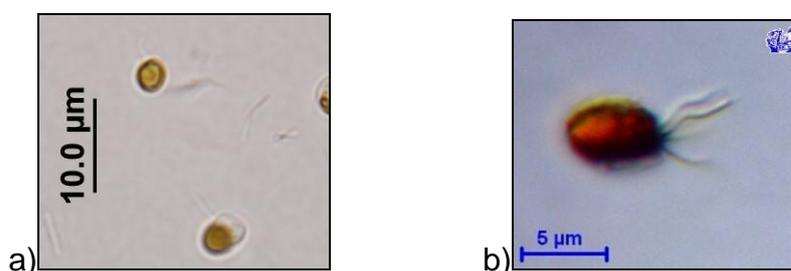


FIGURA 4 - FOTO DE *Pavlova lutheri* (a) *Isochrysis galbana* (b)
FONTE: a) O autor (2010); b) ISOCHRYSIS GALBANA (2010)

2.1.4 Divisão Rhodophyta

Esta divisão corresponde às algas vermelhas. A maioria das rodofíceas ocorre no mar, em águas tropicais e temperadas quentes e são, em geral, macroscópicas, uma vez que são poucas as espécies unicelulares. As algas desta divisão não possuem flagelos em quaisquer fases de seu ciclo de vida, fato que as diferencia das demais algas eucarióticas (LOURENÇO, 2006).

Os principais pigmentos incluem a clorofila *a*, as ficobilinas (ficoeritrina -b, -r e -c, aloficocianina-c, e ficocianina -r e -c) e carotenóides na forma de xantofilas, zeaxantina, neoxantina, luteína e anteraxantina, entre outros. A ficoeritrina -b é o pigmento dominante em muitas rodofíceas, o que determina a coloração vermelha que dá nome ao grupo. Em decorrência da composição de pigmentos que possuem, muitas algas vermelhas são capazes de viver sob baixa intensidade de luz. O produto de reserva é um polissacarídeo derivado de glucose formado por ligações α -(1 \rightarrow 4) substituído em O-6, conhecido como o amido das florídeas (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Porphyridium cruentum* membro deste grupo, já foi bastante explorada, principalmente quanto aos seus exopolissacarídeos sulfatados (GLOAGUEN et al., 2004; TANNIN-SPITZ et al., 2005). Entretanto também apresenta outra característica interessante que é a alta concentração de triglicerídeos e de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, em especial EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (ácido docohexaenóico) e AA (ácido araquidônico) (LOURENÇO, 2006).

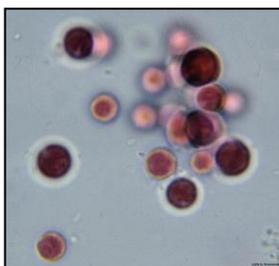


FIGURA 5 - FOTO DE *Porphyridium sp.* FONTE: *PORPHYRIDIUM SP* (2010)

2.2 COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EXTRAÍDOS DE MICROALGAS

Dentre os compostos com potencial biotecnológico existentes em microalgas destacam-se: os com fins antioxidantes, metabólitos secundários como os carotenóides, e os polissacarídeos com diversas atividades biológicas dependentes da sua estrutura química.

Os metabólitos secundários são, em geral, os principais componentes com aplicação comercial devido às suas propriedades benéficas à saúde, fazendo parte muitas vezes da composição de alimentos funcionais ou suplementos nutricionais, ou ainda utilizados na indústria de alimentos e cosméticos onde atuam como antioxidantes ou corantes. Os metabólitos secundários mais abundantes em microalgas são os carotenóides, aos quais se atribui o potencial antioxidante destes organismos (CARDOZO et al., 2007; PLAZA et al., 2008).

Os polissacarídeos encontrados em microalgas podem ser armazenados como material de reserva, estes em geral são constituídos principalmente por glucose, sendo, portanto, denominados de glucanas, ou ainda estrutural, os quais apresentam diversos padrões estruturais de ligações glicosídicas, ramificações e composição monossacarídica (SPOLAORE, 2006). As atividades biológicas já descritas, para este tipo de macromoléculas, são imunomoduladora, antiviral, antitumoral, antibacteriana e anticoagulante, entre outras (BOHN e BeMILLER, 1995).

2.2.1 Carotenóides

Carotenóides são pigmentos naturais derivados de unidades isopreno de cinco carbonos que são enzimaticamente polimerizados para formar estruturas regulares altamente conjugadas de 40 carbonos (com 15 ligações duplas conjugadas). Uma ou ambas as pontas do esqueleto de carbono podem sofrer ciclização para formar anéis β -ionona, os quais podem ser substituídos por grupos oxo, hidroxí ou epóxi em diferentes posições para formar diferentes xantofilas (CARDOZO et al., 2007).

Os carotenóides naturais de algas contêm algumas modificações específicas na estrutura básica, incluindo variações no número de carbonos e na presença de

grupos não usuais, tais como grupo de alenos, lactonas e fucoxantinas (CARDOZO et al., 2007). A estrutura química de alguns carotenóides comuns em microalgas está representada na FIGURA 6.

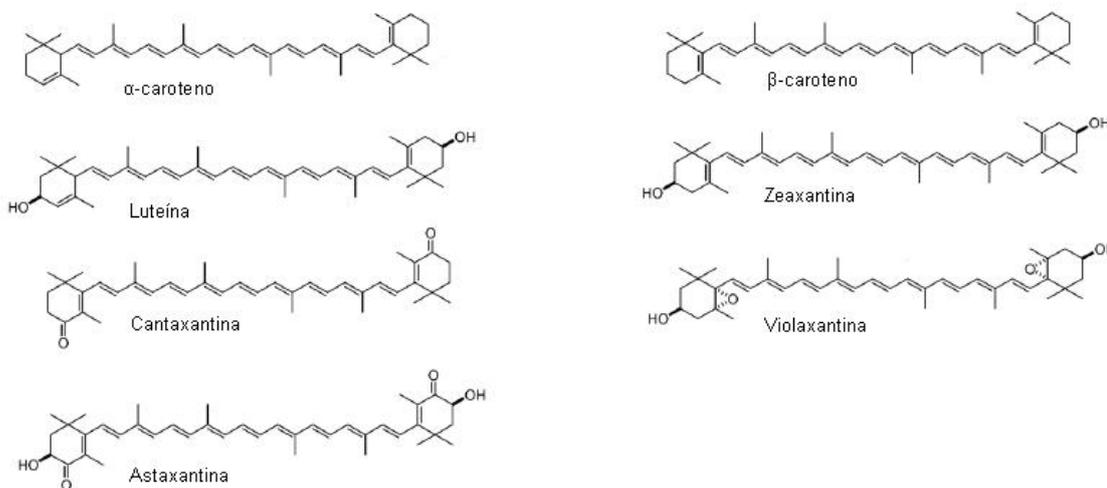


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS CAROTENÓIDES PRESENTES EM MICROALGAS

Fonte: Adaptado de CARDOZO et. al., 2007.

Já foram descritos em diversas pesquisas os efeitos benéficos de carotenóides à saúde humana. Sabe-se que além de atuar como pró-vitamina A, os carotenóides podem diminuir o risco de certas patologias, prover proteção contra a luz UV e foto-oxidação da pele, prevenir o câncer de mama e próstata. Em especial, os baixos níveis de zeaxantina e luteína estão fortemente associados com a degeneração da retina. O efeito antioxidante dos carotenóides pode ser o fator chave para a redução de diversas doenças especialmente, aquelas mediadas pela luz (LORENCIO et al., 2009; CARDOZO et al., 2007).

No mínimo 600 diferentes carotenóides exercem importantes funções biológicas nos organismos vivos. Os carotenóides são produtos metabólicos secundários das plantas, nas quais constituem principalmente aparato fotossintético, onde atuam, por exemplo, como pigmentos acessórios no processo de absorção de luz (STEWART et al., 2008; CARDOZO et al., 2007).

A astaxantina é um dos carotenóides de maior interesse comercial presente em grande quantidade nas microalgas. É um pigmento róseo comum às microalgas, e a outros organismos aquáticos como o Salmão que o obtém alimentando-se do plâncton que o produz. Por essa razão a extração deste pigmento tem sido

altamente explorada para aplicação como corante natural na indústria alimentícia e de cosméticos (STEWART et al., 2008; CARDOZO et al., 2007).

2.2.2 Polissacarídeos de microalgas

Polissacarídeos são macromoléculas presentes em todos os seres vivos. O termo polissacarídeo refere-se aos polímeros com mais de 20 unidades monossacarídicas ligadas por ligações glicosídicas, que podem formar cadeias de centenas de monossacarídeos. Esses polímeros têm funções reconhecidas como elementos estruturais de paredes celulares, material de reserva suprindo o metabolismo energético, na matriz extracelular fornecendo proteção e suporte para células e tecidos, entre outras (ASPINALL, 1970).

Nas microalgas os carboidratos são um dos maiores constituintes da biomassa podendo representar até 90 % da biomassa seca. Devido à grande heterogeneidade desses microorganismos, a composição dos polissacarídeos das microalgas tem acentuadas diferenças entre espécies e classes (PAINTER, 1983; BROWN, 1991).

Dentre os polissacarídeos de microalgas estudados a glucose é a principal unidade monossacarídica encontrada, mas são encontradas também ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose, detectadas em diferentes proporções (PAINTER, 1983; BROWN, 1991; BROWN et al., 1997). A composição do carboidrato, especialmente seu conteúdo de glucose, pode variar de acordo com fatores ambientais, e o período de crescimento (RIJSSEL et al., 2000).

Dentre as glucanas encontradas em microalgas, em geral são glucanas α -(1→4) denominadas amilopectina ou amilose, dependendo da presença ou não de ramificações. Entretanto também foram observadas em algumas espécies unidades de glucose β -(1→3) ligadas, conhecidas como laminaranas (PAINTER, 1983; GRANUM e MYKLESTAD, 2002; FRANCESCHINI et al., 2010). O que indica que podem ocorrer grandes variações na estrutura e conformação das cadeias de polissacarídeos encontradas nestes organismos em função da classe a que pertencem. A partir dos dados disponíveis na literatura foi preparada a TABELA 1 onde estão descritos os polissacarídeos observados em cada grupo de microalgas.

TABELA 1 - POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE DIFERENTES GRUPOS DE MICROALGAS

<i>Grupo de microalga</i>	<i>Tipo de polissacarídeo</i>	<i>Nome comum</i>	<i>Referência</i>
Chlorophyta	α -glucana (1→4) ligada	Amido	PAINTER (1983); VIDOTTI E ROLLEMBERG (2004); LOURENÇO (2006)
Ochrophyta	β -glucana (1→3) ligada	Laminarana	PAINTER (1983); LOURENÇO (2006)
Rhodophyta	α -glucana (1→4,1→6) ligada	Amido das floridaeas	PAINTER (1983); LOURENÇO (2006)
Haptophyta	β -glucana (1→3) ligada	Laminarana	LOURENÇO (2006);

2.2.2.1 *Pavlova lutheri* (HAPTOPHYTA)

A substância de reserva comumente descrita para as Pavlovophyceae são glucanas β -(1→3) ligadas (LOURENÇO, 2006), ou ainda glucanas β -(1→3) ligadas com substituições em O-6 (REVIERS, 2006). Não foram encontrados na literatura dados específicos sobre os polissacarídeos de *P. lutheri* e nem das outras espécies pertencentes à família Pavlovaceae – dos gêneros *Diacronema* e *Exanthemachrysis*.

Para as Prymnesiophyceae, também pertencente à divisão das haptophytas, duas microalgas tiveram seus polissacarídeos estudados *I. galbana* e *E. huxleyi*. Sendo que para *E. huxleyi* foi descrita uma glucana β -(1→6) ligada e ramificada em O-3 por di ou trissacarídeos de glucose ligados em β -(1→6) VARUM et al. (1986). Já *I. galbana* apresentou Glc β -(1→6) ligada ramificadas por dissacarídeos ligados β -(1→3) (RIZZI, 2010).

2.2.2.2 *Porphyridium cruentum* (RHODOPHYTA)

P. cruentum é de fácil cultivo, e seus exopolissacarídeos são de fácil extração (PAINTER, 1983). A biomassa tem aspecto gelatinoso – devido à presença de um polissacarídeo sulfatado - e cor arroxeada, devido à presença do pigmento

ficoeritrina. A parede celular de *Porphyridium sp.* é constituída por um polissacarídeo com uma parte solúvel que difunde no meio (exopolissacarídeo-EPS) e uma parte que permanece ligada à parede celular (ARAD e ONTMAN, 2010; GERESH et al., 2009; FUENTES et al., 2000).

Os exopolissacarídeos protegem as algas contra dessecação, temperatura, pH, salinidade e mudanças extremas de ambiente. Já bastante explorado quanto à estrutura, físico-química e atividades biológicas, o exopolissacarídeo de *Porphyridium sp* têm uma estrutura química proposta por GERESH et al. (2009) (FIGURA 7), sabe-se que são polímeros aniônicos constituídos por L-Gal, D-Glc, D-Xyl, D-GlcA relação molar 1,0:1,1:2,1:0,2, além de aproximadamente 10 % de grupos sulfato ligados à posição O-6 da D-Gal, e em menor quantidade açúcares metilados como o 3 ou 4 Me-Gal. Antes disso muitos outros pesquisadores já haviam isolado oligossacarídeos componentes deste polímero das espécies de *Porphyridium sp.* *P. aeruginosum* e *P. cruentum*, para obtenção de características parciais da molécula, visto que este é um polissacarídeo bastante complexo (LUPESCU et al., 1991; PERCIVAL e FOYLE, 1979; HEANEY-KIERAS e CHAPMAN, 1976; MEDCALFF et al., 1975). Estes polissacarídeos também já tiveram suas propriedades reológicas avaliadas devido à elevada viscosidade que apresentam (ESTESHOLA et al., 1998).

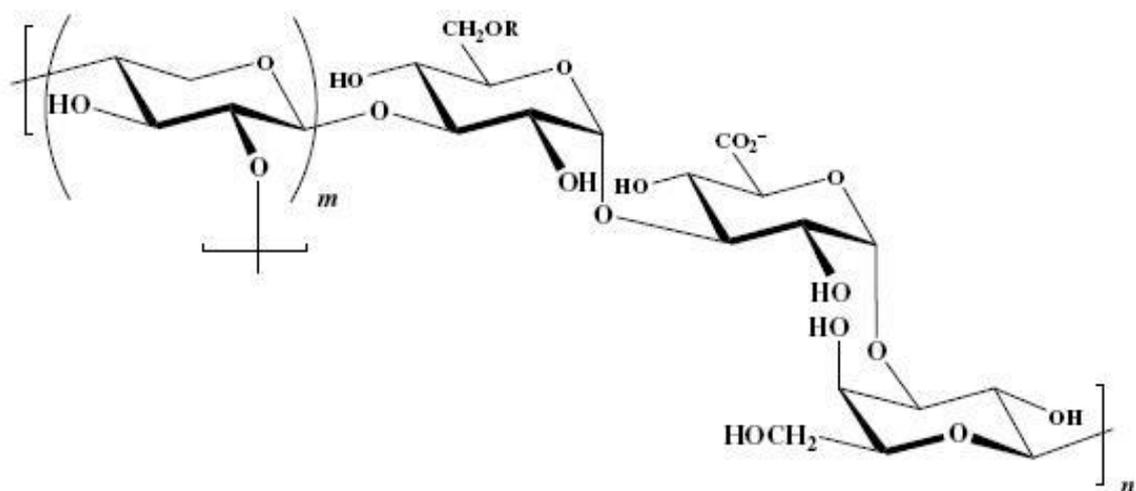


FIGURA 7- ESTRUTURA DA UNIDADE DE REPETIÇÃO ÁCIDA DO EXOPOLISSACARÍDEO DE *Porphyridium sp*

NOTA: R = H, SO₂O, TERMINAL GAL OU TERMINAL XYL, m = 2 OU 3

FONTE: GERESH et al. (2009)

O polissacarídeo que permanece ligado a parede celular, ou forma parte desta, ainda não teve sua estrutura completamente caracterizada devido a complexidade dos padrões de ligações, composição de monossacarídeos e a viscosidade exibida por esses polissacarídeos. Entretanto, GLOAGUEN et al. (2004) realizaram um estudo com fragmentos oligossacarídicos resistentes a fragmentação com lítio em etilenodiamina, uma técnica previamente descrita por LAU et al. (1987), que degrada seletivamente resíduos de ácidos glicosilurônicos pela clivagem das ligações glicosídicas entre uma unidade de açúcar neutro e uma unidade de açúcar ácido. Este estudo revelou dois oligossacarídeos principais (FIGURA 8), que compõem a estrutura do polissacarídeo ligado a parede celular, entretanto a questão da distribuição e periodicidade destas estruturas no polissacarídeo completo ainda está em aberto.

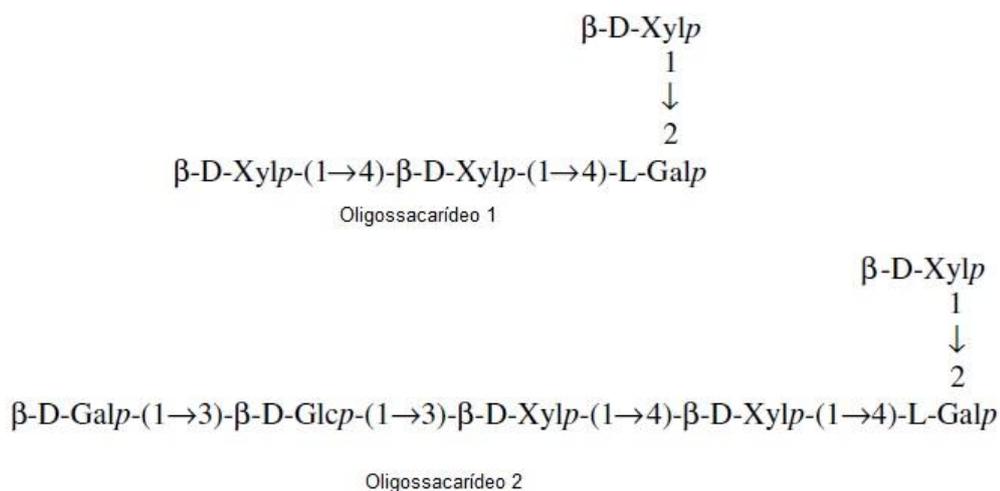


FIGURA 8 - ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DA DEGRADAÇÃO PARCIAL DO POLISSACARÍDEO DE *P. cruentum*
 FONTE: GLOAGUEN et al. (2004)

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE MICROALGAS

Microalgas têm recebido maior atenção nos últimos anos principalmente pelo seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides e outros pigmentos (com ação antioxidante), polissacarídeos sulfatados (descritos em geral como antivirais ou ainda antitumorais e anti-inflamatórios), esteróis (antimicrobianos)

(MINKOVA et al., 1996; MATSUI et al., 2003; HERRERO et al., 2006; GARDEVA et al., 2009; PLAZA et al., 2010) e imunoestimulantes (SUÁREZ et al., 2006).

A seguir serão apresentadas as principais atividades já descritas para estes microorganismos.

2.3.1 Atividade antioxidante

A definição de antioxidantes é entendida como “qualquer composto que em concentrações mínimas em relação ao substrato oxidável, seja capaz de inibir ou prevenir significativamente a oxidação do substrato” (FRANKEL E MEYER, 2000).

Sabe-se que o aumento da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) freqüentemente está associado ao aumento de danos aos tecidos, por oxidar moléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e o DNA. Por isso, nas últimas décadas houve um crescente interesse pelos suplementos nutricionais antioxidantes (ESTRADA et al., 2001).

Os antioxidantes devem apresentar um efeito protetor, prevenindo ou diminuindo a severidade de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças relacionadas ao processo de envelhecimento precoce, as quais são em geral mediadas pelas ERO's geradas durante o *burst* respiratório (PLAZA et al., 2008; GARCIA E GUERRERO, 2008; ESTRADA et al., 2001).

Antioxidantes podem exercer suas propriedades protetoras em diferentes estágios do processo de oxidação e por diferentes mecanismos. Existem dois tipos principais de antioxidantes os “primários” (captadores de radicais livres) e os “secundários” ou preventivos. O mecanismo antioxidante dos secundários pode incluir a desativação de metais, a inibição da lipoperoxidação de ácidos graxos e a regeneração dos antioxidantes "primários", extinguindo o oxigênio singlete (KOLEVA et al., 2002).

Vegetais superiores, em geral, e microalgas são boas fontes de antioxidantes naturais. Durante o processo de fotossíntese estes organismos absorvem luz solar que é convertida em energia química, mais tarde usada na conversão de CO₂ em carboidratos, e ao mesmo tempo, gerando oxigênio molecular que pode atingir localmente níveis de concentração elevados. Como o oxigênio é facilmente ativado a espécies reativas de oxigênio, pela radiação ultravioleta (UV) ou simplesmente pelo calor da luz solar, tanto plantas quanto microalgas

desenvolveram um mecanismo protetor o qual consiste na síntese de compostos antioxidantes capazes de minimizar a concentração destes ERO's e evitar lesões de oxidação ao seu próprio tecido (PLAZA et al., 2008; GARCIA E GUERRERO, 2008).

Os antioxidantes protegem nosso organismo contra os radicais livres formados naturalmente pelas reações do metabolismo ou induzidos por fatores externos como poluição, estresse, radiação UV, etc (PLAZA et al., 2008).

GARCIA E GUERRERO (2008) testaram a atividade antioxidante de *Porphyridium cruentum*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricornutum*, devido ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos (ácido fenolcarboxílico e seus derivados, catecois e flavonóides) e carotenóides. Neste trabalho estas espécies apresentaram alto potencial antioxidante, sendo que *C. vulgaris* e *P. tricornutum* apresentaram atividade antioxidante maior que o controle BHA (Butil Hidroxianisol) e BHT (Butil Hidroxitolueno). Além destas, a *Spirulina platensis* é outra espécie já muito utilizada na preservação de alimentos e prevenção da saúde, devido aos seus efeitos antioxidantes (HERRERO et al., 2005).

Em microalgas as substâncias antioxidantes podem ser das mais diversas naturezas, desde carotenóides, os mais abundantes e solúveis na fração mais apolar, até vitamina E e C, ficobiliproteínas e polifenóis (PLAZA et al., 2008).

2.3.2 Atividade imunoestimulante de glucanas

Polissacarídeos de diversas fontes podem ser capazes de modificar a resposta imunológica, sendo denominados de modificadores da resposta biológica (BRM "biological response modifiers"). A estimulação do sistema imune envolve a ativação de macrófagos, diferenciação de células-T, resposta proliferativa de células polimorfonucleares, interleucinas, produção de interferon e o aumento da atividade fagocítica (BOHN e BeMILLER, 1995).

Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, as D-glucanas do tipo β - (1 \rightarrow 3) e β - (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), extraídas de algumas espécies de fungos, revelaram-se compostos potentes, efetivos contra tumores e na terapia contra o câncer (SILVA et al., 2006). É importante levar em consideração a estrutura fina que diferencia as β -glucanas, como o grau de ramificação, e o comprimento das cadeias laterais, fatores que influenciam diretamente na atividade biológica (BAO et al., 2001).

RIZZI (2010) destaca o aumento da atividade fagocítica de macrófagos quando tratados com baixas concentrações de β -D-glucanas extraídas das microalgas *I. galbana* e *T. fluviatilis*, no mesmo trabalho o tratamento com α -D-glucanas não aumentou a atividade fagocítica significativamente. As microalgas marinhas representam uma ampla fonte destas biomoléculas para realização de um screening para novos compostos imunoestimulantes (STORSETH et al., 2005).

2.3.3 Atividade antiviral de polissacarídeos de microalgas

Os polissacarídeos isolados principalmente de microalgas vermelhas, como a *Porphyridium sp.*, *Porphyridium aerugineum* e *Rhodella reticulata*, têm mostrado atividade promissora contra uma ampla variedade de vírus. Em geral os polissacarídeos que exibem atividade antiviral são altamente sulfatados e possivelmente o seu efeito inibitório seja consequência da interação entre cargas negativas presentes nos polissacarídeos e as cargas positivas na superfície do vírus ou da célula do hospedeiro (HUHEIHEL et al., 2002; TALYSHINSKY et al. 2002; HUHEIHEL et al., 2001).

Já foram descritas atividades contra os vírus HIV, HSV e Varicela, principalmente *in vitro* e já foram realizados estudos *in vivo*, entretanto não foi elucidado ainda o mecanismo exato de ação destes polissacarídeos. Sabe-se que eles podem interferir já no início do estágio de infecção inibindo a adesão, fusão ou penetração nas células do hospedeiro, ou ainda em um estágio mais avançado evitando a síntese de proteínas virais. Já foi observada também a inibição da enzima transcriptase reversa, um tipo de DNA polimerase responsável pela síntese de DNA a partir de RNA viral em retrovírus como o HIV. Estes resultados mostram que o processo de inibição do vírus pode ocorrer tanto antes quanto depois da etapa de penetração (HUHEIHEL et al., 2002; TALYSHINSKY et al. 2002; HUHEIHEL et al., 2001).

2.4 APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

É fato conhecido que a dieta está diretamente ligada com a saúde dos seres humanos, e sabe-se que os alimentos contêm alguns componentes (vitaminas, minerais, polifenóis e micronutrientes tais como ácidos graxos ω -3) que são os

responsáveis pela manutenção ou promoção da saúde e bem-estar. A procura por novas fontes destes compostos impulsionou a pesquisa para o aprofundamento na área de caracterização e extração destes compostos bioativos (antioxidantes, antitumorais, antivirais, etc). As algas apresentam-se como uma nova fonte praticamente ilimitada de ingredientes funcionais não pela presença de um composto em particular, mas pela sua ampla diversidade e possibilidade de cultivo em diferentes condições o que pode levar ao enriquecimento de alguns bioativos (PLAZA et al., 2010).

Estes ingredientes bioativos, ou nutracêuticos, capazes de melhorar a saúde do indivíduo são conhecidos como ingredientes funcionais, e podem de acordo com as últimas pesquisas estar presentes em micro e macroalgas, o que as tornaria, novas fontes naturais destes compostos, podendo seus compostos ser extraídos para formulação de alimentos funcionais ou suplementos (HERRERO et al., 2006; PLAZA et al., 2008; ZUBIA et al., 2009).

Por definição, alimento funcional é aquele que contém um ou mais ingredientes funcionais que estão ausentes no alimento similar convencional, ou em concentrações mais baixas. Suplementos alimentares são aqueles comercializados em pílulas ou tabletes, que contém esses ingredientes capazes de melhorar a saúde. No contexto de formulação de alimentos funcionais ou suplementos, preferem-se fontes naturais, como plantas e algas, aos compostos sintéticos (PLAZA, et al., 2008; ZUBIA et al., 2009).

Além da consolidada produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico – EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas (DERNER et al., 2006)

As principais formas de inserção das microalgas na alimentação humana são os suplementos alimentares (formulações em pó, tabletes, capsulas ou extratos), podendo também ser incorporadas em massas, *snacks*, chocolates ou gomas e bebidas. As principais espécies utilizadas para estes fins são *Arthrospira*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (PULZ e GROSS, 2004; DERNER et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente existe uma grande demanda de compostos antioxidantes tanto para o uso na indústria de alimentos como na formulação de suplementos nutricionais que ajam protegendo as células de danos oxidativos, os quais são responsáveis por doenças cardiovasculares, cânceres, doenças crônicas não degenerativas, entre outras.

Sabe-se que as microalgas são organismos capazes de produzir grandes quantidades de compostos antioxidantes a necessidade de protegerem-se das ERO's que produzem em razão da intensa e continua radiação UV à qual estão expostas.

Dessa forma a pesquisa por compostos antioxidantes nestes microorganismos torna-se de alta relevância, tanto para a área da saúde quanto à indústria de alimentos uma vez que permite o conhecimento de novas fontes para suprir a demanda por esses compostos. É importante destacar que, este tipo de pesquisa ainda não tinha sido realizada para as espécies utilizadas neste trabalho.

Além disso, o conhecimento da estrutura química dos polissacarídeos de duas microalgas de diferentes divisões abre um campo para o screening destes polissacarídeos em diferentes estudos de atividade biológica como imunoestimulante, antiviral entre outras. Para a descoberta de novos compostos com potencial uso biotecnológico na formulação de novos fármacos, por exemplo.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral identificar espécies de microalgas com elevado potencial antioxidante e caracterizar a estrutura dos polissacarídeos de *Pavlova lutheri* e de *Porphyridium cruentum*.

Neste contexto estabelecem-se os seguintes objetivos específicos:

- realizar extrações seqüenciais das microalgas e testar a atividade antioxidante de cada extrato;
- extrair e purificar os polissacarídeos de *P. lutheri* e *P. cruentum*;
- determinar, por métodos químicos e espectroscópicos, a composição e estrutura dos polissacarídeos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MICROALGAS

As microalgas utilizadas no presente estudo *Chaetoceros mulleri* (Lemmermann), *Isochrysis galbana* (Parke), *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J.Hibberd, *Pavlova lutheri* (Droop), *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), *Thalassiosira fluviatilis* (Hustedt), *Tetraselmis chuii* (Butcher), *Tetraselmis gracilis* (Butcher) e *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher são provenientes da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar, da Universidade Federal Fluminense (UFF) e foram cedidas gentilmente pelo prof. Sérgio Lourenço da mesma universidade. Foram cultivadas no Grupo Integrado de Aqüicultura e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Paraná (GIA-UFPR). Além destas foi utilizada também neste trabalho a espécie *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nageli que foi cedida gentilmente pelo Prof. Roberto Derner do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o preparo do meio de cultura foi utilizada água marinha (salinidade 30 UPS) filtrada através de filtros de celulose de porosidade 0,5 µm. Além disso, a água também passou por um processo de desinfecção com hipoclorito de sódio (5 ppm), por 24 horas, seguido de neutralização com tiosulfato de sódio (BECKER, 2008). As células foram cultivadas em meio de cultura Guillard f/2 modificado (LOURENÇO, 2006), seguindo o sistema de cultivo microalgal tipo “batch” (BECKER, 2008). Os meios foram filtrados com papel de filtro e autoclavados.

As cepas foram mantidas no Setor de Microalgas do Laboratório de Pesquisa em Organismos Aquáticos (LAPOA), em sala climatizada a 18-20 °C, com iluminação constante, a potência luminosa 5500 LUX. Seguindo procedimento habitual de esterilização do laboratório, as células foram repicadas em meio estéril para erlenmeyers de 250 mL, sendo, após dois dias levadas a 1,5 L, onde receberam luz e aeração constante, permanecendo em crescimento por sete dias quando foi dado o recolhimento para as análises bioquímicas.

As microalgas foram isoladas do meio de cultivo através da centrifugação a 10200 g. O sobrenadante foi separado e a biomassa congelada e liofilizada. A biomassa liofilizada constituiu o material utilizado para as extrações.

5.3 EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

As extrações foram realizadas com amostras liofilizadas a 2,5 g% (cerca de 1 g de biomassa em 40 mL de solvente extrator) a temperatura ambiente, protegido da luz, sob agitação e pressão atmosférica por aproximadamente 3 horas. Foram feitas extrações seqüenciais com diferentes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, etanol e água. A extração com cada solvente foi feita duas vezes e o extrato da segunda extração somado ao primeiro (Adaptado de GARCIA E GUERRERO, 2008).

Os extratos foram submetidos à filtração a vácuo com filtro de 0,45 µm, exceto o extrato aquoso, que foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos, à 15°C. Os filtrados/sobrenadantes das duas extrações foram somados e reservados. O material proveniente das extrações teve o conteúdo do solvente totalmente evaporado com auxílio de atmosfera de nitrogênio, exceto o extrato aquoso que foi liofilizado. Na seqüência os extratos foram armazenados à -18°C até análise. A cada filtragem e centrifugação (extração com água) foi tomado o cuidado de recuperar o máximo possível a biomassa retida no filtro e pellet para próxima extração.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de microalgas foram utilizados três métodos diferentes: atividade antioxidante total (β -caroteno- ácido linoléico), poder redutor e atividade inibitória de radicais livres (DPPH). A atividade antioxidante de cada extrato determinada por cada um dos métodos foi comparada às atividades dos padrões: BHA (sintético), BHT (sintético) e α -tocoferol (natural) na concentração de 100 µg/mL.

5.4.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno- ácido linoléico)

A atividade antioxidante de cada fração foi determinada pelo método do conjugado (β -caroteno- ácido linoléico) (MILLER, 1971), com ligeiras modificações.

Neste método é realizado um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do β -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo (como o linoléico), ou seja, ao reagir com estes produtos o β -caroteno perde sua coloração alaranjada. Desta forma, a atividade antioxidante foi medida pela capacidade que a amostra testada possui de minimizar a oxidação do β -caroteno e ácido linoléico.

Primeiramente, 2 mg de β -caroteno foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. Em seguida 1 mL desta solução foi adicionada a um frasco contendo 0,02 mL de ácido linoléico e 200 mg de Tween-80. Após remoção do clorofórmio, em atmosfera de nitrogênio, foram adicionados lentamente ao resíduo semi-sólido 50 mL de água destilada saturada com oxigênio (preparada pelo borbulhamento de ar comprimido durante 30 minutos) sob agitação vigorosa para a formação da emulsão β -caroteno- ácido linoléico, a qual foi preparada apenas pouco tempo antes de cada experimento, podendo ser mantida no escuro em temperatura ambiente por até 90 minutos. Placas de poliestireno de 96 micropoços foram utilizadas neste experimento às quais foram aplicados 50 μ L por poço de amostra (teste) ou padrão preparado em etanol e em seguida 200 μ L de emulsão. Os extratos foram preparados na concentração 50, 250 e 500 μ g/mL, sendo que as amostras aquosas foram dissolvidas em água, para as quais foi preparado um branco com água. Os demais extratos, hexânicos e etanólicos foram preparados em etanol para os quais, além do padrão, foram preparados um branco com etanol. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca marca TECAN infinite M 200 a 450 nm. Foi feita uma leitura no tempo zero, considerado o tempo de adição da emulsão, e outra leitura após duas horas em estufa a 50°C. Todos os testes foram realizados em triplicata. A capacidade antioxidante das amostras foi avaliada como percentual de inibição do branqueamento do β -caroteno calculada através da seguinte equação:

$$AA = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0' - A_t')] \times 100$$

Onde,

A_0 : Absorbância da amostra no tempo zero

A_0' : Absorbância do branco no tempo zero

A_t : Absorbância da amostra no $t = 2h$

A_t' : Absorbância do branco no $t = 2h$

5.4.2 Poder Redutor

O poder redutor foi determinado pelo método KUDA et al. (2005), como descrito por ZUBIA et al. (2009).

Alíquotas de 200 μL dos extratos nas concentrações de 50, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ foram misturadas em 200 μL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6) e 200 μL de ferricianeto de potássio 1%. A mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos, e logo após o resfriamento foram adicionados 200 μL de ácido tricloroacético (10% p/v). Em seguida alíquotas de 125 μL desta solução foram transferidas para placas de poliestireno de 96 micropoços, e foi adicionado ainda a cada poço 20 μL de cloreto férrico (0,1%). A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca marca TECAN infinite M 200 a 620 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Foi preparado um branco com água destilada (para os extratos aquosos solubilizados em água) e outro com etanol (para os demais extratos e os padrões). Maiores valores de absorbância indicam maior poder redutor.

5.4.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada quanto à capacidade de doação de hidrogênios, ou seja, inativação de radicais livres, através do método do radical estável DPPH (*α, α diphenyl - β - picrylhydrazil*) descrito por BRAND-WILLIAMS et al., 1995.

Em uma placa de poliestireno de 96 micropoços, 22 μL de amostra nas concentrações de 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, foram misturados a 200 μL de uma solução de DPPH (25 mg/L), preparada apenas pouco tempo antes dos ensaios. Devido às amostras terem cor, foi preparado um branco da amostra com 22 μL da amostra e 200 μL de solvente somente. As placas foram incubadas por duas horas em

temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi feita em leitor de microplaca marca TECAN infinite M 200 a 515 nm. Também foi preparado um branco do DPPH (200 µL de DPPH e 22 µL de solvente somente). A capacidade de inativação do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$I (\%) = \frac{[(A_0) - (A_1 - A_2)] * 100}{A_0}$$

Onde,

I: Inativação do radical DPPH

A₀: Absorvância do branco do DPPH

A₁: Absorvância na presença dos extratos

A₂: Absorvância do branco da amostra

5.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA MICROALGAL

5.5.1 Extração dos polissacarídeos de *Pavlova lutheri*

A extração aquosa seqüencial realizada com a biomassa da espécie *P. lutheri* seguiu o protocolo estabelecido por RIZZI (2010) para uma espécie da mesma divisão *Isochrysis galbana*.

A biomassa liofilizada foi ressuspensa em água destilada (2 g%) e submetida à extração aquosa por 2 h a 80 °C, sob agitação mecânica. Após extração a solução foi centrifugada a 12000 g, por 20 min, a 15°C, em seguida foram adicionados 3 volumes de etanol ao sobrenadante. O precipitado, formado pela adição de etanol, foi isolado por centrifugação a 12000 g por 15 min a 4 °C, ressolubilizado em água, dialisado em membrana com limite de exclusão de 12-14 kDa e liofilizado para obtenção do extrato aquoso PAQ. O sobrenadante etanólico foi concentrado em rota evaporador à 30 °C, dialisado em membrana de 1 kDa e liofilizado, rendendo a fração PAQ-SE.

A biomassa residual da extração aquosa foi submetida à extração alcalina (2 g%), com NaOH 0,5 M, após adição de NaBH₄ (5% em relação a biomassa - com objetivo de impedir a degradação da molécula, na presença de base, a partir da ponta redutora) por 2 h a 80°C, sob agitação mecânica. O extrato foi centrifugado

(12000 g, por 20 min, a 15°C) e ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de etanol, novamente centrifugado e o precipitado obtido foi então ressolubilizado em água, dialisado e liofilizado para obtenção do extrato alcalino PAL.

5.5.2 Extração dos polissacarídeos de *P. cruentum*

A extração aquosa foi realizada a 2,5 g%, em agitação mecânica a temperatura ambiente, por 3 h. A amostra foi centrifugada a 12000 g, por 20 min, a 15°C. O sobrenadante teve seu volume reduzido em rota-evaporador. Em seguida o extrato foi dialisado em membrana de 12 a 14 kDa, congelado e liofilizado, rendendo a fração PCAD.

O resíduo aquoso foi submetido à nova extração aquosa, a 80 °C, por 2 h. Em seguida o material foi centrifugado, e o sobrenadante foi tratado com EtOH (3 volumes), e centrifugado. O precipitado (fração polissacarídica) foi dialisado e liofilizado, rendendo a fração PCAH.

O resíduo aquoso resultante foi submetido à extração alcalina, com NaOH 0,5 M, após adição de NaBH₄ (5% em relação a biomassa), a 80 °C, por 2 h, e em seguida centrifugado. O sobrenadante foi precipitado com etanol e centrifugado. O precipitado resultante foi dialisado e liofilizado, rendendo a fração PCAL.

5.6 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POLISSACARÍDICOS

5.6.1 Tratamento dos polissacarídeos com KCl

As frações polissacarídicas brutas, obtidas tanto de *P. lutheri* quanto de *P. cruentum*, foram solubilizadas em água (0,25 g%), após solubilização foi adicionado KCl sólido até atingir a concentração de 2 M, mantido sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2h, na sequência a amostra permaneceu em repouso por 6 horas à 2° C (CEREZO, 1967). Os extratos polissacarídicos tratados com KCl 2M foram centrifugados, e os respectivos sobrenadantes e precipitados dialisados contra água destilada e liofilizados. As amostras tratadas foram renomeadas com adição do sufixo FS nas frações solúveis em KCl 2M e FI nas insolúveis, ou precipitadas com KCl 2M.

5.6.2 Purificação por ultrafiltração em membrana

Nesta técnica é realizada a filtração em membrana de celulose (Millipore), com limite de exclusão de 3 kDa. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração SARTORIUS (modelo 16249), acoplado com cilindro de ar comprimido. Neste método, a fração PAL foi solubilizada em NaOH 0,1M (2 g%) e submetidos à filtração em cilindro, rendendo uma fração retida na membrana (PAL-R) e uma eluída (PAL-E).

5.7 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *p.cruentum*

5.7.1 Cromatografia de troca-iônica

A fração polissacarídica solúvel em KCl 2 M PCAD-FS aproximadamente 90 mg, foi submetida a fracionamento através de cromatografia de troca-iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel (9 cm x 5cm), utilizando-se como eluente: água e soluções de NaCl de concentração crescente - 0,5; 1,0 e 1,5 M (aproximadamente 3x o volume da coluna de cada eluente). A eluição foi monitorada pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al.,1956) rendendo as frações FS-w, FS-1, FS-2 e FS-3, respectivamente.

5.8 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

5.8.1 Métodos químicos

5.8.1.1 Dosagem de açúcares totais

A dosagem de açúcares totais dos polissacarídeos foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), sendo utilizado como padrão glucose na concentração 1 mg/mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

5.8.1.2 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas nas frações obtidas foi realizada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951), sendo a solução de BSA (soro-albumina bovina cristalina) utilizada como padrão na concentração de 1 mg/mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 660 nm.

5.8.1.3 Dosagem de grupamentos sulfatos

O teor de grupos sulfato nas frações foi determinado através do método turbidimétrico da gelatina-BaCl₂ após hidrólise das amostras com HCl 1 M por 5 h a 105°C, segundo o método de DODGSON e PRICE (1962). Foi utilizado como padrão sulfato de sódio na concentração de 100 µg/0,1mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 360 nm.

5.8.1.4 Dosagem de ácidos urônicos

Para determinação de ácidos urônicos dos polissacarídeos foi utilizado o método do m-hidroxibifenil, descrito por FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991). Foi utilizado ácido glucurônico como padrão e a leitura feita em espectrofotômetro em 525 nm.

5.8.1.5 Hidrólise ácida Total

Para determinação da composição monossacarídica os polissacarídeos sofreram hidrólise ácida total. Aproximadamente 1,5 mg de polissacarídeo foram solubilizados em 0,5 mL TFA 2 M, e mantido em estufa a 100 °C por 2 h. Na sequência, o ácido foi seco em atmosfera de nitrogênio, e a amostra ressolubilizada em 0,5 mL de água destilada. Os monossacarídeos foram então reduzidos com NaBH₄ por 12 h e neutralizados com ácido acético diluído até pH 5. O material seco

em atmosfera de nitrogênio foi submetido a co-destilação em metanol (3-4x). Os alditóis foram acetilados com 0,5 mL de anidrido acético por 1 h a 120 °C em estufa e os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por CG-EM.

5.8.1.6 Metilação

O processo de metilação do polissacarídeo foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização em DMSO (5 mg/mL) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg), sendo a mistura submetida a agitação magnética vigorosa por 30 min. Em seguida, foi adicionado iodeto de metila (0,2 mL), e mais 30 min sob agitação vigorosa. Este processo seqüencial de adição de NaOH e iodometano foi repetido por três vezes. Após interrupção da reação com água, a amostra foi neutralizada, com ácido acético diluído, dialisada e liofilizada.

A hidrólise do polissacarídeo metilado foi realizada de acordo com as condições descritas para glucanas, por BAO et al. (2001). A amostra (1,5 mg) foi hidrolisada com ácido fórmico 90% (0,5 mL), por 6 h a 100 °C e, em seguida, com TFA 2 M (0,5 mL) por 2 h a 80 °C, sendo posteriormente reduzida e acetilada (como descrito no item anterior) para análise por CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

5.8.2 Métodos cromatográficos e espectrométricos

5.8.2.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

O método foi realizado em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massa da marca SATURN 200 R, modelo ITD 800. O CG é equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) modelo DB-225, marca J.W. O gás de arraste utilizado é o hélio, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetindo-se a cada 1/8 de segundo, e com relação massa/carga (m/z) entre 90 a 220.

Este método foi utilizado para determinação da composição monossacarídica feita por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação da amostra, e os padrões - ribose, arabinose,

xilose, manose, galactose e glucose. E também para quantificação de acetatos de alditóis parcialmente metilados (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparado com padrões (JANSON et al., 1976; SASSAKI et al., 2005).

5.8.2.2 Cromatografia de exclusão estérica de alto rendimento (HPSEC-MALLS-RID)

As análises de homogeneidade dos extratos obtidos foram realizadas utilizando o cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial (RID) WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS). Para isto, foram preparadas soluções de 1 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água MilliQ, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,22 μm . A fase móvel utilizada foi nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm). A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500 μL de solução com fluxo de 0,6 mL/min. Os dados foram analisados através do programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY).

5.8.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectroscópio utilizado para as análises de RMN, foi da marca BRUKER, Modelo DRX 400, série Avance, à temperatura entre 50 e 70°C. As amostras solubilizadas em D_2O , em concentrações entre 20 e 30 mg/mL, foram analisadas em probes de 5 ou 10 mm e tiveram seus deslocamentos químicos expressos em ppm, determinados utilizando acetona como padrão interno, sendo para as análises de ^{13}C 30,2 ppm.

Os espectros de RMN de ^{13}C e RMN ^{13}C DEPT foram obtidos utilizando a frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante das microalgas estudadas e na seqüência os resultados obtidos para a caracterização estrutural de polissacarídeos de *P. lutheri* e *P. cruentum*, separadamente, já que cada microalga recebeu diferentes tratamentos.

6.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies inicialmente cultivadas e após o período de crescimento (sete dias), as células foram isoladas do meio de cultura por centrifugação e liofilizadas. O rendimento, calculado em relação ao volume de cultivo, estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – RENDIMENTO DA BIOMASSA EM (g/L) DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

<i>Espécie</i>	<i>Rendimento (g/L)</i>
<i>Chaetoceros mulleri</i>	0,5
<i>Isochrysis galbana</i>	0,4
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0,3
<i>Pavlova lutheri</i>	0,4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0,7
<i>Porphyridium cruentum</i>	1,1
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	0,6
<i>Tetraselmis chuii</i>	0,5
<i>Tetraselmis gracilis</i>	0,6
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,4

As espécies estudadas apresentam perfil diverso de rendimento de biomassa em relação ao volume de cultivo em litros. Sabe-se que a quantidade de biomassa ao final de um cultivo é diretamente influenciada pelas condições, sendo que cada espécie possui especificidades em relação à temperatura e pH principalmente. Além disso, também são variáveis importantes o número de dias total de cultivo, e o número de células no inoculo inicial, o qual não deve ser muito

baixo, pois interfere no período de adaptação da curva de crescimento de microalgas e nem muito alto, pois pode prejudicar a iluminação de todas as células. Cada espécie possui ainda a sua própria taxa de crescimento a qual expressa a velocidade na qual a espécie cresce.

O rendimento da biomassa também pode ser mascarado pelo tamanho da célula, variável entre as espécies, e a composição da parede celular. Sendo que espécies com células maiores e flageladas, ou mais pesadas devido à capa de sílica podem apresentar rendimento maior, mesmo tendo número de células menor em relação a uma espécie com outras características.

O fato das condições de cultivo e dia de colheita ter sido padrão para todas as espécies, além do número de células no inóculo inicial, são variáveis que podem ter interferido nos rendimentos obtidos.

As microalgas avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante sofreram extração seqüencial para obtenção dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos, os quais foram diluídos nas concentrações de 50, 250 e 500 µg/mL e avaliados pelos testes de Poder Redutor, DPHH e β-caroteno - ácido linoléico (FIGURA 9).

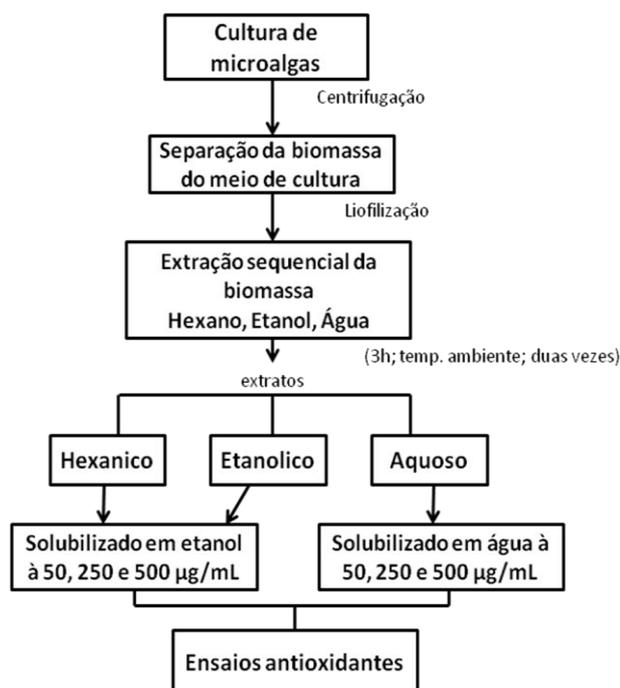


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS UTILIZADOS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
FONTE: O autor.

A escolha dos solventes para a extração hexano, etanol e água foi feita de acordo com a polaridade para a extração de moléculas apolares, de média polaridade e polares, respectivamente. Visto que, em microalgas os compostos já descritos que exibem maior atividade antioxidante são principalmente carotenóides e seus derivados (altamente apolares), compostos fenólicos e, em menor ocorrência, polissacarídeos. O rendimento das extrações variou em relação ao solvente utilizado sendo que maiores rendimentos foram obtidos na extração etanólica e aquosa, onde para a maior parte das espécies foram obtidos cerca de 20 a 30 % de rendimento, podendo chegar até 50%, como no caso do extrato aquoso da microalga *Tetraselmis gracilis*. Os extratos hexânicos foram os que apresentaram menor rendimento em todas as espécies variando de 2 a 8% (TABELA 3).

TABELA 3 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS HEXANICOS (HEX), ETANÓLICOS (ETN) E AQUOSOS (AQU) DAS NOVE ESPÉCIES DE MICROALGAS PESQUISADAS.

Espécies	Extratos (%)		
	Hex	Etn	Aqu
CHM ¹	3,3	13,8	1,2
ISO ²	7,8	32,4	14,6
NOC ³	7,9	24,9	17,6
PL ⁴	4,8	22,2	27,1
PHT ⁵	4,0	26,3	36,6
TFL ⁶	7,9	23,5	23,8
TC ⁷	3,8	28,4	26,6
TG ⁸	5,1	16,9	50,5
TS ⁹	2,0	14,2	14,5

¹: CHM: *Chaetoceros mulleri*, ²: ISO: *Isochrysis galbana*, ³: NOC: *Nannochloropsis oculata*, ⁴: PL: *Pavlova lutheri*, ⁵: PHT: *Phaeodactylum tricornutum*, ⁶: TFL: *Thalassiosira fluviatilis*, ⁷: TC: *Tetraselmis chuii*, ⁸: TG: *T. gracilis*, ⁹: TS: *T. suecica*.

De acordo com BAZYKINA et al. (2002), que realizou um estudo para otimização das condições de extração em diversas matérias-primas vegetais, o aumento da constante dielétrica do solvente extrator promove o maior rendimento na extração, e ainda uma boa atividade antioxidante. Isto pode explicar o elevado rendimento nos extratos obtidos a partir de etanol e água como extrator.

As condições ótimas para a extração de compostos antioxidantes descritas por BAZYKINA et al. (2002) são: o uso de etanol ou acetato de etila como extrator,

em extração seqüencial, a temperatura de ebulição do solvente, por no máximo 5 h. A concentração pode ser de até 10 g%.

A metodologia de extração pode interferir não só no rendimento dos extratos, mas também na avaliação da atividade antioxidante, visto que estas moléculas são bastante sensíveis a exposição ao calor e a luz e podem ser facilmente degradadas se expostas por muito tempo ao ambiente. Por esse motivo tem sido descritas várias metodologias de extração de compostos antioxidantes, principalmente de microalgas, sendo que as mais comuns são as extrações em aparelho de Soxhlet ou ainda por um método conhecido como *Accelerated solvent extraction* descritos na maior parte dos trabalhos mais atuais. Neste último método a extração é realizada por um sistema totalmente automatizado capaz de extrair compostos usando um solvente ou uma mistura de solventes, em alta pressão e temperatura. O que torna o processo mais rápido, cerca de 20 minutos, e diminui o volume de solvente utilizado. Esse procedimento já foi descrito para obtenção de carotenóides de *Haematococcus pluvialis* e extração de compostos antioxidantes de *Spirulina platensis* e algumas macroalgas (JAIME et al., 2010; HERRERO et al., 2005; ZUBIA et al., 2009).

Quanto à composição química dos extratos antioxidantes BAZYKINA et al. (2002) observaram que o acetato de etila extrai a maior parte das moléculas com maior potencial antioxidante como ácidos fenolcarboxílicos, ácido cafeíco, ácido clorogênico e neoclorogênico enquanto o etanol, um solvente mais polar que o anterior, extrai mais flavonóides e seus derivados glicosídeos, catecois e taninos. Enquanto GARCIA E GUERRERO (2008) atribuem o alto potencial antioxidante do extrato etanólico de *Chlorella vulgaris*, superior ao controles BHT e BHA, ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados encontrados neste extrato.

Levando-se em consideração que a utilização de um método unidimensional não reflete a complexidade dos sistemas biológicos (FRANKEL E MEYER, 2000) foram utilizados três métodos que avaliam diferentes mecanismos de proteção antioxidante, de maneira rápida, simples e eficaz (ZUBIA et al., 2009).

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes serão apresentados separados por metodologia e as microalgas foram agrupadas de acordo com a divisão a que pertencem clorofitas (TC, TG e TS - *Tetraselmis chunii*, *T. gracilis* e *T. suecica*, respectivamente), ocrofitas (CHM, PHT, TFL e NOC - *Chaetoceros mulleri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Nannochloropsis oculata*,

respectivamente) e haptofitas (PL e ISO - *Pavlova lutheri* e *Isochrysis galbana*, respectivamente) para fins de visualização dos resultados.

6.1.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno- ácido linoléico)

Este método é baseado na perda da coloração amarelada do β -caroteno devido à sua reação com radicais que são formados pela oxidação do ácido linoléico em uma emulsão. Esta perda de coloração, ou o branqueamento do β -caroteno como é comumente descrita, é medida em espectrofotômetro após 2 h de reação. Sendo que na presença de antioxidantes esta diminuição na absorbância deve ser minimizada, em relação ao sistema sem antioxidantes. Este método tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de diversas amostras tanto de extratos vegetais como de compostos puros. Para estimativa da atividade antioxidante os valores de absorbância são aplicados em uma fórmula (descrita na secção 5.4.1) e o resultado é expresso em coeficiente de atividade antioxidante. Os resultados obtidos para as microalgas estudadas são apresentados nas figuras 10 e 11, sendo que valores negativos são considerados com efeito pró-oxidante, ou seja, aquele que favorece a oxidação.

O Mecanismo de proteção antioxidante pode ser por inibição da oxidação da cadeia lipídica, por ligação a íons de metais de transição que catalisam a decomposição do peróxido, ou também pela retenção de radicais livres (ZUBIA et al., 2009; FRANKEL E MEYER, 2000).

Os resultados obtidos para os extratos de microalgas testados por este método não foram superiores aos padrões sintéticos BHA e BHT e nem ao composto natural α -tocoferol, os três na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, em nenhuma espécie e nenhuma das concentrações testadas (50, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$).

Para as espécies da divisão Chlorophyta (FIGURA 10) observa-se que tanto *Tetraselmis suecica* como *T. gracilis* apresentaram resultados muito próximas e muito abaixo dos valores obtidos para os padrões, independente das concentrações testadas. A microalga *T. Chuii* destacou-se das outras, pois na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ o extrato hexânico apresentou atividade próxima de 50% dos padrões, os extratos etanólico e aquoso também apresentaram atividade superior aos extratos das outras espécies de Clorófitas, embora tenham apresentado valores menores que o extrato hexânico. Entretanto a atividade antioxidante de *T. Chuii* declinou

bastante para todos os extratos na concentração de 250 µg/mL e foi negativa, ou pró-oxidante em 500 µg/mL, o que indica que para os extratos desta espécie o aumento da concentração a partir de um limite é prejudicial à atividade antioxidante.

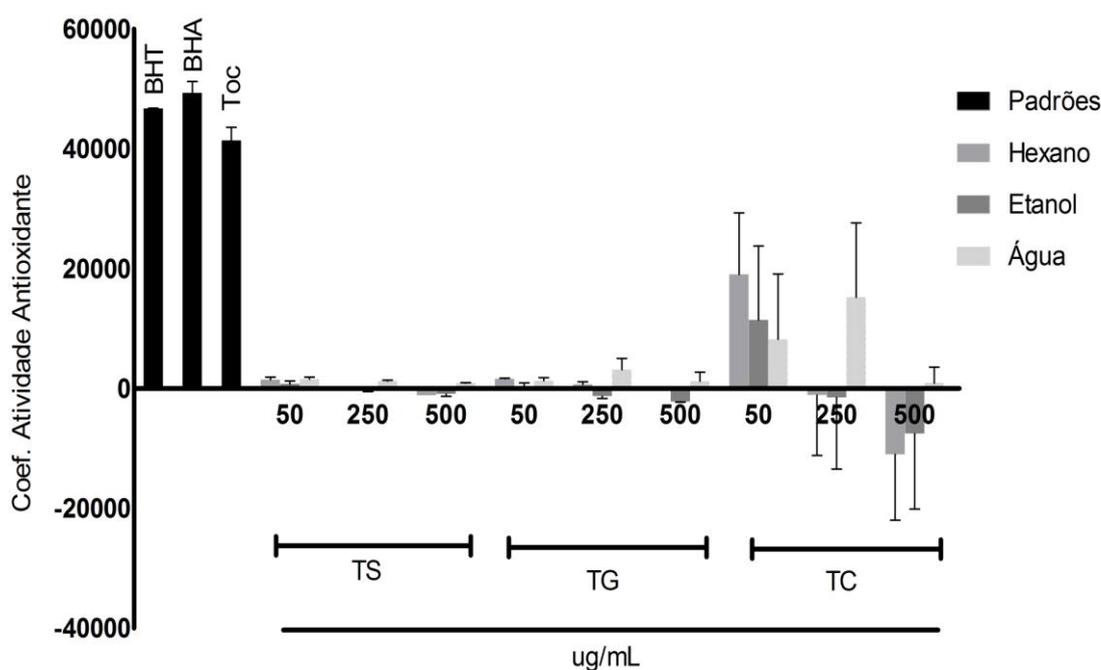


FIGURA 10 – COEFICIENTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CLOROFITAS *TETRAELMIS SUECICA*, *TETRAELMIS GRACILIS*, *TETRAELMIS CHUII*, PELO MÉTODO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (β -CAROTENO- ÁCIDO LINOLÉICO)

Para as espécies da divisão Ocrophyta (FIGURA 11-a), todos os extratos nas três concentrações testadas apresentaram-se muito abaixo dos padrões utilizados, entretanto nenhum deles apresentou efeito pró-oxidante. Estes resultados contrariam os resultados obtidos por GARCIA E GUERRERO (2008) para o extrato etanólico da microalga *P. tricornutum* citado como superior aos controles BHT e BHA. Da mesma forma os resultados obtidos para as haptofitas (FIGURA 11-b) *P. lutheri* e *I. galbana* não superaram nem 50 % do valor de coeficiente de atividade antioxidante dos padrões testados. A espécie *P. lutheri* apresentou comportamento similar ao apresentado pela Clorophyta *T. chuii* onde os extratos hexânico e etanólico apresentaram atividade antioxidante superior ao extrato aquoso, em todas as concentrações testadas. Além disso, o aumento da concentração da solução

testada apresentou efeito negativo, uma vez que a atividade diminuiu na dose de 250 $\mu\text{g/mL}$ e foi pró-oxidante na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

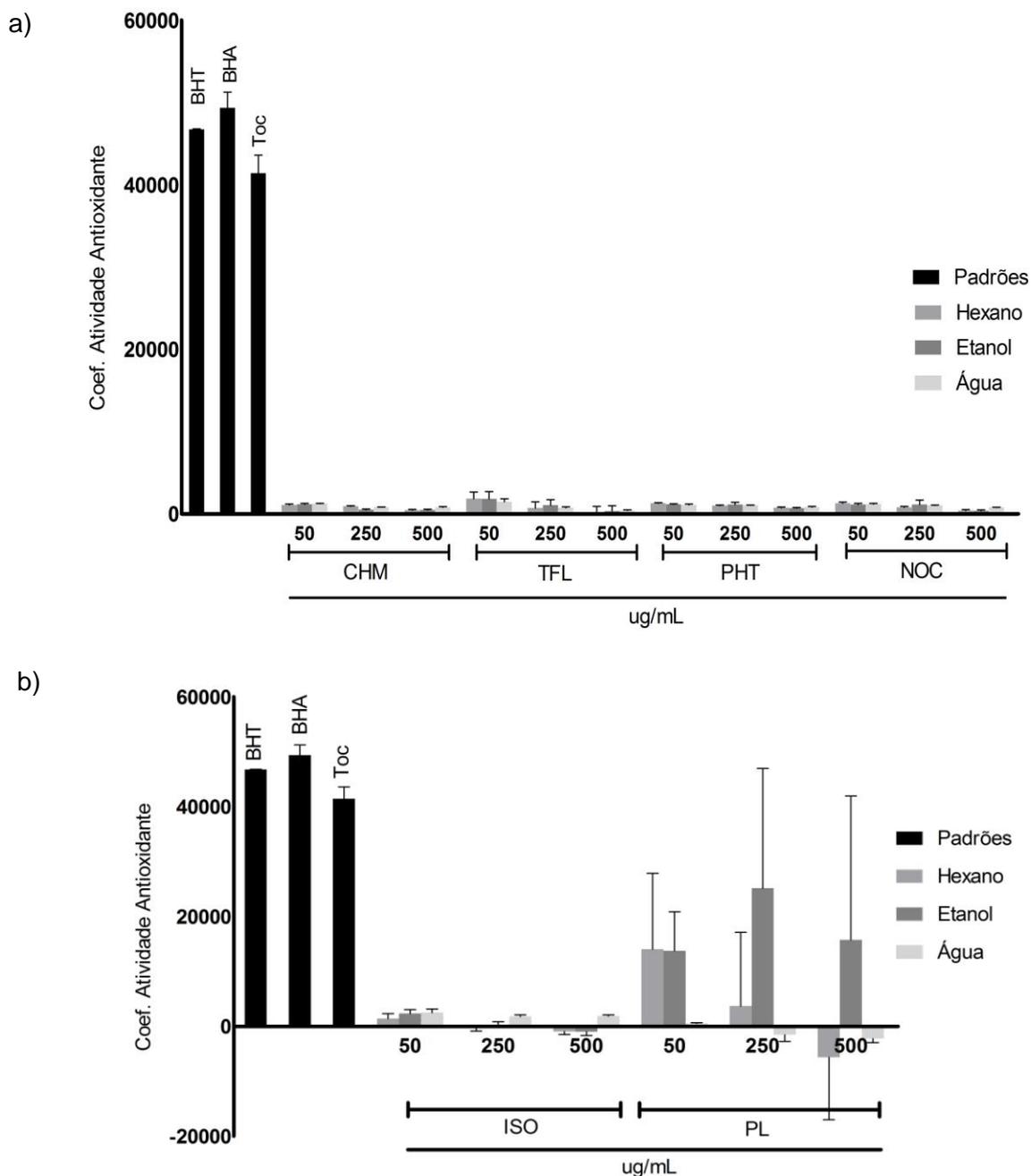


FIGURA 11 – COEFICIENTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (β -CAROTENO- ÁCIDO LINOLÉICO) DAS OCROFITAS (a) E DAS HAPTOFITAS (b)

Os resultados observados na avaliação do potencial antioxidante pelo método do β -caroteno-ácido linoléico não foram positivos para a maior parte das

espécies, sendo independente da dose ou do tipo de extrato aplicado. Os resultados de baixa atividade antioxidante podem ser relacionados ao mecanismo de reação destas moléculas, indicando que a inibição da peroxidação lipídica não seria o mecanismo de ação utilizado por estes compostos. O fato de algumas amostras terem apresentado efeito pró-oxidante pode ser devido à dose, ou ainda às condições experimentais. Além disso, a polaridade dos extratos pode ter sido também um fator importante nos resultados obtidos por este método, pois o uso de uma emulsão de lipídios introduz um número maior de variáveis que influenciam na oxidação (KOLEVA et al., 2002).

Este método apresenta um grande paradigma em relação ao complexo interfacial que influencia no comportamento e no resultado dos antioxidantes. Um fenômeno conhecido como “paradoxo polar” mostra que compostos apolares apresentam uma forte propriedade antioxidante em emulsões, pois eles concentram-se na superfície lipídio-ar. Por outro lado antioxidantes polares permanecem na fase aquosa e por isso são menos efetivos na proteção do lipídio (KOLEVA et al., 2002; FRANKEL E MEYER, 2000). Isso justifica a maior atividade antioxidante dos extratos hexânicos, principalmente nas espécies de microalgas *T. chuii* e *P. lutheri* que apresentaram uma atividade superior as demais. Pois devido a sua característica apolar, mais moléculas apolares teriam ficado solúveis neste extrato.

Além disso, observa-se a baixa atividade antioxidante de solventes polares como etanol e água em todas as espécies, que também pode ser explicado pela presença de sais de metais presentes na microalga e solúveis em água que podem transformar compostos como os flavonóides em pró-oxidantes. Em alguns casos, entretanto a posição dos grupos hidroxila em uma molécula pode ser mais importante que a polaridade (KOLEVA et al., 2002).

Visto que extratos não purificados, como os utilizados neste trabalho, são uma mistura de compostos, as interações entre as diferentes moléculas existentes em um extrato ou ainda entre essas moléculas com o meio de reação podem afetar a atividade antioxidante. Interações específicas entre uma molécula e o emulsificador, por exemplo, podem promover ligações que bloqueiam a atividade dos grupos contribuintes para a atividade antioxidante (KOLEVA et al., 2002; FRANKEL E MEYER, 2000). Portanto, a complexa composição dos extratos pode provocar certas interações, tendo efeitos sinérgicos, aditivos, ou ainda antagonistas entre seus compostos (KOLEVA et. al., 2002).

6.1.2 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)

O método do DPPH é representante dos métodos que empregam radicais na avaliação de inibidores de radicais livres, tais métodos têm ganhado popularidade na última década devido a sua rapidez e sensibilidade (KOLEVA et al., 2002).

O método é baseado na redução do radical livre DPPH em solução alcoólica por um composto doador de hidrogênio (antioxidante) formando um produto não radical DPPH-H. O radical DPPH remanescente é medido depois de certo tempo e é inversamente proporcional a capacidade de captação de radicais livres do antioxidante testado.

Neste método os padrões BHT e BHA apresentaram cerca 80% de inibição do radical livre DPPH, e α -tocoferol 40%. As espécies de clorófitas (FIGURA 12) apresentaram de 10 a 30% de inibição do DPPH, sendo que os extratos hexânicos e etanólicos apresentaram atividade superior ao extrato aquoso. Não foi observado efeito dose-dependente onde, o aumento da concentração do extrato potencializa a atividade antioxidante.

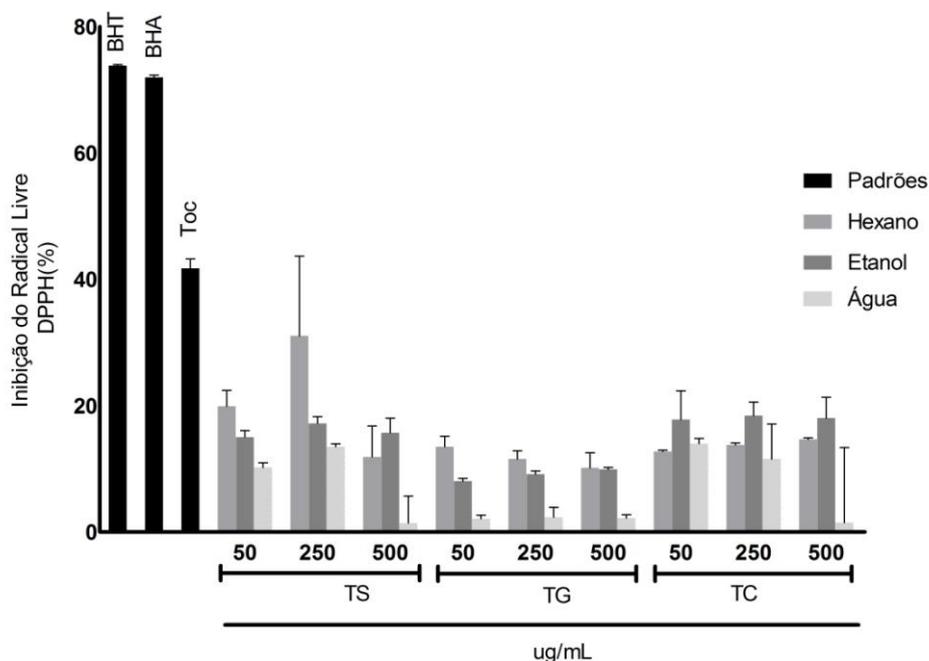


FIGURA 12 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH DAS CLORÓFITAS

As espécies da divisão das ocrófitas e haptófitas (FIGURAS 13 - a,b) apresentaram menores atividades antioxidantes quando comparadas com as

clorófitas. Nenhuma das espécies testadas apresentou atividade superior a 20%. Entretanto foi observado que nestas espécies, exceto *P. lutheri* (PL), a atividade antioxidante de todos os extratos foi muito próxima, e em alguns casos como da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (TFL) a atividade do extrato aquoso foi superior as demais.

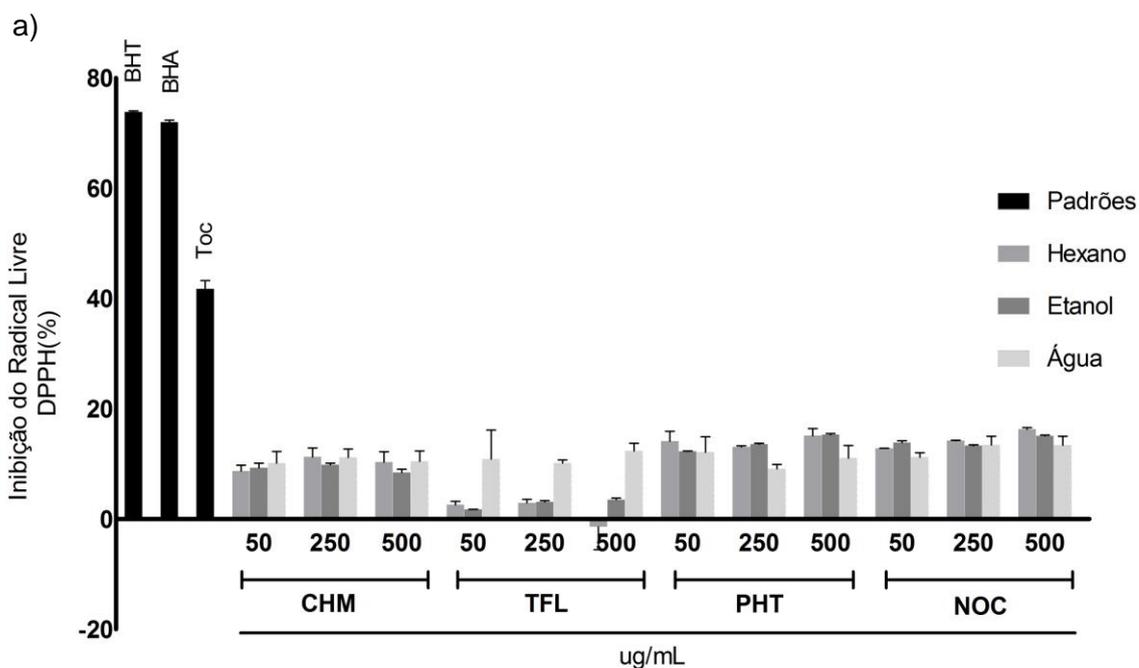
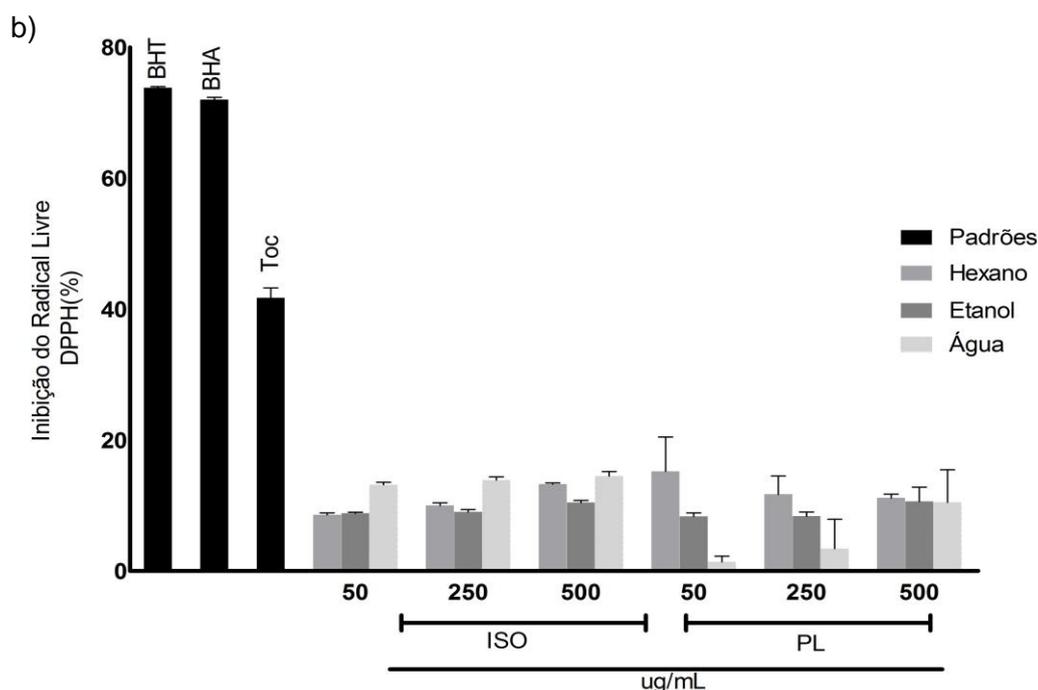


FIGURA 13 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH DAS OCROPHYTAS (a) E DAS HAPTOPHYTAS (b)

Este resultado indica que nestas espécies os compostos com maior potencial antioxidante possam ter ficado solúveis mesmo em um solvente mais polar como a água, embora BAZYKINA et. al. (2002) tenham encontrado nos extratos testados por eles concentrações maiores de compostos antioxidantes, como flavonóides e compostos fenólicos em extratos etanólicos e de acetato de etila. Visto isso, é possível que o metabolismo das espécies desta divisão seja diferenciado produzindo diferentes metabólitos solúveis em água com capacidade antioxidante.



Fazendo uma breve comparação entre os métodos testados observa-se que, as espécies *T. chuii* e *P. lutheri* que haviam demonstrado os melhores resultados pelo método do β -caroteno-ácido linoléico não evidenciaram o mesmo potencial pelo método do DPPH. Levando em consideração que os dois métodos avaliam diferentes mecanismos de reação antioxidante é possível sugerir que possivelmente os compostos extraídos destas duas espécies exerçam suas funções antioxidantes mais pela inibição da peroxidação lipídica do que pela doação de elétrons/hidrogênios para radicais livres.

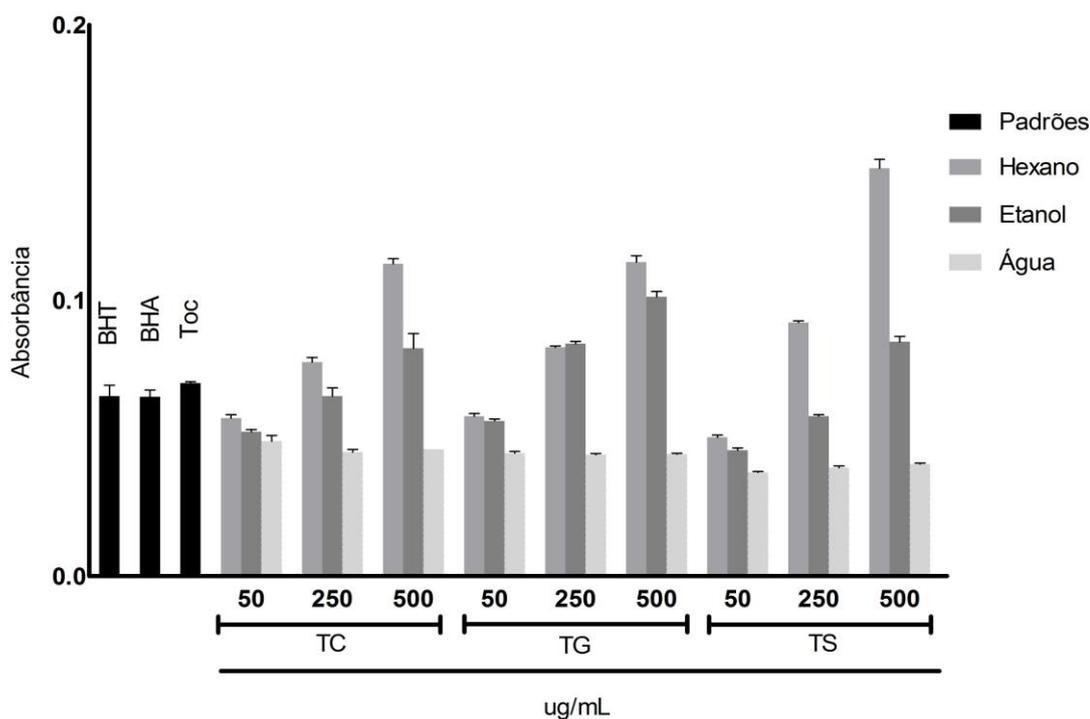
6.1.3 Poder Redutor

O método do poder redutor avalia a atividade antioxidante de um dado extrato pelo potencial redox dos compostos, ou seja, pela capacidade doadora e/ou receptora de elétrons. Sua avaliação é feita diretamente pela absorbância depois da reação, sendo que maiores valores de absorbância indicam maior poder redutor. Este é um processo indicativo do potencial antioxidante uma vez que a maioria das reações antioxidantes não enzimáticas ocorrem por reações de transferência de elétrons (ZUBIA, et. al., 2009). Especificamente este método mede a capacidade do

extrato de reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}) tornando-o menos reativo. O íon férrico é uma espécie química bastante reativa que age como um agente oxidante, podendo gerar radicais livres.

De modo geral, observa-se que neste método todas as espécies (FIGURA 14) superaram o poder redutor dos padrões testados, sendo em alguns casos 2 ou 3 vezes maior que os valores de absorvância observados para os padrões. Os extratos que apresentaram melhores resultados, foram em ordem decrescente, os hexânicos, etanólicos e aquosos. Além disso, os resultados expressam que o poder redutor dos extratos hexânicos e etanólicos é dose-dependente, ou seja, o poder redutor aumenta, com o aumento da concentração do extrato. Enquanto que para os extratos aquosos os valores de absorvância foram muito próximos, variando pouco em função da concentração do extrato.

a)



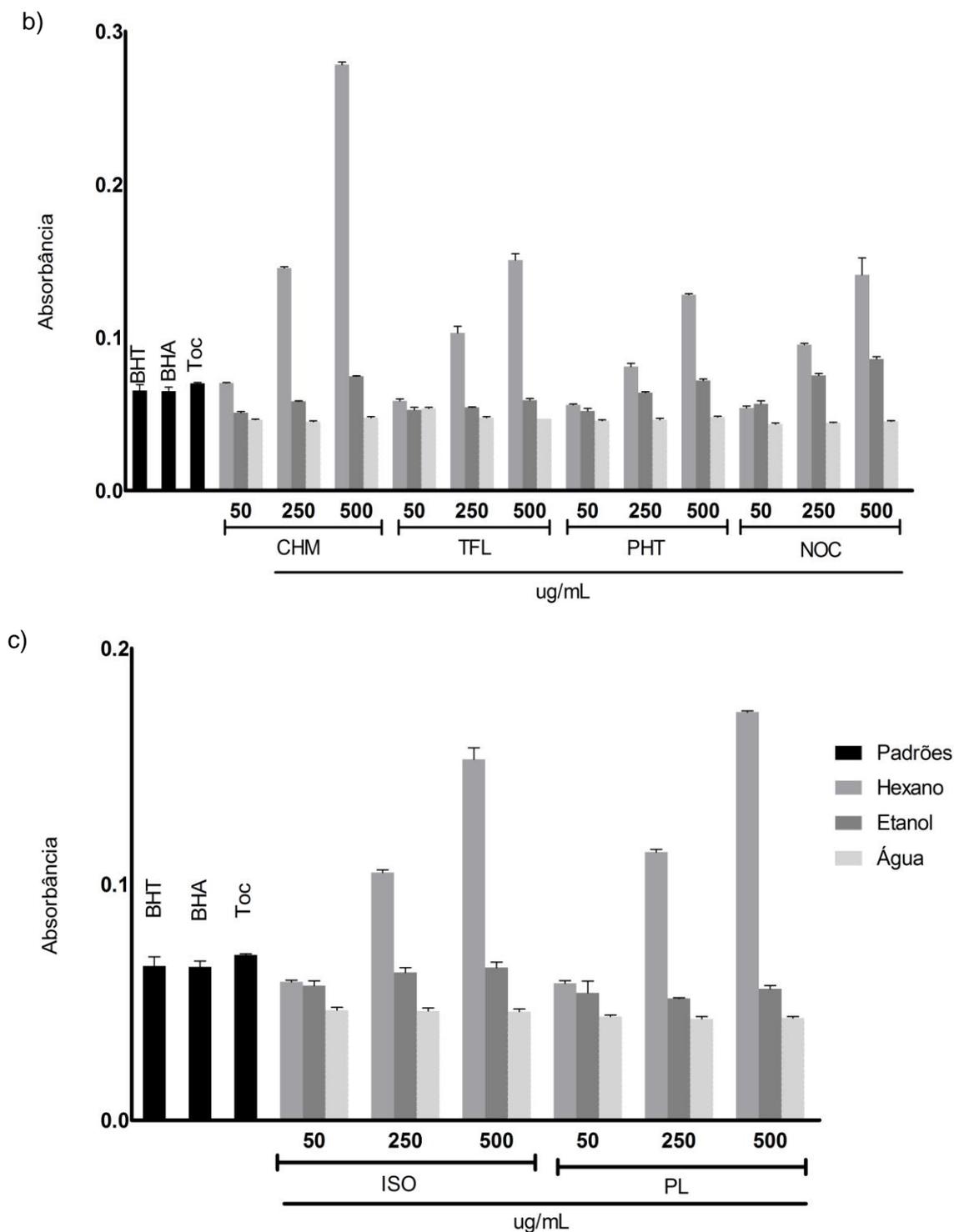


FIGURA 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO PODER REDUTOR DAS CLOROFITAS (a) OCROFITAS (b) HAPTOFITAS (c)

Os resultados obtidos neste método devem ser avaliados com precaução, uma vez que contrariam os baixos valores de atividade antioxidante, em relação aos padrões, obtidos pelos testes do β -caroteno-ácido-linoléico e DPPH em todas as

espécies testadas. Os valores de absorvância observados para as amostras podem mascarar os valores reais devido ao fato de que muitos extratos hexânicos e etanólicos, dependendo da espécie, apresentam uma cor amarelada ou esverdeada pela presença de pigmentos fotossintéticos das microalgas, como carotenóides e clorofila, e alguns compostos fenólicos que têm estruturas que são facilmente extraídas com solventes com o hexano e etanol. Levando em consideração que a solução de ferricianeto de potássio, utilizada no teste, também apresenta coloração amarelada, o valor da absorvância pode ter sido superestimado devido à absorção de luz pela cor da amostra, e não pelo produto da reação no comprimento de onda utilizado no teste. Os valores dose-dependentes poderiam ser explicados pelo fato de que o aumento da concentração do extrato aumenta a intensidade da cor, devido ao aumento na concentração destes pigmentos. Além disso, esta hipótese pode ser confirmada visto que extratos aquosos que não apresentaram cor tiveram menor potencial redutor que os extratos coloridos sem efeito dose-dependente.

Além disso, seria esperado que os resultados de poder redutor corroborassem os dados obtidos pelo método do DPPH, visto que ambos avaliam a mesma propriedade doadora e/ou receptora de elétrons. Entretanto como visto anteriormente (FIGURA 12 e 13) a avaliação do potencial antioxidante pelo método do DPPH não foi promissora, sendo, portanto, mais uma evidência da ineficácia do método do poder redutor para amostras coradas (principalmente amareladas).

Embora as microalgas apresentem um amplo potencial de gerarem compostos antioxidantes e já existam espécies utilizadas na produção de suplementos antioxidantes, as espécies pesquisadas neste trabalho não apresentaram potencial para serem utilizadas industrialmente na produção de antioxidantes. Isso não significa que estas espécies não sejam fontes destes compostos, pois diversas variáveis podem ter interferido nos resultados obtidos, desde o cultivo das células, processo de extração, e os métodos utilizados para avaliação. Uma vez que estas moléculas com capacidade antioxidante são produzidas pelas microalgas em razão da intensa exposição à radiação UV como uma forma de auto proteção, o cultivo com iluminação artificial pode interferir no metabolismo das microalgas ao nível da produção destes compostos. O processo de extração, nas variáveis tempo e temperatura, também é crucial. Desta forma, é possível que a metodologia de extração utilizada neste trabalho não tenha sido a mais adequada para a extração destas moléculas. Por isso a utilização do sistema

automatizado, *Accelerated solvent extraction*, seja mais adequado, pois a temperatura e pressão utilizadas, em menos tempo, favorecem a solubilidade destas moléculas no solvente extrator utilizado, sem degradá-las. Finalmente, outra possibilidade é que os métodos testados não evidenciem o mecanismo de reação utilizado pelos compostos extraídos destas microalgas, não demonstrando, portanto seu real potencial antioxidante.

6.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE MICROALGAS MARINHAS

6.2.1 *Pavlova lutheri*

6.2.1.1 Extração dos polissacarídeos

A extração aquosa a quente da biomassa de *P. lutheri* rendeu a fração PAQ que representou apenas 3% da biomassa inicial. Visto o baixo rendimento da extração aquosa o sobrenadante etanólico também foi pesquisado, a fim de verificar se polissacarídeos de menor massa molecular poderiam ter permanecido solúveis sobrenadante. Após concentração, diálise e liofilização o sobrenadante etanólico originou a fração PAQ-SE com um rendimento de 5,1%. O resíduo da extração aquosa foi submetida a extração alcalina, originando a fração PAL com 9,5% de rendimento.

6.2.1.2 Caracterização estrutural

Os resultados das dosagens químicas das três frações obtidas de *P. lutheri* (TABELA 4) demonstraram um baixo valor de carboidratos, próximo a 40 %, e um elevado teor de proteínas, cerca de 12 %, embora trate-se de frações polissacarídicas. Entretanto a dosagem de carboidratos pode ter sido subestimada, visto que estes polissacarídeos apresentaram uma baixa solubilidade em água possivelmente devido ao elevado teor de proteínas.

TABELA 4 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *P. lutheri*

Fração	Carboidratos(%) ^a	Proteína(%) ^b	Sulfato(%) ^c	Ác. Urônico(%) ^d
PAQ	39,7	13,9	3,8	4,9
PAQ-SE	35,3	11,4	2,8	Tr ^e
PAL	45,7	11,7	nd	2,7

^{a, b, c, d} = Determinado pelos métodos: DUBOIS et al. (1956); LOWRY et al. (1951); DOGSON e PRICE (1962); FILIZETI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e:Tr: Traço (menor que 1 %); nd: não detectado.

A composição monossacarídica das frações demonstrou que o polissacarídeo extraído em meio aquoso (PAQ) e a parte que ficou solúvel no sobrenadante etanólico (PAQ-SE) desta extração poderiam ser classificados como glucanas, visto que são compostos por aproximadamente 80% de glucose (TABELA 5). Na fração PAL foi observada uma heterogeneidade maior de monossacarídeos, sendo composta por 40,1% de glucose além de xilose (24,7%), galactose (14,7%) e manose (13,2%) como constituintes principais. Esta heterogeneidade aliada ao elevado teor de proteínas pode indicar a presença de glicoproteínas e/ou heteropolissacarídeos na fração alcalina, podendo esta condição ter extraído além do polissacarídeo de reserva um heteropolímero da parede celular.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *P. lutheri*

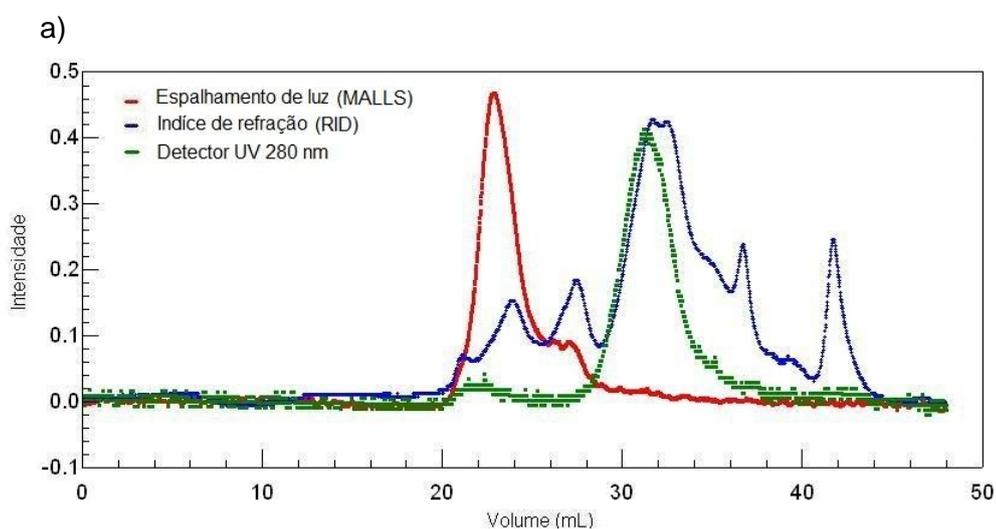
Monossacarídeos ^a	Ribose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose
PAQ	4,4	2,4	2,9	2,8	10,2	77,4
PAQ-SE	Tr ^b	Tr ^b	Tr ^b	7,0	11,6	79,8
PAL	Tr ^b	7,3	24,7	13,2	14,7	40,1

^a Monossacarídeos quantificados em moles% na forma de acetato de alditóis, por GC-MS. ^b Traço (menor que 1 mol%).

As frações também foram analisadas quanto ao seu perfil de homogeneidade (FIGURA 15 e 16). A fração PAQ apresentou um perfil cromatográfico indicativo de elevada heterogeneidade (FIGURA 15-a). Os picos centrados em 24 e 28 mL (detector de índice de refração - RID) também foram detectados pelo detector de espalhamento de luz (MALLS) indicando que estes são constituídos por moléculas de alta massa molar. O pico centrado em 33 mL (RID) também mostrou absorção em UV (280 nm), indicando a eluição das proteínas

detectadas analiticamente (13,9% - TABELA 3). Estas proteínas podem estar livres e/ou ligadas aos carboidratos na forma de glicoproteínas e/ou proteoglicanos. Os picos centrados em 33 e 37 mL não foram detectados pelo MALLS indicando a presença de moléculas com relativamente baixa massa molar. O pico centrado em 42 mL (volume total do sistema cromatográfico) indica a presença de traços de sal na amostra.

O cromatograma da fração PAQ-SE (FIGURA 15-b) apresenta um grande quantidade de ruídos no detector por espalhamento de luz em relação aos demais, isto está relacionado com a baixa massa molecular do polímero presente em solução, visto que são moléculas solúveis no sobrenadante etanólico. Os ruídos representam um aumento na sensibilidade do detector a fim de possibilitar a detecção de moléculas de menor massa. Nesta fração, também heterogênea, observa-se a presença de um pico principal, centrado em 36 mL (RID) que não foi detectado pelo MALLS, indicando a presença de moléculas de baixa massa molar, como era esperado considerando que esta fração permaneceu solúvel no sobrenadante etanólico (EtOH 75%). O pico centrado em 42 mL corresponde a sais presentes na amostra.



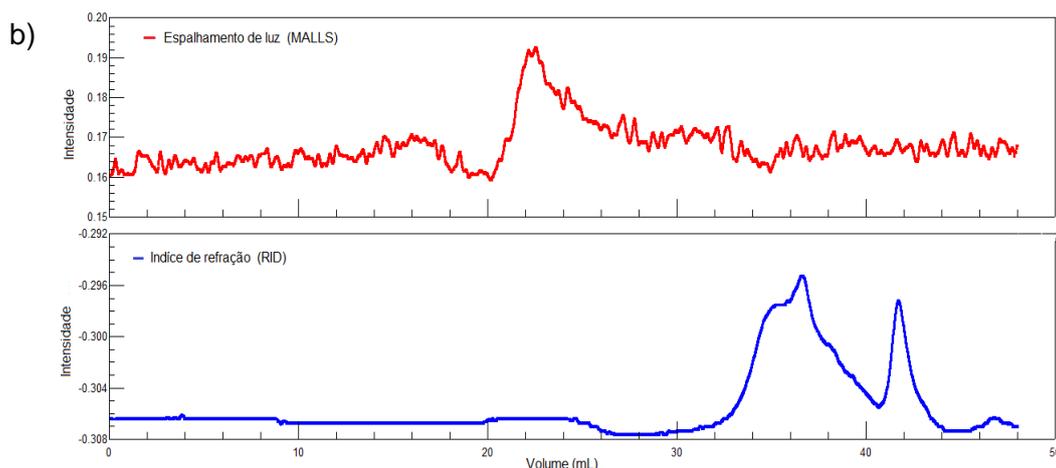


FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO PAQ (a) e PAQ-SE (b)

A amostra PAL (FIGURA 16) apresentou perfil heterogêneo com moléculas de elevada massa molar, detectadas pelo RID e MALLS (pico centrado em 28 mL e ombro centrado entre 22 e 26 mL) um grupo de moléculas de menor massa molar, detectadas apenas pelo RID (pico eluído entre 30 e 36 mL).

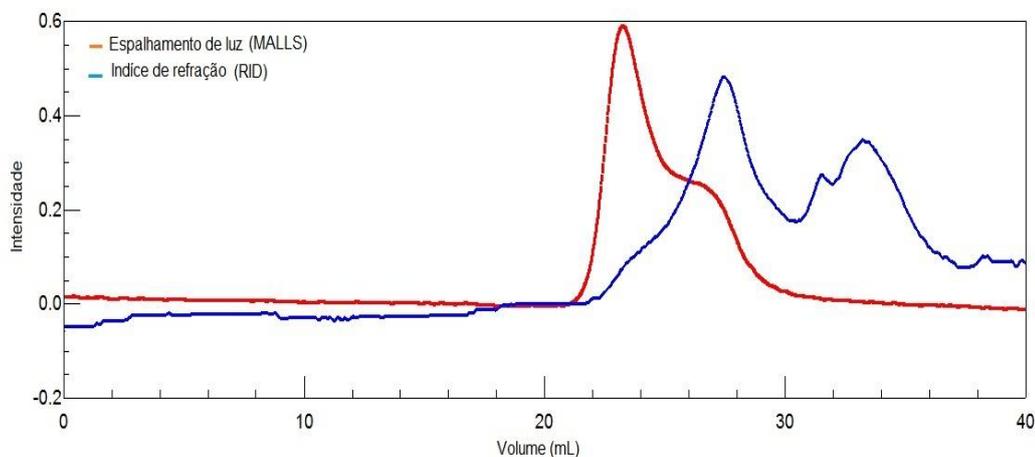


FIGURA 16 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO PAL

Portanto as frações PAQ e PAL mostraram perfis heterogêneos, contendo moléculas de elevada e baixa massa molar enquanto a fração PAQ-SE foi aquela que apresentou a menor distribuição em termos de tamanho molecular com uma população de moléculas relativamente homogêneas de baixa massa molar.

Devido ao alto percentual de proteínas nas frações, que pode também ser um fator coadjuvante da baixa solubilidade destas amostras, as mesmas foram

submetidas ao tratamento com KCl, com intuito de provocar a precipitação das proteínas. Entretanto o rendimento das frações solúveis e insolúveis em KCl foi maior para as frações insolúveis. Além disso, as análises por HPSEC-MALLS pós tratamento com KCl mostraram que este não foi efetivo (nem para remoção de proteínas, nem para homogeneização das amostras) pois o perfil de homogeneidade observado foi muito semelhante aos obtidos nas frações originais, o mesmo foi observado nas análises por RMN.

A fração PAL foi submetida ainda a ultrafiltração em membrana de celulose com limite de exclusão de 3 kDa, a fim de separar os dois grupos de moléculas distintas observadas pelas análises de HPSEC-MALLS. A fração eluída (PAL-E) apresentou 16,6% de rendimento enquanto que a maior parte ficou retida na membrana (PAL-R, 60% de rendimento). Não foi possível analisar a fração PAL-E devido ao baixo rendimento e a fração PAL-R após liofilização foi insolúvel em água, NaOH e DMSO, o que impediu a análise por HPSEC-MALLS e RMN.

Desta forma ainda será necessário testar outras técnicas para conseguir purificar os extratos aquoso (PAQ) e alcalino (PAL) de *P. lutheri*.

6.2.1.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

A análise de ressonância magnética nuclear indicou nas frações PAQ, PAQ-SE e PAL a presença de α – glucanas (1 \rightarrow 3)-ligadas. Entretanto todas as frações apresentaram algumas particularidades. A fração PAQ (FIGURA 17), por exemplo, apresentou sinais referentes a β -glucanas- (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) ligadas. Observa-se no espectro desta amostra dois sinais na região anomérica correspondentes ao C-1 de unidades de β -D-glucose (em 102,8 e 102,5 ppm), indicando a presença de 2 carbonos anoméricos em diferentes ambientes químicos. Um sinal na região de ligação em C3 84,5 ppm e diversos sinais na região do anel entre 67 e 80 ppm, além do sinal característico do C6 livre de hexoses em 60,9 ppm (TABELA 6). Estes assinalamentos estão de acordo com os propostos por VARUM et al. (1986) e RIZZI (2010), na identificação de uma β -D-glucana extraída da microalga *Emiliana huxleyi* e *I. galbana*, respectivamente, e que, assim como a *P. lutheri*, pertencem a divisão Haptophyta. Também se assemelham aos sinais estabelecidos na identificação de β -D-glucanas fúngicas (CARBONERO et al., 2006; AMARAL et al., 2008; CHENGHUA et al., 2000).

Entretanto, considerando que a fração PAQ é heterogênea não é possível descartar a presença de dois polissacarídeos diferentes, uma β -glucana (1 \rightarrow 3) e outra β -glucana (1 \rightarrow 6). VARUM et al. (1986) e RIZZI (2010), identificaram nas microalgas desta divisão a presença de β -D-glucanas – (1 \rightarrow 6) ligadas ramificadas em C3, embora RIZZI (2010) tenha descrito as ramificações como um resíduo único de β -D-Glcp, ou ainda dissacarídeos de β -D-Glcp (1 \rightarrow 3)-ligados e VARUM et al. (1986) tenham descrito ramificações de di ou trissacarídeos de β -D-Glcp (1 \rightarrow 6) ligados.

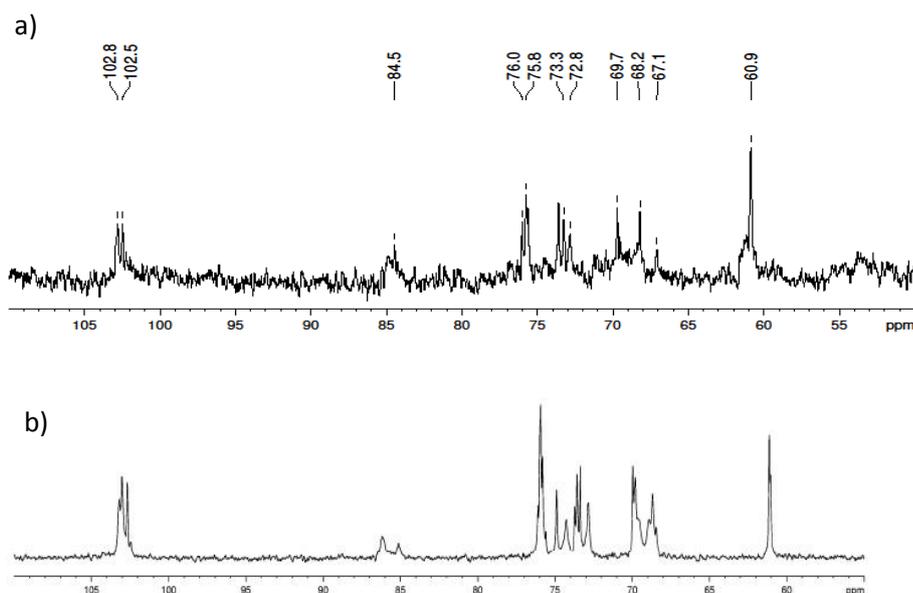


FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO PAQ (a) FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DA MICROALGA HAPTOPHYTA *I. galbana* (b)¹. SOLVENTE D₂O. TEMPERATURA 50°C.
¹: FONTE: RIZZI (2010)

A FIGURA 17-b apresenta a similaridade desta fração solúvel em água extraída de *P. lutheri* e o polissacarídeo solúvel em água isolado da microalga *I. galbana* descrito por RIZZI (2010) como uma β -glucana (1 \rightarrow 6)-ligada. Observam-se os mesmos padrões de sinais na região anomérica, e na região do anel, além de sinais de menor intensidade na região de C-3 ligado e o sinal de C-6 livre próximo a

61,0 ppm. Como discutido anteriormente a observação destes dados, reforça que devido à heterogeneidade desta amostra não é possível descartar a presença de dois polímeros distintos.

No espectro da fração PAQ-SE (FIGURA 18) observam-se sinais bem mais definidos e intensos em relação ao espectro discutido anteriormente. Entretanto os sinais principais também estão presentes no espectro da PAQ e são os mesmos da β -D-glucana (1 \rightarrow 3)-ligada, apresentando apenas um sinal de carbono anomérico em 102,5 ppm, o sinal de C3 ligado em 84,7 ppm, os sinais referentes aos carbonos do anel entre 68,3 e 75,8 ppm, em 61,0 ppm observa-se o sinal referente ao C6 livre da glucose e observam-se ainda dois sinais, em 66,1 e 67,4 ppm, referentes a carbonos da glucose substituídos na posição 6, confirmados pelo experimento de DEPT 135.

Estes assinalamentos são coincidentes com os obtidos para uma β -D-glucana obtida do fungo *Ganoderma lucidum* descrita por BAO et al. (2001) como β -D-glucana - (1 \rightarrow 3) ligada, substituída em C6 por cadeias laterais de glucose ligadas em (1 \rightarrow 6), onde o C6 livre está em 62,9 ppm, o C6 substituído em 70,9 ppm e o C6 ligado em 68,1 ppm. Por este motivo, sinais de menor intensidade visualizados no espectro de PAQ-SE podem possivelmente ser atribuídos aos sinais das cadeias laterais de β -D-glucose (1 \rightarrow 6) ligadas.

Considerando a similaridade dos sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C da fração PAQ e PAQ-SE é possível que ambas as frações sejam constituídas da mesma molécula com os mesmos padrões de ligações glicosídicas e substituições embora, no sobrenadante etanólico tenham ficado solúveis as moléculas de menor massa molecular e/ou com cadeias laterais menores (visto os sinais de menor intensidade referentes às ligações 1 \rightarrow 6) e devido a isso tenham um caráter mais solúvel, o que preponderou para a qualidade do espectro em PAQ-SE.

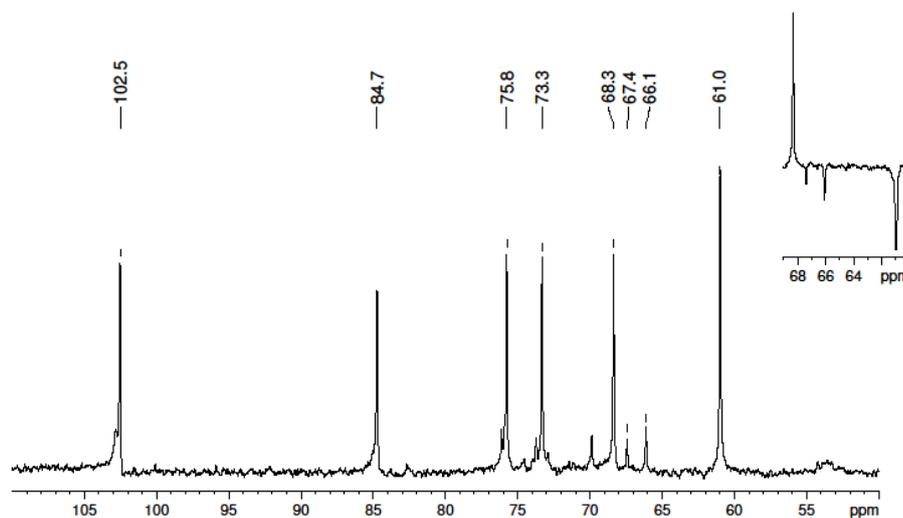


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C E INSERTO COM DEPT 135 (70-55 ppm) DA FRAÇÃO PAQ-SE. SOLVENTE D_2O . TEMPERATURA 50°C .

Foi realizada uma comparação entre os deslocamentos observados na fração PAQ (extrato aquoso) e PAQ-SE (solúvel no sobrenadante etanólico) (TABELA 6), visto que a principal diferença entre estes espectros é a diminuição de um grupo de sinais atribuídos as unidades de β -glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas, desta observação pode-se concluir que possivelmente a molécula solúvel em EtOH 75% é menos ramificada que a da fração PAQ. Outra evidência de que a fração PAQ-SE é menos ramificada é sua similaridade com o espectro de um β -glucana (1 \rightarrow 3)-ligada linear isolada por RIZZI (2010) de uma microalga do grupo das diatomáceas (FIGURA 19).

TABELA 6 – ASSINALAMENTOS DE ^{13}C DA FRAÇÃO PAQ EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO PAQ-SE

	PAQ		PAQ-SE	
	β -(1 \rightarrow 3)	β -(1 \rightarrow 6)	β -(1 \rightarrow 3)	β -(1 \rightarrow 6)
C1	102,5	102,8	102,5	102,8
C2	73,3	72,8	73,3	72,9
C3		76,0		76,1
C3'	84,5		84,5	
C4	68,2	69,5	68,3	69,9

C5	75,8	75,6	75,8	76,1
C6	60,9	69,7	60,9	66,1
C6'	67,1		67,4	

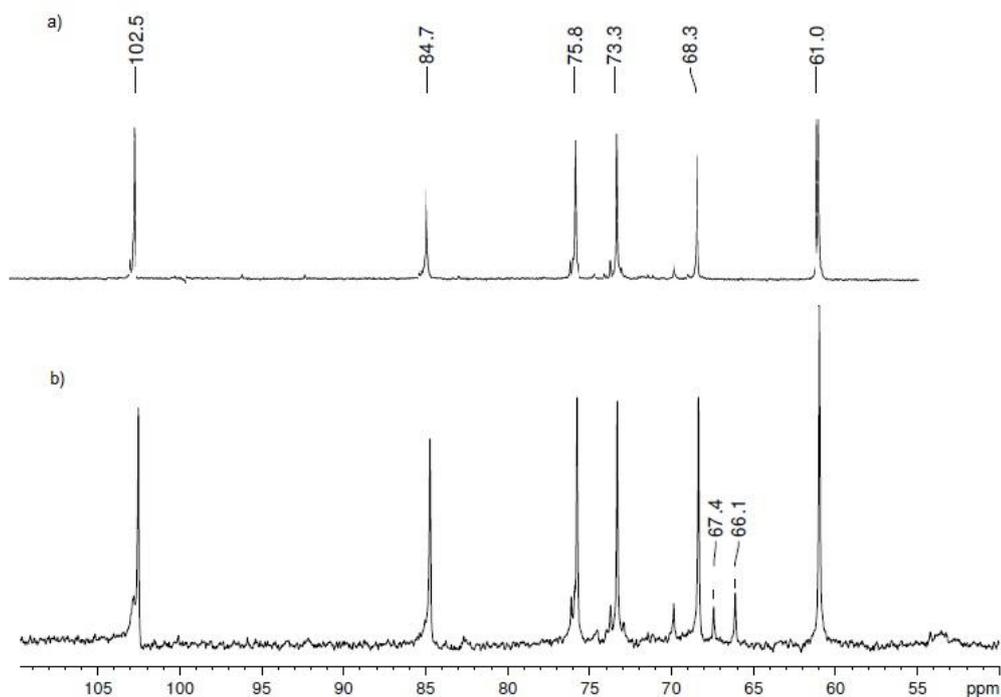


FIGURA 19 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DE UMA β -GLUCANA ISOLADA DE *Thalassiosira fluviatilis* POR RIZZI (2010) (a) E DA FRAÇÃO PAQ-SE DE *P. lutheri* (b)

A fração extraída em álcali, PAL, apresentou também os sinais referentes a uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligada, entretanto a principal diferença foi a presença de sinais referentes à uma β -D-xilana-(1 \rightarrow 4) ligada condizentes com a composição monossacarídica desta fração que apresentou além de 40 % de glucose aproximadamente 25 % de xilose (TABELA 5). O espectro de RMN (FIGURA 20) apresentou 5 novos sinais proeminentes e típicos de β -D-xilana-(1 \rightarrow 4)-ligada: na região anomérica em 101,6 ppm, na região do anel em 76,4 ppm referente ao C4 ligado de β -D-xilanas, em 73, 8 ppm o sinal referente ao C3 e em 72, 8 ppm o sinal do C-2, além disso, observa-se o sinal do C-5 de pentose em 63,0 ppm, deslocado para campo mais alto, devido a substituição glicosídica em C-4. Estes assinalamentos condizem com os de outras β -D-xilanas (1 \rightarrow 4)-ligadas como a caracterizada por SIMAS et al., (2004) na goma do exsudato de uma espécie da família das palmeiras (TABELA 7).

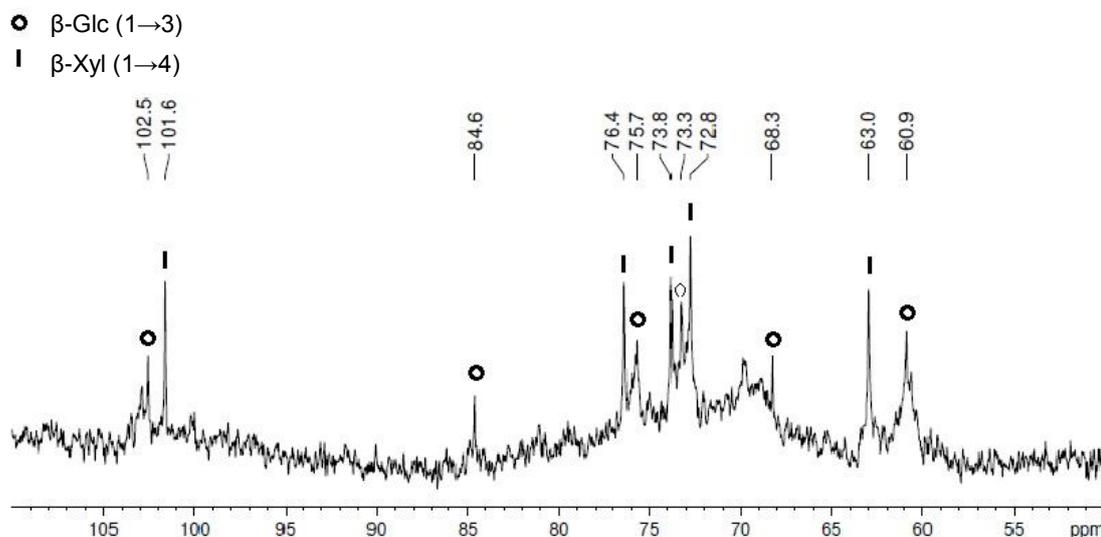


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PAL. SOLVENTE D_2O . TEMPERATURA 50°C .

TABELA 7 – ASSINALAMENTOS DE ^{13}C DA FRAÇÃO PAL EM COMPARAÇÃO COM UMA XILANA EXTRAÍDA DO EXSUDATO DE UMA PALMEIRA DA ESPÉCIE *Scheelea Phalerata*

Espécie	C1	C2	C3	C4	C5
<i>P. lutheri</i>	101,6	72,8	73,8	76,4	63,0
<i>S.Phalerata</i> *	101,7	72,8	73,8	76,5	63,1

*FONTE: SIMAS et al. (2004)

Entretanto, a análise por HPSEC-MALLS da fração PAL (FIGURA 16) detectou a presença de uma mistura de moléculas, visto que apresentaram um perfil heterogêneo. Portanto, os resultados das análises de RMN e composição monossacarídica, indicam que esta amostra é composta por dois polímeros distintos, uma β -D-xilana (1→4)-ligada (FIGURA 21), provável constituinte da parede celular e uma β -D-glucana (1→3)(1→6)-ligada (FIGURA 22), semelhante aquela obtida na extração aquosa.

A presença de unidades de xilose (1→4) ligadas é relatada em macroalgas vermelhas onde a D-xilose está presente em homoxilanas lineares ou heteropolissacarídeos, como xilomananas, da parede celular (VIANA, 2005). Sendo que as xilanas são solúveis em água quando contém ligações glicosídicas mistas

(1→3) e (1→4). Polímeros que contenham apenas uma dessas duas ligações são solúveis apenas em soluções básicas (MATULEWICZ e CERZO, 1987). Entretanto não foram encontrados relatos na literatura do isolamento de xilanas produzidas por uma microalga.

Tanto xilanas quanto xiloglucanas, genericamente denominadas hemiceluloses, são moléculas abundantes na parede celular de plantas monocotiledôneas. As xilanas de diferentes fontes podem diferir muito em sua complexidade estrutural, mas, em geral, são constituídas de cadeias lineares de β-D-xilose (1→4)-ligada, substituídas por arabinose e/ou ácido glucurônico. Dependendo do grau de ramificação estas moléculas também podem ser chamadas de heteroxilanas (KABEL et al., 2007).

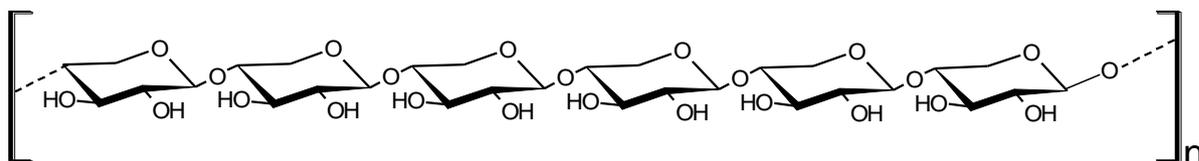


FIGURA 21 – MODELO DE ESTRUTURA PROPOSTO PARA O POLÍMERO EXTRAÍDO DA BIOMASSA DE *P. lutheri* NA CONDIÇÃO ALCALINA – XILANA (1→4)-LIGADA

6.2.1.4 Análise de metilação de PAQ-SE

Dentre as três frações obtidas a partir da microalga *P. lutheri* apenas a fração PAQ-SE foi submetida à análise de metilação, visto que foi a que apresentou perfil mais homogêneo nas análises de HPSEC-MALLS, e ainda um espectro de RMN com elevada relação sinal/ruído. O resultado da análise de metilação para a fração PAQ-SE (TABELA 8) mostrou que este polissacarídeo apresenta as unidades de glucose principalmente (1→3)-ligada (25 %), pontos de ramificação em C-6 (derivado 2,4 Me₂ Glc, 25 %) e cadeias laterais curtas (1→6)-ligada ou constituídas apenas por uma unidade terminal de glucose. A elevada percentagem de terminais não redutores de glucose (33,3 %) pode ser justificada pelo elevado grau de ramificação e baixa massa molar do polissacarídeo.

TABELA 8 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA PAQ-SE

Derivado metilado	PAQ-SE ^a	Rt ^b	Ligação
2,3,4,6-Me₄-Glc	33,3	1	Glc _p -1(→
2,4,6-Me₃-Glc	25,0	1,280	→3)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me₃-Glc	8,3	1,351	→6)-Glc _p -(1→
2,4-Me₂-Glc	25,0	2,008	→3,6)-Glc _p -(1→

^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditol parcialmente metilados, analisados em CG-EM; ^b Tempo de retenção em relação ao tetra-metil Glc_p.

Os resultados analíticos de composição monossacarídica, RMN e análise de metilação indicam que *P. lutheri* produz β-glucana (1→3)(1→6)-ligadas (FIGURA 22), semelhantes as β-glucanas produzidas por alguns fungos. A comparação com outros estudos de microalgas da mesma divisão, Haptophyta, indica que *P. lutheri* (classe Pavlovophyceae) produz um polissacarídeo de reserva diferente dos polissacarídeos produzidos tanto por *I. galbana* quanto por *E. huxleyi*, que são todas espécies da mesma divisão, porém da classe Primnesiophyceae. Isso demonstra que os polissacarídeos de reserva de espécies pertencentes a mesma divisão podem ser diversos em seus padrões de ligações glicosídicas, não havendo ainda um padrão estabelecido para esta divisão - Haptophyta. Será necessário estudar mais espécies da classe Pavlovophyceae para poder determinar se o padrão do polissacarídeo isolado de *P. lutheri* é representativo desta classe de microalgas. Visto essa diversidade a investigação de diferentes β-glucanas pode ser útil em testes biológicos que apresentem novas moléculas bioativas, e ainda a presença de polímeros distintos como a β-xilana (1→4)-ligada pode sugerir novos estudos quimiotaxinômicos.

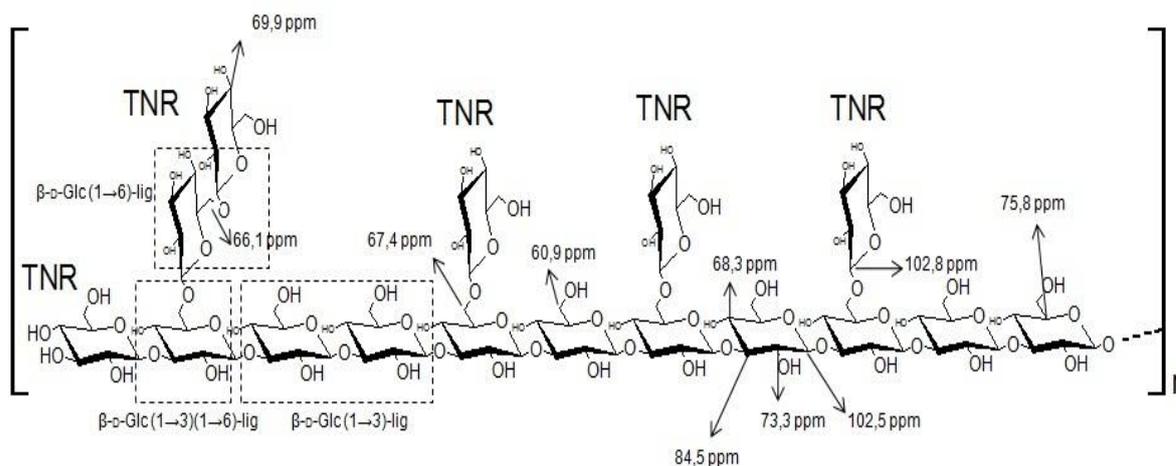


FIGURA 22 – MODELO DE ESTRUTURA PROPOSTO PARA O POLÍMERO SOLÚVEL NO SOBRENADANTE ETANÓLICO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DA BIOMASSA DE *P. lutheri* - β -GLUCANA (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-LIGADA

6.2.2 *Porphyridium cruentum*

6.2.2.1 Extração dos polissacarídeos

Para a extração dos polissacarídeos de *P. cruentum*, foi realizada uma extração seqüencial. Primeiramente foi realizada uma extração aquosa a temperatura ambiente onde se obteve a fração PCAD que representou 19,1% da biomassa inicial, aquosa a quente (fração PCAH que rendeu 34,6%), e alcalina com temperatura (fração PCAL que rendeu 18,2%). Embora o rendimento da fração PCAD não tenha sido o maior das frações brutas ele representa uma boa parte da biomassa seca, levando-se em consideração o aspecto do polissacarídeo em solução que se apresenta altamente viscoso, este se torna um material interessante para estudos reológicos.

6.2.2.2 Caracterização química

De acordo com o resultado das dosagens analíticas (TABELA 9) observa-se que todas as frações apresentam um alto teor de carboidratos e baixo percentual de proteína, quanto ao teor de grupos sulfato observou-se que a única fração que apresenta polissacarídeo sulfatado é PCAD (extraída com água a temperatura

ambiente) visto que os polissacarídeos extraídos com água quente (PCAH) e álcali (PCAL) apresentaram baixo percentual dos mesmos. Ácidos urônicos foram detectados apenas nas frações brutas PCAH e PCAD em baixa concentração, diferindo do que era esperado visto que os polissacarídeos desta espécie são geralmente descritos como aniônicos devido à sua estrutura carregada negativamente pelo seu alto percentual de sulfato e ácidos urônicos.

TABELA 9 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *P. cruentum*

<i>Fração</i>	<i>Carboidratos(%)^a</i>	<i>Proteína(%)^b</i>	<i>Sulfato(%)^c</i>	<i>Ác. Urônico(%)^d</i>
PCAH	85,6	2,8	8,0	3,4
PCAL	49,9	2,4	2,5	Tr ^e
PCAD	61,0	7,0	14,0	4

^{a, b, c, d} = Determinado pelos métodos: DUBOIS et. al. (1956); LOWRY et. al. (1951); DOGSON e PRICE (1962); FILIZETI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e:Tr: Traço (menor que 1%).

Quanto a composição monossacarídica da fração PCAD os principais açúcares encontrados foram glucose, galactose, xilose, manose e uma hexose naturalmente metilada a 3- ou 4-Me-Gal (TABELA 10). As frações PCAH e PCAL apresentaram majoritariamente glucose em sua composição, mais de 80%, esse resultado e as análises de RMN (FIGURA 25 e 26) indicam que estas frações são compostas pelo amido das florídeas, polissacarídeo de reserva das Rhodophytas, e muito similar a amilopectina dos vegetais superiores.

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *P. cruentum*

<i>Monossacarídeos^a</i>	<i>PCAH</i>	<i>PCAL</i>	<i>PCAD</i>
3 ou 4 Me-Gal	-	-	4,3
Xilose	9,8	1,1	30,9
Manose	-	4,8	Tr ^b
Galactose	9,3	3,4	38,7
Glucose	80,9	90,7	24,9

^a Monossacarídeos quantificados em moles% na forma de acetato de alditóis, por GC-MS. ^b Traço (menor que 1 mol%). – não detectado

6.2.2.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise de RMN das frações PCAH e PCAL (FIGURA 23) apresentou-se muito similar entre si e semelhantes ao espectro de RMN da amilose, tipo de polissacarídeo de reserva vegetal. Os deslocamentos assinalados para a amilose são descritos para os amidos isolados de vegetais (DAIS e PERLIN, 1982) e para polissacarídeos de algas vermelhas solúveis em água (KNUTSEN e GRASDALEN, 1987; VIANA, 2005), assim como para polissacarídeos de microalgas verdes, solúveis em água e em álcali (RIZZI, 2010). A comparação entre os sinais observados para a amilose isolada de diferentes fontes está apresentada na TABELA 11.

No espectro (FIGURA 23) podem ser observados sinais de maior intensidade referentes a unidades de α -glucana (1 \rightarrow 4) ligadas e sinais de menor intensidade que e correspondem aos terminais não redutores da molécula de amilopectina (FIGURA 24). O sinal em 69,5 ppm, por exemplo, representa o C4 das unidades terminais não redutoras. Esse dado pode ser confirmado pelo experimento de DEPT 135 realizado na fração PCAL (FIGURA 23-b), onde o único sinal invertido referente ao CH₂ presente na posição 6 da glucose, está em 60,6 ppm, região de C6 livre. Enquanto os sinais de menor intensidade como 69,5 e 70,3 ppm, que poderiam ser confundidos com C6 substituídos devido à sua localização, permanecem na mesma fase. Essas análises juntamente com os dados de composição monossacarídica confirmam que as extrações, aquosa a quente e alcalina extraíram o composto de reserva da microalga – uma glucana α -(1 \rightarrow 4) ligada, conhecida como amido das florídeas.

TABELA 11 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS FRAÇÕES PCAH E PCAL DE *P. cruentum* EM COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS

Fração	C1	C2	C3	C4	C5	C6
PCAH	99,5	71,6	73,2	77,3	71,2	60,6
PCAL	99,7	71,6	73,4	77,3	71,3	60,6
A ¹	99,8	71,8	73,5	77,2	71,4	60,7
B ²	100,0	71,9	73,8	77,3	71,6	60,9
B ³	99,7	71,8	73,4	77,8	71,6	60,9
C ⁴	99,9	71,9	73,1	78,7	71,5	60,5

¹: RIZZI (2010); ²: VIANA (2005) ³: KNUTSEN e GRASDALEN (1987); ⁴: DAIS e PERLIN (1982)

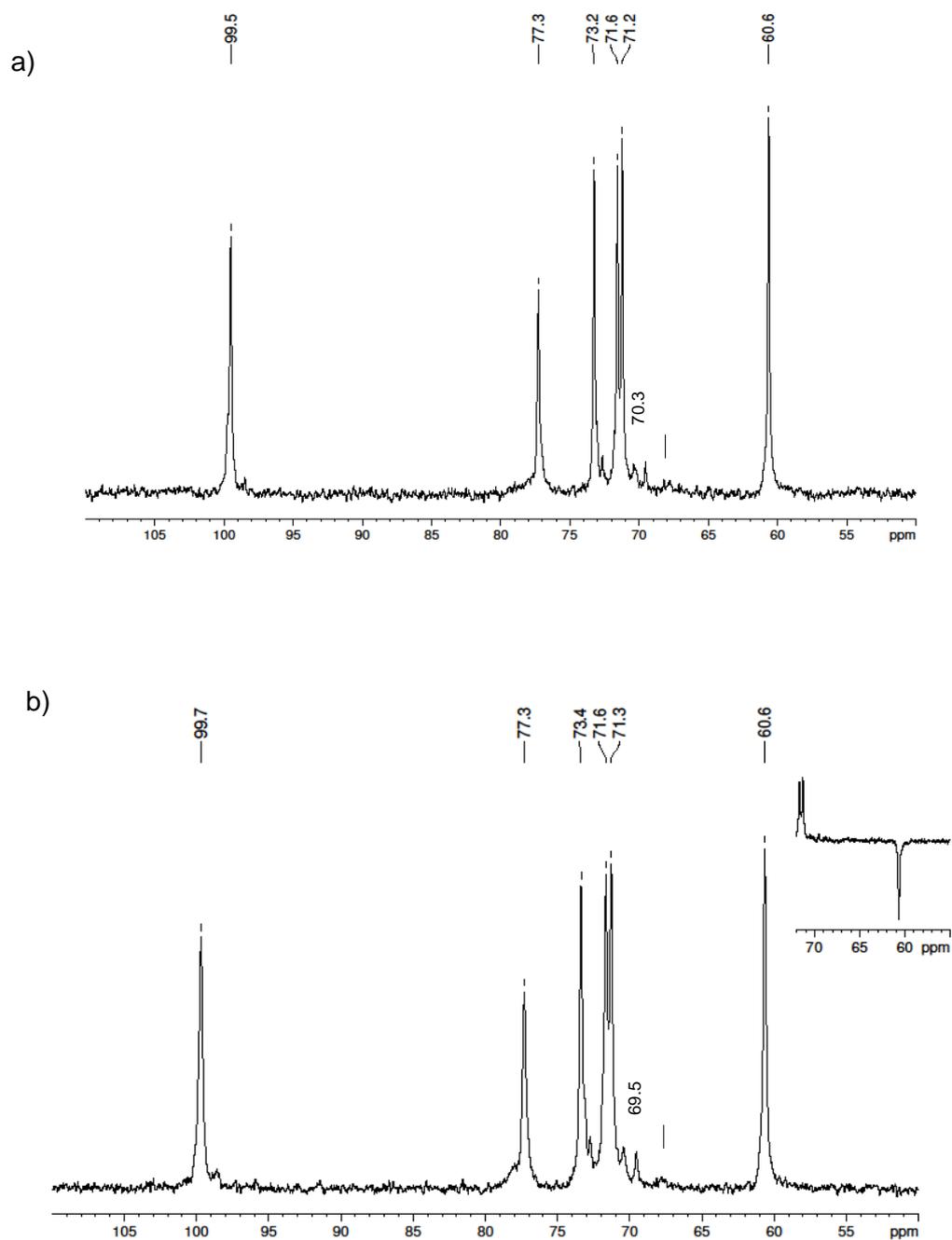


FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PCAH (a) E DA FRAÇÃO PCAL JUNTAMENTE COM INSERTO DE DEPT 135 (70-55 ppm) (b)
NOTA: SOLVENTE D_2O . TEMPERATURA 70°C .

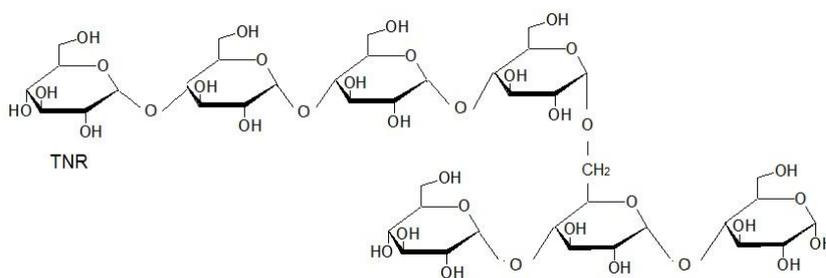


FIGURA 24 – AMILOPECTINA. FONTE: DAIS e PERLIN (1982)

6.2.3 Fracionamento da fração PCAD

A fração PCAD foi tratada com KCl para uma purificação prévia rendendo a fração PCAD-FS (solúvel em KCl – 70,5 %) e PCAD-FI (insolúvel em KCl – 10 %), sendo que esta última não foi analisada devido ao seu baixo rendimento e quantidade de material. A fração PCAD-FS foi fracionada em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel (FIGURA 25), rendendo as frações FS-w (eluída com água – 25,3%), FS-1 (eluída com NaOH 0,5M – 25,8%), FS-2 (eluída com NaOH 1M – 22%) e FS-3 (eluída com NaOH 1,5M – 0,3 %), sendo que esta última não foi analisada devido ao baixo rendimento e quantidade de material.

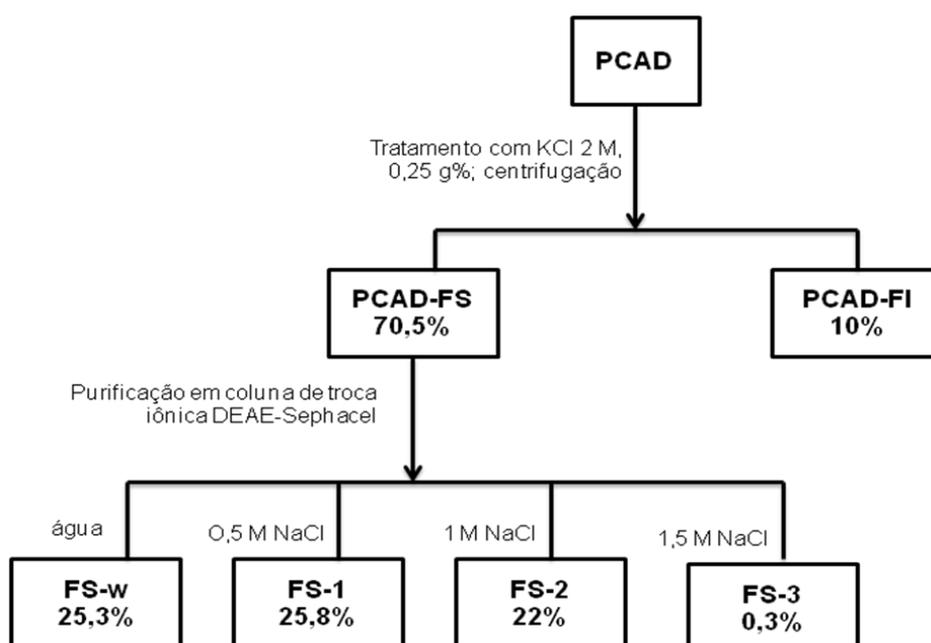


FIGURA 25 – FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DE *P. cruentum*
FONTE: O autor

6.2.3.1 Análise química das frações obtidas a partir de PCAD

As frações obtidas pelo fracionamento em coluna de troca iônica apresentam, assim como as frações brutas alto teor de carboidratos totais e baixo teor de proteínas. A dosagem de ácidos urônicos revelou que o tratamento com KCl 2 M possivelmente promoveu a precipitação das poucas moléculas que pudessem conter ácidos urônicos em sua composição visto que o percentual de 4 % observado na fração bruta (PCAD) passou a ser menor que 1 % (Tr^e) na fração solúvel em KCl 2 M, PCAD-FS, por este motivo não foi realizada esta dosagem nas demais frações (TABELA 12). Além disso, pode-se observar um aumento gradativo no teor de sulfato de acordo com o aumento da molaridade do eluente, isso ocorre porque quanto maior a força iônica da fase móvel maior a capacidade de separação da mistura de polissacarídeos carregados, sendo que os polímeros mais carregados serão eluídos com o eluente de maior força iônica (COLLINS et al., 2006). Desta forma o polissacarídeo é fracionado pela carga mesmo que apresente massas muito próximas. Esses dados estão de acordo com a vasta literatura sobre o exopolissacarídeo de *P. cruentum*, principalmente no teor de sulfato, indicando que o polímero isolado da biomassa pode apresentar semelhanças com o polímero solúvel, excretado por essa espécie de microalga, descrito por GERESH et al. (2009), LUPESCU et al. (1991), PERCIVAL e FOYLE (1979).

TABELA 12 - ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE PCAD

Fração	Carboidratos(%) ^a	Proteína(%) ^b	Sulfato(%) ^c	Ác. Urônico(%) ^d
PCAD	61,0	7,0	14,0	4
PCAD-FS	73,3	5,8	13,7	Tr ^e
FS-w	67,4	3,1	14,7	nd
FS-1	50,1	3,4	18,5	nd
FS-2	33,3	2,3	20,8	nd

^a, ^b, ^c, ^d = Determinado pelos métodos: DUBOIS et. al. (1956); LOWRY et. al. (1951); DOGSON e PRICE (1962); FILIZETI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e:Tr: Traço (menor que 1%); nd: não determinado.

As frações brutas PCAD e PCAD-FS apresentam composição muito semelhante (TABELA 13) sendo compostas principalmente de Gal:Xyl:Glc na

proporção de 1:0,8:0,6 e Gal:Xyl:Glc 1:1:0,6, respectivamente. Entre as frações obtidas pelo fracionamento os principais açúcares continuaram sendo os mesmos encontrados nas frações brutas, entretanto as proporções variaram. Na fração FS-w foram encontrados principalmente galactose, xilose e glucose (1:0,8:0,9) enquanto que nas frações FS-1 e FS-2 a proporção entre galactose, xilose e glucose manteve-se semelhante à da fração original Gal:Xyl:Glc (0,9:0,6:1) e Gal:Xyl:Glc (1:1:0,8). Observa-se que embora, o açúcar majoritário alterne-se entre xilose, galactose e glucose nas frações eluídas pela coluna de troca iônica a proporção entre eles mantém-se próximo a 1:1:1. A composição de monossacarídeos observada nas amostras obtidas a partir da extração aquosa a frio apresenta mais um indicativo de que o polímero extraído neste trabalho tem semelhanças estruturais com o exopolissacarídeo de *P. cruentum* já caracterizado.

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE PCAD

<i>Monossacarídeos</i> ^a	<i>PCAD</i>	<i>PCAD-FS</i>	<i>FS-w</i>	<i>FS-1</i>	<i>FS-2</i>
3 ou 4 Me-Gal	4,3	3,2	2,7	3,9	5
Xilose	30,9	37,7	28,6	24,8	33,4
Manose	Tr ^b	Tr ^b	1,2	1,5	Tr ^b
Galactose	38,7	36,7	34,8	32,2	33,5
Glucose	24,9	22	32,8	37,5	27

^a Monossacarídeos quantificados em moles% na forma de acetato de alditóis, por GC-MS. ^b Traço (menor que 1%)

6.2.3.2 Análise por HPSEC-MALLS-RID das frações obtidas a partir de PCAD

A fração PCAD-FS e suas derivadas foram analisadas também quanto ao seu perfil de eluição em HPSEC-MALLS para avaliação do grau de homogeneidade. A fração PCAD-FS apresentou um único pico detectado pelo espalhamento de luz (em vermelho), entretanto este pico apresentou-se bastante polidisperso o que indica a heterogeneidade da amostra que pode apresentar moléculas de massa molecular muito próxima detectadas também pelo índice de refração (em azul) (FIGURA 26).

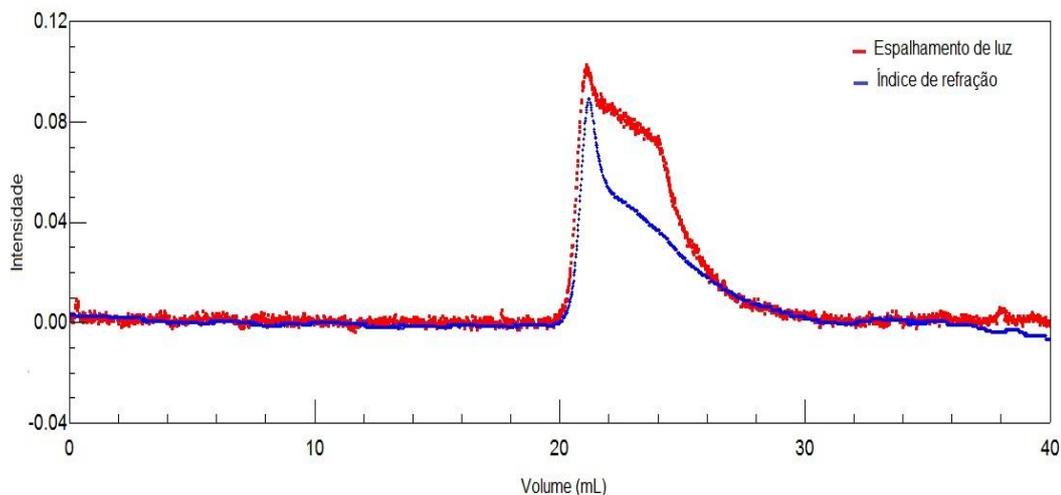
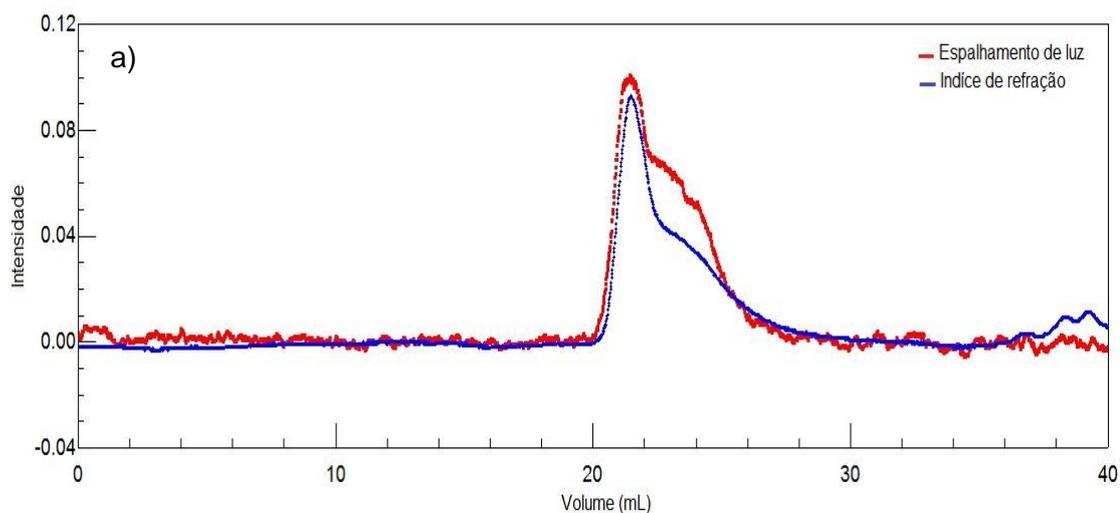


FIGURA 26 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO PCAD-FS

O perfil de eluição obtido nas amostras eluídas na coluna de troca iônica apresenta picos coincidentes detectados pelo espalhamento de luz e pelo detector de índice de refração na mesma região dos picos observados na amostra mãe PCAD-FS. Entretanto na fração FS-w observa-se um pico ainda um pouco polidisperso, enquanto que nas amostras FS-1 e FS-2, com perfil de eluição muito semelhantes entre si observam-se dois picos distintos (FIGURA 27).



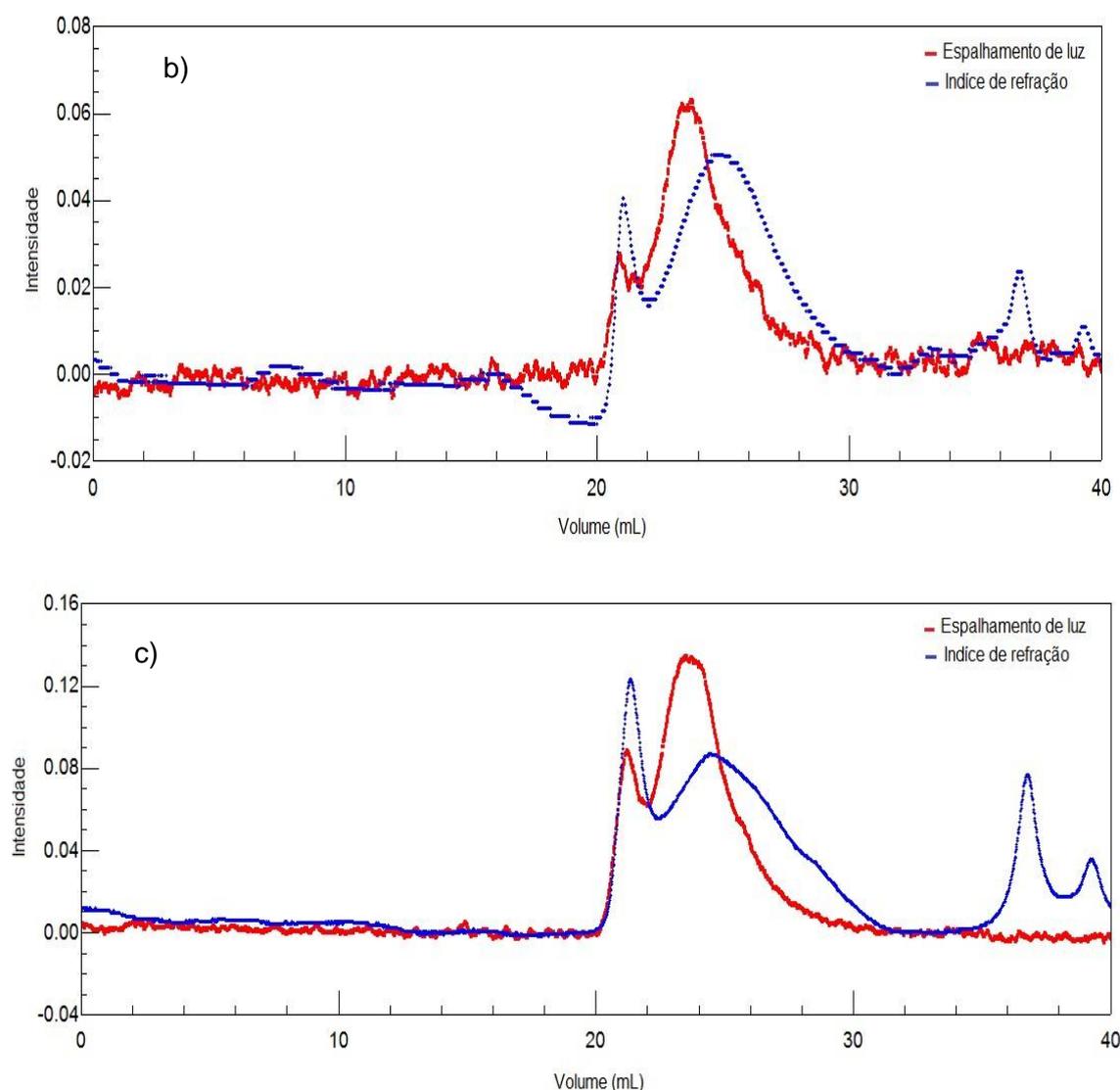


FIGURA 27 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES FS-w (a), FS-1 (b) e FS-2 (c)

Com esses dados é possível concluir que a purificação em coluna de troca iônica ainda não foi totalmente suficiente para obtenção de polissacarídeos homogêneos quanto a massa molecular, sendo necessário o refractionamento destas frações FS-w, FS-1 e FS-2 em coluna de troca iônica ou ainda em coluna de exclusão molecular para separação dos polissacarídeos e obtenção de amostras homogêneas.

6.2.3.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As frações PCAD-FS, FS-w, FS-1 e FS-2 também foram analisadas por espectroscopia de RMN (FIGURAS 28 e 29), entretanto seus espectros são bem mais complexos devido à complexidade da própria molécula, alta viscosidade e presença de grupos sulfato, os espectros apresentam picos mais alargados e sobrepostos, o que dificulta a análise e o assinalamento dos deslocamentos químicos. Além disso, a presença de diferentes monossacarídeos e diversos tipos de ligações glicosídicas entre eles gera inúmeros sinais diferentes.

Ainda assim, é possível fazer algumas observações em relação aos espectros: na fração PCAD-FS observa-se na região anomérica 2 ou mais sinais referentes à carbonos anoméricos em diferentes ambientes químicos, no campo mais alto (103,1 e 102,4 ppm), típicos de anomeridade β . Observa-se em 61,1 ppm um sinal bastante intenso do C6 livre de hexoses como a galactose e glucose. Em 59.7 ppm o sinal referente à hexoses metiladas como 3 ou 4 Me–Gal, de acordo com GLOAGUEN, et. al. (2004). Em 67,9 ppm um sinal típico de galactose sulfatada em C6, exibido no espectro de RMN de galactanas sulfatadas extraídas de outras rodofíceas. Um sinal em 82,1 ppm na região de ligação em C3, o que não exclui a possibilidade de ligações em C4. Na região do anel entre 65 e 80 ppm, referentes a carbonos do anel monossacarídico, observa-se uma grande quantidade de sinais sobrepostos, os quais estão mostrados na figura mas não foram atribuídos a nenhuma unidade específica devido a heterogeneidade de monossacarídeos.

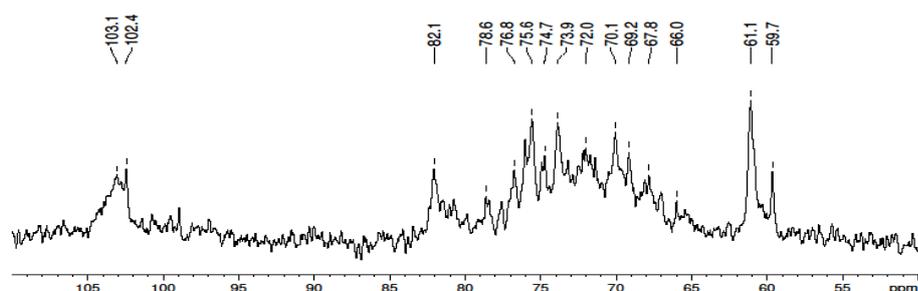


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PCAD-FS. SOLVENTE D_2O . TEMPERATURA 70°C

As frações FS-w, FS-1 e FS-2 apresentaram espectro com um padrão de sinais muito semelhante ao da fração PCAD-FS. Com apenas um sinal alongado e complexo na região anomérica com deslocamento químico característico de anomericidade β . Sinais de substituição glicosídica em C-3, C-6 livre e carbono de açúcar metilado, além dos complexos sinais na região do anel (FIGURA 28).

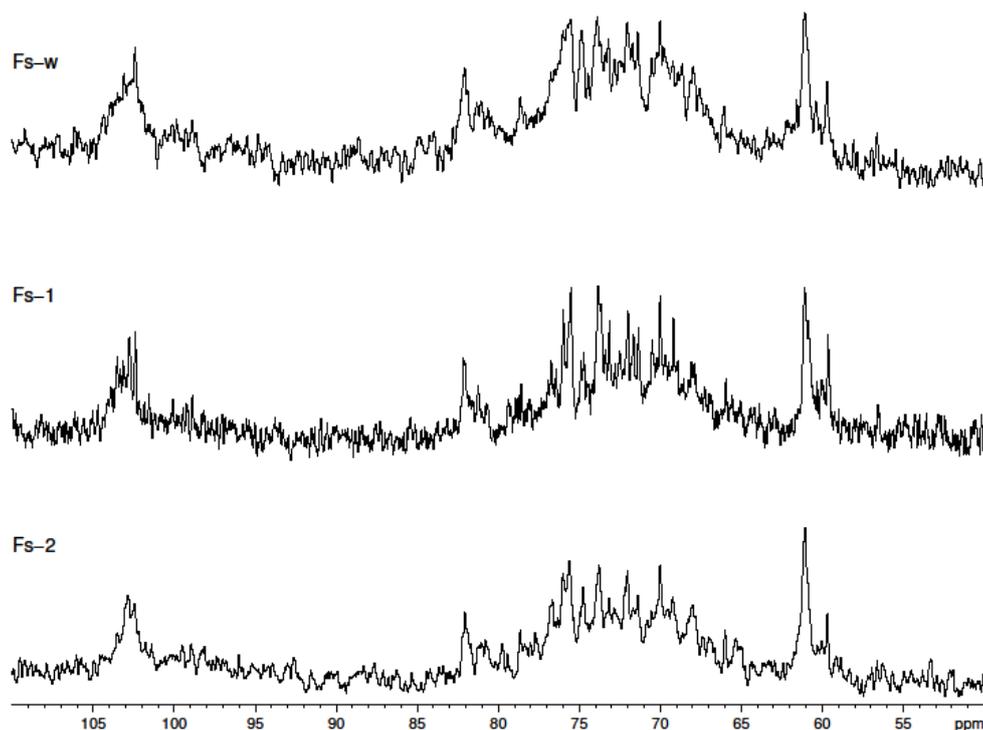


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES FS-w, FS-1 E FS-2. SOLVENTE D_2O . TEMPERATURA 70°C

Embora com apenas estas análises não seja possível determinar a estrutura química desta molécula, já é possível esboçar algumas características gerais deste polímero. Devido à complexidade deste material faz-se necessário a utilização de outras metodologias que inicialmente reduzam a sua complexidade, como dessulfatação, despolimerização por hidrólise enzimática ou ácida parcial, degradação parcial de Smith, entre outras. Todas essas metodologias seriam úteis para obtenção de fragmentos menores da molécula que possam ser analisados em partes, para posterior construção da estrutura química do polímero completo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de microalgas marinhas indicou que nenhuma das espécies estudadas apresentou potencial antioxidante visto que no método do β -caroteno-ácido linoléico, os valores observados para todas as espécies foram muito inferiores aos padrões comerciais já consolidados como antioxidantes. O mesmo ocorreu no método do DPPH, onde os padrões apresentaram cerca de 80% atividade antioxidante, enquanto que os extratos em geral apresentaram no máximo 25% de atividade antioxidante. Embora, pelo método do poder redutor os extratos tenham apresentado resultados superiores aos padrões, estes possivelmente foram superestimados devido interferentes analíticos, como pigmentos presente nas amostras.

Da microalga marinha *Pavlova lutheri*, (Haptophyta) foram isoladas β -glucanas (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligadas com diferentes graus de ramificação. Este foi, até onde se sabe, o primeiro relato da caracterização da estrutura química de uma espécie da classe Pavlovophyceae, e esta apresentou uma estrutura diferente das já descritas para outras espécies da divisão Haptophyta. Também foi extraída uma β -xilana-(1 \rightarrow 4) ligada possivelmente constituinte da parede celular, uma estrutura não comum à microalgas, não tendo sido encontrados outros relatos para este tipo de microorganismo até então.

Da microalga vermelha *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta) produz como polissacarídeo de reserva uma α -glucana (1 \rightarrow 4)-ligada com pontos de ramificação em C-6, semelhante àquela produzida pelas macroalgas vermelhas e denominada amido das florídeas. Além desta glucana foi isolado um heteropolissacarídeo sulfatado constituinte da parede celular composto de galactose (38,7 mol %), xilose (30,9 mol %) e glucose (24,9 mol %), além de sulfato (14%). Este polissacarídeo apresenta características semelhantes ao exopolissacarídeos (EPS) comumente produzido por esta espécie e já bem caracterizado quimicamente. A principal semelhança observada é a elevada viscosidade característica do EPS.

REFERENCIAS

AMARAL, A.E.; CARBONERO, E.R.; SIMAO, R.C.G.; KADOWAKI, M.K.; SASSAKI, G.L.; OSAKU, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 72, p. 473-478, 2008.

ARAD, S. e LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, p. 1-7, 2010.

ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**. Ed. Pergamon Press, Oxford. 228p, 1970.

BAO, X. K., LIU, C., FANG, J., LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Carbohydrate Research. v. 332, p. 67-74, 2001.

BAZYKINA, N. I., NIKOLAEVSKII, A. N., FILIPPENKO, T. A., KALOEROVA, V. G. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 36, n. 2, p. 46–49, 2002.

BECKER, A.G. **Utilização de organismos-alimento na larvicultura do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacia, Brachyura, Ocypodidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28, p. 3-14, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v. 28, p. 25–30, 1995.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K. e DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151 p.315-331, 1997.

BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of experimental marine biology and ecology**. v. 145, n1, p. 79-99, 1991.

CARBONERO, E.R.; SMIDERLER, F.R.; GRACHER, A.H.P.; MELLINGER, C.G.; TORRI, G.; AHTI, T.; GORIN, P.A.J.; IACOMONI, M. Structure of two glucans and a galactofuranomannan from the lichen *Umbilicaria mammulata*. **Carbohydrate Polymers**. v. 63, p. 13-18, 2006.

CARDOZO, K.H.M; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 146. p. 60 – 78, 2007.

CEREZO, S. A. The Carrageenan System of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part 1. Studies on a Fraction of K-Carrageenan. **J. Chem. Soc.** p. 992-997, 1967.

CHAETOCEROS MULLERI. Disponível em:
<<http://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx%3FspeciesID%3D1674&usg>>.
Acesso em 25 de Julho de 2010.

CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**. v. 328, p. 629-633, 2000.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. **Biotechnology Advances**. v. 22. p. 565 - 567, 2004.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**. v. 131, p. 209-217, 1984.

COLLINS, H. C., BRAGA, L. G., BONATO, S. P. **Fundamentos de cromatografia**. Ed. da Unicamp. Campinas, SP. 103p. 2006.

DAIS, P.; PERLIN, A.S. High-Field, ^{13}C -N.M.R. Spectroscopy of β -d-glucans, amylopectin, and glycogen. **Carbohydrate Research**. v. 100, p. 103-116, 1982.

DERNER, R. B., S. OHSE, M. VILLELA, S. M. de CARVALHO e R. FETT. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural** n. 36, v. 6. p. 1959 -1967, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v.28, p. 350-356, 1956.

DVIR, I., STARK, H. A., CHAYOTH, R., MADAR, Z., ARAD, S. Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium* sp in Rats. **Nutrients**. v. 1, p. 156-167, 2009.

DVIR, I., CHAYOTH, R., SOD-MORIAH, U., SHANY, S., NYSKA, A., STARK, H. A., MADAR, Z., ARAD, S. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. **British Journal of Nutrition**. v. 84, p. 469-476, 2000.

DODGSON, K.S; PRICE, R.G.. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemistry Journal**, London, v. 78, p. 312-319, 1962.

ESTESHOLA, E., KARPASAS, M., ARAD, S., GOTTLIEB, M. Red microalga exopolysaccharides: 2. Study of the reology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. **Acta Polymers**. v.49, p. 549-556, 1998.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**. v. 56.p. 497 – 500, 2001.

FILIZETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurament or uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**. v. 197, p. 157-162, 1991.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; REZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenetica, taxonomica e ecologica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

FRANKEL, E. N. e MEYER, S. A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.80, p. 1925-1941, 2000.

FUENTES, R. M. M., FERNANDEZ, A. G. G., PEREZ, S. J. A., GUERRERO, G. J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**. v. 70, p. 345-353, 2000.

GARCIA, I. R.; GUERRERO, J. L. G. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgae species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chemistry**. v. 108. p. 1023 – 1026, 2008.

GARDEVA, E., TOSHKOVA, R., MINKOVA, K., GIGOVA, L. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* – a biological background. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** v. 23, p. 783-787, 2009.

GERESH, S., ARAD, S., LEVY-ONTMAN, O., ZHANG, W., TEKOAH, Y., GLASER, R. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. **Carbohydrate Research**. v. 344, p. 343-349, 2009.

GLOAGUEN, V.; RUIZ, G.; MORVAN, H.; MOURADI-GIVERNAUD, A.; MAES, E.; KRAUSZ, P.; STRECKER, G. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. **Carbohydrate Research**. v. 339. p. 97-103, 2004.

GRANUM, E. e MYKLESTAD, S.M. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. **Hydrobiologia**. v. 477, p. 155–161, 2002.

GREAT LAKES WATER LIFE PHOTO GALLERY ALGAE DIATOMS
THALASSIOSIRA SP. Disponível em:
<http://www.glerl.noaa.gov/seagrant/GLWL/Algae/Diatoms/Cards/Thalassiosira.html>.
Acesso em 25 de Julho de 2010.

GUILLARD, R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: Smith, W.L., Charley, M.H. (eds.). Culture of Marine Invertebrate Animals, p. 29-60. 1975.

HEANEY-KIERAS, J., e CHAPMAN, J. D. Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Research**. v. 52, p. 169-177, 1976.

HERRERO, M., MARTIN-ALVAREZ, P. J., F. SENORANS, F. J., B, CIFUENTES, A., IBANEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**. v. 93, p. 417–423, 2005.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food – by – products, algae and microalgae a review. **Food Chemistry**. v. 98. p. 136 – 148, 2006.

HULEIHEL, M., ISHANU, V., TAL, J., ARAD, S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. **Journal of Applied Phycology**. v. 13, p. 127-134, 2001.

HUHEIHEL, M., ISHANU, V., TAL, J., ARAD, S. Activity of *Porphyridium* sp. Polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **J. Biochem. Biophys. Methods**. v. 50, p. 189-200, 2002.

ISOCHRYISIS GALBANA. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isochrysis_galbana.jpg>. Acesso em 25 de julho de 2010.

JAIME, L., RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I., CIFUENTES, A., SANTOYO, S., SUAREZ, S., IBÁÑEZ, E., SEÑORANS, F.J. Pressurized Liquids as an Alternative Process to Antioxidant Carotenoids Extraction from *Haematococcus Pluvialis* Microalgae. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 105–112, 2010.

JANSON, P. –E.; KENNE, L.; LIEGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, Estocolmo, v. 8, p. 1-71, 1976.

KABEL, A., M., VAN DEN BORNE, H., VINCKEN, J. P., VORAGEN, G. J. A., SCHOLS, A. H. Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 94–105, 2007.

KNUTSEN, S.H.; GRASDALEN, H. Characterization of water-extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour,. (Gigartinales Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. **Botanica Marina**. v. 30, p. 497-505. 1987.

KOLEVA, I., VAN BEEK, T. A., LINSSEN, P. H. J., GROOT, A., LYUBA N. EVSTATIEVA, N. L. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 8–17, 2002.

KUDA, T.; TSUNEKAWA, M.; HISHI, T.; ARAKI, Y. Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). **Food Chemistry**. v. 89. p. 617 – 622, 2005.

LAU, M. J., MCNEIL, M., DARVILL, G., A., ALBERSHEIM, P. Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine. **Carbohydrate Research**. v. 168, p. 219-243, 1987.

LIU, C.P. e LIN, L.P. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. 207 **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 42, p. 207-214, 2001.

LORENCIO, F. G.; BARCUDO, H. C; FERNÁNDEZ, Z. G. A.; GRIMA, E. M.; SEVILLA, F. J. M.; SACRISTÁN, B. P.; NAVARRO, B. I. In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**. v. 114. p. 747 – 752, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima Editora. 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

LUPESCU, N., ARAD, S., GERESH, S. Structure of some sulfated sugar isolated after acid hydrolysis of extracellular polysaccharides of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. **Carbohydrate Research**. v. 210, p. 349-352, 1991.

MATSUI, M. S., MUIZUDDIN, N., ARAD, S., MARENUS, K., Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 104, p. 13-22, 2003.

MATULEWICZ, C. M. e CEREZO, S. A. Alkali soluble polysaccharide from *Chaetangium fastigiatum*: Structure of a xylan. **Phytochemistry**. v. 26, p. 1033–1035, 1987.

MEDCALF, G. D., SCOTT, R. J., BRANNON, H. J., HEMERICK, A. G., CUNNINGHAM, L. R., CHESSEN, H., J., SHAH, J. Some structural features and viscometric properties of the extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Research**. v. 44, p. 87-96, 1975.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 48. n. 2. p. 91, 1971.

MINKOVA, K., MICHAILOV., Y., TONCHEVA-PANOVA, T., HOUBAVENSKA, N. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. **Pharmazie**. v.51, p. 3-7, 1996.

NANNOCHLOROPSIS OCULATA. Disponível em:
<http://cdn2.auctions.overstock.com/aimages/d/0/4/85/40851537_1.jpg&imgrefurl>.
Acesso em: 25 de julho de 2010.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). **The Polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PERCIVAL, F. e FOYLE, R. A. J. The extracellular polysachharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. **Carbohydrate Research**. v. 72, p. 165-176, 1979.

PHAEDODACTILUM TRICORNUTUM. Disponível em:
<<http://energiesdelamer.blogspot.com/2009/01/alpha-biotech-rejoint-le-projet-franais.html&usg>>. Acesso em 25 de Julho de 2010.

PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in food Science & Technology**. v. 19. p. 31 – 39, 2008.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G. B.; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBANEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**. v.51. n.2. p. 450-455, 2010.

PORPHYRIDIDIUM SP. Disponível em: <<http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/Phoryridium.JPG&imgrefurl>>. Acesso em 18 de Novembro de 2010.

PULZ, O. e GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.65. n.6. p.635-648, 2004.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Tradução: Iara Maria Franceschini. 280 p. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIJSSEL, M.V.; JANSEB, I.; NOORDKAMPB, D.J.B.; GIESKESA, W.W.C. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. **Journal of Sea Research** v. 43, p. 297–306, 2000.

RIZZI, J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RULE, D. C.; LIEBMAN, M. LIANG, Y. B. Impact of different dietary fatty acids on plasma and liver lipids is influenced by dietary cholesterol in rats. **Nutritional Biochemistry**. v. 7. p. 142 – 149, 1996.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 731-739, 2005.

SIMAS, F. F., GORIN, A. J. P., GUERRINI, M., NAGGI, A., SASSAKI, L. G., DELGOBO, C. L., IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (urucuri). **Phytochemistry**. v. 65, p. 2347–2355, 2004.

SILVA, M.L.C da; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**. v. 29, n.1, 85-92, 2006.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**. v. 6. p. 20-24, 1972.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 101, n.2, p. 87-96, 2006

STEWART, J. S.; LIGNELL, A.; PETTERSON, A.; ELFVING, E.; SONI, M. G. Safety assessment of astaxanthin – rich microalgae biomass. Acute and subchronic toxicity studies in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46. p. 3030 – 3036, 2008.

STORSETH, T.R.; HANSEN, K.; REITAN, K.I.; SKJERMO, J. Structural characterization of β -d-(1→3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. **Carbohydrate Research**. v. 340, n. 6, p. 1159-1164, 2005.

SUÁREZ, E. R.; SYVTSKI, R.; KRALOVEC, J.A.; NOSEDA, M.D.; BARROW, C.J.; EWART, H. S.; LUMSDEN, M. D.; GRINDLEY, T.B. Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuronan. Measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY- NMR. **Biomacromolecules**. v. 7. p. 2368 - 2376, 2006.

TALYSHINSKY, M., SOUPRUN, Y., HULEIHEL, M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. **Cancer Cell International**. v. 2, 2002.

TANNIN-SPITZ, T.; BERGMANN, M.; VAN-MOPPES, D.; GROSSMAN, S.; ARAD, S. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalgae *Porphyridium* sp. **Journal of Applied Phycology**. v. 17. n. 3. p. 215 – 222, 2005.

TETRASELMIS. Disponível em: <<http://www.eol.org/pages/89647>>. Acesso em 25 de Julho de 2010.

VARUM, K.M.; KHAM, B.J.; MYKLESTAD, S. Structure of a food-reserve β -D-glucan produced by the haptophyte alga *Emiliana huxleyi* (LOHMANN) Hay and Mohler. **Carbohydrate Research**. v. 152, p. 243-248, 1986.

VIANA, G. A. **Estrutura química de polissacarídeos neutros e sulfatados isolados de algas vermelhas e cinética química da reação de ciclização em galactanas**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

YONEDA, N.T. **Plâncton**. Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná. Pontal do Paraná, PR. 29 p. 1999.

ZUBIA, M.; FABRE, M. S.; KERJEAN, V.; LANN, K. L.; POUVREAU, V. S.; FAUCHON, M.; DESLANDES, E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**. v. 116. p. 693 – 701, 2009.